 © 2007 Российская академия наук, Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского

УДК 538.364

Метод спиновых меток и зондов с использованием импульсной ЭПР-спектроскопии

С.А.Дзюба

Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3, факс (383)330–7350

Рассмотрен метод спиновых меток и зондов с использованием вариантов импульсного ЭПР, базирующихся на спектроскопии электронного спинового эха: метода модуляции спада сигнала спинового эха за счет электрон-ядерных взаимодействий, двойного электрон-электронного резонанса, эхо-детектируемого ЭПР и др. Показано, что с применением этих методов можно получать информацию о конформациях сложных биомолекул, наноструктуре вещества, глубине проникновения воды внутрь биологических мембран, супрамолекулярной структуре многокомпонентных систем (мембрана–пептид и др.), кооперативной ориентационной динамике молекул, динамических низкотемпературных переходах в неупорядоченных молекулярных средах и биосистемах. Библиография — 130 ссылок.

Оглавление

I.	Введение	752
II.	Основы спектроскопии ЭПР нитроксильных радикалов	752
III.	Методы импульсного ЭПР	755
IV.	Структурные исследования спин-меченых систем	759
V.	Исследование динамики спин-меченых систем	762
VI.	Заключение	765

I. Введение

Метод спиновых меток и зондов стали активно использовать в физико-химических и биофизических исследованиях, начиная с 1970-х годов.[1–3] Спиновыми зондами называют стабильные парамагнитные молекулы, которые вводят в исследуемую систему в качестве малой добавки. Обычно это нитроксильные радикалы.[4,5] Спиновые метки — нитроксильные радикалы, ковалентно пришитые к макромолекулам. Метод спиновых меток и зондов применяют для изучения локальной структуры и динамики молекул, диагностирования некоторых функциональных групп, измерения концентрации кислорода и протонов, определения полярности, для ускорения релаксации ядерных спинов в магнитно-резонансной томографии, а также для решения ряда других задач.

Применение данного метода основано на наличии в радикалах неспаренных электронов, что позволяет использовать спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Несмотря на то что спектроскопия ЭПР известна уже свыше 60 лет, ее различные варианты продолжают развиваться и совершенствоваться. Сравнительно недавно в методе спиновых меток и зондов стали использовать импульсную ЭПР-спектроскопию, в частности такие методы, как двойной электрон-электронный резонанс, метод модуляции спада сигнала электронного спинового эха (ЭСЭ), импульсный электрон-ядерный резонанс, эхо-детектируемый (ЭД) ЭПР и другие. Все они основаны на применении техники электронного спинового эха.[6,7]

Импульсная спектроскопия ЭПР существенно расширила возможности метода спиновых меток и зондов. С ее помощью можно изучать наноструктуру вещества и больших биомолекул, супрамолекулярную структуру сложных систем, например таких, как мембраны и включенные в них пептиды, кооперативные малоамплитудные ориентационные движения молекул в неупорядоченных средах и биологических жидкостях.

Опубликован ряд обзоров,[8–15] посвященных отдельным аспектам применения метода спиновых меток и зондов с использованием импульсной ЭПР-спектроскопии. В данной работе предпринята попытка охватить в целом различные сферы применения этого метода, обобщить новые результаты и появившиеся недавно методики.

С.А.Дзюба. Доктор физико-математических наук, профессор, директор ИХКГ СО РАН. Телефон: (383)330–9150, e-mail: dzuba@kinetics.nsc.ru
Область научных интересов: спектроскопия ЭПР, электронное спиновое эхо, спиновые метки и зонды, супрамолекулярная структура и динамика сложных молекулярных систем, биомембраны, молекулярные стекла, радикальные пары в фотохимии.

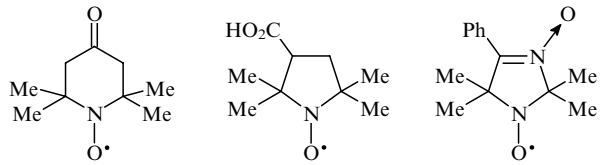
Дата поступления 17 апреля 2007 г.

II. Основы спектроскопии ЭПР нитроксильных радикалов

1. Нитроксильные радикалы. Метод спинового мечения избранного места

Нитроксильные радикалы — стабильные парамагнитные молекулы, содержащие парамагнитный фрагмент NO с

неспаренным электроном.[4, 5] Этот фрагмент окружен экранирующими заместителями, обычно метильными группами. К настоящему времени синтезировано несколько сотен разных нитроксильных радикалов. Некоторые простые примеры приведены ниже:



Для получения информации на молекулярном уровне особое значение приобрел метод так называемого спинового мечения избранного места (site-directed spin labeling).[16–18] В соответствии с этим методом спиновая метка пришивается к интересующему исследователя фрагменту в сложной биомолекуле или супрамолекулярной системе. При исследовании белков чаще всего метят цистеиновый остаток в аминокислотной последовательности с помощью метантиосульфонатной спиновой метки — 2,2,5,5-тетраметил-1-оксилпирролин-3-метилметантиосульфоната (MTSL). Также изучаются специально созданные аналоги белков, в которые этот остаток искусственно введен. Возможно мечение некоторых других аминокислотных остатков — лизина, аминоизомасляной кислоты и др. Небольшие спин-меченые пептиды (с числом аминокислот <50) могут быть получены путем прямого синтеза с помещением спиновой метки в желаемом месте аминокислотной последовательности. Кроме пептидов и белков спиновое мечение избранного места может быть осуществлено и в других биомолекулах, например липидах.

2. Спектры ЭПР нитроксильных радикалов. Электрон-ядерные взаимодействия. Эффекты движения

Условие электронного парамагнитного резонанса для нитроксильных радикалов в обычно используемом X-диапазоне длин волн спектрометра (длина волны ~ 3 см, частота ~ 10 ГГц) с применением первого порядка теории возмущений в хорошем приближении записывается в виде [19]

$$g(\theta,\varphi)\beta B + a(\theta,\varphi)M = \hbar\omega, \qquad (1)$$

где

$$g(\theta,\varphi) = g_{XX}\sin^2\theta\cdot\cos^2\varphi + g_{YY}\sin^2\theta\cdot\sin^2\varphi + g_{ZZ}\cos^2\theta,$$

$$a(\theta,\varphi) = \sqrt{A_{XX}^2\sin^2\theta\cdot\cos^2\varphi + A_{YY}^2\sin^2\theta\cdot\sin^2\varphi + A_{ZZ}^2\cos^2\varphi},$$

β — магнетон Бора; B — величина магнитного поля; M — проекция ядерного спина на свою ось квантования; $\hbar$ — постоянная Планка; ω — частота переменного магнитного поля; g_{XX}, g_{YY}, g_{ZZ} — главные значения g-тензора; A_{XX}, A_{YY}, A_{ZZ} — главные значения тензора сверхтонкого взаимодействия. Обычно используют молекулярную систему координат, в которой ось X направлена вдоль связи N–O, а ось Z перпендикулярна плоскости фрагмента N–O. Углы θ и φ определяют направление магнитного поля в сферической системе координат. Типичные значения компонент магнитных тензоров для нитроксильных радикалов: $g_{XX} \approx 2.0090$, $g_{YY} \approx 2.0060$, $g_{ZZ} \approx 2.0025$, $A_{XX}/g_e\beta \approx A_{YY}/g_e\beta \approx 5$ Гс, $A_{ZZ}/g_e\beta \approx 35$ Гс (g_e — g-фактор свободного электрона). Для высокопольного ЭПР в уравнение (1) необходимо ввести член, соответствующий зеемановскому взаимодействию ядер.

Неразрешенные сверхтонкие взаимодействия (СТВ) неспаренного электрона с другими ядрами радикала и матрицы в сумме смещают резонанс на ~ 3 Гс. В спектре стационарного ЭПР эти взаимодействия не разрешаются из-за наложения многих линий с небольшими расщеплениями, причем на одном и том же участке спектра могут находиться сигналы от радикалов с разными $g(\theta,\varphi)$.

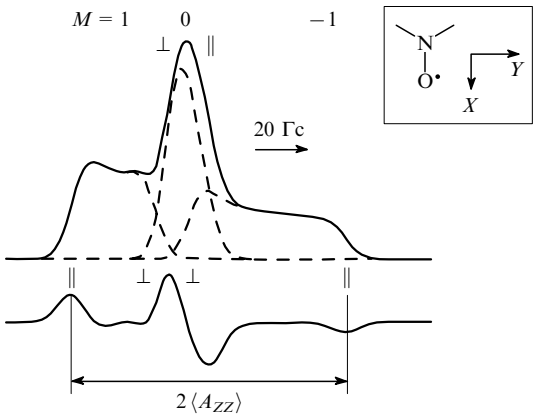


Рис. 1. Форма спектра ЭПР нитроксильного радикала. Внизу приведен спектр в виде первой производной формы линии поглощения по полю. Пунктиром показаны отдельные компоненты СТВ; для каждой из них указаны примерные положения параллельной и перпендикулярной ориентаций. На врезке — молекулярная система координат. Расщепление между крайними пиками для спектра в виде производной примерно соответствует удвоенному главному значению A_{ZZ} тензора СТВ (усредненное значение $\langle A_{ZZ}\rangle$ при наличии либраций).

В стационарном методе ЭПР сканируется поле B при непрерывном воздействии переменного СВЧ-поля на фиксированной частоте ω. Типичная форма спектра ЭПР нитроксильного радикала приведена на рис. 1. В спектрометрах ЭПР обычно измеряется первая производная формы линии поглощения по полю. Также показаны параллельные и перпендикулярные ориентации молекулы, которые можно указать в приближении аксиальной симметрии упомянутых выше тензоров, пренебрегая неразрешенными сверхтонкими взаимодействиями.

Ориентационные движения усредняют магнитные взаимодействия. Для X-диапазона характерный разброс частот из-за разных ориентаций молекулы составляет $\sim 10^9$ рад$\cdot$с$^{-1}$. Поэтому в случае быстрых движений молекулы как целого с частотой, много большей 10^9 рад$\cdot$с$^{-1}$, спектр будет состоять из трех одинаковых линий, соответствующих трем проекциям спина атома азота на направление внешнего магнитного поля. При этом g-тензор и тензор СТВ усредняются до скалярных значений, соответствующих 1/3 величины их следа.

В биологических и других супрамолекулярных системах обычно реализуется режим медленного движения — с частотой $<10^9$ рад$\cdot$с$^{-1}$. При таком режиме полного усреднения взаимодействий не происходит, поэтому обычные стационарные методы ЭПР часто не дают однозначной информации. Импульсные же методы на основе ЭСЭ оказываются чувствительными к движению даже в условиях перехода к твердому стеклообразному состоянию.

3. Электрон-электронные диполь-дипольные взаимодействия между радикалами

Диполь-дипольное (d–d) взаимодействие спинов электронов спиновых меток в настоящее время активно привлекается для изучения наноструктур спин-меченых систем. Это взаимодействие по величине порядка $g_e^2\beta^2/r^3$, где r — расстояние между двумя радикалами. Большой чувствительностью к

d – d-взаимодействию обладают импульсные методы ЭПР, основанные на спектроскопии ЭСЭ. Характерные времена поперечной релаксации в органических твердых веществах составляют $\sim 10^{-6}$ с, что соответствует верхней оценке измеряемых расстояний в $\sim 5-7$ нм. Нижняя оценка основана на величине «мертвого времени» прибора ($\sim 10^{-7}$ с) и практически достигает ~ 1.5 нм. Достоинством спектроскопии ЭСЭ является высокая точность измерений в указанном диапазоне расстояний. Для $r \sim 3$ нм погрешность не превышает 0.1 нм.[8–10] Это рекордная разрешающая способность среди всех известных физических методов. С такой разрешающей способностью в наноструктуре веществ можно обнаружить ряд тонких эффектов, которые не выявляются при исследовании другими методами. Отметим также, что использование ЭСЭ не требует специальной подготовки образцов (например, их кристаллизации, высокой степени очистки и др.)

Гамильтониан магнитного диполь-дипольного взаимодействия между магнитными моментами двух электронов имеет вид

$$H_{\mathrm{d}} = g_1 g_2 \beta^2 r^2 \frac{\hat{\vec{S}}_1 \hat{\vec{S}}_2 - (\hat{\vec{S}}_1 \vec{r})(\hat{\vec{S}}_2 \vec{r})}{r^5}, \qquad (2)$$

где g_1, g_2 — g-факторы двух частиц; $\hat{\vec{S}}_1$, $\hat{\vec{S}}_2$ — операторы спинов; $\vec{r}$ — радиус-вектор, соединяющий две частицы. Практически во всех случаях для длинноцепочечных бирадикалов справедливо приближение точечных диполей, т.е. можно считать, что спиновая плотность неспаренных электронов локализована в точке.[10]

Для нитроксильных бирадикалов можно использовать теорию возмущений, в рамках которой гамильтониан (2) является малой добавкой к условию (1). В случае слабых d – d-взаимодействий, когда

$$\varepsilon_{\mathrm{d}} \ll |g_1 - g_2| \beta B$$

(это соотношение всегда справедливо при $r > 0.15$ нм), частоты переходов для каждого из двух спинов [10]

$$\omega_{1,2} = \frac{g_{1,2}\beta}{\hbar} B \pm \frac{1}{2}\varepsilon_{\mathrm{d}}, \qquad (3)$$

где

$$\varepsilon_{\mathrm{d}} = \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar}(1 - 3\cos^2 \Theta),$$

(Θ — угол между направлением внешнего магнитного поля и линией, соединяющей два радикала). Знак $\pm$ означает, что для каждого спина резонанс сдвигается за счет d – d-взаимодействия со спином-партнером в зависимости от направления проекции последнего на внешнее магнитное поле.

Выражение (3) приводит в импульсных методах ЭПР к временны́м зависимостям типа $\cos(\varepsilon_{\mathrm{d}} t)$ (см. ниже).[10] После фурье-преобразования таких зависимостей появляется дублет на частотах $\pm\varepsilon_{\mathrm{d}}$. В полиориентированной системе интенсивности линий дипольного дублета в зависимости от частоты ω усредняются по всем ориентациям пары в пространстве; при

$$\omega_{\perp} = \pm \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar}$$

возникают сингулярности ($\Theta = \pi/2$, перпендикулярная ориентация пары). В эксперименте часто удается наблюдать только сингулярность из-за относительно низкой интенсивности других линий. По ее положению можно сразу определить расстояние r.

4. Электронное спиновое эхо нитроксильных радикалов

Если переходы между спиновыми уровнями возбуждать мощными импульсами СВЧ-поля, в образце появится свободная индукция — осциллирующая макроскопическая поперечная намагниченность.[6,7] Оптимальным для наблюдения сигнала свободной индукции является импульс, поворачивающий вектор намагниченности на угол $\pi/2$. Типичные длительности СВЧ-импульсов в спектрометрах ЭСЭ составляют от 10 до 100 нс. Затухание сигнала обусловлено разбросом частот прецессии (который и определяет форму спектра ЭПР).

Разрешающая способность спектрометров ЭСЭ ограничена временем «звона» резонатора после приложения СВЧ-импульсов (обычно ~ 100 нс),[6,7] которое называют «мертвым» временем. В случае нитроксильных радикалов наличие этого времени означает практическую невозможность наблюдения сигнала свободной индукции из-за его быстрого спада. Наблюдать сигнал можно только при некоторых специальных технических усовершенствованиях, направленных на уменьшение «мертвого времени», например при переходе в Ku-диапазон СВЧ (резонансная частота 17 ГГц, не путать с Q-диапазоном!) и при использовании повышенных температур для сужения линий.

В случае не одного, а двух импульсов с запаздыванием появляется сигнал эха (см. рис. 2,*a*). Запаздывание после второго импульса равно времени задержки между двумя импульсами τ. Оптимальное значение угла поворота намагниченности вторым импульсом равно π. Импульсную последовательность и сигнал эха формально записывают так:

$$\pi/2 - \tau - \pi - \tau - \text{эхо}.$$

Механизм появления сигнала эха следующий. Второй импульс, приложенный через время τ после первого, изменяет фазу прецессии спинов в плоскости, поперечной к внешнему магнитному полю. После этого импульса спины продолжают прецессировать с той же скоростью, но с другими начальными фазами. Через время τ после второго импульса у всех спинов фаза опять становится одинаковой, вследствие чего возникает сигнал (затем спины снова разойдутся).

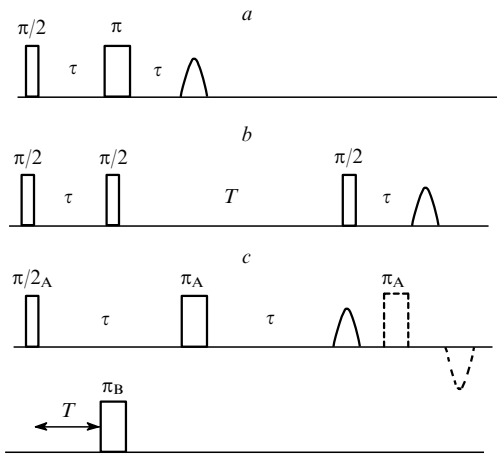


Рис. 2. Импульсные последовательности в ЭСЭ.
a — обычная двухимпульсная последовательность, *b* — трехимпульсная последовательность стимулированного эха, *c* — двухчастотный двойной резонанс. В последнем случае наблюдение велось на частоте спинов A, а на частоте спинов B подавали дополнительный импульс накачки. Пунктиром показаны дополнительные рефокусирующие импульс и эхо (см. текст).

Сигнал эха с увеличением τ спадает из-за процессов спиновой релаксации.

Другим методом регистрации ЭСЭ является трехимпульсная последовательность стимулированного эха (рис. 2,*b*)

$$\pi/2-\tau-\pi/2-T-\pi/2-\tau-\text{эхо}.$$

Первый импульс создает поперечную прецессирующую намагниченность, второй — проекцию намагниченности на ось Z (продольную намагниченность), которая в отсутствие релаксации сохраняется в течение времени T. Этот импульс создает ядерную когерентность, т.е. после его действия система описывается нестационарной суперпозицией различных электрон-ядерных состояний. Третий импульс вновь создает поперечную намагниченность, которая рефокусируется в момент времени

$$t = 2\tau + T,$$

т.е. возникает сигнал эха.

Особенность эксперимента ЭСЭ в применении к нитроксильным радикалам заключается в неполном (или селективном) возбуждении спектра ЭПР сверхвысокочастотными импульсами. Их амплитуда в большинстве экспериментов достигает 3–5 Гс, в то время как полная ширина спектра ЭПР — порядка 70–80 Гс. Эта особенность в ряде случаев имеет принципиальное значение, например при исследовании спектральной диффузии — стохастических флуктуаций резонансной частоты за счет ориентационного движения.

Если в результате ориентационного движения имеют место флуктуации резонансных частот со среднеквадратичным значением $\langle\Delta\omega^2\rangle$ и временем корреляции движения τ_c, то теоретически, при выполнении условия

$$\langle\Delta\omega^2\rangle\tau_c^2 \ll 1,$$

скорость релаксации будет равна $\langle\Delta\omega^2\rangle\tau_c$.[20] Величину $\Delta\omega$ можно легко оценить из уравнения (1). Для простоты примем, что имеет место аксиальная симметрия

$$g_{XX} = g_{YY} = g_\perp,\ A_{XX} = A_{YY} = A_\perp.$$

Обозначим для единообразия

$$g_{ZZ} = g_\parallel,\ A_{ZZ} = A_\parallel.$$

При малоамплитудном движении происходят флуктуации угла θ на малую величину $\Delta\theta$. Тогда в постоянном магнитном поле B флуктуации резонансной частоты $\Delta\omega$ при разложении по $\Delta\theta$ описываются выражением[21]

$$\Delta\omega = 2\sin\theta\cdot\cos\theta\times \tag{4}$$
$$\times\left[(g_\perp - g_\parallel)\frac{\beta B}{\hbar} + M\frac{A_\perp^2 - A_\parallel^2}{2\hbar\sqrt{A_\perp^2\sin^2\theta + A_\parallel^2\cos^2\theta}}\right]\Delta\theta.$$

Видно, что при $\theta = 0$, π и $\pi/2$ значение $\Delta\omega$ будет равно нулю, т.е. спиновая релаксация вблизи канонических ориентаций (параллельной и перпендикулярной) должна быть медленной.

Быстрые малоамплитудные ориентационные движения проявляются и в спектрах стационарного ЭПР, так как они частично усредняют анизотропные магнитные взаимодействия. Для ориентационного движения относительно оси, лежащей в плоскости XY молекулярной системы координат, величина $A_\parallel$ в результате движения усредняется[22]

$$\langle A_\parallel\rangle = A_\parallel - (A_\parallel - A_\perp)\langle\alpha^2\rangle, \tag{5}$$

где угол отклонения от равновесного положения α связан с $\Delta\theta$ соотношением $\Delta\theta = \alpha\sin\varphi$. Величину $\langle A_\parallel\rangle$ легко измерить из расщепления между крайними пиками в спектре ЭПР (см. рис. 1).

III. Методы импульсного ЭПР

1. Модуляция спада ЭСЭ за счет электрон-ядерных взаимодействий

Если электронный спин взаимодействует с ядерным спином, то в твердом теле при действии СВЧ-импульсов на резонансной частоте ЭПР одновременно возбуждаются разрешенные и запрещенные спиновые переходы (без переворота и с переворотом ядерного спина).[6,7] Из-за интерференции резонансных частот этих переходов при спаде ЭСЭ возникают биения (осцилляции) сигнала, которые называют электронно-ядерной модуляцией или эффектом ESEEM (Electron Spin Echo Envelope Modulation).[6,7] Примеры таких биений представлены на рис. 3,*a*. Приведен случай взаимодействия неспаренного электрона спиновой метки с дейтонами окружающей тяжелой воды. В частотном спектре фурье-преобразования биений содержатся пики (см. рис. 3,*b*), положение которых определяется электрон-ядерными взаимодействиями. В случае взаимодействий с близлежащими ядрами матрицы эти пики центрированы на резонансной ларморовской частоте данного ядра в магнитном поле спектрометра ЭСЭ (2.2 МГц для дейтонов). В стационарном ЭПР, как отмечено выше, такие пики не разрешаются.

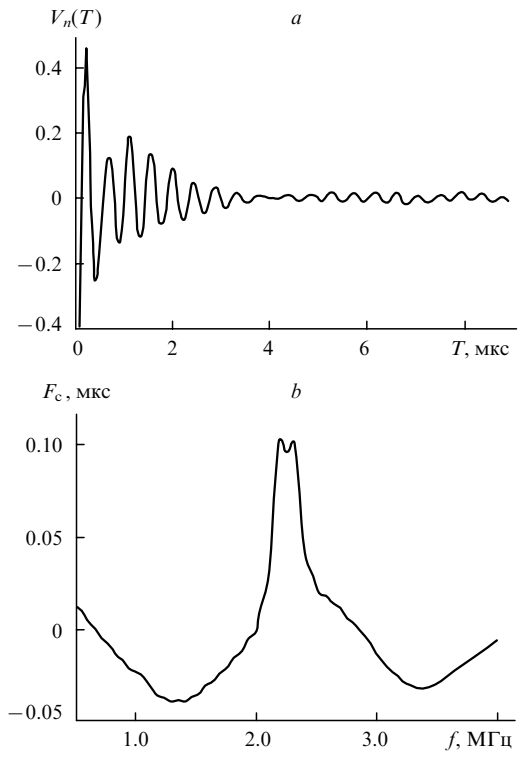


Рис. 3. Типичные осцилляции сигнала (ESEEM) за счет электрон-ядерных взаимодействий (*a*) и результат фурье-преобразования (*b*) для спиновой метки в матрице, содержащей D_2O.
Из экспериментального спада на рис. 3,*a* вычтена полученная усреднением гладкая неосциллирующая функция, сигнал $V_n(T)$ нормирован на величину этой функции при нулевом начальном времени. F_c — амплитуда фурье-преобразования.

Эффекты ESEEM, обусловленные электрон-ядерными взаимодействиями, — удобный инструмент изучения структуры ближайшего окружения спиновых меток, с помощью которого можно идентифицировать типы ядер в ближайшем окружении и определять их пространственное расположение относительно неспаренного электрона.

Данный подход в импульсном ЭПР используют давно и его можно считать классическим. Методические вопросы здесь в основном уже решены. Основные принципы метода ESEEM подробно изложены, например, в работах [6, 7]. В последнее время в литературе стало все больше появляться примеров его применения для изучения локального окружения спиновых меток.

2. Импульсный двойной электрон-электронный резонанс для изучения d – d-взаимодействий между радикалами

Выше было отмечено, что в настоящее время d – d-взаимодействие между радикалами активно привлекается для изучения наноструктуры спин-меченых систем. Основным методом исследования является импульсный двойной электрон-электронный резонанс (Pulsed Electron-Electron Double Resonance (PELDOR)).[8–10, 13] Этот метод был предложен в работах[23, 24]. Он позволяет определять расстояния между радикалами в нанометровом диапазоне; в случае дважды спин-меченых биомолекул можно делать выводы об их конформации, а при наличии агрегации (кластеризации) спин-меченых молекул можно судить о размерах агрегатов (кластеров).

В методе PELDOR сигнал эха формируется с помощью стандартной двухимпульсной последовательности, при этом на другой резонансной частоте подается дополнительный 180-градусный импульс накачки (рис. 2,*c*). Спины, от которых наблюдается сигнал эха, называют спинами A, их спины-партнеры в паре (на которые в данном случае действует дополнительный импульс) называют спинами B. Фаза, набираемая спином A в момент времени 2τ, есть

$$\varphi_{\mathrm{A}} = \pi \pm \varepsilon_{\mathrm{d}} T$$

(знак плюс или минус зависит от проекции спина B).

Сигнал эха пропорционален $\cos(\varepsilon_{\mathrm{d}} T)$, что означает модуляцию сигнала при изменении времени T с частотой ε_{d}. Отметим, что в отличие от рассмотренной выше модуляции за счет электрон-ядерных взаимодействий в данном случае модуляция вызвана электрон-электронными взаимодействиями. После фурье-преобразования модулированного спада ЭСЭ в полиориентированной системе возникает пик на частоте сингулярности

$$\omega_{\perp} = \pm \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar}.$$

По его положению можно определить расстояние между спиновыми метками.

Для устранения влияния конечной длительности импульса (в теории длительности импульсов предполагаются нулевыми) можно использовать дополнительный рефокусирующий импульс.[13]

С помощью метода PELDOR можно изучать кластеризацию спин-меченых молекул. В реальном эксперименте импульсом накачки возбуждается лишь часть (P_{B}) спинов-партнеров данного спина A. Для кластера из N частиц, если вероятность одновременного возбуждения более чем одного спина B мала, т.е. $P_{\mathrm{B}} N \ll 1$, сигнал ЭСЭ равен [8]

$$V(T) = \left[1 - P_{\mathrm{B}} \langle 1 - \cos(\varepsilon_{\mathrm{d}} T) \rangle\right]^{N-1}. \qquad (6)$$

Из этого выражения следует, что при $t \to \infty$ величина $V(T)$ стремится к пределу $(1 - P_{\mathrm{B}})^{N-1}$. Это асимптотическое значение экспериментально легко измерить, поэтому можно оценить число частиц N в кластере.

Такой же эффект, помимо воздействия на спины B на другой резонансной частоте, можно получить путем импульсного смещения магнитного поля. Данная методика была реализована в работах[25, 26] для X- и W-диапазонов СВЧ-излучения соответственно. Для возбуждения спинов A используется трехимпульсная последовательность стимулированного эха. В промежутке между вторым и третьим импульсами скачком меняется магнитное поле, и в этот момент прикладывается 180-градусный импульс накачки. Из-за смещения резонанса импульс влияет только на спины B. В данном подходе варьируется время τ между первым и вторым импульсами. При этом кроме модуляции за счет электрон-электронных взаимодействий возникает электрон-ядерная модуляция. Разделить эти два механизма можно с помощью деления временно́го спада на спад с накачкой и без нее (т.е. с отключением импульса накачки). Данные механизмы независимы, поэтому они должны мультипликативным образом определять наблюдаемую модуляцию спада.

Метод импульсного PELDOR со скачком магнитного поля имеет преимущество перед методом двухчастотного PELDOR в отношении возможности использования сканирующей накачки.[25] При использовании импульсного PELDOR повышается доля возбуждаемых спинов P_{B}, что приводит к увеличению глубины модуляции. Недостатком данного метода является влияние процессов поперечной релаксации на наблюдаемый спад эха.

В ряде недавно опубликованных работ рассмотрены разнообразные методические аспекты метода PELDOR. В работе[27] затронуты вопросы о корректном учете структуры самой спиновой метки и ее связывания с биомолекулой при построении структуры биомолекулы по данным PELDOR. В работах[28–30] обсуждены методические аспекты получения информации из данных PELDOR и вопросы оптимизации эксперимента. В работе[31] проведено сравнительное исследование бирадикалов методом PELDOR в двух диапазонах СВЧ-излучения — X и S. С учетом того что электрон-ядерная модуляция зависит от диапазона СВЧ-излучения, а электрон-электронная не зависит, такой подход можно использовать для выделения чистого вклада последней. В работе[32] утверждается, что качество информации из частотных спектров PELDOR можно улучшить при изотопном замещении в одном из радикалов пары атома ^{14}N на ^{15}N и водорода на дейтерий. В таком случае предложено использовать двумерную версию четырехимпульсного метода PELDOR. В статье[33] обсуждены возможности метода PELDOR при изучении бирадикалов в высокочастотном диапазоне ЭПР (> 95 ГГц). Продемонстрированы эффекты ориентационной селекции, возникающие из-за высокого разрешения по ориентациям.

3. Другие методы изучения d – d-взаимодействий

В связи с некоторой сложностью проведения эксперимента с использованием метода PELDOR (необходимо иметь дополнительный источник СВЧ-излучения, резонатор специальной конструкции и др.) были предложены другие методики проведения эксперимента по изучению d – d-взаимодействий.

Метод «2 + 1», предложенный в работе[34], аналогичен методу PELDOR, с тем отличием, что все импульсы здесь действуют на одной и той же резонансной частоте. Импульсная последовательность имеет вид

импульс 1 – T – импульс (+1) – ($\tau - T$) – импульс 2 – τ – эхо.

Эхо формируется двумя импульсами (первым и вторым), дополнительный импульс (который и называется +1) включается для альтернирования d – d-взаимодействия. В эксперименте варьируется время T при фиксированном τ. Недостатком метода «2 + 1» является влияние эффекта ESEEM. Далее, диполь-дипольное взаимодействие альтернируется не только под воздействием импульса +1, но и под воздействием второго импульса. Интерференцию этих двух эффектов не всегда можно корректно учесть. В результате может получиться существенное искажение информации о d – d-взаимодействии.

Метод на основе двухквантовой когерентности. С помощью определенным образом составленной импульсной последовательности можно возбудить двухквантовую когерентность в системе спиновых уровней бирадикала.[35] Базовая импульсная последовательность для этого эксперимента состоит из четырех импульсов. Три из них ($\pi/2$-импульсы) формируют сигнал стимулированного эха. В промежутке между вторым и третьим импульсами (посредине между ними) включают дополнительный π-импульс. Чтобы выделить вклад двухквантовой когерентности, циклически изменяют фазы импульсов от одной серии к другой. В эксперименте варьируется время τ, сигнал при этом оказывается модулированным с частотой ε_d.

Чтобы избежать потери сигнала в течение «мертвого времени», применяют дополнительный рефокусирующий пятый импульс. Можно также использовать шестиимпульсную последовательность, в которой двухквантовая когерентность создается не двумя, а тремя импульсами, —

$$\pi/2 - \tau/2 - \pi - \tau/2 - \pi/2.$$

Преимущество данного метода заключается в отсутствии эффектов интерференции, характерных для метода «2 + 1». Однако здесь также имеет место эффект ESEEM.[36] К недостаткам метода двухквантовой когерентности следует отнести и большое число (64) циклов изменения фазы (что может служить источником дополнительной погрешности), а также повышенные технические требования — амплитуда СВЧ-импульсов должна быть больше амплитуд рабочих импульсов коммерческих спектрометров. Наконец, следует отметить сложность теоретического описания и отсутствие наглядной картины явления. Тем не менее в ряде работ этот метод был использован для изучения d – d-взаимодействия спиновых зондов. Методические аспекты применения метода рассмотрены в работе [37]. В исследовании [38] предложены пути подавления ESEEM.

Метод на основе последовательностей ЯМР твердого тела предложен в работе [39]. Он основан на известных импульсных последовательностях типа «твердотельное эхо» и последовательности Джинера – Брукэрта. Последовательность твердотельного эха имеет вид

$$(\pi/2)_x - \tau - (\pi/2)_y - \tau - \text{эхо}.$$

По сравнению с методом наблюдения двухквантовой когерентности экспериментальная схема в этом случае значительно проще (меньше циклов изменения фазы). Однако и для этого метода характерны сложность теоретического описания, а также отсутствие наглядной картины явления.

С учетом указанных сложностей можно считать, что PELDOR пока является наиболее адекватным методом определения d – d-взаимодействий: его теория проста и наглядна, а эффекты ESEEM практически отсутствуют. Эти преимущества продемонстрированы в работе [36], авторы которой провели сравнительное изучение методов двухквантовой когерентности и PELDOR для одного и того же объекта — дважды спин-меченого белка с расстоянием между метками 3.55 нм.

4. Релаксационное усиление электрон-электронной модуляции спада ЭСЭ при d – d-взаимодействии

Недостатком, характерным для всех описанных выше методов, в том числе и метода PELDOR, является малая доля возбуждаемых импульсами спинов (не более 10 – 15%), что связано с большой шириной спектра ЭПР нитроксильных радикалов по сравнению с амплитудой СВЧ-излучения и, как следствие, малой величиной эффекта модуляции ЭСЭ. Особенно существенен этот недостаток при переходе к ЭПР в высоких полях. В работе [40] предложен подход, основанный на использовании эффектов спин-решеточной (продольной) релаксации в паре спинов, который позволяет преодолеть указанные трудности. Возможным процессом, изменяющим ларморовскую частоту резонансного спина A в паре со спином B

$$\omega_A^* = \omega_A + m_B \varepsilon_d,$$

где m_B — проекция спина B, является переворот нерезонансного спина B под действием продольной релаксации. В этом случае вероятность того, что спин B совершит нечетное число переворотов за время T, равна $0.5(1 - \exp(-T/T_1))$, где T_1 — время продольной релаксации. При этом при сканировании τ стимулированное ЭСЭ будет модулировано с дипольной частотой ε_d. Амплитуда этой модуляции с удлинением «периода эволюции» T возрастает. Эффект усиления дипольной модуляции вследствие релаксации (Relaxation-Induced Dipolar Modulation Enhancement (RIDME)) экспериментально наблюдался в работе [40]. Проблемы, связанные с малой долей возбуждаемых спинов, в методе RIDME отсутствуют, поскольку в формировании дипольной модуляции участвуют до половины всех нерезонансных спинов. Поэтому RIDME — весьма перспективный метод для исследований ЭСЭ в высоких магнитных полях. Авторами работы [41] эффект RIDME в ЭСЭ был зарегистрирован в магнитном поле 4.4 Тл (рабочая частота спектрометра — 130 ГГц).

5. Модуляция спада ЭСЭ за счет спонтанных процессов внутримолекулярного движения и спиновой релаксации ядер

Модуляционные явления в традиционных методах ЭСЭ обусловлены когерентными динамическими эффектами, возникающими при возбуждении СВЧ-импульсами одновременно двух и более переходов в спектре ЭПР. В методе RIDME модуляция ЭСЭ обусловлена спонтанным изменением магнитных параметров радикалов под действием последовательности импульсов. Спонтанные изменения могут происходить также из-за внутримолекулярной подвижности [42] и вследствие спиновой релаксации близлежащих ядер.[43] При изучении таких эффектов используют трехимпульсную последовательность, формирующую сигнал стимулированного эха. Сканируется временная задержка τ между первым и вторым импульсами при фиксированной задержке T между вторым и третьим импульсами. К модуляции спада ЭСЭ приводит спонтанный сдвиг частоты ларморовской прецессии электронного спина в процессе эволюции системы между импульсами в течение интервала T за счет продольной спиновой релаксации близлежащих ядер. Вероятность этого события тем выше, чем больше T. Эффекты проявления в модуляции спада ЭСЭ спонтанных процессов рассмотрены в обзоре [44].

6. Метод импульсного высокопольного/высокочастотного ЭПР

При использовании метода ЭПР высокими полями (частотами) считают поля свыше 3 Тл (частоты >95 ГГц). В стационарном варианте метод высокопольного/высокочастотного ЭПР давно используют для изучения спин-меченых систем. Его основным достоинством является ориентационная селективность: из-за анизотропии *g*-фактора появляется возможность селективно изучать разные ориентации зондов и меток. Поэтому для обычной полиориентированной системы можно получать информацию такого же типа, что и для ориентированного монокристалла. В последнее время появились работы (см., например,[26, 33, 41, 45, 46]), авторы которых применяли метод высокопольного/высокочастотного ЭПР в импульсном варианте для изучения спин-меченых систем. При этом решались как структурные задачи, так и проблемы динамики молекул. В настоящее время выпускаются коммерческие спектрометры высокопольного/высокочастотного ЭПР.

7. Метод эхо-детектируемого ЭПР для изучения ориентационной динамики

В методе эхо-детектируемого ЭПР (ЭД ЭПР) сигнал эха записывают как функцию магнитного поля при разных значениях времени τ (двумерный эксперимент).[21] Разные резонансные поля соответствуют разным ориентациям радикала относительно направления внешнего магнитного поля (см. рис. 1), поэтому с помощью данного метода получают информацию об ориентационной зависимости скорости релаксации или о ее анизотропии. Анизотропия релаксации связана с механизмом и скоростью движения.

Для удобства спектры ЭД ЭПР представляют в виде их набора, записанного при разных τ и нормированных на одну и ту же величину магнитного поля, соответствующую максимуму спектра (рис. 4). Таким образом достигают сразу две цели: во-первых, исключается изотропная релаксация, не зависящая от поля, которая определяется процессами, не связанными с движениями; во-вторых, становится наглядным характер анизотропии релаксации. Например, на рис. 4 видно, что вблизи краев спектра (которые соответствуют параллельной ориентации молекулы, см. рис. 1) релаксация более медленная.

Метод ЭД ЭПР спиновых зондов оказался чувствительным к быстрым малоамплитудным стохастическим движениям молекул зондов и меток вблизи положения их равновесия. Такие ориентационные движения называют стохастическими либрациями, они характерны только для неупорядоченных молекулярных сред, включая биологические. Метод чувствителен к очень малым амплитудам движения[47] — вплоть до величин 0.1 – 1°. Отметим, что стохастические движения следует отличать от обычных динамических ориентационных колебаний. Последние характерны для любого фазового состояния вещества.

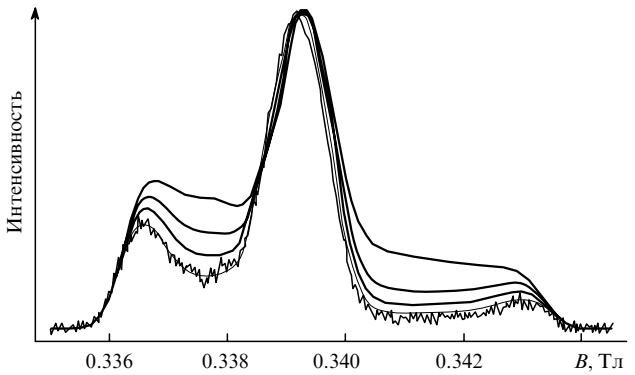


Рис. 4. Типичные эхо-детектированные спектры, записанные при разных временах между импульсами τ, нормированные на максимум интенсивности.
Тонкая линия — пример расчета для модели быстрых малоамплитудных движений (см. текст).

8. Двумерный импульсный двойной электрон-электронный резонанс для изучения ориентационной динамики

Для последовательности импульсов в методе двумерного импульсного двойного электрон-электронного резонанса используют[12, 48, 49] ту же импульсную схему, что и в методе PELDOR. Отличие в том, что измеряемой величиной служит сигнал свободной индукции после последнего импульса. В этом методе производится фурье-преобразование по двум временам — T и времени задержки после последнего импульса. В двумерных спектрах можно разделить однородное уширение, вызванное движением, и неоднородное уширение, определяемое микроскопическим упорядочением, т.е. получить данные о структурно-динамической гетерогенности системы. Чтобы наблюдать сигнал свободной индукции, при использовании данного метода необходимо применять спектрометры специального типа с коротким «мертвым временем», например работающих в Ku-диапазоне (17 ГГц). Для сужения линий необходимо также использовать повышенные температуры.

9. Импульсный двойной электрон-ядерный резонанс

Для изучения электрон-ядерных взаимодействий, кроме ESEEM, используют и другие методики ЭПР: стационарный двойной электронно-ядерный резонанс (Electron-Nuclear Double Resonance (ENDOR)) и импульсный ENDOR в вариантах Мимса и Дэвиса. Авторами работы[50] проведено сравнительное исследование возможностей разных методик. На примере взаимодействия спиновых меток со спинами ядер ^{31}P показано, что наиболее достоверные данные дает метод импульсного ENDOR в варианте Мимса. Данным методом могут быть измерены малые расщепления — до 0.03 МГц, что соответствует расстоянию 1 нм. В случае спин-меченых липидов в полностью гидратированной мембране на основе таких измерений можно судить о величинах углов наклона липидных цепей к плоскости мембраны.

Метод импульсного ENDOR применяют также в варианте высокопольного ЭПР.[51] Благодаря ориентационной селективности можно получать более детальную информацию о структуре ближайшего окружения исследуемой молекулы. С использованием такого варианта данного метода была показана[51] возможность изучения геометрии комплексов спиновых зондов с молекулами растворителей (например, комплексов 5-доксилстеариновой кислоты с дейтерированными спиртами).

10. Метод «насыщение – восстановление» во времяразрешенном ЭПР

Метод времяразрешенного ЭПР[52] не относится к импульсным, так как регистрацию сигнала проводят с помощью непрерывного СВЧ-поля. Метод «насыщение – восстановление» для измерения времен релаксации занимает промежуточное положение между импульсными и стационарными методами: в нем используют импульсное насыщение спектра (длительность насыщающего импульса обычно составляет

несколько микросекунд) и непрерывную регистрацию сигнала ЭПР. В ряде работ (см.[53–55]) таким методом изучали эффект ускорения спиновой релаксации метки в биосистемах за счет флуктуирующего магнитного диполь-дипольного взаимодействия с близлежащим ионом металла. Это позволило оценить расстояния в паре метка – ион.

Метод «насыщение – восстановление» применяют для целей так называемой оксиметрии биологических объектов — определения в них локальных концентраций молекулярного кислорода.[56] Применение метода основано на эффектах ускорения спиновой релаксации меток за счет столкновений с молекулярным кислородом.

Метод времяразрешенного ЭПР имеет преимущество перед методами, базирующимися на спектроскопии ЭСЭ, так как сигнал ЭСЭ (или свободной индукции) не всегда удается наблюдать из-за проблем, связанных с наличием «мертвого» времени спектрометра и короткими временами релаксации. К недостаткам этого метода относится более низкое временное разрешение, сложность и неоднозначность теоретического описания, меньшие функциональные возможности.

Имеется ряд интересных приложений метода времяразрешенного ЭПР для решения задач спиновой химии. Примером может служить перенос спиновой поляризации на спиновую метку в молекуле модельного гексапептида с расположенного в этой же молекуле фотовозбужденного хромофора.[57] Другой пример — влияние спиновых меток на формирование спиновой поляризации в спин-коррелированных радикальных парах, возникающих при возбуждении светом реакционных центров фотосинтеза растений.[58] Данные таких исследований могут оказаться полезными при изучении процесса переноса электрона в этих системах. Не исключено, что такого рода задачи можно решать и с использованием импульсного ЭПР.

IV. Структурные исследования спин-меченых систем

1. Конформации длинноцепочечных бирадикалов и дважды спин-меченых биомолекул

Для разных конформаций молекулы характерны ее разные длины. Поэтому для определения конформационного строения бирадикалов или дважды спин-меченых биомолекул можно измерить расстояния между двумя неспаренными электронами в них. Детали проведения измерений для изучения конформационного строения таких молекул с помощью методов PELDOR и других рассмотрены в ряде обзоров (см., например,[8–10]). Обсудим общее состояние исследований в этой области и появившиеся в последнее время публикации.

Число возможных конформаций длинноцепочечных бирадикалов может быть большим, поэтому вопрос надо ставить о функции распределения по расстояниям между парамагнитными фрагментами. Если ожидается, что распределение по расстояниям будет достаточно узким, то ширину распределения можно оценить сразу из затухания модуляции. Авторами работы[25] методом PELDOR со скачком магнитного поля изучены два длинноцепочечных (длиной $\sim$2 нм) бирадикала — жесткий и гибкий. По затуханию модуляции для гибкого бирадикала была оценена ширина распределения по расстояниям, составившая $\sim$0.3 нм.

В работах[59, 60] методом PELDOR изучали конформации бирадикала, содержащего между двумя нитроксильными фрагментами цепочку метиленовых групп, число которых (n) менялось от 8 до 20. Следовало ожидать широкого разброса расстояний между двумя радикалами. Данные, полученные из частотных спектров, сравнивали с результатами расчета полностью растянутой *транс*-конформации (предельный случай) и расчета конформационной статистики при заданной температуре. Наиболее близкими оказались результаты измерения расстояний и расчета статистики конформаций — они совпали в пределах ошибки эксперимента. Для $n = 10$ при среднем расстоянии $r = 2.1$ нм ширина функции распределения на полувысоте составила 0.5 нм.

С помощью метода PELDOR можно измерять взаимодействия спинов не только в нитроксильных бирадикалах, но и в бирадикалах, содержащих в качестве спина-партнера парамагнитный ион металла.[61]

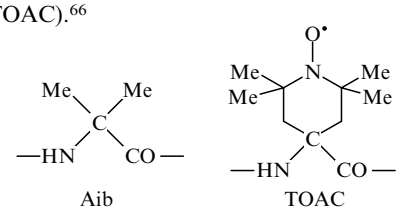
Аналогичные исследования можно проводить для дважды спин-меченых пептидов. Если расстояние между метками мало́ (<1.5 нм), исследование проводят с помощью стационарного ЭПР.[62] Если же метки расположены на расстоянии >1.5 нм, необходимо применять методы импульсной спектроскопии ЭПР.

Методом PELDOR в ряде работ (см., например,[63–65]) изучены конформации дважды спин-меченого пептида Trichogin GA IV в органических стеклах. Это линейный пептид, выделенный из грибка *Trichoderma longibrachiatum*, богатый аминоизомасляной (Aib) кислотой

$$\text{n-Oct}-\text{Aib}^1-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Aib}^4-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Aib}^8-\\ -\text{Gly}-\text{Ile}-\text{Lol}$$

(n-Oct — *н*-октаноил, Lol — лейцинол). Trichogin GA IV обладает антибактериальными и антигрибковыми свойствами. Известно, что такие пептиды способны создавать ионные каналы в мембранах, в результате чего мембраны становятся проницаемыми. Последнее свойство может приводить к гибели клетки. Отличительная особенность пептида Trichogin GA IV — малая длина (в его составе находится только 10 аминогрупп), которая гораздо меньше толщины мембраны, поэтому механизм возникновения проницаемости мембраны в настоящее время неясен.

Остатки Aib при химическом синтезе замещаются на близкие по строению нитроксильные спиновые метки (TOAC).[66]



Для удобства синтеза конечные группы пептида могли замещать и на другие остатки. Эти замещения не приводят к изменению мембрано-модифицирующих свойств пептидов.[67] Синтезированы дважды меченые пептиды по положениям 1 и 4, 4 и 8, 1 и 8. Первые два типа бирадикалов можно исследовать с помощью стационарного ЭПР, последний — только импульсного (из-за большого расстояния между спинами).

Конформации дважды спин-меченого пептида изучали при 77 K в разных стеклующихся растворителях — метаноле, этаноле, трифторэтаноле и смеси хлороформ – диметилсульфоксид с разным соотношением компонентов.[63, 64] Модуляция при использовании метода PELDOR наблюдается во всех матрицах, но с разной частотой осцилляций. Определены расстояния между метками в положениях 1 и 8, которые варьируются от 1.53 (в трифторэтаноле) до 2.18 нм (в этаноле). Сделаны выводы, что в трифторэтаноле пептид имеет конформацию 3_{10}-спирали, а в других матрицах — 2_7-спирали.

Работы[68, 69] посвящены исследованию конформации спин-меченого Trichogin-1,8, помещенного в биологические

мембраны. Для мембран яичного L-α-фосфатидилхолина найдено,[68] что функция распределения по расстояниям содержит два максимума — при 1.3 и 1.8 нм. Авторы пришли к выводу, что конформации пептида представляют «смесь» α-спирали, 3_{10}-спирали и более растянутых конформаций. Аналогичные результаты получены для этого пептида в модельных фосфолипидных мембранах.[69]

Примером исследования методом PELDOR спин-меченых РНК служат работы[70–72], в которых изучались РНК, меченные нитроксильными метками в двух положениях. Для расстояний между метками получен набор значений между 2 и 5 нм. Данные измерений совпали с данными расчетов методом молекулярной динамики. По результатам исследований сделаны выводы о конформациях биомолекул.

Авторами статьи[73] использовано сочетание методов спинового мечения избранного места с PELDOR для изучения изменения конформации белка (BtuB) при его связывании в мембране с субстратом (TonB). Данный белок отвечает за связывание и транспорт витамина B-12 через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli*. В белок вводили пару спиновых меток. В отсутствие субстрата данные измерений показывали узкое распределение числа пар по расстояниям между двумя синами (число пар от r до $r + \mathrm{d}r$). При добавлении субстрата появлялись большие расстояния. Этот результат свидетельствует о переходе белка при добавлении субстрата из упорядоченного в неупорядоченное состояние.

В работе[74] изучали однократно меченые регуляторы Na^+/H^+ — NhaA из *Escherichia coli*. Для мечения выбрали остатки, расположенные в областях, структура которых меняется при изменении pH. В результате исследований методом PELDOR обнаружена модуляция сигнала эха, свидетельствующая о том, что NhaA в системе присутствует в виде димеров. Глубина модуляции обратимо уменьшалась с уменьшением pH, что свидетельствовало об увеличении расстояния в димере. Обсуждена связь этих результатов с механизмом активности NhaA.

Методом PELDOR изучена структура [2]катенанов различных размеров.[75] Метки вводили в каждый из двух макроциклов. При сравнении экспериментальных данных и теоретических оценок сделаны выводы о конформационном распределении молекул и об их размерах.

Расположение *b*-подсистем в энзиме F0F1 синтазы из *Escherichia coli* изучено в работе[76] с использованием методов спинового мечения избранного места и PELDOR. На основании полученных расстояний между спиновыми метками сделан вывод о параллельном расположении двух спиралей и о других особенностях структуры.

Методом двухквантовой когерентности проведено исследование специально синтезированных пептидных спиралей.[77] Определены внутримолекулярные расстояния и изучены процессы фолдинга этих спиралей.

Возможности изучения глобальной структуры нуклеиновых кислот с использованием методов спинового мечения избранного места и PELDOR обсуждены в публикации[78]. В качестве модельной системы использовали меченые дуплексы додекамеров ДНК с известной структурой. Измеренные методом PELDOR расстояния (от 2 до 4 нм) совпали с теми, которые можно получить из данных ЯМР.

2. Агрегация пептидов в молекулярных стеклах и биомембранах

Имеется ряд данных, на основании которых можно предположить, что агрегация пептидов в биомембранах существенно влияет на функциональные свойства последних, например такие, как формирование в них ионных каналов. Размеры агрегатов лежат в нанометровой области, что свидетельствует о перспективности использования здесь метода PELDOR.

Для развития представлений о возможных механизмах агрегации пептидов в биомембранах в ряде работ были изучены пептиды в более простых модельных системах. Результаты исследований методом PELDOR агрегации спин-меченого пептида Trichogin GA IV в органических молекулярных стеклах подробно рассмотрены в обзорах[8, 10, 14]. В полярных средах агрегации не наблюдалось, а для слабополярных стекол было найдено, что число молекул в агрегатах (N) меняется в интервале от 3.1 до 4.3 в зависимости от системы. В работе[79] для спин-меченых димеров Trichogin (ковалентные соединения двух молекул типа «голова к хвосту») в смеси хлороформ – толуол N изменяется в интервале от 2 до 3, а расстояние между спиновыми метками — от 3.0 до 4.5 нм. При повышении концентрации молекулы агрегируются в тетрамеры.[80]

Исследование агрегации спин-меченого зервамицина IIA — гексадекапептида грибкового происхождения — методом PELDOR в смеси толуол – метанол, застеклованной при 77 K, показало наличие агрегатов с антипараллельной ориентацией молекул пептидов.[81]

В работе[82] изучена агрегация спин-меченого пептида аламетицина в полярных и неполярных молекулярных стеклах. В состав пептида входит 20 аминокислот

Act – Aib – Pro – Aib – Ala – Aib – Ala – Glu – Aib –
– Val – Aib – Gly – Leu – Aib – Pro – Val –
– Aib – Glu – Gln – Phol.

Он проявляет антибиотические свойства. Изучались образцы, спин-меченые в положении 16 путем замещения остатка аминоизомасляной кислоты на спиновую метку TOAC. В полярном стекле агрегации не обнаружено, а в малополярном (смесь хлороформ – толуол) она установлена. Оказалось, что число молекул в агрегате довольно велико — 6 – 8.

Агрегация спин-меченых пептидов Trichogin GA IV в биологических мембранах исследована в работах[68, 69]. Для мембран яичного L-α-фосфатидилхолина найдено,[68] что при концентрациях пептида 2.2 мол.% он распределен в мембране равномерно. Добавление холестерина (до 16.5 мол.%) приводило к увеличению локальных концентраций пептида. Для модельных фосфолипидных мембран установлено,[69] что при малой концентрации пептидов (в молекулярном соотношении к липидам, меньшем чем 1 : 100) агрегации не происходит. Увеличение же этой концентрации в модельных фосфолипидных мембранах до соотношения 1 : 20 приводит к образованию агрегатов в виде пар. Среднее расстояние между метками в парах оказалось близким к 2.5 нм.

Эффект агрегации пептидов с увеличением их концентрации, по-видимому, имеет принципиальное значение для появления каналов в мембранах. Уникальное достоинство метода PELDOR заключается в возможности определения числа молекул в агрегатах и их характерного размера.

3. Наноструктура иономеров

Иономеры — полимеры с концевыми ионными группами.[83, 84] В их структуре имеются кластеры ионных групп размером порядка нескольких нанометров. Расстояние между кластерами такого же порядка. Для иономеров на основе сополимера полиизопрена и полистирола оба эти параметра наноструктуры оценены методом PELDOR с использованием ионных спиновых зондов.[85–87] Известно, что такие зонды попадают на поверхность ионных кластеров. Были определены характерное расстояние между частицами в кластере (~ 2 нм) и характерное межкластерное расстояние

(~5 нм). Подробнее эти результаты обсуждены в обзорах [10, 13].

4. Диагностика структурных превращений вещества

Авторы работ [88–91] методом модуляции спада ЭСЭ за счет электрон-ядерных взаимодействий изучали механизм формирования мезопористых материалов (MCM-41 и SBA-15) из исходных мицеллярных веществ с добавлением спинового зонда. На разных стадиях реакции образец охлаждали до 77 K и регистрировали ESEEM за счет взаимодействия неспаренного электрона спинового зонда с содержащимся в исходных веществах дейтерием. Удалось наблюдать и интерпретировать несколько различных стадий процесса формирования материалов.

5. Профиль проникновения воды в биомембраны

Глубина проникновения воды в биомембрану — важная характеристика, определяющая транспорт полярных и заряженных частиц через мембраны и энергетику встраивания в них белков.[92–95] В работах [96–99] использован метод измерения содержания воды в локальном окружении спиновой метки с помощью эффекта ESEEM, обусловленного сверхтонким взаимодействием неспаренного электрона метки с ядрами дейтерия молекул тяжелой воды, которой гидратировались мембраны. Использование тяжелой воды обусловлено, во-первых, тем, что амплитуда дейтериевой модуляции значительно больше, чем протонной. Во-вторых, таким образом можно отделить вклад в ESEEM от протонов самих биомолекул. Используя селективное спин-мечение, методом ESEEM можно определять локальную концентрацию воды в ближайшем окружении спиновой метки. Оценки показали, что разрешающая способность метода — порядка 0.5 нм.

В исследованиях использовали либо липиды, спин-меченые в различных положениях алифатического хвоста в модельных фосфолипидных мембранах DL-α-дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC),[96, 99] либо спиновые зонды на основе *n*-доксилстеариновой кислоты (n = 5, 7, 12, 16) в мультислойных липосомах яичного фосфатидилхолина.[97, 98] Авторы работ [96–98] применяли метод двухимпульсного эха. Гораздо более точные результаты удалось получить при использовании стимулированного эха.[99]

Вид экспериментально полученных временны́х осцилляций сигналов стимулированного ESEEM и их косинус-фурье-спектров аналогичен приведенным на рис. 3. Видно, что спектр состоит из узкой линии и широкой подложки (см. рис. 3,*b*). Согласно теоретическому анализу, проведенному в работе [99], узкая линия обусловлена взаимодействием со свободной водой, а широкая подложка — с водой, связанной с нитроксильным радикалом в комплекс. У образцов с разным положением спиновой метки вдоль липидного хвоста амплитуды дейтериевой линии (спектральная плотность) заметно отличаются. На рис. 5 эта амплитуда приведена как функция положения метки (амплитуды узкой линии и широкой подложки оказались пропорциональны друг другу). Видно, что при «движении» в глубь мембраны амплитуда (а значит, и концентрация воды) уменьшается. Причем наличие холестерина приводит к двум эффектам: большей концентрации воды вблизи поверхности мембраны и к значительно более резкому спаду концентрации при «движении» в глубь мембраны. Спад происходит вблизи положения 8 атома углерода липидного хвоста. Сглаженный спад в отсутствие холестерина можно объяснить «перепутыванием» хвостов липидов (известно, что холестерин способствует упорядочению молекул липидов).

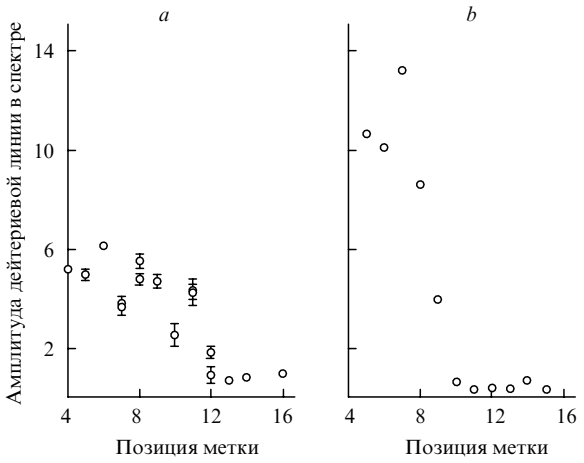


Рис. 5. Амплитуды линий на частоте 2.2 МГц (см. рис. 3) в зависимости от положения метки вдоль липидного хвоста в гидрированных дейтериевой водой модельных фосфолипидных мембранах.
a — мембрана DPPC без холестерина, *b* — мембрана DPPC с холестерином.

Описанные выше результаты обсуждены также в обзоре [100].

6. Определение локализации в мембране пептидов и других биомолекул

В работе [101] методом ESEEM были выполнены исследования серии спиновых зондов — *n*-доксилстеариновой кислоты (n = 5, 7, 10, 12, 16) в везикулах DPPC и дигексадецилфосфата (DHP). Эффект ESEEM возникал из-за взаимодействия неспаренного электрона в доксильной группе с ядрами ^{31}P полярных головок липидов везикул. На основании полученных данных можно делать вывод о локализации спинового зонда относительно поверхности мембраны. Найдено, что внутрь везикул DHP спиновый зонд проникает на расстояние ~0.5 нм.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению супрамолекулярной структуры систем мембрана – пептид. «Классическим» объектом в этих исследованиях является пептид Trichogin GA IV. Длина спирали пептида 1.6 нм, что составляет примерно половину от толщины мембраны. В большинстве работ исследование проводили с использованием флуоресцентных меток.[102–104] Однако данный метод имеет существенный недостаток — метки слишком объемные, и они вместе с пептидом могут выталкиваться на поверхность мембраны.[103] Поэтому представляет интерес использование для этих целей спиновых меток, которые занимают гораздо меньший объем.

Исследования локализации и ориентации пептида Trichogin GA IV в фосфолипидной мембране выполнены в работе [67]: проанализировано влияние полярности на параметры СТВ в спектрах стационарного ЭПР. Однако в эти взаимодействия вносят вклад также молекулярные движения, вследствие чего данные не всегда достоверны. Методы же на основе ESEEM свободны от указанного недостатка.

Данные о профиле концентрации воды в модельной фосфолипидной мембране, полученные методом ESEEM,[99] были использованы для определения локализации спин-меченого пептида Trichogin GA IV в этой мембране.[105] Исследовались три аналога пептида, спин-меченых в разных положениях (1, 4 и 8)

Fmoc – TOAC – Gly – Leu – Aib^4 – Gly – Gly –
– Leu – Aib^8 – Gly – Ile – Leu – OMe,
Fmoc – Aib^1 – Gly – Leu – TOAC – Gly – Gly –
– Leu – Aib^8 – Gly – Ile – Leu – OMe,
Fmoc – Aib^1 – Gly – Leu – Aib^4 – Gly – Gly – Leu –
– TOAC – Gly – Ile – Leu – OMe.

Для этих трех образцов на рис. 6 приведены спектры ESEEM. Полученные амплитуды пиков надо сравнивать с амплитудами для спиновых меток в липидах, которые измерены в аналогичных условиях (см. рис. 5, данные в отсутствие холестерина). При сравнении видно, что для положений 1 и 8 амплитуды (соответственно равные 4.2 и 3.3, см. рис. 6) близки по величине к таковым для положений спиновых меток в липидах, которые находятся ближе, чем положение 10, считая с полярной головки, т.е. положения 1 и 8 спиновых меток в пептиде расположены в мембране ближе к поверхности, чем спиновая метка в положении 10 в липиде. В то же время сравнение двух типов данных показало, что положение 4 в пептиде близко по расположению к положению 10 в липиде. Можно сделать вывод, что пептид ориентирован параллельно поверхности мембраны.

Такая картина имеет место при малых соотношениях концентраций пептид : липид, — меньших 1 : 100. С увеличением соотношения до 1 : 20 картина существенно меняется (рис. 7): амплитуда пика для спин-меченого положения 1 заметно уменьшается. Таким образом, с увеличением концентрации пептида он своим *N*-концом погружается глубже в мембрану — переходит в ориентацию, близкую к трансмембранной. Выше отмечено, что при этом наблюдается также его агрегация в виде пар пептидов с широким распределением по расстояниям между спиновыми метками.

Возможно, проницаемость мембраны при включении в ее структуру пептидов связана как раз с такими изменениями супрамолекулярной структуры. Видимо, образование трансмембранного димера может привести к образованию канала в мембране.

Аналогичный подход использован авторами работы [106], изучавшими на модельных мембранах локализацию двух пептидов-антибиотиков — 26-мера пептида натурального происхождения мелиттина и 15-мера синтетического пептида. К *N*-окончанию пептидов присоединяли спиновую метку (в отличие от исследования [105] использовали пептиды, меченные лишь по одному положению). Мембраны гидрировали тяжелой водой либо использовали мембраны с дейтерозамещенными липидами, гидрированные обычной водой. Сравнение пиков дейтериевой ESEEM с пиками для спин-меченых в разных положениях липидов показало, что *N*-окончание пептидов лежит на поверхности мембраны. Увеличение концентрации немеченых пептидов приводило к заметному проникновению воды внутрь мембраны, что регистрировали по увеличению дейтериевых пиков для меченых липидов. Это свидетельствует о том, что проницаемость мембран определяется концентрацией пептидов.

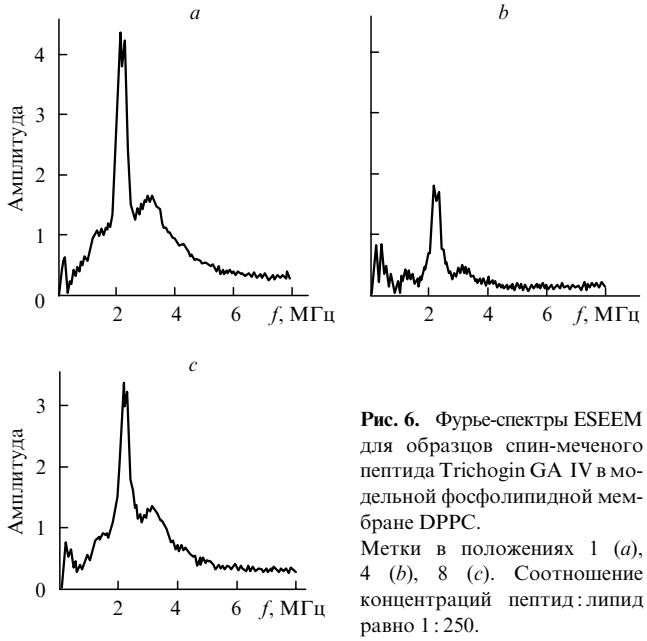


Рис. 6. Фурье-спектры ESEEM для образцов спин-меченого пептида Trichogin GA IV в модельной фосфолипидной мембране DPPC.
Метки в положениях 1 (*a*), 4 (*b*), 8 (*c*). Соотношение концентраций пептид : липид равно 1 : 250.

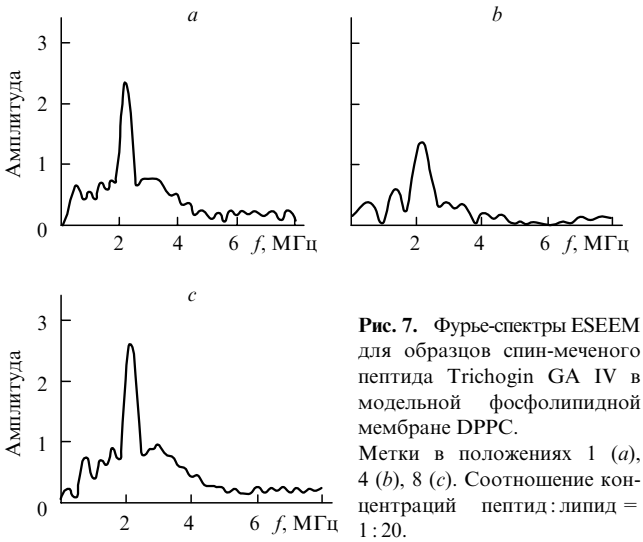


Рис. 7. Фурье-спектры ESEEM для образцов спин-меченого пептида Trichogin GA IV в модельной фосфолипидной мембране DPPC.
Метки в положениях 1 (*a*), 4 (*b*), 8 (*c*). Соотношение концентраций пептид : липид = 1 : 20.

7. Структурные исследования спин-меченых фотосинтезирующих реакционных центров

Сравнительно недавно с помощью методов спинового мечения избранного места и импульсного ЭПР стали исследовать супрамолекулярную структуру фотосинтезирующих реакционных центров растений и бактерий. Авторы работы [107] использовали метод PELDOR. Метку MTSL пришивали к цистеиновому остатку в положении 156 белка *H* реакционного центра бактерий *Rhodobacter sphaeroides* R26. Расстояние между спиновой меткой и первичным хинонным акцептором электронов Q_A было найдено равным 3.05 ± 0.05 нм. Результаты измерений сравнивали с данными расчета методом молекулярной динамики. Сделан вывод, что полученная точность измерений вполне достаточна, чтобы в будущих исследованиях обнаружить структурные изменения, которые можно ожидать при переносе электрона.

V. Исследование динамики спин-меченых систем

1. Вращение метильных групп нитроксильных радикалов

Парамагнитный фрагмент NO нитроксильных радикалов чаще всего экранируют 4 метильные группы. Вращение метильных групп оказывает хотя и небольшое, но часто заметное влияние на форму спектров ЭПР. Поэтому для грамотного использования метода ЭПР спиновых меток и

зондов необходима информация о параметрах этого движения. Лишь совсем недавно появились работы, в которых для ряда нитроксильных радикалов в широкой температурной области определены времена корреляции движения и амплитуда возникающих при этом флуктуаций СТВ. Исследования были выполнены на основе описанного выше эффекта модуляции ЭСЭ, возникающего из-за спонтанного изменения магнитных параметров радикалов под действием трехимпульсной последовательности стимулированного ЭСЭ.[42–44]

Результаты фурье-преобразования спада сигнала стимулированного ЭСЭ при 77 и 90 K показали[42] для ряда нитроксильных радикалов в стеклах толуола, этанола и водно-глицериновой смеси (1 : 1) появление интенсивных пиков в широкой области частот — от 0 до 15 МГц. Причем пик при 15 МГц, который обусловлен взаимодействием с протонами матрицы, от величины T не зависел, в то время как пики на более низких частотах с увеличением T заметно увеличивались. Этот эффект приписан вращению метильных групп. В контрольном эксперименте для нитроксильного радикала соли Фреми, в составе которой метильных групп нет, не было обнаружено и эффекта.

В работе[43] для нитроксильных радикалов в *о*-терфениле и глицерине в интервале температур 120 – 260 K были также обнаружены интенсивные пики, увеличивающиеся с повышением T. Этот эффект был приписан релаксации протонов метильных групп. Из кинетики роста пика была найдена скорость релаксации ядер. С использованием теории Рэдфильда[20] из скорости релаксации было определено время корреляции вращения метильных групп. Получены аррениусовские параметры этого вращения — величина энергетического барьера в интервале 1300 – 1500 K и предэкспоненциальный множитель порядка 10^{12} $с^{-1}$.

2. Малоамплитудная быстрая ориентационная подвижность спиновых зондов в молекулярных стеклах

Картина трансформаций спектра с увеличением τ, представленная на рис. 4, соответствует модели малоамплитудных стохастических либраций. Для них анизотропия релаксации определяется формулой (4). Результаты расчета по этой формуле и экспериментальные данные прекрасно согласуются между собой.[22] Причем в расчетах всей совокупности записанных при разных τ спектров был использован практически лишь один подгоночный параметр — произведение $\langle\alpha^2\rangle\tau_c$, которому пропорциональна скорость релаксации $\langle\Delta\omega^2\rangle\tau_c$.

Спектры стационарного ЭПР также согласуются с моделью быстрых малоамплитудных движений.[108] Отметим, что для описания эксперимента в стационарном ЭПР в застеклованных жидкостях и других неупорядоченных системах часто используются такие модели движения, как непрерывная броуновская диффузия в угловом пространстве или дискретные скачки на произвольный или фиксированный угол (с учетом и без учета анизотропии движения).[109] В соответствии с этими моделями предполагается неограниченное в угловом пространстве движение молекул. Однако имеется ряд данных, противоречащих неограниченности движения. Например, если поляризованным светом «выжечь» определенную ориентацию фоточувствительных молекул, то можно проследить, как возникший в спектре «провал заплывает» со временем.[110] В таком эксперименте непосредственно измеряют скорость неограниченного углового движения. Оказывается, что найденная скорость на много порядков меньше скорости, полученной из анализа спектров ЭПР аналогичных по размеру спиновых зондов. Поэтому, несмотря на часто неплохое согласие теории и эксперимента,[109] модели с неограниченными движениями не подходят для описания движения в высоковязких средах и молекулярных стеклах.

Поведение спектров ЭД ЭПР с увеличением τ, отраженное на рис. 4, типично для спиновых меток и зондов в неупорядоченных средах, включая биосистемы. Более того, оно характерно и для парамагнитных частиц других типов, обладающих анизотропными спектрами ЭПР, — таких как комплексы металлов,[111] семихинонные радикалы в ЭПР высоких полей,[112] молекулы в возбужденных триплетных состояниях.[113] Становится понятно, что речь здесь идет о некоторых универсальных фундаментальных закономерностях динамики молекул в таких системах. Необычность динамики молекул в неупорядоченных средах давно замечена в исследованиях, проводившихся с привлечением разных физических методов — рассеяния света,[114] спектроскопии одиночной молекулы,[115] диэлектрической релаксации,[116] рассеяния нейтронов,[117] мёссбауэровского поглощения[118] и др. Несмотря на обилие экспериментальных данных, определенных выводов о природе наблюдаемых явлений сделать пока не удалось.

Метод ЭД ЭПР позволил получить ряд интересных данных о свойствах наблюдаемого движения. Само наличие

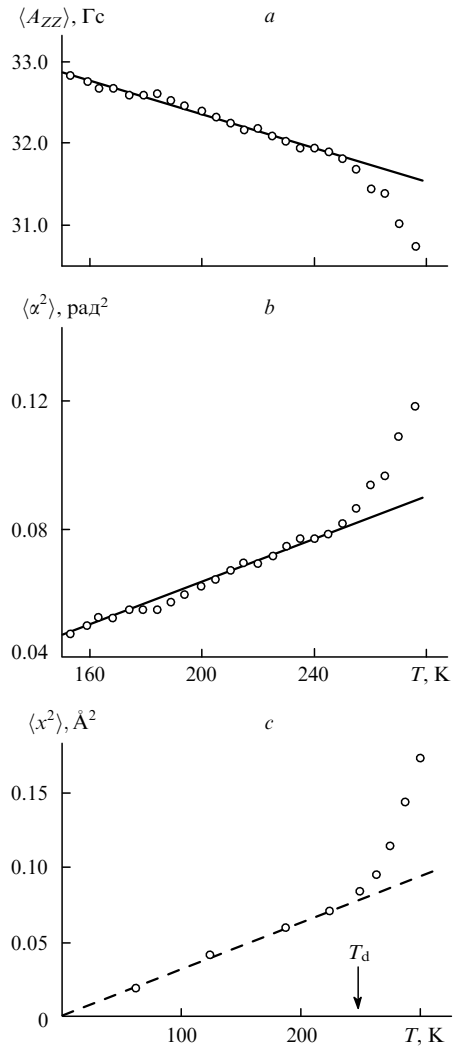


Рис. 8. Типичные температурные зависимости величины расщепления в спектре $\langle A_{ZZ}\rangle$ (см. рис. 1) для нитроксильных спиновых зондов в *о*-терфениле (*a*), среднеквадратичных углов отклонения от положения равновесия, полученные из соотношения (5), (*b*) и среднеквадратичных флуктуаций атомов относительно положения равновесия $\langle x^2\rangle$, полученные методом рассеяния нейтронов (*c*).
T_d — температура динамического перехода.

эффекта анизотропной релаксации в ЭД ЭПР говорит о том, что в системе реализуется ориентационное движение молекул как целого. Исследование динамики спиновых зондов разной структуры и в разных стеклующихся растворителях [119] позволило с определенностью установить, что движение зависит не от типа зонда, а от природы растворителя. В этих исследованиях применяли зонды с размерами, варьируемыми от 0.3 до 5 нм, поэтому понятно, что речь идет о кооперативной динамике молекул, т.е. движение происходит путем коллективных перестроек в молекулярной структуре вещества (имеет супрамолекулярный характер). Размер «задействованного» кластера молекул составляет несколько нанометров. Причем супрамолекулярный характер движения имеет место также и в случае простых низкомолекулярных стекол.

Из спектров стационарного ЭПР (см рис. 1) легко измеряется усредненное за счет быстрых движений главное значение тензора СТВ $\langle A_{ZZ}\rangle$. Типичные для молекулярных стекол результаты измерений приведены на рис. 8,*a*. Видно, что температурная зависимость $\langle A_{ZZ}\rangle$ линейна при низких температурах и становится заметно круче выше некоторой температуры. Из этих данных, используя соотношение (5), можно получить температурную зависимость $\langle \alpha^2\rangle$ (рис. 8,*b*).

3. Динамический низкотемпературный переход в неупорядоченных средах

При изучении колебательного движения атомов в молекулярных неупорядоченных средах (в том числе биологических) методами рассеяния нейтронов [117, 120] и мёссбауэровского поглощения [118] (в последнем случае в веществе присутствуют ионы ^{57}Fe) был обнаружен ярко выраженный переход при повышении температуры от гармонического движения к ангармоническому. Этот эффект проявляет себя как переход от линейной температурной зависимости измеряемого в этих методах среднеквадратичного смещения атомов $\langle x^2\rangle$ (что характерно для гармонического движения) к более крутой зависимости при повышении температуры. Причем переход характерен только для неупорядоченного состояния вещества, для кристаллического состояния во всем диапазоне температур имеет место линейная зависимость. Этот переход принято называть динамическим переходом, его температура обозначается как $T_{\rm d}$ (рис. 8,*c*).

Для биосистем $T_{\rm d}$ лежит в интервале 200 – 230 K,[120] причем физиологическая активность биосистем проявляется только выше $T_{\rm d}$. В настоящее время активно исследуются природа этого перехода и его значимость для биосистем. Интересно, что указанные значения $T_{\rm d}$ соответствуют минимальным температурам воздуха на Земле.

Важную информацию о динамике молекул можно получить, применяя метод ЭД ЭПР спиновых меток и зондов. Обращает на себя внимание аналогия между данными ЭПР и метода рассеяния нейтронов, представленными на рис. 8,*b* и *c* соответственно . Эффект рассеяния нейтронов чувствителен к движениям с частотой $>10^9$ с$^{-1}$ (мёссбауэровское поглощение — к движениям с частотой $>10^7$ с$^{-1}$). Эти частоты того же порядка, что требуются в ЭПР для сужения спектров за счет либрационного движения (10^8 с$^{-1}$). Характерные амплитуды движений $\langle x^2\rangle$ (см.[117, 118, 120]) также близки по величине к указанным на рис. 8,*b* значениям $\langle \alpha^2\rangle$ (численные значения $\langle \alpha^2\rangle$ в радианах в квадрате и $\langle x^2\rangle$ в ангстремах в квадрате можно сопоставлять с учетом того, что характерный размер молекулы составляет ~ 1 Å). Данные количественные соответствия дают основание предполагать, что в разных методах речь идет об одном и том же типе движения.

Применимость метода стационарного ЭПР для измерения $\langle \alpha^2\rangle$ ограничена только неполярными средами.

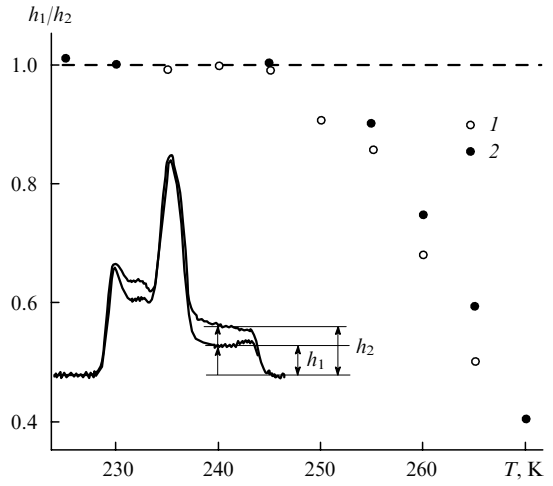


Рис. 9. Типичная температурная зависимость характерных изменений в спектре ЭД ЭПР за счет размораживания стохастических либраций (нитроксильный спиновый зонд в *o*-терфениле).
h_1/h_2 — отношение высот для нормированных на максимум спектров, записанных при разной температуре; h_2 соответствует температуре 230 K, ниже которой спектральные изменения уже не происходят. *1*, *2* — точки, относящиеся к разным нитроксильным радикалам.

В полярных средах на измеряемую величину A_{ZZ} кроме движения также влияет изменение полярности матрицы, что может существенно исказить результаты. В методе ЭД ЭПР данные о движении извлекаются из скорости анизотропной релаксации, на которую полярность матрицы не влияет.

Типичная температурная зависимость характерных изменений в спектрах ЭД ЭПР в молекулярных стеклах, наблюдаемых при изменении температуры, представлена на рис. 9. Эти изменения количественно характеризуются относительной интенсивностью в центре высокопольной компоненты. При низких температурах изменений не происходит, а при повышении температуры наблюдается заметный спад интенсивности.

Для исследованных в работах [121, 122] молекулярных стекол глицерина и *o*-терфенила определены значения $T_{\rm d}$ — 195 и 245 K соответственно. Оказалось, что эти температуры совпадают со значениями $T_{\rm d}$, найденными для этих стекол по рассеянию нейтронов.[117, 123]

Таким образом, метод ЭД ЭПР является чувствительным инструментом определения точки динамического перехода от гармонического движения к ангармоническому (или стохастическому). Другие важные его преимущества — относительная, по сравнению с методами рассеяния нейтронов и мёссбауэровским поглощением, доступность измерений, возможность изучения разных участков сложных супрамолекулярных систем путем спинового мечения избранного места.

Довольно резкий спад температурной зависимости на рис. 9 дает основание предполагать, что сам потенциал, в котором происходит движение, по-видимому, зависит от температуры и выше некоторой температуры его форма меняется. Причем возможны разные варианты — потенциал может стать заметно ангармоническим либо он может начать зависеть от времени стохастическим образом.

Так как потенциал определяется структурой вещества, можно говорить об изменении выше $T_{\rm d}$ так называемого среднего порядка в этой структуре, т.е. корреляций в расположении атомов и молекул в нанометровой шкале расстояний.

4. Динамический низкотемпературный переход в спин-меченых модельных биомембранах

При изучении в модельных фосфолипидных мембранах с большим содержанием холестерина (50 мол.%) динамики липидов DPPC, спин-меченных в разных положениях липидного хвоста, методом ЭД ЭПР обнаружен [124] общий для всех положений динамический переход с T_d в интервале 200 – 230 K. Это совпадает с результатами, полученными методом рассеяния нейтронов.[93] При сопоставлении данных для разных положений метки обнаружено новое явление — в глубине мембраны динамический переход очень растянут по температуре и начинается с 100 – 120 K.

При изучении динамики холестанового спинового зонда (который напоминает по структуре важный компонент мембран холестерин)[125] также установлено наличие низкотемпературных движений в глубине мембраны.

Обнаруженная динамическая неоднородность по глубине мембраны и наличие низкотемпературных движений могут оказаться важными для понимания механизмов ее функционирования. Эти данные могут представлять интерес и с точки зрения развития фундаментальных представлений о возможных механизмах криоконсервации биологических тканей.

5. Динамический низкотемпературный переход в спин-меченых сложных биосистемах, взаимосвязь с функциональной активностью

Интересными объектами для применения метода спиновых меток и зондов являются клетки семян и пыльцы. Они замечательны тем, что могут храниться годами без потери жизнеспособности. Одна из гипотез, объясняющих эту способность, связывает ее с внутриклеточным стеклообразованием. Для спиновых зондов, введенных в клетки семян и пыльцы, ЭД ЭПР показал наличие заметной анизотропной релаксации при $T > 200$ K, что само по себе говорит о стеклообразовании.[126] Эти эффекты сильно зависят от содержания воды в образцах. Такие исследования важны для понимания процессов, определяющих время хранения семян и других биологических объектов.

Методом ЭД ЭПР изучались также спин-меченые по избранному месту реакционные центры, выделенные из фотосинтезирующего аппарата пурпурных бактерий.[127] Такие центры часто используют при изучении фундаментальных процессов в фотосинтезе. С помощью спиновой метки MTSL в этих центрах метили цистеиновые аминокислотные остатки. Вблизи 200 K был обнаружен хорошо заметный динамический переход. Известно, что при этой температуре блокируется перенос фотоиндуцированного электрона по цепи его акцепторов:[128 – 130] вместо того чтобы от первичного хинонного акцептора переноситься дальше к вторичному, электрон возвращается назад и рекомбинирует с «дыркой» — катион-радикалом димера молекул бактериохлорофилла. Природа этого резкого изменения направления переноса электрона до сих пор не выяснена. Более того, вплоть до настоящего времени не были известны какие-либо корреляции этого эффекта со свойствами сложной супрамолекулярной структуры реакционного центра. Результат, полученный методом ЭД ЭПР, указывает на наличие динамического перехода в системе вблизи 200 K.

6. Динамическая структура везикулярных мембран

В работе [49] методом двумерного PELDOR изучено движение холестановых спиновых зондов в многослойных фосфолипидных везикулах в присутствии холестерина. В настоящее время считается, что при наличии холестерина в мембранах кроме обычной жидкокристаллической (которая есть и в отсутствие холестерина) появляется и жидкоупорядоченная фаза. Области упорядочения называют плотами (rafts). Эти две фазы находятся в равновесии между собой, их изучение представляет значительный интерес с точки зрения исследования механизмов функционирования мембран. Визуальное изучение двумерных спектров действительно позволило различить две фазы, отличающиеся скоростью вращательной диффузии и степенью упорядочения молекул. В упорядоченных областях скорости движения липидов и степени их упорядочения оказались выше.

VI. Заключение

Импульсную ЭПР-спектроскопию в методе спиновых меток и зондов стали использовать сравнительно недавно. Применение спектроскопических методов оказалось полезным при изучении конформаций больших биомолекул, их агрегации, наноструктуры веществ, супрамолекулярной структуры многокомпонентных систем, кооперативной ориентационной динамики молекул. В ряде случаев предложенные экспериментальные подходы обладают рекордной разрешающей способностью по сравнению с другими физико-химическими методами исследования. Так, PELDOR обладает высокой чувствительностью к измерению расстояний в нанометровом диапазоне: при расстояниях порядка 3 нм точность измерений может быть не хуже чем 0.1 нм. Метод эходетектируемого ЭПР оказался чувствительным инструментом изучения малоамплитудных стохастических ориентационных движений: вплоть до таких малых амплитуд, как 0.1 – 1°. Этим методом для неупорядоченных молекулярных сред и биосистем можно легко определить точку динамического перехода от гармонического движения к ангармоническому (или стохастическому). В литературе появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что данный переход является очень важной характеристикой живых систем.

Методики импульсного ЭПР непрерывно развиваются и совершенствуются. Важно отметить, что абсолютное большинство из описанных в обзоре результатов были получены (или могли быть получены) на серийных спектрометрах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и NWO (совместный проект 06-03-89 400-HBO_a), CRDF (грант RUC1-2635-NO-05), интеграционного проекта СО РАН № 51.

Литература

1. *Метод спиновых зондов и меток*. (Под ред. Л.Д.Берлинера). Мир, Москва, 1979
2. *Spin Labeling. Theory and Applications, Biological Magnetic Resonance. Vol. 8*. (Ed. L.J.Berliner). Plenum, New York, 1989
3. *Spin Labeling. The Next Millennium, Biological Magnetic Resonance. Vol. 14*. (Ed. L.J.Berliner). Plenum, New York, 1998
4. А.Л.Бучаченко, А.М.Вассерман. *Стабильные радикалы*. Химия, Москва, 1973
5. Л.Б.Володарский, И.А.Григорьев, С.А.Диканов. *Имидазолиновые нитроксильные радикалы*. Наука, Новосибирск, 1988
6. К.М.Салихов, А.Г.Семенов, Ю.Д.Цветков. *Электронное спиновое эхо и его применение*. Наука, Новосибирск, 1976
7. A.Schweiger, G.Jeschke. *Principles of Pulsed Electron Paramagnetic Resonance*. University Press, Oxford, 2001
8. A.D.Milov, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **15**, 107 (1998)
9. *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000
10. С.А.Дзюба. *Успехи химии*, **74**, 686 (2005)
11. T.Prisner, M.Rohrer, F.MacMillan. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **52**, 279 (2001)

12. J.H.Freed. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **51**, 655 (2000)
13. G.Jeschke. *ChemPhysChem*, **3**, 927 (2002)
14. Yu.D.Tsvetkov. In *EPR Instrumental Methods, Biological Magnetic Resonance. Vol. 21.* (Eds C.L.Bender, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2004. P. 385
15. H.J.Steinhoff. *Biol. Chem.*, **385**, 913 (2004)
16. C.Altenbach, T.Marti, H.Khorana, W.L.Hubbell. *Science*, **248**, 1088 (1990)
17. W.L.Hubbell, A.Cross, R.Langen, M.A.Lietzov. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 649 (1998)
18. G.E.Fanucci, D.S.Cafiso. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 644 (2006)
19. L.J.Libertini, O.H.Griffith. *J. Chem. Phys.*, **53**, 1359 (1970)
20. C.P.Slichter. *Principles of Magnetic Resonance*. Springer-Verlag, Berlin, 1996
21. S.A.Dzuba, Yu.D.Tsvetkov, A.G.Maryasov. *Chem. Phys. Lett.*, **188**, 217 (1992)
22. E.P.Kirilina, S.A.Dzuba, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **21**, 203 (2001)
23. А.Д.Милов, К.М.Салихов, М.Д.Щиров. *Физика тв. тела*, **23**, 975 (1981)
24. A.D.Milov, A.B.Ponomarev, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys. Lett.*, **110**, 67 (1984)
25. L.V.Kulik, Yu.A.Grishin, S.A.Dzuba, I.A.Grigoryev, S.V.Klyatskaya, S.F.Vasilevsky, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **157**, 61 (2002)
26. A.A.Dubinskii, Yu.A.Grishin, A.N.Savitsky, K.Mobius. *Appl. Magn. Reson.*, **22**, 369 (2002)
27. K.Sale, L.K.Song, Y.S.Liu, E.Perozo, P.Fajer. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9334 (2005)
28. M.K.Bowman, A.G.Maryasov, N.Kim, V.J.DeRose. *Appl. Magn. Reson.*, **26**, 23 (2004)
29. G.Jeschke, G.Panek, A.Godt, A.Bender, H.Paulsen. *Appl. Magn. Reson.*, **26**, 223 (2004)
30. G.Jeschke, A.Bender, H.Paulsen, H.Zimmermann, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **169**, 1 (2004)
31. A.Weber, O.Schiemann, B.Bode, T.Prisner. *J. Magn. Reson.*, **157**, 277 (2002)
32. G.Jeschke, H.Zimmermann, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **180**, 137 (2006)
33. Ye.Polyhach, A.Godt, C.Bauer, G.Jeschke. *J. Magn. Reson.*, **185**, 118 (2007)
34. V.V.Kurshev, A.M.Raitsimring, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **81**, 441 (1989)
35. S.Saxena, J.H.Freed. *Chem. Phys. Lett.*, **251**, 102 (1996)
36. H.Hara, T.Tenno, M.Shirakawa. *J. Magn. Reson.*, **184**, 78 (2007)
37. Y.W.Chiang, P.P.Borbat, J.H.Freed. *J. Magn. Reson.*, **172**, 279 (2005)
38. M.Bonora, J.Becker, S.Saxena. *J. Magn. Reson.*, **170**, 278, (2004)
39. G.Jeschke, M.Pannier, A.Godt, H.W.Spiess. *Chem. Phys. Lett.*, **331**, 243 (2000)
40. L.V.Kulik, S.A.Dzuba, I.A.Grigoryev, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys. Lett.*, **343**, 315 (2001)
41. L.V.Kulik, S.V.Paschenko, S.A.Dzuba. *J. Magn. Reson.*, **159**, 237 (2002)
42. L.V.Kulik, I.A.Grigor'ev, E.S.Salnikov, S.A.Dzuba, Yu.D.Tsvetkov. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3692 (2003)
43. L.V.Kulik, E.S.Salnikov, S.A.Dzuba. *Appl. Magn. Reson.*, **28**, 1 (2005)
44. Л.В.Кулик, С.А.Дзюба. *Журн. структ. химии*, **45**, 313 (2004)
45. M.M.Hertel, V.P.Denysenkov, V.Bennati, T.F.Prisner. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 248 (2005)
46. E.P.Kirilina, T.F.Prisner, M.Bennati, B.Endeward, S.A.Dzuba, M.R.Fuchs, K.Möbius, A.Schnegg. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, S119 (2005)
47. S.A.Dzuba, E.P.Kirilina, E.S.Salnikov, L.V.Kulik. *J. Chem. Phys.*, **122**, 094702 (2005)
48. P.P.Borbat, A.J.Costa-Filho, K.A.Earle, J.Moscicki, J.H.Freed. *Science*, **291**, 266 (2001)
49. A.J.Costa-Filho, Y.Shimoyama, J.H.Freed. *Biophys. J.*, **84**, 2619 (2003)
50. P.P.Zanker, G.Jeschke, D.Goldfarb. *J. Chem. Phys.*, **122**, 024515, (2005)
51. T.I.Smirnova, A.I.Smirnov, S.V.Paschenko, O.G.Poluektov. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3476 (2007)
52. R.W.Quine, S.S.Eaton, G.R.Eaton. *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 4252 (1992)
53. M.Huber, M.Lindgren, P.Hammarstrom, L.G.Martensson, U.Carlsson , G.R.Eaton, S.S.Eaton. *Biophys. Chem.*, **94**, 245 (2001)
54. C.S.Klug, S.S.Eaton, G.R.Eaton, J.B.Feix. *Biochemistry*, **37**, 9016 (1998)
55. J.S.Hyde, J.J.Yin, W.K.Subczynski, T.G.Camenisch, J.J.Ratke, W.Froncisz. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 9524 (2004)
56. W.K.Subczynski, A.Wisniewska, J.S.Hyde, A.Kusumi. *Biophys. J.*, **92**, 1573 (2007)
57. F.Formaggio, E.Sartori, A.Toffoletti, C.Corvaja, L.Moroder, C.Toniolo. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **527**, 731 (2003)
58. K.M.Salikhov, S.G.Zech, D.Stehlik. *Mol. Phys.*, **100**, 1311 (2002)
59. G.Jeschke, A.Koch, U.Jonas, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **155**, 72 (2002)
60. V.Pfannebecker, H.Klos, M.Hubrich, T.Volmer, A.Heuer, U.Wiesner, H.W.Spiess. *J. Phys. Chem.*, **100**, 13428 (1996)
61. E.Narr, A.Godt, G.Jeschke. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 3907 (2002)
62. J.C.McNulty, G.L.Millhauser. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19.* (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 277
63. A.D.Milov, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov, J.Raap. *Chem. Phys. Lett.*, **303**, 135 (1999)
64. А.Д.Милов, А.Г.Марьясов, Р.И.Самойлова, Ю.Д.Цветков, Я.Раап, В.Монако, Ф.Формаджио, М.Крисма, К.Тониоло. *Докл. АН*, **370**, 265 (2000)
65. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3784 (2001)
66. M.Crisma, V.Monako, F.Formaggio, C.Toniolo, C.George, J.-L.Flippen-Anderson. *Lett. Pept. Sci.*, **4**, 213 (1997)
67. V.Monaco, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, P.Hanson, G.L.Millhauser. *Biopolymers*, **50**, 239 (1999)
68. A.D.Milov, R.I.Samoilova, Y.D.Tsvetkov, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap. *Appl. Magn. Reson.*, **29**, 703 (2005)
69. A.D.Milov, D.A.Erilov, E.S.Salnikov, Y.D.Tsvetkov, F.Formaqqio, C.Toniolo, J.Raap. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 1794 (2005)
70. O.Schiemann, A.Weber, T.E.Edwards, T.Prisner, S.T.Sigurdsson. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3434 (2003)
71. N.Piton, O.Schiemann, Y.G.Mu, G.Stock, T.Prisner, J.W.Engels. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **24**, 771 (2005)
72. O.Schiemann, N.Piton, Y.G.Mu, G.Stock, J.W.Engeels, T.F.Prisner. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5722 (2004)
73. Q.Xu, J.F.Ellena, M.Kim, D.S.Cafiso. *Biochemistry*, **45**, 10847 (2006)
74. D.Hilger, H.Jung, E.Padan, C.Wegener, K.P.Vogel, H.J.Steinhoff, G.Jeschke. *Biophys. J.*, **89**, 1328 (2005)
75. G.Jeschke, A.Godt. *ChemPhysChem*, **4**, 1328 (2003)
76. S.Steigmiller, M.Borsch, P.Graber, M.Huber. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics*, **1708**, 143 (2005)
77. A.T.Fafarman, P.P.Borbat, J.H.Freed, R.Kirshenbaum. *Chem. Commun.*, 377 (2007)
78. Q.Cai, A.K.Kuznetzov, W.L.Hubbell, I.S.Haworth, G.P.C.Gacho, N.Van Eps, K.Hideg, E.J.Chambers, P.Z.Qin. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4722 (2006)
79. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, S.Oancea, C.Toniolo, J.Raap. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 13719 (2003)
80. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Pept. Sci.*, **9**, 690 (2003)
81. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, E.Yu.Gorbunova, L.G.Mustaeva, T.V.Ovchinnikova, J.Raap. *Biopolymers*, **64**, 326 (2002)
82. А.Д.Милов, Р.И.Самойлова, Ю.Д.Цветков, К.Пегион, Ф.Формаджио, К.Т.Тониоло, Я.Раап. *Докл. АН*, **406**, 341 (2006)
83. S.Schlick. *Ionomers*: *Characterization, Theory and Applications*. CRC-Press, Boca Raton, 1996

84. A.Eisenberg, J.-S.Kim. *Introduction to Ionomers*. Wiley-Interscience, New York, 1998
85. M.Pannier, V.Schadler, M.Schops, U.Wiesner, G.Jeschke, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **33**, 7812 (2000)
86. M.Pannier, M.Schops, V.Schadler, U.Wiesner, G.Jeschke, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **34**, 5555 (2001)
87. G.Jeschke. *Macromol. Rapid Commun.*, **23**, 227 (2002)
88. D.Baute, V.Frydman, H.Zimmermann, S.Kababya, D.Goldfarb. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 7807 (2005)
89. S.Ruthstein, V.Frydman, D.Goldfarb. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 9016 (2004)
90. S.Ruthstein, V.Frydman, S.Kababya, M.Landau, D.Goldfarb. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 1739 (2003)
91. J.Y.Zhang, P.J.Carl, H.Zimmermann, D.Goldfarb. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 5382 (2002)
92. K.Aman, E.Lindahl, O.Edholm, P.Hakansson, P.-O.Westlund. *Biophys. J.*, **84**, 102 (2003)
93. J.Fitter, R.E.Lechner, N.A.Dencher. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8036 (1999)
94. J.Milhaud. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, **1663**, 19 (2004)
95. S.Y.Bhide, M.L.Berkowitz. *J. Chem. Phys.*, **123**, 224702 (2005)
96. R.Bartucci, R.Guzzi, D.Marsh, L.Sportelli. *Biophys. J.*, **84**, 1025 (2003)
97. V.Noethig-Laslo, P.Cevc, D.Arcon, M.Sentjurc. *Origins Life Evol. Biosphere*, **34**, 237 (2004)
98. V.Noethig-Laslo, P.Cevc, D.Arcon, M.Sentjurc. *Appl. Magn. Reson.*, **27**, 303 (2004)
99. D.A.Erilov, R.Bartucci, R.Guzzi, A.A.Shubin, A.G.Maryasov, D.Marsh, S.A.Dzuba, L.Sportelli. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 12003 (2005)
100. R.Bartucci, D.A.Erilov, R.Guzzi, L.Sportelli, S.A.Dzuba, D.Marsh. *Chem. Phys. Lipids*, **141**, 142 (2006)
101. V.V.Kurshev, L.Kevan. *J. Phys. Chem.*, **99**, 10616 (1995)
102. R.F.Epand, R.M.Epand, V.Monaco, S.Stoia, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1021 (1999)
103. R.D.Kaiser, E.London. *Biochim. Biophys. Acta*, **1375**, 13 (1998)
104. C.Mazzuca, L.Stella, M.Venanzi, F.Formaggio, C.Toniolo, B.Pispisa. *Biophys. J.*, **88**, 3411 (2005)
105. E.S.Salnikov, D.A.Erilov, A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, C.Peggion, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap, S.A.Dzuba. *Biophys. J.*, **91**, 1532 (2006)
106. R.Carmieli, N.Papo, H.Zimmermann, A.Potapov, Y.Shai, D.Goldfarb. *Biophys. J.*, **90**, 492 (2006)
107. I.V.Borovykh, S.Ceola, P.Gajula, P.Gast, H.J.Steinhoff, M.Huber. *J. Magn. Reson.*, **180**, 178 (2006)
108. S.V.Paschenko, Yu.V.Toropov, S.A.Dzuba, Yu.D.Tsvetkov, A.Kh.Vorobiev. *J. Chem. Phys.*, **110**, 8150 (1999)
109. J.S.Hwang, R.P.Mason, L.-P.Hwang, J.H.Freed. *J. Phys. Chem.*, **79**, 489 (1975)
110. A.K.Vorobiev, V.S.Gurman, T.A.Klimenko. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2**, 379 (2000)
111. R.Husted, J.L.Du, S.S.Eaton, G.R.Eaton. *Magn. Reson. Chem.*, **33**, S66 (1995)
112. A.Schnegg, M.Fuhs, M.Rohrer, W.Lubitz, T.F.Prisner, K.Mobius. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9454 (2002)
113. A.Barbon, M.Bortolus, M.Brustolon, A.Comotti, A.L.Maniero, U.Segre, P.Sozzani. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 3325 (2003)
114. N.V.Surovtsev, J.A.H.Wiedersich, V.N.Novikov, E.Rössler. *Phys. Rev. B*, **58**, 14888 (1998)
115. E.Barkai, A.V.Naumov, Yu.G.Vainer, M.Bauer, L.Kador. *Phys. Rev. Lett.*, **91**, 075502 (2003)
116. J.P.Johari. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **279**, 117 (1976)
117. A.Tölle, H.Zimmermann, F.Fujara, W.Petry, W.Schmidt, W.Schober, J.Wuttke. *Eur. Phys. J., B*, **16**, 73 (2000)
118. F.G.Parak. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 552 (2003)
119. E.P.Kirilina, I.A.Grigoriev, S.A.Dzuba. *J. Chem. Phys.*, **121**, 12465 (2004)
120. G.Galiskan, R.M.Briber, D.Thirumalai, V.Garein-Sakai, S.A.Woodson, A.P.Sokolov. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 32 (2006)
121. S.A.Dzuba, E.P.Kirilina, E.S.Salnikov. *J. Chem. Phys.*, **125**, 054502 (2006)
122. S.A.Dzuba, E.S.Salnikov, L.V.Kulik. *Appl. Magn. Reson.*, **30**, 637 (2006)
123. J.Wuttke, W.Petry, G.Coddens, F.Fujara. *Phys. Rev. E*, **52**, 4026 (1995)
124. D.A.Erilov, R.Bartucci, R.Guzzi, D.Marsh, S.A.Dzuba, L.Sportelli. *Biophys. J.*, **87**, 3873 (2004)
125. S.A.Dzuba, H.Watari, Y.Shimoyama, A.G.Maryasov, Y.Kodera, A.Kawamori. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **115**, 80 (1995)
126. J.Buitink, S.A.Dzuba, F.A.Hoekstra, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **142**, 364 (2000)
127. I.V.Borovykh, P.Gast, S.A.Dzuba. *Appl. Magn. Reson.*, **31**, 159 (2007)
128. Q.Xu, M.R.Gunner. *Biochemistry*, **40**, 3232 (2001)
129. M.Bixon, J.Jortner. *J. Phys. Chem.*, **90**, 3795 (1986)
130. G.Feher, M.Y.Okamura, D.Kleinfeld. In *Protein Structure: Molecular and Electronic Reactivity*. (Eds R.Austin, E.Buhks, B.Chance, D.De Vault, P.L.Dutton, H.Frauenfelder, V.I.Goldanskii). Springer-Verlag, New York, 1987. P. 399

SPIN LABEL PROBE METHOD WITH PULSE EPR SPECTROSCOPY

S.A.Dzuba

Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
3, Ul. Institutskaya, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)330–7350

The spin label and probe method with various versions of pulse EPR based on electron spin echo spectroscopy (spin echo decay modulation through electron–nuclear interactions, electron–electron double resonance, echo detected EPR, *etc.*) in considered. It is shown that these methods provide information on the conformations of complex biomolecules, nanostructure of matter, the depth of water penetration into biological membranes, supramolecular structure of multicomponent systems (membrane–peptide, *etc.*), cooperative orientational dynamics of molecules, and dynamic low-temperature transitions in disordered molecular media and biosystems.
Bibliography — 130 references.

Received 17 April 2007