

Динамика воды в бинарных и тройных растворах ДНК и порфиринов

© В.Т. Лебедев, Ю.В. Кульвеллис, Gy. Török*

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН,
Гатчина, Ленинградская обл., Россия

* Research Institute for Solid State Physics and Optics,
Budapest, Hungary

E-mail: kulvelis@pnpi.spb.ru

Методом резонансного нейтронного спин-эха в интервале времени $t = 1-1000$ ps изучена динамика тяжелой воды (20°C) в растворах с полианионными цепями ДНК и тройных системах, содержащих ДНК и отрицательно заряженные тетрафенилпорфины. В диапазоне переданных импульсов $q = 1.3-1.8 \text{ \AA}^{-1}$ наблюдалась диффузионная динамика, причем скорость релаксации находилась примерно на одинаковом уровне в одно-, двух- и трехкомпонентных системах. При импульсе $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ в растворах наряду с релаксацией обнаружена колебательная мода. Введение порфиринов в раствор (1 молекула на 10 пар оснований ДНК) вызывало замедление диффузии и значительное (5–10%) увеличение частоты трансляционных колебаний молекул воды вследствие взаимодействия с молекулами порфиринов.

1. Введение

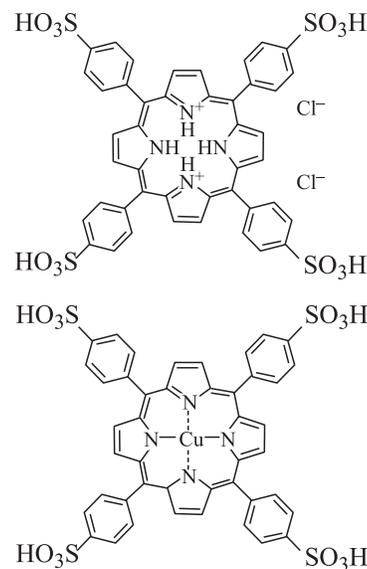
Порфирины — соединения на основе цикла порфина — перспективны для применений в медицине в качестве антивирусных и противоопухолевых средств. Например, сульфированные тетрафенилпорфины проявляют активность против вируса иммунодефицита [1], обладают свойствами фотосенсибилизаторов (уничтожают опухолевые клетки при облучении лазером) [2]. Прогресс в этой области стимулирует постановку нейтронных исследований ассоциации порфиринов и ДНК, их взаимодействия на структуру и динамику воды, способного модифицировать функциональные свойства биомолекул. Как известно, катионные порфирины образуют комплексы с ДНК [3]. В отношении анионов это считалось невозможным до обнаружения адсорбции анионов сульфированных дифталоцианинов металлов на поверхностях отрицательно заряженных модельных биологических мембран [4,5] и ассоциации дифталоцианинов с ДНК в водных растворах [6]. Такое связывание одинаково заряженных молекул анионного порфирина и ДНК может объясняться наличием в порфиринах гидрофобных фрагментов [7,8], возмущающих структуру водородных связей и динамику воды.

Цель работы — определение особенностей динамики воды, обусловленных присутствием в растворе полиэлектролита (ДНК) и сульфированных тетрафенилпорфинов, несущих отрицательный заряд.

2. Экспериментальная часть

Методом резонансного нейтронного спин-эха (спектрометр RSNE, Лаборатория Л. Бриллюэна, Сакле, Франция) [9] изучалась динамика тяжелой воды в системах, приготовленных растворением ДНК (молекулярная масса $M = 1.3 \cdot 10^6$, фирма Sigma, Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes) в D_2O (1 mM NaCl) при введении сульфированных порфиринов (1 молекула порфирина на 10 пар оснований ДНК, табл. 1). Использо-

ваны сульфированный тетрафенилпорфин дигидрохлорид $\text{H}_2\text{TPPS}_4 (\text{HCl})_2$ и сульфированный тетрафенилпорфин меди CuTPPS_4 (USA, porphyrin products: meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine dihydrochloride, Cu(II) meso-tetra(4-sulfonatophenyl) porphine acid form). Химическая структура соединений следующая.



Для оптимизации условий наблюдения динамики в растворах ДНК первоначально измеряли дифракцию нейтронов при переданных импульсах $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2) = 0.3-1.9 \text{ \AA}^{-1}$ (θ — угол рассеяния, $\lambda = 5 \text{ \AA}$ — длина волны нейтрона). Верхний край q -диапазона соответствовал положению характерного для жидкости D_2O дифракционного пика $q_m \sim 2 \text{ \AA}^{-1}$, отвечающего межмолекулярному расстоянию $2\pi/q_m \sim 3 \text{ \AA}$ [10]. Опыты квазиупругого рассеяния (20°C) проводились в диапазоне спин-эхо-времени $t = 0.5-1000$ ps в области $q = 1.3-1.9 \text{ \AA}^{-1}$. В ней рассеяние является интенсивным и отражает как динамику отдельных молекул, так и межмолекулярные корреляции. Результаты для бинарных и тройных растворов сравнивались с данными по динамике чистой D_2O .

Таблица 1. Состав образцов

Номер образца	Состав	Концентрация ДНК, М/л	Концентрация $H_2TPPS_4(HCl)_2$, 10^{-3} М/л	Концентрация $CuTPPS_4$, 10^{-3} М/л
1	D_2O	—	—	—
2	$D_2O + ДНК$	0.015	—	—
3	$D_2O + ДНК + H_2TPPS_4(HCl)_2$	0.015	1.50	—
4	$D_2O + ДНК + CuTPPS_4$	0.015	—	1.50

3. Результаты и их обсуждение

В исследованных системах при импульсах $q = 1.3-1.8 \text{ \AA}^{-1}$ спин-эхо-сигналы $P_{nsc}(q, t) = S(q, t)/S(q, 0)$ — молекулярные корреляционные функции D_2O , нормированные на значения при $t = 0$, затухают во времени ($t \sim 0.5-10 \text{ ps}$), что характеризует диффузию молекул воды и показано на примере раствора ДНК и $CuTPPS_4$ (рис. 1). При $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ кроме диффузии [11] (рис. 2) в динамике растворов обнаружены особенности, связанные с трансляционными колебаниями молекул воды [12] (рис. 3).

Диффузионная динамика при $q = 1.3-1.8 \text{ \AA}^{-1}$ описывается функцией

$$P_{nsc}(q, t) = \alpha \exp(-\Gamma_D t) + (1 - \alpha) \exp(-t/\tau_F). \quad (1)$$

Первое слагаемое с весомым фактором α , описывающее медленную релаксацию за характерное время $\tau_D = 1/\Gamma_D$, соответствует частотной функции рассеяния — лоренциану $S(q, \omega) = 2\Gamma_D/[\omega^2 + \Gamma_D^2]$ с полушириной $2\Gamma_D$. Второе слагаемое характеризует атомные движения на коротких временах $\sim 10^{-14}-10^{-13} \text{ s}$, поэтому использована экспонента $F(t) = \exp(-t/\tau_F)$ с параметром $\tau_F \rightarrow 0$, т.е. „ступенчатая“ функция, $F(t=0) = 1$, $F(t > 0) = 0$. Данные для всех образцов были аппроксимированы функцией (1) с параметрами Γ_D и α .

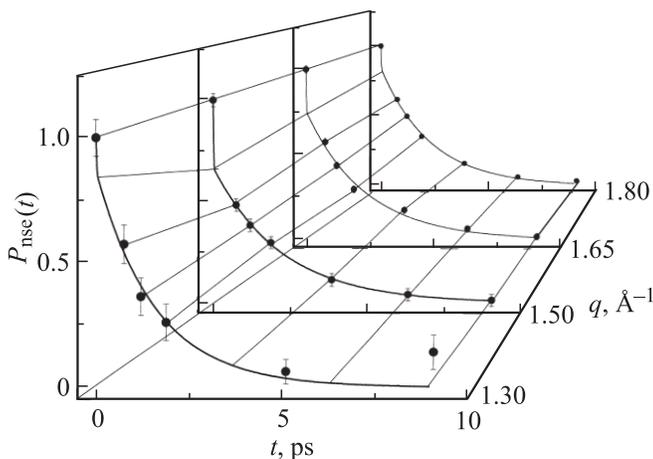


Рис. 1. Зависимость спин-эхо-сигнала от времени при рассеянии нейтронов в растворе ДНК и $CuTPPS_4$ в тяжелой воде при импульсах $q = 1.3-1.8 \text{ \AA}^{-1}$. Линии — аппроксимирующие функции (1).

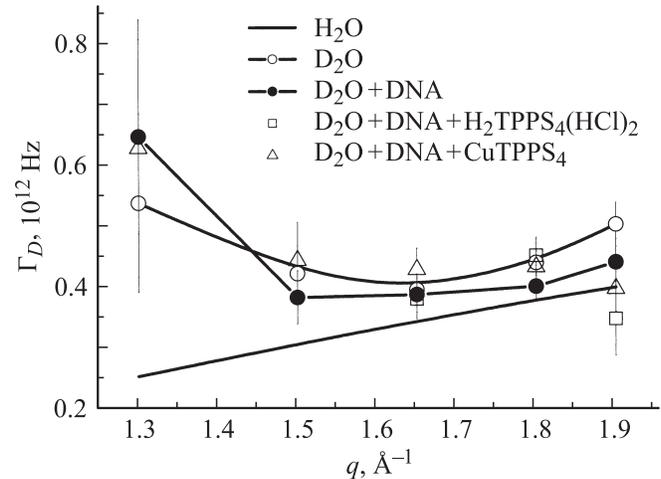


Рис. 2. Ширина спектра квазиупругого рассеяния нейтронов в зависимости от импульса для легкой (линия) и тяжелой (точки) воды в образцах, содержащих D_2O , ДНК, ДНК и порфирины.

Особенности динамики тяжелой воды в растворах ДНК и порфиринов (рис. 2) видны из сравнения параметра $\Gamma_D(q)$ и ширины частотного спектра $\Gamma_H(q) = D_H q^2/[1 + D_H q^2 \tau_H]$ для H_2O ($20^\circ C$, константа трансляционной диффузии $D_H = 2.2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, время локализации молекулы $\tau_H = 1.25$ раз), рассчитанной по данным работы [11]. Во всех системах при $q = 1.3 \text{ \AA}^{-1}$ подвижность молекул D_2O , связанная с индивидуальными и коллективными движениями, выше, чем у отдельных молекул H_2O (рис. 2). Это можно объяснить вкладом трансляционных колебаний (фононы), частоты которых $\omega \sim 1 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$ при таком импульсе втрое больше ширины квазиупругого спектра. С увеличением импульса $q > 1.3 \text{ \AA}^{-1}$ параметры $\Gamma_D(q)$ приближаются к значениям $\Gamma_H(q)$ для H_2O , так как при высоких импульсах фононов не существует.

Данные экспериментов позволили оценить верхнюю границу эффекта влияния ДНК и порфиринов на диффузионную подвижность молекул воды. Как показали расчеты, для средних по диапазону импульсов величин Γ_D влияние молекулярных добавок на подвижность воды достаточно слабое, эффект замедления диффузии не превышает 1–3 статистических ошибок при данной точности эксперимента (рис. 2).

Таблица 2. Параметры функции рассеяния (2)

Образец	α	$\Gamma_D, 10^{12}$ Hz	$\Gamma_V, 10^{12}$ Hz	$\omega_0, 10^2$ Hz	χ^2
D ₂ O	0.66 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.62 ± 0.11	7.61 ± 0.06	1.5
D ₂ O = ДНК	0.61 ± 0.04	0.44 ± 0.04	1.20 ± 0.16	7.60 ± 0.22	0.79
D ₂ O + ДНК + H ₂ TPPS ₄ (HCl) ₂	0.48 ± 0.07	0.35 ± 0.06	1.23 ± 0.19	8.48 ± 0.54	0.69
D ₂ O + ДНК + CuTPPS ₄	0.57 ± 0.04	0.40 ± 0.04	1.21 ± 0.13	7.95 ± 0.31	0.85

Вклад диффузии в спин-эхо-сигнал при импульсах $q = 1.3\text{--}1.8 \text{ \AA}^{-1}$ находится на уровне $\alpha = 60\text{--}90\%$, в среднем составляя $\langle \alpha \rangle \approx 0.8$ во всех растворах, где зафиксированы лишь малые различия величин диффузионных сечений образцов (в пределах 1–2 статистических погрешностей).

Отдельного рассмотрения заслуживает поведение спин-эхо-сигналов при максимальном угле рассеяния $\theta = 98^\circ$, которому соответствует упругий переданный импульс $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2) = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ (рис. 3). Кроме диффузии при $\theta = 98^\circ$ обнаружено неупругое рассеяние с увеличением энергии нейтронов от начального значения $E_0 = 3.3 \cdot 10^{-3}$ eV до $E_1 = 8.3 \cdot 10^{-3}$ eV в результате поглощения квантов энергии $\hbar\omega \sim 5 \cdot 10^{-3}$ eV трансляционных (оптических) колебаний молекул воды. Подобное неупругое рассеяние нейтронов наблюдалось как в легкой, так и в тяжелой воде [13,14]. Данные [12] показывают динамику D₂O и H₂O, которая описывается единой моделью с близкими константами диффузии и частотами мягкой колебательной моды $\hbar\omega_D \sim (4\text{--}5) \cdot 10^{-3}$ eV, $\hbar\omega_H \sim 6 \cdot 10^{-3}$ eV.

Как видно из рис. 3, с увеличением угла рассеяния с 92 до 98° (упругого импульса от $q = 1.8$ до 1.9 \AA^{-1}) происходит качественное изменение динамики D₂O.

При $q = 1.8 \text{ \AA}^{-1}$ спин-эхо-сигнал монотонно затухает, тогда как при $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ он содержит осциллирующую компоненту

$$P_{\text{nse}}(q, t) = \alpha \exp(-\Gamma_D t) + (1 - \alpha) \exp(-\Gamma_V t) \cdot \cos(\omega_0 t). \quad (2)$$

Первая часть выражения (2) описывает диффузию, вторая — колебания (частота ω_0 , ширина линии Γ_V) с параметрами аппроксимации, приведенными в табл. 2. Осциллирующая компонента в уравнении (2) отвечает лоренцевой частотной функции рассеяния, описывающей неупругое рассеяние согласно представлениям и моделям спин-эхо-спектроскопии [15].

Обработка данных нашего эксперимента при $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ проводилась с помощью двух моделей (см. (1), (2)). В случае модели (1) соответствие теоретических и экспериментальных данных плохое, фактор $\chi^2 = 9\text{--}25$ для серии образцов. Модель (2) хорошо описывает данные, $\chi^2 = 0.7\text{--}1.5$ (табл. 2), и ее не требуется модифицировать, вводя компоненту быстрой релаксации. Вклад быстрой релаксации присутствует в сигнале при $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$, как и при меньших импульсах (рис. 3). Она протекает за время $\sim \tau_F \ll t_{\text{min}} = 0.75$ ps,

значительно меньшее минимального спин-эхо-времени в эксперименте t_{min} . Ввиду этого для описания быстрого спада сигнала достаточно варьировать параметр Γ_V , не включая компоненту $\sim \exp(-t/\tau_F)$ в формулу (2). Как показали детальные расчеты, аппроксимация данных с учетом быстрой компоненты $\sim \exp(-t/\tau_F)$ не улучшает согласия эксперимента и расчета, поэтому при обработке данных использовано соотношение (2).

Наиболее статистически значимый результат — обнаруженные корреляции параметров при $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$: между параметром Γ_D , характеризующим скорость диффузии, и частотой молекулярных колебаний ω_0 — уменьшение Γ_D по мере увеличения ω_0 , между диффузионным сечением и скоростью релаксации — уменьшение α при убывании Γ_D (табл. 2).

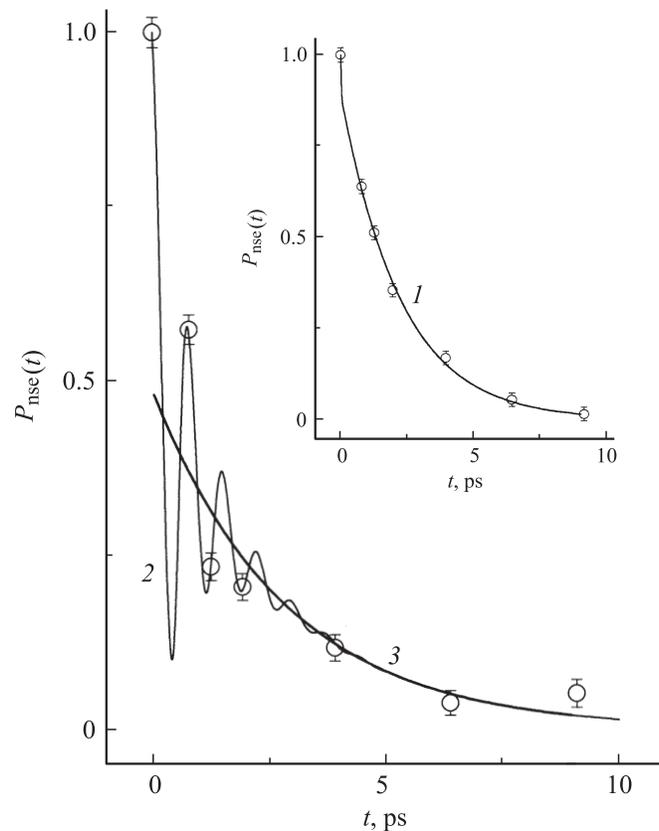


Рис. 3. Сравнение динамики тяжелой воды в растворе ДНК и порфирина H₂TPPS₄(HCl)₂ при упругих импульсах $q = 1.8$ (1) и 1.9 \AA^{-1} (2). Линии — функции аппроксимации (1), (2). 3 — кривая аппроксимации для простой диффузии при $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$.

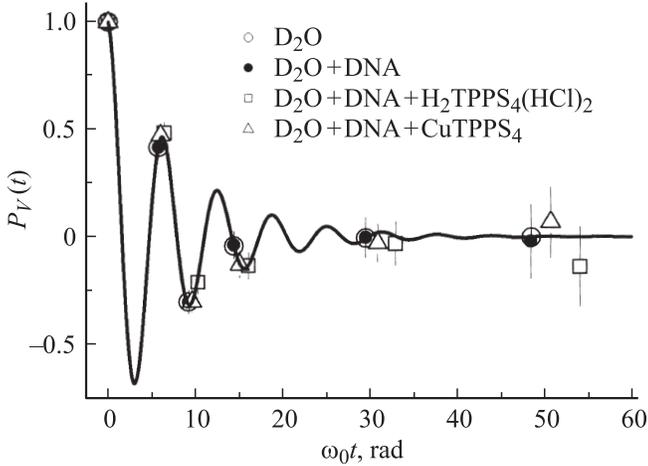


Рис. 4. Спин-эхо-сигнал для колебательной моды. Приведены данные для всех образцов (точки). Линия — аппроксимирующая функция $\exp(-\langle\Gamma_V\rangle t) \cdot \cos(\omega_0 t)$.

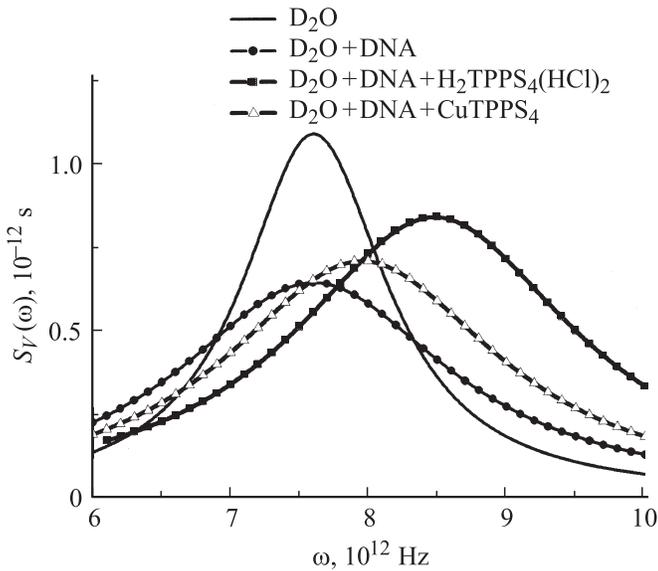


Рис. 5. Частотные спектры осциллирующих мод при значении упругого импульса $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$ в D_2O , бинарных и тройных растворах, построенные в результате Фурье-преобразований временных спектров аппроксимации.

Общее представление о колебательной динамике воды дает рис. 4, на котором построен сигнал $\exp(-\langle\Gamma_V\rangle t) \cdot \cos(\omega_0 t)$, затухание которого задано средней по образцам величиной $\langle\Gamma_V\rangle = 0.96 \cdot 10^{12} \text{ Hz}$.

Частотный спектр колебаний, отвечающий функции (2), $S_V(\omega) = 2(1 - \alpha)\Gamma_V / [(\omega - \omega_0)^2 + \Gamma_V^2]$ различен для изученных систем (рис. 5). Введение ДНК в раствор вызывает уширение линии в ~ 2 раза без смещения частоты. Хотя при добавлении в раствор CuTPPS_4 и $\text{H}_2\text{TPPS}_4(\text{HCl})_2$ ширина линии относительно данных для ДНК существенно не меняется, частота колебаний ω_0

возрастает на 5–10%. Это означает, что молекулы порфиринов упорядочивают водное окружение (рис. 6), что ведет к замедлению диффузии молекул воды (уменьшение Γ_D , табл. 2).

Эффект замедления диффузии при увеличении частоты колебаний молекул является наиболее значимым в растворе с порфирином $\text{H}_2\text{TPPS}_4(\text{HCl})_2$. Усиление взаимодействия молекул (рост частоты колебаний) должно увеличить энергию активации при диффузионном скачке и замедлить диффузию. Действительно, логарифм ширины квазиупругого спектра $\Gamma_D(\omega)$, нормированной на частоту ω_0 , линейно уменьшается с увеличением квадрата частоты колебаний (рис. 6).

На рис. 6 корреляция параметров объясняется в рамках рассмотренной далее модели. Время релаксации $\tau_D = 1/\Gamma_D = \tau_{0D} \exp(E_D/k_B T)$ зависит от энергии активации диффузии E_D и параметра $\tau_{0D} \sim 2\pi/\omega_0$, где $\omega_0 = (K_V/M_W)^{1/2}$ — частота колебаний молекулы воды массой M_W . При движении вдоль некоторого направления x потенциальная энергия молекулы $E(x) = E_D\Phi(x)$ определяется величиной E_D и некоторой функцией $\Phi(x)$, принимающей значения $\Phi(x) = 1$ в точке перехода через барьер ($x = a$) и $\Phi(x) = 0$ в положении равновесия ($x = 0$). Отсюда следует константа жесткости осциллятора $K_V = \gamma E_D$, где $\gamma = d^2\Phi(x=0)/dx^2$. При условии малого количества порфирина в растворе, не возмущающего профиль $\Phi(x)$, логарифм ширины линии $\Gamma_D = 1/\tau_D$, нормированный на частоту ω_0 , связан с квадратом частоты ω_0 линейной зависимостью

$$\ln[\Gamma_D/\omega_0]/(\Gamma_{DW}(\omega_{0W})) = -\{A + B[(\omega_0/\omega_{0W})^2 - 1]\}. \quad (3)$$

Здесь Γ_{DW} и ω_{0W} — параметры для чистой D_2O , A — доля иммобилизованных молекул воды (гидратационная

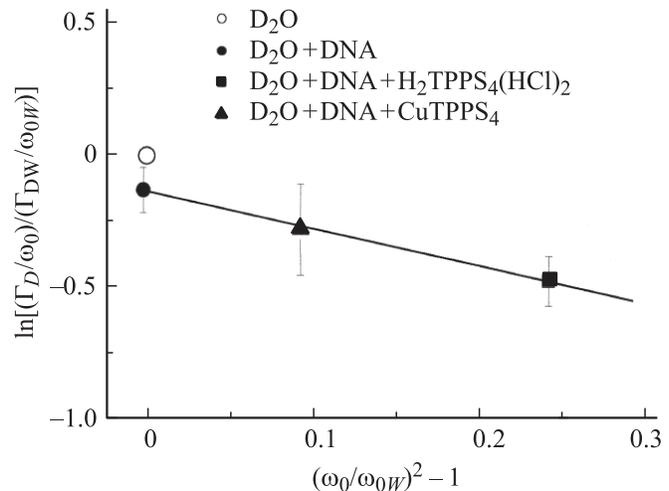


Рис. 6. Корреляция изменения ширины спектра квазиупругого рассеяния и частоты молекулярных колебаний при значении упругого импульса $q = 1.9 \text{ \AA}^{-1}$. Данные нормированы на соответствующие параметры Γ_D и ω_{0W} для тяжелой воды. Прямая линия — аппроксимирующая функция (3).

оболочка ДНК), величина $B = 2K_{VW}/\gamma k_B T$, а K_{VW} — константа жесткости для чистой D_2O . Предложенная модель подтверждена экспериментом (рис. 6), из аппроксимации данных функцией (3) найдены значения $A = 0.14 \pm 0.08$, $B = 1.4 \pm 0.5$.

В растворе ДНК замедление диффузии без изменения частоты колебаний — результат связывания части молекул воды (A) с ДНК при сохранении подвижности остальных как в чистой D_2O . При $t \ll \tau_D$ затухание сигнала $P_{nsc}(t) = A + (1 - A)(1 - t/\tau_{DW}) \approx 1 - t/\tau_{ef}$ определяется временем $\tau_{ef} = \tau_{DW}/(1 - A)$, превосходящим время релаксации τ_{DW} для чистой воды, что приводит к равенству $\ln(\Gamma_D/\Gamma_{DW}) = -\ln(\tau_{ef}/\tau_{DW}) \approx -A$. Объемная доля ДНК в растворе $\varphi_{DNA} = \pi R_{DNA}^2 L_T \approx 0.01$ определяется радиусом $R_{DNA} \approx 1$ nm сечения нити ДНК и общей длиной цепей L_T в cm^3 . Из выражения для объема связанной воды $A = \pi(R_W^2 - R_{DNA}^2)L_T$ следуют величины внешнего радиуса $R_W = 3.9 \pm 1.0$ nm и толщины $R_W - R_{DNA} = 2.9 \pm 1.0$ nm гидратационной оболочки (~ 10 молекулярных слоев).

Связь между диффузией и колебаниями определяется параметром B . В квадратичном приближении $E(x)/E_D = \Phi(x) = \gamma x^2/2$ найдена константа $\gamma = 2K_{VW}/B k_B T = 6.7 \cdot 10^{16} cm^{-2} = 2/a^2$, определяющая размер потенциальной ямы $a = 0.55 \pm 0.10$ Å (порядка радиуса атома водорода), в которой колеблется молекула, совершающая затем скачок длиной $L_D \approx 2a \approx 1.1 \pm 0.2$ Å. Значение диффузионной длины L_D отвечает данным [11], согласно которым $L_D \approx 1.3$ Å.

4. Заключение

Анализ поведения воды в растворах ДНК и тройных системах выявил аномально сильное влияние порфиринов на колебательную динамику и диффузию молекул D_2O . Внедрение молекул порфиринов в сетку водородных связей неизбежно нарушает исходный молекулярный порядок, однако их суммарное действие на водное окружение носит не деструктивный, а организующий характер — водная среда становится более упорядоченной, чем первоначальная структура D_2O . Обнаруженное замедление диффузии ($\sim 30\%$) при одновременном росте частоты молекулярных колебаний ($\sim 10\%$) сопоставимо с эффектом охлаждения чистой воды на $\sim 13^\circ C$ [16]. Вследствие этого *in vivo* возможно замедление скорости химических реакций, изменение функциональных свойств молекулы ДНК, процессов передачи информации и скорости деления клеток. Полученные результаты позволяют приблизиться к пониманию причин антивирусного действия порфиринов, а также известной разницы действия лекарственных препаратов в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Авторы благодарят S. Longeville за техническую помощь.

Список литературы

- [1] A.N. Vzorov, D.W. Dixon, J.S. Trommel, L.G. Marzilli, R.W. Compans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3917 (2002).
- [2] H.I. Pass. *J. Nat. Cancer Inst.* **85**, 443 (1993).
- [3] Б.М. Джагаров, Н.Н. Крук, В.С. Чирвоный, В.А. Галиевский, П.-И. Турпен. В сб.: Успехи химии порфиринов / Под ред. О.А. Голубчикова. НИИХ СПбГУ, СПб (1999). С. 50.
- [4] Г.М. Драбкин, В.С. Забиякин, А.И. Иоффе, А.И. Сибилев, И.К. Марочкина. Предпринт № 1052. ЛИЯФ АН СССР, Л. (1985). 26 с.
- [5] В.В. Клобин, Л.А. Круглова, А.И. Сибилев. *Коллоид. журн.* **53**, 39 (1991).
- [6] Ю.В. Кульвеллис, В.Т. Лебедев, Д. Торок, А.Б. Мельников. *ЖСХ* **48**, 789 (2007).
- [7] Ю.В. Кульвеллис, А.И. Сибилев, В.Т. Лебедев, П.Н. Москалев. 10-й Междунар. семинар „Российские технологии для индустрии, нанотехнологии и оптоэлектроника в биологии, медицине и экологии“. СПб. (2006). С. 59.
- [8] Ю.В. Кульвеллис, В.Т. Лебедев, Д. Торок, А.Б. Мельников. Четвертая Всерос. Каргинская конф. „Наука о полимерах 21-му веку“. М. (2007). Т. 2. С. 396.
- [9] S. Longeville, W. Doster, M. Diehl, R. Gähler, W. Petry. *Lecture notes in physics. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-N.Y.* (2003). V. 601. P. 325.
- [10] M.-C. Bellissent-Funel, T. Tassaing, H. Zhao, D. Beysens, B. Guillot, Y. Guissani. *J. Chem. Phys.* **107**, 2942 (1997).
- [11] J. Teixeira, M.-C. Bellissent-Funel, S.H. Chen, A.J. Dianoux. *Phys. Rev. A* **31**, 1913 (1985).
- [12] S. Longeville, R.E. Lechner. *Physica B* **276–278**, 534 (2000).
- [13] В.Ф. Турчин. Медленные нейтроны. Госатомиздат, М. (1963). 362 с.
- [14] И.И. Гуревич, Л.В. Тарасов. Физика нейтронов низких энергий. Наука, М. (1965). 608 с.
- [15] A. Heidemann, W.S. Howells, G. Jenkin. *Lecture notes in physics. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-N.Y.* (1980). V. 128. P. 123.
- [16] W.S. Price, H. Ide, Y. Arata, O. Soderman. *J. Phys. Chem. B* **104**, 5874 (2000).