



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АТОМАРНОГО ТРИТИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ ТВЕРДЫХ ТЕЛ

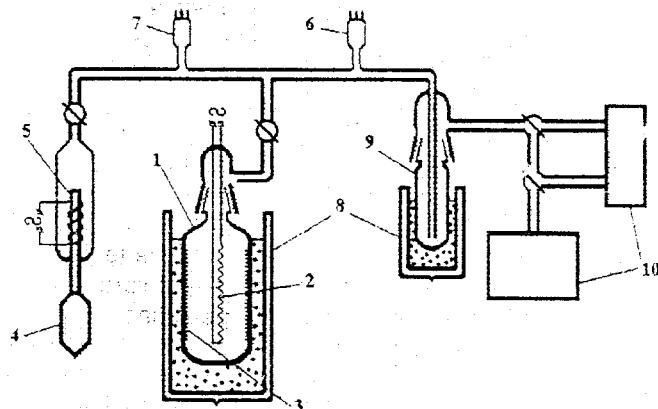
Г.А. Бадун, В.М. Федосеев

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра радиохимии
Воробьевы Горы, 119899 Москва, Россия
E-mail: badun@radio.chem.msu.ru тел/факс (095) 939-3187

Одним из удобных способов получения атомарного водорода в лабораторных условиях является термическая каталитическая диссоциация молекул водорода на вольфрамовом катализаторе при высокой температуре. Достаточно простая лабораторная установка, имеющая в качестве атомизатора водорода вольфрамовую проволоку, нагреваемую электрическим током до 1500 – 2000 К, широко используется для исследования реакций атомарного водорода. Использование трития позволило не только изучить механизм реакций изотопного замещения водорода на тритий в органических молекулах различных классов, но и применить данный метод генерации атомов (в литературе его часто называют методом термической активации трития - МТАТ) для получения меченых биологически активных соединений. В последние годы атомарный тритий, получаемый с помощью термической диссоциации на вольфрамовой проволоке, широко используется для структурных исследований сложных биологических макромолекул и их комплексов. Рассмотрим основные физико-химические процессы, протекающие в описываемой системе, с целью оценки возможностей метода как для получения меченых соединений, так и для проведения структурных исследований.

Наиболее распространенный вариант реакционного сосуда, в котором проводятся исследования с помощью атомарного трития, изображен на рис. 1. Размещение вольфрамовой проволоки вдоль центральной оси цилиндрического сосуда обеспечивает оптимальную доставку атомов с атомизатора на мишень без существенных потерь их энергии, а охлаждение внешних стенок сосуда жидким азотом препятствует сильному разогреванию вещества мишени во время реакции, что позволяет избежать его деструкции в процессе мечения. Были проведены расчеты возможности термализации атомов трития при их перемещении от атомизатора до стенок сосуда за счет столкновений в газовой фазе с молекулами трития. Оказалось, что для типичного реактора цилиндрической формы диаметром 7 см термализация атомов не существенна при давлении менее 0,5 Па. Для давлений больше 3 Па число столкновений так велико, что происходит практически полная термализация атомов. Хотя в области промежуточных давлений спектр атомов отличается от Максвелл-Больцмановского, тем не менее, в качестве энергетической характеристики потока атомов можно использовать некую характеристическую температуру, зависимость которой от давления в сосуде представлена на рис. 2. При давлениях меньше 0,5 Па мы имеем систему, в которой молекулы мишени, охлажденной до низкой (77 К) температуры, подвергаются воздействию потока «горячих» (2000 К) атомов трития.

Атомарный тритий, попадая в мишень, вступает во взаимодействие с ее молекулами. Реакция отрыва водорода от углеводородной группы с последующей рекомбинацией полученного



- 1 - реакционный сосуд
- 2 - вольфрамовая проволока
- 3 - мишень, распределенная по стенкам сосуда
- 4 - ампула с тритием
- 5 - палладиевый натекатель
- 6 - термопарная лампа
- 7 - ионизационная лампа
- 8 - сосуды с жидким азотом
- 9 - ловушка
- 10 - насосы

Рис. 1. Схема установки для введения метки.

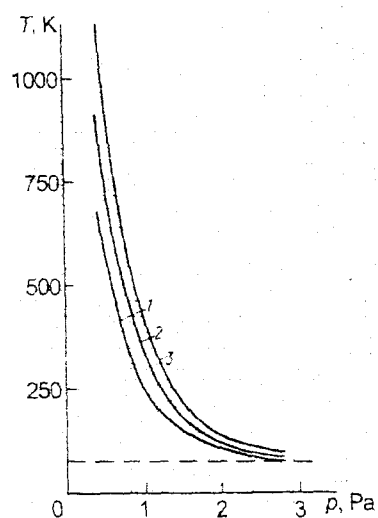


Рис. 2. Зависимость температуры атомов, падающих на мишень, от давления в сосуде (диаметром 7 см); 1, 2, 3 соответствуют температуре атомизатора 1500, 2000, 2500 К.

радикала с другим атомом трития приводит к изотопной модификации молекул мишени и лежит в основе получения меченных тритием соединений с помощью МТАТ. В то же время возможны и другие реакции, в том числе и отщепление функциональных групп (декарбоксилирование, дегалогенирование, замещение на тритий гидроксильной, аминогруппы). В случае получения меченого материнского соединения такие реакции являются побочными, снижают выход основного продукта и усложняют стадии его очистки. Вместе с тем их можно использовать для получения меченых соединений с высокой молярной радиоактивностью путем модификации немеченого предшественника. Скорость реакций и состав продуктов зависят как от состава мишени, так и от условий воздействия атомарного трития на мишень. Для многих органических соединений проведены исследования механизма реакций с атомарным тритием в равновесных температурных условиях (термализованные атомы трития). Оказалось, что реакционная способность атомарного трития в реакции отрыва водорода от углеводородных групп сохраняется даже при низких температурах. Кажущаяся энергия активации реакции уменьшается с уменьшением температуры от величины 20-27 кДж/моль до 1-3 кДж/моль, а для ряда соединений найдено, что ниже 60-80 К скорость реакции перестает зависеть от температуры. Использование дейтерированных соединений в качестве мишени позволило определить кинетический изотопный эффект реакции и при низких температурах он оказался очень велик (>100). Совокупность этих данных позволила предположить, что при низких температурах реакция отрыва атома водорода атомарным тритием происходит преимущественно по туннельному механизму, а при температурах, близких к комнатной, вклад туннелирования в общую скорость реакции тоже существенен.

Так как атомарный тритий поступает в мишень из газовой фазы, одной из важнейших характеристик взаимодействия атомарного трития с молекулами мишени является глубина зоны реакции. Как показывает ряд исследований, мечению подвергаются в основном только те молекулы (или фрагменты макромолекул), которые находятся непосредственно на границе раздела газ – твердое тело. Явление преимущественного включения тритиевой метки в поверхностные участки мишени с одной стороны является существенным ограничением в получении меченого материнского соединения с высокой молярной радиоактивностью. С другой стороны данное явление можно использовать для исследования структурной организации приповерхностных участков твердой мишени. По величине радиоактивности компонентов мишени сложного состава можно однозначно ответить, какие компоненты мишени находились на ее поверхности. На рис. 3 продемонстрировано, как меняется радиоактивность аминокислот норлейцина и аланина в зависимости от того, раствор какой концентрации использовался для приготовления мишени. Растворы выдерживались при комнатной температуре для термодинамического уравнивания, затем быстро замораживались и подвергались процедуре мечения. Как оказалось, радиоактивность аланина растет пропорционально увеличению его концентрации в растворе, тогда как для норлейцина с увеличением концентрации раствора его радиоактивность быстро увеличивается, а при концентрации выше 1 мМ – практически не меняется. Известно, что аланин не обладает поверхностно-активными свойствами, и его

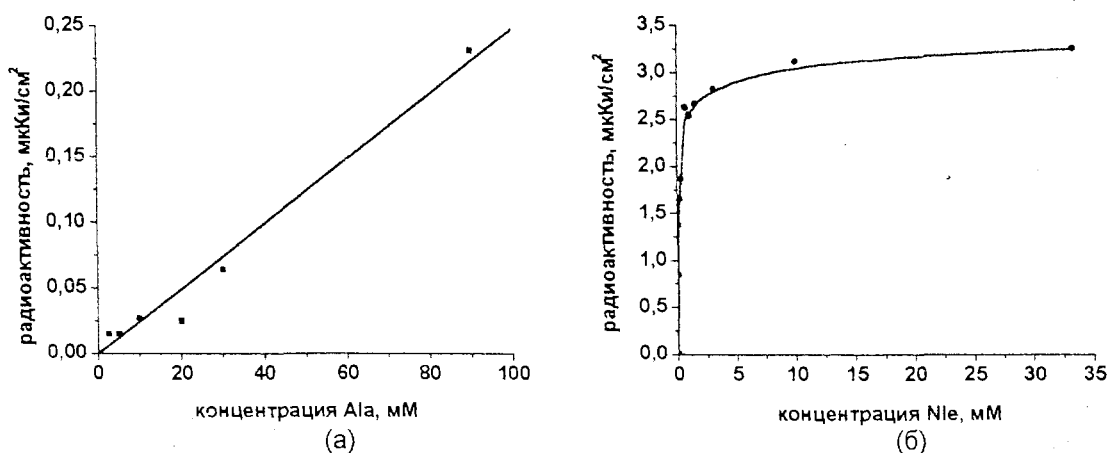


Рис. 3. Зависимость радиоактивности аланина (а) и норлейцина (б) от их концентрации в растворе.

концентрация в приповерхностных слоях практически равна объемной, тогда как для норлейцина характерно образование насыщенного адсорбционного слоя [1]. Полученные данные являются наглядной иллюстрацией использования МТАТ для исследования состава адсорбционных слоев.

В настоящее время атомарный тритий, полученный с помощью МТАТ, широко используется для исследования пространственной структуры биологических макромолекул и надмолекулярных образований. Весь комплекс работ, включающий введение тритиевой метки и последующие процедуры, позволяющие найти распределение трития по компонентам изучаемого объекта, называется методом тритиевой планиграфии. Для белковых молекул глубина зоны реакции оценивается как величина, не превышающая 0,3 нм [2]. Столь малая зона реакции позволяет выявить участки макромолекулы, находящиеся на поверхности, а фрагменты, не содержащие тритий, с уверенностью отнести к находящимся во внутренних областях макромолекулы или на местах контактов макромолекулярных комплексов. При интерпретации многочисленных экспериментальных данных в качестве основного постулата метода тритиевой планиграфии принято положение, что реакция замещения протия на тритий происходит при первом столкновении налетающего атома трития с молекулой мишени. Вместе с тем экспериментальные данные последних лет не могут быть объяснены с использованием столь простого подхода. Характерным примером таких исследований является изучение белков, входящих в состав вируса гриппа, имеющего липидную мембрану [3,4]. Было обнаружено высокое включение трития в поверхностный гликопротеин НА, что легко объяснимо с помощью концепции первого реакционного столкновения. Одновременно было найдено, что матриксный белок М1 также является меченым в значительной степени, хотя по данным других методов белок М1 находится или под липидной мембраной, или во внутреннем сегменте бислоя. Исследование распределения тритиевой метки по компонентам липидного бислоя липосом подтвердило достаточно высокую проницаемость таких образований для атомарного трития. Найдено [3], что отношение молярных радиоактивностей этаноламина, входящего в состав гидрофильной головки липида, для наружного и внутреннего слоев липосомы равно 17 ± 3 .

Известно, что молекулы липида в бислое находятся в упорядоченном состоянии перпендикулярно или под небольшим углом к его поверхности. Длина проекции С-С связи на перпендикулярную поверхности ось составляет 0,125 нм, а толщина бислоя - 5 нм. Вероятно, малая разница в радиоактивности этаноламина в составе липида наружного и внутреннего слоев связана со способностью атомарного трития проникать между молекулами липида. Попробуем оценить, на каких центрах масс может происходить рассеяние атомов трития с тем условием, что радиоактивность продуктов реакции на поверхности мишени и на глубине 5 нм различалась в 17 раз. Будем исходить из того, что эксперимент по введению тритиевой метки в липидный бислой ставился в условиях малой степени превращения молекул мишени, когда радиоактивность меченого продукта пропорциональна скорости реакции. Допустим также, что скорость накопления меченого продукта будет определяться скоростью реакции отрыва атома водорода от молекул

мишени атомарным трением, а зависимость от температуры последней подчиняется закону Аррениуса

$$dc/dt \sim \exp(-E_{\text{акт}}/RT), \quad (1)$$

где $E_{\text{акт}}$ – энергия активации реакции, T – температура, R – универсальная газовая постоянная. Учитывая то, что рассматривается неравновесная система, а энергия атомов трития намного превышает энергию тепловых колебаний молекул мишени, примем в выражении (1) T равной температуре, соответствующей средней энергии атомов трития. В результате нереакционных столкновений с молекулами мишени, имеющими температуру 77 К, атомы трития будут терять энергию. Для оценки термализующих свойств среды воспользуемся понятием логарифмического декремента потери энергии, позволяющего определить среднюю потерю энергии горячего атома: $\xi = 1 + \alpha \ln \alpha / (1 - \alpha)$, где $\alpha = (M - m)^2 / (M + m)^2$, M и m – массы центра рассеивания и атома трития соответственно. Будем также считать, что убыль атомов за счет реакции при прохождении ими липидного бислоя невелика, и в первоначальных расчетах ее не будем учитывать.

При выполнении указанных выше условий отношение радиоактивностей этаноламина в наружном (A_H) и внутреннем (A_B) слоях будет определяться только изменением реакционной способности атомов трития за счет уменьшения их энергии и составит

$$A_H/A_B = \exp(-E_{\text{акт}}/RT_H) / \exp(-E_{\text{акт}}/RT_B) \quad (2)$$

где T_H и T_B – температурная характеристика атомов в соответствующих слоях мишени.

Если при движении через липидный бислой атом трития испытывает z столкновений, то его энергия составит величину

$$E_B = \exp(-z\xi) \cdot E_H \quad (3)$$

Во столько же раз уменьшится и характеристическая температура T_B в выражении (2). Комбинируя выражения (2) и (3) получаем

$$z\xi = \ln(1 + \ln(A_H/A_B) \cdot RT_H/E_{\text{акт}}) \quad (4)$$

При условии свободного пролета атомов трития от вольфрамовой проволоки до мишени $T_H = 2000$ К. Энергия активации реакции отрыва вторичного атома водорода составляет 27,5 кДж/моль. Подставив в выражении (4) численные значения, получим

$$z\xi = 1 \quad (5)$$

Выдвинув условие, чтобы произведение количества рассеивающих центров на длину их проекции на перпендикуляр к поверхности мишени составляло 5 нм, получаем для группы $-(\text{CH}_2)_4-$ ($M = 56$ Дальтон, длина проекции 0,5 нм) $\xi = 0,103$, $z = 9,7$. Это означает, что если в качестве атомной группы, с которой сталкивается атом трития, принять $-(\text{CH}_2)_4-$, то испытает около десяти столкновений при движении вдоль липидных молекул бислоя атомарный тритий потеряет энергию до величины, характеризующейся температурой 714 К, что уменьшает скорость реакции в 17 раз.

Необходимо отметить, что к группе, на которой происходит рассеяние атомарного трития в липидном бислое, следует отнести 8 углеводородных групп в составе двух остатков пальмитиновой кислоты и два остатка глицерина, длина проекции которых также составляет около 0,5 нм. Учитывая то, что рассматривается рассеяние атомов в составе твердого тела, скорее всего надо говорить не о конкретной атомной группе, а о рассеивающем центре с эффективной массой, зависящей от силы внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий в исследуемой системе. Данный расчет, проведенный в рамках теории замедления горячих атомов, дает разумное объяснение высокой проницаемости липидных мембран для атомарного трития. Вероятно, бислоенная липидная мембрана является характерным примером системы, демонстрирующей возможность атомарного трития проникать в среды с пониженной электронной плотностью без потери своей реакционной способности.

Рассмотрим возможные последствия первого столкновения атома трития с мишенью. Потеря энергии при взаимодействии атомарного трития ($m = 3$) с рассеивающим центром массой M зависит от угла рассеяния.

$$\Delta E/E = 2\mu(1 - \cos\theta) \quad (6)$$

где θ – угол рассеяния, $\mu = Mm/(M + m)^2$.

Реакция отрыва атома водорода от молекулы мишени может осуществиться только при лобовом столкновении ($|\theta| \rightarrow \pi$). В случае нереакционного столкновения с углом рассеяния ($|\theta| > \pi/2$) относительная потеря энергии составит от 2μ до 4μ , но атом трития после столкновения покинет мишень. В случае скользящего удара ($|\theta| < \pi/2$) атом проникнет вглубь мишени, однако относительная потеря энергии будет находиться в интервале от 0 до 2μ . Средняя потеря энергии

для диапазона углов рассеяния $|\theta| < \pi/2$ составляет $(\Delta E/E)_{cp} = 0,363\mu$. При рассеивании на атомах водорода $(\Delta E/E)_{cp} = 0,136$, на $-CH_2-$ группах $(\Delta E/E)_{cp} = 0,053$. Это означает, что в случае столкновения, приведшего к проникновению атома трития вглубь мишени, потеря энергии будет небольшой. Если атом внедряется в среду с высокой электронной плотностью, то при следующем столкновении он или вступит в химическую реакцию, или покинет мишень. При наличии полости с достаточно гладкими стенками после первого столкновения атом будет испытывать дальнейшие столкновения с углом отражения $\theta < \pi/2$, то есть проникновение в такие полости будет происходить с минимальной потерей энергии атома («соскальзывание» атомов в полость). Данный эффект может иметь место в случае структурированных объектов с параллельной ориентацией молекул, между которыми имеются области с пониженной электронной плотностью, типичным представителем которых является бислойная липидная мембрана.

Аналогичный эффект наблюдался при исследовании с помощью метода тритиевой планиграфии вируса табачной мозаики (ВТМ). Было обнаружено [2], что включение трития происходит не только в поверхностные аминокислотные остатки S1-S15, S48 – K68 и R141 – T158, но и в остатки V96, P102, T103 и, возможно, T104. По данным рентгеноструктурного анализа (РСА) с разрешением 2,9 Å последние из указанных остатков находятся во внутренней области вириона (рис. 4). Предполагается, что проникновение трития к данным аминокислотным остаткам происходит через зону межсубъединичных контактов, имеющую по данным РСА пониженную электронную плотность. Длина канала составляет около 7 нм, диаметр 0,5 нм, а внутри канала может находиться несколько молекул воды. Количество атомов, достигающих дна канала без столкновений с его стенками, во много раз меньше, чем аналогичное количество атомов, бомбардирующих поверхность мишени. В случае концепции только первого реакционного столкновения радиоактивность аминокислотных остатков на дне рассматриваемого канала должна быть существенно ниже радиоактивности поверхностных остатков, в то время как их удельные радиоактивности оказались близкими. С помощью эффекта «соскальзывания» атомов экспериментальные данные легко объяснимы.

Возможность «соскальзывания» трития в полости маленького сечения надо учитывать при исследовании с помощью МТАТ объектов со сложной топографией. Например, в работе [5] была предпринята попытка определения экспонированности синтезируемой на рибосоме полипептидной цепи по радиоактивности ее участков после реакции с атомарным тритием. Найденное распределение метки по аминокислотным остаткам можно интерпретировать в том числе, как отсутствие препятствия для проникновения атомарного трития в возможный канал для растущей полипептидной цепи транслирующихся рибосом. Геометрические размеры его могут быть таковы, что протеолитическим ферментам пептид недоступен, однако атомарный тритий способен метить его аминокислотные остатки.

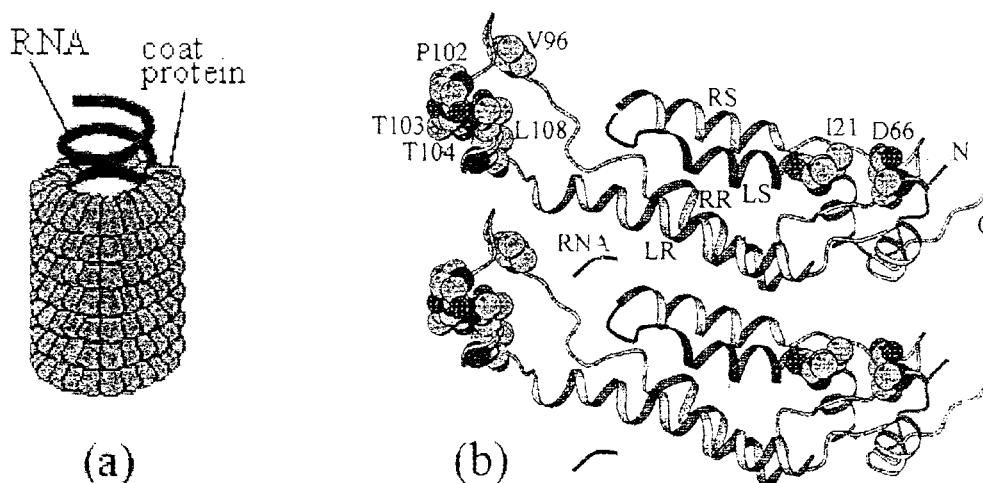


Рис. 4. Вирус табачной мозаики. (а) Схематическое представление. (б) Структура белка оболочки вируса табачной мозаики в составе вирусных частиц. Показаны две белковые субъединицы. Ось вириона находится слева. Полипептидная цепь белка образует четыре крупные α -спирали: LS, RS, LR и RR (left and right slewed, left and right radial) и две маленькие на N- и C-концах молекулы.

Несомненно, для более строгого описания физико-химических процессов, протекающих при взаимодействии горячих атомов водорода с молекулами твердых мишеней, требуются более сложные математические модели, учитывающие квантовые свойства системы и корпоративные взаимодействия в макромолекулах. Учитывая то, что метод тритиевой планиграфии наиболее эффективен в применении к сложным биологическим системам, строгое математическое описание протекающих при мечении процессов практически невозможно. Вместе с тем использование простых моделей с четким пониманием границ их применимости вполне обосновано и позволяет получать уникальные результаты на сложнейших объектах, исследование которых другими методами затруднительно или практически невозможно.

Литература

1. Поверхностно-активные вещества и мощные средства. Справочник под ред. А.А. Абрамзон а. Л.: Химия, 1993.
2. Баратова Л. А., Богачева Е. Н., Гольданский В. И., Колб В. А., Спирин А. С., Шишков А.В. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул. М.: Наука, 1999. 175 с.
3. Ксенофонтов А. Л., Федорова Н. В., Бадун Г. А. и др. // Мол. биол. 1999. Т. 33. С. 881-886.
4. Shishkov, A.V., Goldanskii, V.I., Baratova, L.A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. V. 96. P. 7827-7830.
5. Колб В. А., Коммер А. А., Спирин А. С. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. С. 1497-1501.