

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Вісник Харківського університету № 497

Біофізичний Вісник



2000

Biophysical Bulletin

2000

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направленням установи і експертним висновком, а також електронний варіант статті (у форматі MS Word 6.0 і вище) на дискеті 3,5". Рукописи, які подаються до редакції, повинні точно відповідати наступним вимогам.

Текст друкується на білих аркушах формату А4, через один інтервал, з високою якістю друку, придатною для фотокопіювання (рекомендується лазерний або струйний принтер). Використовується редактор MS Word, шрифт Times New Roman (Cyr), розмір шрифту 10 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем.

Математичні та хімічні символи, рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою комп'ютерної техніки. Рисунки, у вигляді повністю придатному до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки виготовляються з використанням комп'ютерної техніки або виконуються тушшю на білому папері з друкованими цифрами і буквами на осях. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 9 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

Послідовність розміщення матеріалу:

На першій сторінці зверху пропускаються два рядка; на третьому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 9 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 9 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкується за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число - цифрами, місяць - прописом, рік - цифрами (шрифт прямий, 9 pt., вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка вміщується реферат статті, не менше 6 і не більше 12 рядків, з коротким викладом об'єкту дослідження, мети або задач, методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів і висновків. Слово "реферат" не пишеться (для тексту реферату використовується прямий шрифт розміром 9 pt.). На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів (9 pt., заголовок "КЛЮЧОВІ СЛОВА:" пишеться прописом на тому ж рядку, що й ключові слова і виділяється напівжирним шрифтом).

Текст реферату і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Потім, після пропуску одного рядка, вміщується основний текст статті. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ**, **ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ**, **МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються (в назвах розділів усі букви прописні і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу іде один пустий рядок. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться.

У кінці тексту статті, після пропуску одного рядка, якщо необхідно, зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту.

Використані в роботі літературні джерела нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи. Список літератури (шрифт 9 pt.) розміщується одразу за основним текстом статті й виділяється як розділ.

На окремому аркуші з полями справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см до статті додається реферат англійською мовою. Слово "Abstract" не пишеться. Назва статті: прописом, шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру. На наступному рядку - ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру). На наступному рядку друкується повна назва організації та її адреса (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка вміщується текст реферату (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині, без червоного рядка). На наступному рядку після слів "KEY WORDS:" (прописом, шрифт прямий напівжирний, 9 pt.) вміщуються ключові слова (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині).

Для статей написаних англійською мовою, крім окремого реферату англійською мовою, у кінці статті, після списку літератури наводиться реферат українською мовою за тими ж правилами.

Зверніть увагу на компактне викладення матеріалу статті, бо друкування журналу здійснюється на підставі самофінансування.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету
№ 497, 2000

БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК

Заснований у 1998 році

Випуск 2(7)

Харків
2000

Від редакції:

Шановні читачі та автори !

Випуск журналу "БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" є новою серією "Вісника Харківського університету" (ISSN 0453-8048). Періодичність журналу – від двох до чотирьох разів на рік у залежності від набору матеріалу.

"БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" публікує огляди, статті та короткі повідомлення, які містять оригінальні результати вирішення фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної, теоретичної фізики та математичного моделювання. Журнал має традиційні для біофізики підрозділи: МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА, БІОФІЗИКА КЛІТИНИ, БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ, ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООБ'ЄКТИ, МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.

До публікації приймаються статті, що написані українською, російською чи англійською мовами згідно з правилами для авторів і мають позитивні рекомендації двох рецензентів, яких призначає редакція.

Журнал розрахований на науковців, викладачів вузів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики, чи цікавляться біофізичними проблемами.

Запрошуємо до плідного співробітництва!

Редакційна колегія

д.ф.-м.н., проф. Малєєв В.Я. – відповідальний редактор

д.ф.-м.н. Благой Ю.П.
д.б.н. Бондаренко В.А.
д.б.н. Гордієнко Є.О.
д.ф.-м.н. Казанський В.Б.
д.б.н. Кнігавко В.Г.
д.ф.-м.н. Осецький О.І.

д.б.н. Церський Є.Є.
д.ф.-м.н. Семенов М.О.
д.ф.-м.н. Сорокін В.О.
д.ф.-м.н. Товстяк В.В.
д.ф.-м.н. Шкорбатов О.Г.

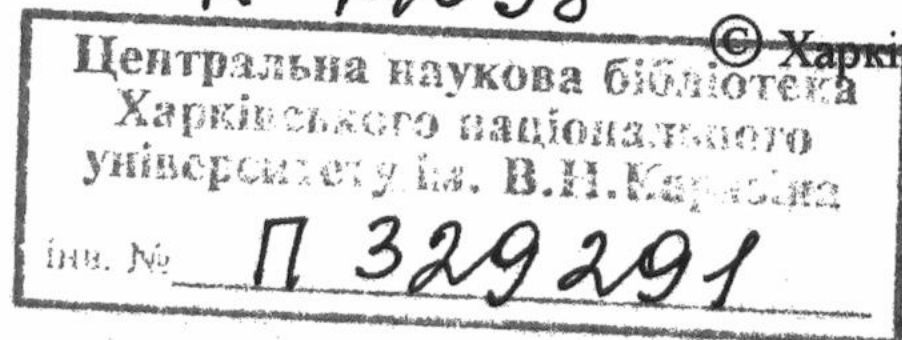
Відповідальний секретар: к.б.н., доц. Гаташ С.В.

Адреса редакційної колегії: 61077, м. Харків, пл. Свободи, 4,
Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, радіофізичний факультет,
кафедра молекулярної та прикладної біофізики,
тел.: (0572)-457576, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

Технічна група: Березняк К.Г., Берест В.П., Жигалова Н.М., Січевська Л.В.

Друкується за рішенням вченої ради Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна
протокол № 9 від 24.11.00

К-14038



© Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, 1998

© Гаташ С.В., 1998 – оформлення

ISSN 0453-8048

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE

Visnyk Kharkivskogo universytetu
№ 497, 2000

BIOPHYSICAL BULLETIN

Founded in 1998

Issue 2(7)

Kharkiv
2000

Dear readers and authors:

BIOPHYSICAL BULLETIN is a new series of *Visnyk* of V.N.Karazin Kharkiv National University. The periodicity of the journal varies from two to four times per year depending on the number of the papers submitted.

The journal publishes reviews, articles, and short communications, that contain original results of solution of physical and mathematical problems corresponding to biological systems of various levels of organization by using the methods of experimental and theoretical physics and biology and mathematical modelling. The journal contains sections, which are traditional for biophysics: MOLECULAR BIOPHYSICS, CELL BIOPHYSICS, BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS, ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS, METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS.

Contributions should be written in English, Ukrainian or Russian according to the Instructions for Authors and would be accepted for publication after the approval of two reviewers appointed by the editors.

You are welcome for fruitful cooperation !

Editorial Board

Editor-in-Chief - Prof. V.Ya. Maleev

Prof. Yu.P. Blagoi,
Prof. V.A. Bondarenko,
Dr. Ye.A. Gordienko
Prof. V.B. Kazanskiy,
Prof. V.G. Knigavko
Dr. A.I. Osetskiy

Dr. Ye.Ye. Perskiy
Dr. M.A. Semenov
Dr. V.A. Sorokin
Dr. V.V. Tovstiak,
Dr. A.G. Shkorbatov

Executive Secretary: Dr. S.V. Gatash

Address: Department of Molecular and Applied Biophysics
School of Radio Physics
V.N.Karazin Kharkiv National University
4 Svobody Sq.,
61077, Kharkov, Ukraine,
phone: 38 0572 45 75 76, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

ЗМІСТ • CONTENTS**МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА • MOLECULAR BIOPHYSICS**

- Волков С.Н.** Моделювання великоамплітудної динаміки структури макромолекул ДНК 7
- Семенов М.А., Сагайдакова Н.Н., Больбух Т.В., Гасан А.И., Круглова Е.Б., Березняк Е.Г., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Овчинников Д.В., Веселков А.Н.** Физические механизмы взаимодействия производных актиноцина с ДНК. 2. Спектроскопическое исследование влияния воды на взаимодействие актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил) амина с тимусной ДНК 16
- Горобченко О.А., Николов О.Т., Гаташ С.В., Берест В.П.** Влияния γ -облучения и температуры на плазму и сыворотку крови по данным СВЧ-диэлектрметрии 24
- Пашинская В.А., Косевич М.В., Степаньян С.Г.** Квантовомеханическое исследование структуры гидратированного бисчетвертичного аммониевого соединения декаметоксина 29

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ • CELL BIOPHYSICS

- Семенова Н.П., Давидовська Т.Л., Філіппов І.Б., Богуцька К.І., Мірошніченко М.С.** Роль іонів Ca^{2+} у регуляції скорочення та розслаблення гладеньких м'язів 35
- Бойко Н.М., Санагурський Д.І.** Вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків риб 42
- Алмазова Е.Б., Румих М.Х., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А.** Влияние температуры на транспорт протонов в эритроцитах 47

**БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ
BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEM**

- Останков М.В., Гордиенко Е.А.** Оптимальный режим быстрого двухступенчатого замораживания клеток костного мозга мыши 52
- Книгавко В.Г., Бондаренко М.А., Буц В.Г.** Диффузия кислорода в злокачественной опухоли на раннем этапе ее развития (этапе сфероида) 55

- Цимбрик А.Є., Санагурський Д.І.** Моделювання динаміки біосинтезу рибофлавіну та його похідних дріжджами при різних внутрішніх параметрах системи 60

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

- Dovbeshko G.I., Kruglova E.B., Paschuk O.P., Alesina M.Yu., Karpenko N.A., Mysnyk A., Novoselets M.** FTIR spectroscopy studies of DNA from low-dose irradiated tissues 65

- Никитченко Ю.В., Овсянников С.Е.** Влияние острого охлаждения на свободнорадикальное окисление липидов в органах молодых и старых крыс 74

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS

- Баранник Е.А., Гирнык С.А., Толстолужский Д.А., Товстяк В.В., Емельянов С.Ю., Марусенко А.И., Сарвазян А.П.** Доплеровская регистрация сдвиговых деформаций в фантомах мягких тканей индуцированных фокусированным ультразвуковым излучением 78

- Косевич М.В., Шелковский В.С.** Прогресс техники биомедицинского масс-спектрометрического эксперимента как пример влияния потребностей общества на развитие науки 84

- Книгавко В.Г., Лесовой В.Н., Радзишевская Е.Б., Пилипенко Н.И., Арсеньев А.В., Книгавко А.В.** Новый метод определения среднего времени транзита радиофармпрепаратов в почках 100

- Тишко Т.В., Титарь В.П., Бархоткина Т.М., Набока А.М., Некрасов В.И., Кудь А.А.** Применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния озонотерапии на форму эритроцитов крови человека 103

- К 70-летию со дня рождения. Владимир Яковлевич Малеев** 112

ABSTRACTS

115

УДК: 539.199+577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

МОДЕЛЮВАННЯ ВЕЛИКОАМПЛІТУДНОЇ ДИНАМІКИ СТРУКТУРИ
МАКРОМОЛЕКУЛ ДНК

С.Н. Волков

Інститут Теоретичної Фізики ім. М.М. Боголюбова НАНУ, вул. Метрологічна 14-б, Київ 03143

Надійшла до редакції 5 жовтня 2000 р.

Виходячи з підходу моделі чотирьох мас, розвиненої раніше для опису низкочастотних коливань подвійної спіралі, і враховуючи природні особливості структури макромолекули показана можливість побудови адекватних моделей великоамплітудної динаміки структурних перетворень ДНК, таких як конформаційний перехід і плавлення. Для можливих траєкторій структурної перебудови одержані вирази для енергії конформаційного збудження у двокомпонентній формі. Визначені параметри кінетичної енергії та вигляд потенційних функцій для моделювання великоамплітудної рухливості ДНК. Показано, що кінетична енергія конформаційного збудження гетерогенної макромолекули може бути приведена до гомогенного вигляду. Зроблено висновок про існування у ДНК двох типів рухливості: чутливого та нечутливого до гетерогенності макромолекули.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: макромолекули, ДНК, гетерогенність, конформаційна динаміка, моделювання

Починаючи з робіт Уотсона і Кріка, модельний підхід у дослідженнях структури і динаміки ДНК був одним з найбільш продуктивних. Застосування таких моделей, як "спіраль-клубок", "пружний стержень" або "намистенкова" [1-7], суттєво поглибили та прискорили дослідження фізичних властивостей макромолекул нуклеїнових кислот та особливостей їх конформаційної механіки. У сучасній молекулярній біології потік структурної інформації неупинно зростає і моделювання може стати чи не єдиним засобом усвідомлення конформаційних можливостей подвійної спіралі ДНК.

Модельний підхід у дослідженнях конформаційної динаміки ДНК має певні переваги перед різноманітними обчислювальними методами. Із-за великої кількості атомів у макромолекулі (а це більш як 60 атомів на мономерну ланку, та ще й молекули розчину і протиіони) обчислювальні методи мають зрозумілі обмеження і у таких роботах звичайно досліджують фрагменти спіралі ДНК довжиною не більше 10-20 пар основ [8-10]. У той же час модельний підхід при вдалому виборі моделі і визначенні її параметрів дозволяє описувати структурні процеси у макромолекулах реальних розмірів і з урахуванням природних факторів.

Розвиток моделювання структурної динаміки ДНК можна умовно розподілити на три етапи. На першому етапі (див. [3-7]) в основному досліджували зовнішню рухливість подвійної спіралі. Цей напрямок, важливий для інтерпретації даних по третинній структурі макромолекули, розвивається ще й зараз (сучасний стан див. у роботах [10-12]). На другому етапі розвитку моделей ДНК більше звертали увагу на дослідження внутрішньої динаміки подвійної спіралі, що було пов'язане з необхідністю інтерпретації даних по низькочастотним коливанням макромолекули [13-15] та флуктуаційній рухливості структурних елементів ДНК [16,17]. Малоамплітудну динаміку структури ДНК, яка відповідає за низькочастотні спектри, моделювали у роботах [18-23]. Для вивчення великомасштабних рухів у структурі ДНК і дослідження можливості реалізації солітонних збуджень у макромолекулі на другому етапі були створені цілий ряд моделей великоамплітудної динаміки макромолекули (див. огляди [24-27], збірник [28] та книгу [29]). На останньому напрямку було виконано досить велику кількість досліджень, але не всі вони досягли реальних результатів (критичний аналіз робіт цього напрямку подано у [25]).

У моделюванні малоамплітудної динаміки структури ДНК високу ефективність продемонстрував підхід динаміки кристалічної ґратки, на основі якого була запропонована модель чотирьох мас для мономерної ланки подвійної спіралі [20-22]. Ця модель дозволила одержати згоду з експериментом і дати інтерпретацію низькочастотним спектрам комбінаційного розсіювання макромолекули. Було також вказано, що у моделі чотирьох мас є можливість зробити перехід до опису великоамплітудних рухів у ДНК [30].

В останні роки у моделюванні структурних перетворень ДНК спостерігається третя хвиля досліджень [10,31-35]. Вона пов'язана з побудовою моделей великомасштабної (або мезоскопічної) динаміки

макромолекули для скороченого опису великоамплітудної рухливості структурних елементів подвійної спіралі і подальшого використання цих моделей у обчислювальних експериментах.

Розвитку моделей для опису великоамплітудної динаміки структури ДНК додає актуальності і поява спостережень великомасштабних перебудов подвійної спіралі при виконанні макромолекулою її біологічних функцій [36,37].

У поданій роботі проаналізовані особливості структурної організації нуклеїнових кислот, запропоновано метод побудови адекватних моделей великоамплітудної рухливості ДНК, показана ефективність підходу динаміки ґратки і можливість його застосування до моделювання структурних перетворень макромолекули ДНК.

Структурна організації макромолекул ДНК і узагальнена модель чотирьох мас

Молекули ДНК це ланцюжкові макромолекули з великою кількістю (10^5 - 10^7) мономерних ланок. Ланцюжки ДНК (тяжі) утворені послідовністю фосфатних груп та п'ятиатомних кілець дезоксирибози. До кілець рибози приєднані нуклеїнові основи, які мають різний склад атомів. Різниця між основами обумовлює гетерогенність первинної структури макромолекули.

У подвійній спіралі нуклеїнові основи різних тяжів за допомогою водневих зв'язків з'єднують ланцюжки макромолекули, утворюючи комплементарні пари А·Т і G·C. Геометрія подвійної спіралі залежить від зовнішніх факторів, але мономерні ланки макромолекули відрізняються дуже мало для пар А·Т або G·C (відхиленням можна знехтувати у порівнянні з величиною геометричного параметру [38]). Тобто, макромолекула ДНК має досить гомогенну вторинну структуру. Це, зокрема, дозволяє використовувати модель пружного стержня для опису таких властивостей, як згинання та скручування ДНК.

Розглянемо структуру подвійної спіралі більш детально. З точки зору механіки макромолекула ДНК це система з двома підґратками. Перша підґратка утворена комплементарними парами нуклеїнових основ, розташованих стопками у центрі спіралі та зв'язаних уздовж ланцюжка ДНК ван-дер-ваальсовими взаємодіями. У формуванні стопок пар ДНК важливу роль відіграють гідрофобні контакти з водним оточенням макромолекули [38-40]. Другою підґраткою фактично є рибозо-фосфатний остів, який представляє собою ланцюжки фосфатних груп та рибозних кілець. Фосфатні групи від'ємно заряджені і для їх стабілізації з розчину підходять протиіони (Na^+ , K^+ та інш.). Таким чином, рибозо-фосфатний остів стабілізується електростатичними взаємодіями, утворюючи зовнішню підґратку, в середині якої розташовується внутрішня підґратка - стопки пар нуклеїнових основ. Обидві підґратки взаємно узгоджують свою конформацію за допомогою гнучких кілець дезоксирибози. Конформаційні перетворення ДНК проходять по певних траєкторіях, у яких зовнішні та внутрішні ступені вільності змінюються зкординовано [38-42].

Наявність внутрішньої та зовнішньої підґраток у структурі ДНК вказує на доцільність використання двокомпонентних моделей при моделюванні конформаційної динаміки макромолекули. Для зовнішньої компоненти можуть бути використані силові константи, відомі для ступенів вільності пружного стержня [5,7,13]. Важливо, що ці константи ефективно враховують вплив розчину на силове поле подвійної спіралі. Силові константи для внутрішньої підґратки можуть бути оцінені по частотам конформаційних коливань і відомим з експерименту бар'єрам переходів, що розглядаються.

У моделюванні конформаційної рухливості ДНК будемо спиратися на підхід, розвинутий нами раніше для опису низькочастотних коливань цих макромолекул [20-22]. Для побудови моделі динаміки макромолекули були виділені основні конформаційні ступені вільності системи, які характеризують рухливість структурних елементів подвійної спіралі. Згідно [20-22] це, по-перше, торсіонна рухливість нуклеїнових основ разом з кільцями цукру у складі нуклеозидів навколо ланцюжків остова - аналог лібрацій у молекулярних кристалах. У цих рухах нуклеозид розглядається як фізичний маятник, прикріплений до ланцюжка остову (Рис. 1а). По-друге, це внутрішньонуклеозидна рухливість, обумовлена зміною конформації нуклеозидів (геометрії кільця рибози та кута гликозидного зв'язку). По-третє, рухливість нуклеотидної ланки (нуклеїнова основа, рибоза та фосфатна група остова) як цілого.

Для опису рухливості структурних елементів ДНК в підході [20-22] використані чотири маси: дві маси маятників-нуклеозидів (m) і дві маси груп атомів остова (m_0) (Рис. 1б). В моделі чотирьох мас можуть бути вираховані усі необхідні параметри (такі, як довжина фізичного маятника-нуклеозида - l_0 , та його кут розташування у площині пари - Θ_0), а також масові коефіцієнти. Для геометрії В-форми ДНК параметри моделі наведені у Табл. 1.

Модель чотирьох мас враховує суттєву властивість макромолекул ДНК - гетерогенність їх мономерного складу. Так, маси нуклеозидів, нуклеотидів ($M = m + m_0$) та їх геометричні параметри залежать від включеної до їх складу нуклеїнової основи (див. Табл. 1).

Моделювання великоамплітудної динаміки структури макромолекул ДНК

Таблиця 1. Параметри моделі чотирьох мас

Основа ДНК	m^* (а.о.м.)	M (а.о.м.)	l_0 (Å)	Θ_0 (град.)
Ade	203(134)	312	5.1	25
Thy	194(125)	303	4.6	35
Gua	219(150)	328	5.4	23
Cyt	179(110)	288	4.5	30

* В дужках подано маси нуклеїнових основ.

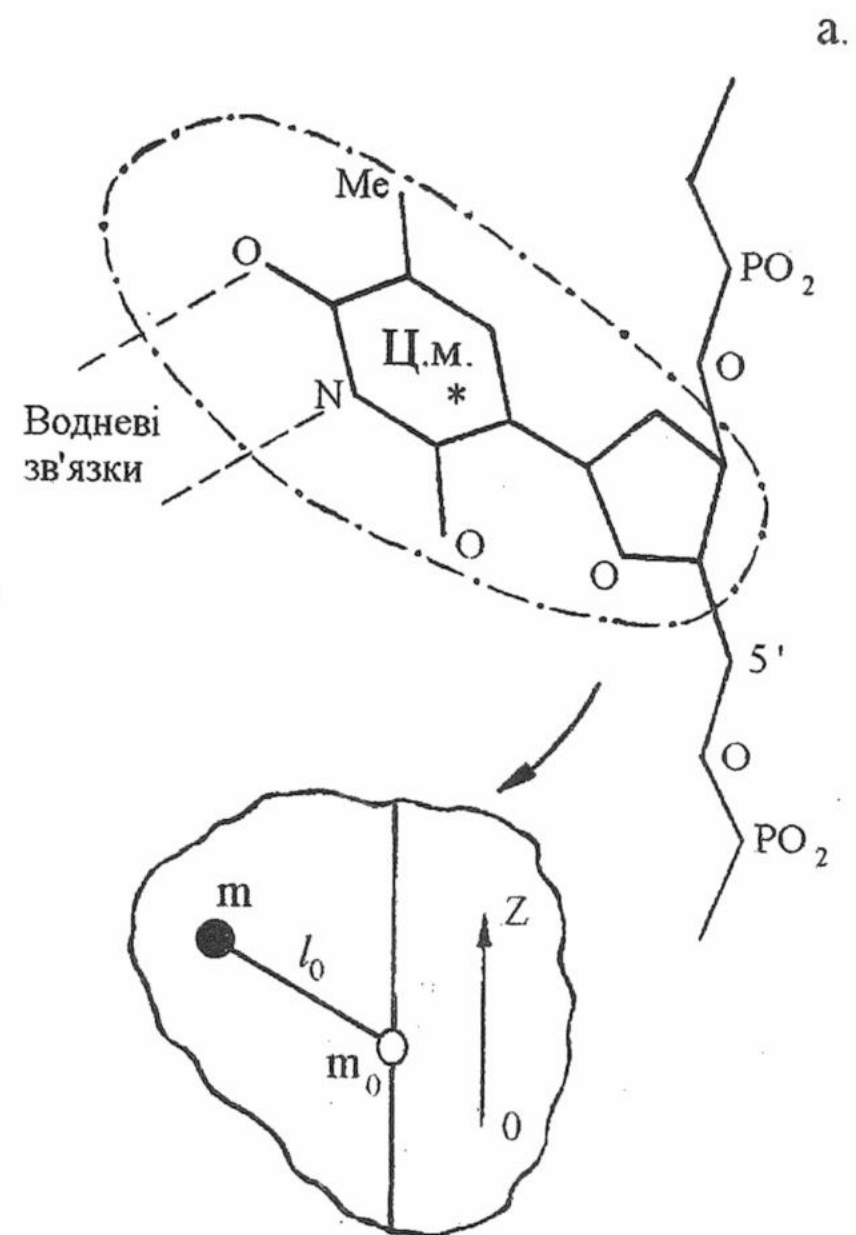
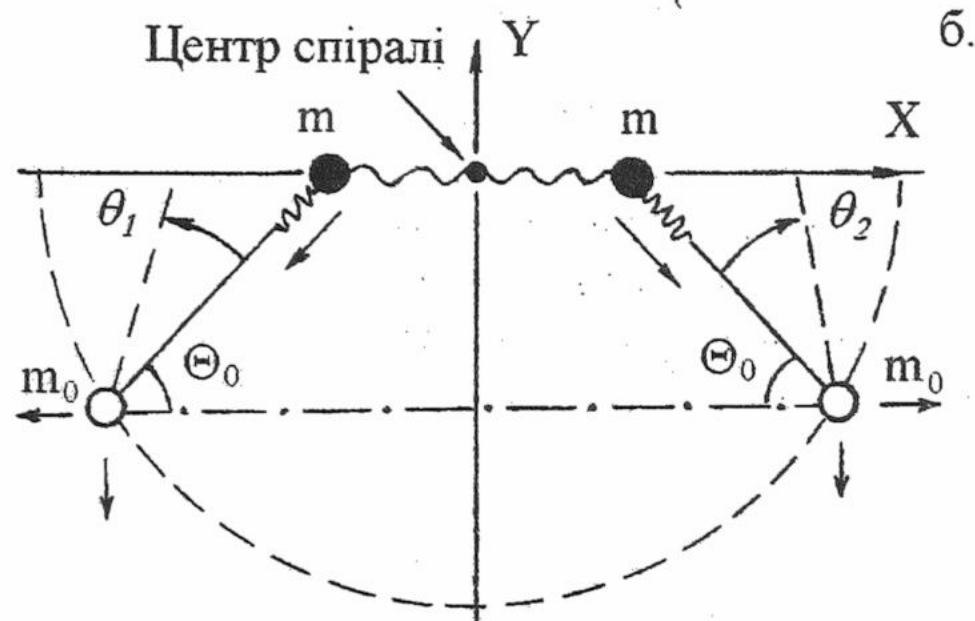


Рис. 1. Модель чотирьох мас для мономерної ланки ДНК: а. - маятник-нуклеозид, * - центр мас нуклеозида; б. - зміщення мас у площині комплементарної пари.

За допомогою розвинутого підходу у гармонічному наближенні були розраховані спектри конформаційних коливань подвійної спіралі ДНК з усередненими по нуклеотидному складу параметрами [21,22]. Відхилення від усередненого значення - похибку гетерогенності оцінили для кожної моди і визначили ступінь залежності конформаційних коливань від гетерогенності. Виконані розрахунки показали, що теорія дає результати, які добре узгоджуються з експериментом.

Одержана згода між теорією і експериментом у дослідженнях малоамплітудної рухливості вказує на можливість використання моделі чотирьох мас для опису великоамплітудної динаміки структурних елементів у макромолекулах ДНК. Але принциповими тут стають труднощі врахування гетерогенності макромолекули. Справа в тому, що до гетерогенності параметрів моделі тут додається ще й суттєва гетерогенність потенційної енергії ДНК, яку для великих амплітуд не можна усереднювати. Як відомо, уотсон-кріківські пари А·Т та Г·С зв'язані різною кількістю водневих зв'язків і для великих амплітуд розтягування значення енергії можуть дуже (до 40%) відрізнятися [43]. Тому у випадку моделювання великоамплітудної динаміки ДНК потрібно вирішувати проблему гетерогенності у кожній моделі безпосередньо.

Виходячи із моделі чотирьох мас розглянемо можливість опису великоамплітудної динаміки подвійної спіралі. Вираз для енергії конформаційних збуджень макромолекули у моделі чотирьох мас запишемо наступним чином:

$$E = \frac{1}{2} \sum_{n,i} \{m_0 \dot{\mathbf{R}}_i^2(n) + m_i \dot{\mathbf{r}}_i^2(n) + U[\mathbf{r}_i(n), \mathbf{R}_i(n)]\}. \quad (1)$$

У виразі (1) сумування ведеться по всіх мономерних ланках (n) подвійного ланцюжка ($i = 1, 2$). Радіуси-вектори $\mathbf{r}_i$ та $\mathbf{R}_i$ описують зміщення центрів мас нуклеозидів та груп остова, відповідно.

Зрозуміло, що рухи структурних елементів подвійної спіралі супроводжуються розтягуванням водневих зв'язків у парах нуклеїнових основ, згинанням та скручуванням остова макромолекули. Беручи до уваги структурну організацію макромолекули, потенційна енергія конформаційних збуджень для n -ої ланки може бути представлена як сума з трьох доданків:

$$U = U_1[n] + U_2[(n, n-1)] + U_3[n(n, n\pm 1)]. \quad (2)$$

Перший доданок у виразі (2) описує енергію, пов'язану з конформаційними змінами безпосередньо у мономерній ланці подвійної спіралі:

$$U_1 = U_{11}[\mathbf{R}_1 - \mathbf{r}_1] + U_{12}[\mathbf{R}_2 - \mathbf{r}_2] + U_{13}[\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2] + U_{14}[\mathbf{R}_1 - \mathbf{R}_2].$$

Ця енергія складається з енергії внутрішньонуклеозидної рухливості - $U_{11} + U_{12}$, енергії розтягування водневих зв'язків у комплементарних парах нуклеїнових основ - U_{13} та енергії взаємодії груп атомів остова різних ланцюжків спіралі - U_{14} . Останньою складовою енергії можна знехтувати, тому що взаємодія між масами остову в мономерній ланці значно менша ніж та ж взаємодія уздовж тяжа макромолекули (відповідні відстані відрізняються більш як у два рази [38]).

Доданок U_2 у виразі (2) описує енергію взаємодії найближчих сусідів уздовж макромолекули. Звичайно, наближення найближчих сусідів достатньо для опису основних ефектів у структурній динаміці макромолекул ДНК. Таке обмеження обумовлене труднощами оцінки енергії взаємодії більш далеких сусідів.

Останній доданок - U_3 описує енергію взаємозв'язку між компонентами. Цей доданок враховує відому для макромолекул ДНК властивість: при зміні конфігурації мономерної ланки зміниться і її розташування у подвійному ланцюжку спіралі [38,41]. Цей доданок є суттєвим тільки для значних по амплітуді зміщень структурних елементів і його вигляд залежить від траєкторії конформаційного руху, що розглядається.

Вигляд енергії (1,2) є дуже складним для моделювання. По-перше, це - векторний характер зміщень, який обумовлює необхідність побудови силового поля для всіх компонент. По-друге, це - гетерогенність як кінетичної так і потенційної енергії, що робить аналітичні дослідження практично неможливими. Але, як відомо (див. [38,41,42,44]), у великомасштабних трансформаціях ДНК, таких як конформаційні переходи із однієї форми макромолекули до іншої, або у процесах розкриття подвійної спіралі структурні елементи мономерної ланки рухаються сумісно за певними траєкторіями. Тому при моделюванні великоамплітудної динаміки ДНК доцільно у моделі чотирьох мас перейти до опису сумісних рухів структурних елементів мономерної ланки.

Конформаційні переходи

Розглянемо можливість опису динаміки конформаційних переходів в ДНК. У цих структурних трансформаціях звичайно змінюються зовнішні параметри подвійної спіралі, такі як кут закрутки та крок спіралі [38,41]. Для внутрішньої підґратки характерне переміщення нуклеїнових основ у парах поперек спіралі ДНК [38,41,44].

Для опису рухливості структурних елементів ДНК у конформаційних переходах введемо зміщення центру мас пари нуклеозидів ($\mathbf{r}_p$) та центру мас остова ($\mathbf{r}_q$), а також зміщення нуклеозидів та мас остову відносно один одного у мономерній ланці (δ та Δ):

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_p &= \frac{m_1 \mathbf{r}_1 + m_2 \mathbf{r}_2}{m_p}, & m_p &= m_1 + m_2; \\ \delta &= \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2, & \mu_p &= m_1 \cdot m_2 / m_p, \end{aligned} \quad (3)$$

де m_p, μ_p - маса пари нуклеїнових основ та приведена маса мономерної ланки.

Відповідно для мас остову:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_q &= \frac{1}{2} (\mathbf{R}_1 + \mathbf{R}_2), & m_q &= 2m_0; \\ \Delta &= \mathbf{R}_1 - \mathbf{R}_2, & \mu_q &= \frac{1}{2} m_0. \end{aligned} \quad (4)$$

В позначеннях (3,4) вираз для кінетичної енергії системи приймає вигляд:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \left\{ m_p \dot{\mathbf{r}}_p^2(n) + m_q \dot{\mathbf{r}}_q^2(n) + \mu_p \dot{\delta}^2(n) + \mu_q \dot{\Delta}^2(n) \right\}. \quad (5)$$

Привертає увагу той факт, що після переходу до сумісних рухів у виразі для кінетичної енергії (5) фігурують масові коефіцієнти, які фактично не залежать від гетерогенності мономерного складу макромолекули ДНК. Розрахунок значень цих коефіцієнтів подано у Табл. 2.

Моделювання великоамплітудної динаміки структури макромолекул ДНК

Таблиця 2. Параметри моделі конформаційних переходів у ДНК

Пара основ	m_p (а.о.м.)	m_q (а.о.м.)	μ_p (а.о.м.)	μ_q (а.о.м.)	M (а.о.м.)	m (а.о.м.)	I_{0Z} (10^{-37} г·см ²)
A·T	259	218	99.2	54.5	615	140.7	33.7
G·C	260	218	98.5	54.5	616	140.8	34.5

Для подальшого аналізу доцільно виділити зміщення центру мас мономерної ланки ($\mathbf{R}$) та зміщення центру мас пари відносно мас остова ($\mathbf{r}$):

$$\begin{aligned}\mathbf{R} &= \frac{m_p \mathbf{r}_p + m_q \mathbf{r}_q}{M}, & M &= m_1 + m_2 + 2m_0; \\ \mathbf{r} &= \mathbf{r}_p - \mathbf{r}_q, & m &= m_p \cdot m_q / M.\end{aligned}\quad (6)$$

Тут M та m - маса та приведена маса мономерної ланки, відповідно.

З урахуванням (6) вираз для кінетичної енергії набуває наступного вигляду:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \left\{ M \dot{\mathbf{R}}^2(n) + m \dot{\mathbf{r}}^2(n) + \mu_p \dot{\delta}^2(n) + \mu_q \dot{\Delta}^2(n) \right\}. \quad (7)$$

Вираз (7) може бути спрощений, оскільки не всі складові кінетичної енергії однаково важливі для опису динаміки конформаційних переходів. Так, останнім доданком у виразі (7) можна знехтувати, тому що в системі фактично нема відповідної потенційної енергії ($U_{14} \sim 0$), тобто з точки зору класичної механіки Δ це циклічна координата.

Прийmemo також до уваги, що у таких структурних перетвореннях, як конформаційні переходи поміж формами подвійної спіралі, основи у парах зміщуються разом без значних взаємних зрушень. У всякому разі у початковій і у кінцевій формах спіралі пари знаходяться в одній (уотсон-криківській) конфігурації [38,41,44]. Враховуючи це, покладемо для траєкторій конформаційних переходів: $\delta \approx \dot{\delta} \approx 0$.

Тоді вираз кінетичної енергії для опису динаміки конформаційних переходів може бути записаний у вигляді:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \left\{ M \dot{\mathbf{R}}^2(n) + m \dot{\mathbf{r}}^2(n) \right\}. \quad (8)$$

Кінетична енергія у вигляді (8) все ще залишається достатньо складною для моделювання. Для подальшого спрощення вигляду кінетичної енергії врахуємо, що конформаційні зміни у макромолекулі проходять уздовж певних траєкторій руху і це доцільно використати у моделюванні її конформаційної динаміки.

Траєкторія В-А переходу. Відомо [38,41,44], що у конформаційних переходах типу В-А макромолекула міняє кут закрутки спіралі і центр мас мономерної ланки обертається навколо осі спіралі ДНК. Тоді для ступеню вільності центру мас ланки можна записати:

$$M \dot{\mathbf{R}}^2 = M \dot{R}^2 + I \dot{\tau}^2,$$

де R - зміщення ланки, τ - кут обертання, $I = I_{0Z}$ - момент інерції мономерної ланки відносно осі спіралі (0Z).

Необхідність врахування одночасно зміщення по R і скручування по τ визначається конкретними умовами конформаційного переходу. Відомо, що В-А переходи не призводять до зміни діаметра або згинання ланцюжка, змінюється лише кут закрутки спіралі [38,41,44]. Тобто зміщення R тут несуттєве і їм можна знехтувати: $R \approx 0$.

Також відомо [38,41,42,44], що у В-А переходах пара основ зміщується уздовж осі 0Y (Рис. 16). Одночасно пара нахиляється відносно осі 0X. Однак, ці параметри спіралі змінюються зкорельовано і немає потреби розглядати їх незалежно. Достатньо враховувати це у значеннях параметрів потенціалу зміщення. Тому для компоненти $\mathbf{r}$ доцільно перейти до зміщення уздовж траєкторії переміщення центру мас пари - осі 0Y: $\mathbf{r} \rightarrow u$.

Вираз для кінетичної енергії В-А переходу для компонент τ і u може бути записаний у вигляді:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \left[I \dot{\tau}^2(n) + m \dot{u}^2(n) \right]. \quad (9)$$

Таким чином, при переході до опису руху по траєкторіях кінетична енергія конформаційного перетворення набуває скалярного вигляду.

Відповідну потенційну енергію для В-А переходу неважко змодельовати. Потенційна енергія скручування має вигляд аналогічній енергії скручування пружного стержня, а константа скручування для ДНК добре відома [5,7,13].

Рух пари у В-А переходах відбувається за рахунок зміни конформації цукрових кілець [41,42,44]. Тому потенційна енергія для зміщення по координаті u має вигляд двоямного потенціалу. Параметри цього потенціалу можна визначити з відомих експериментальних даних та конформаційних розрахунків для В-А переходів в ДНК [41,42,44,45].

Загальний вираз для енергії В-А переходів може бути записаний у континуальному наближенні, тому що для цих переходів у ДНК характерна кооперативність структурних перетворень (для природних умов кооперативність становить біля 20 пар основ [38,39,43]).

У континуальному наближенні енергія системи набуває вигляду:

$$E = \int \frac{dz}{2h} \left[m \left(\dot{u}^2 + s_1^2 u'^2 \right) + I \left(\dot{\tau}^2 + s_2^2 \tau'^2 \right) + \Phi(u) + \kappa F(u) \tau' \right], \quad (10)$$

де h - крок спіралі, $s_{1,2}$ - пружні константи взаємодії уздовж макромолекулярного ланцюжка. Потенційна функція $\Phi(u)$ описує подвійну яму, яка відповідає переходу з В до А стану макромолекули.

Доданок енергії (10) з коефіцієнтом κ описує взаємозв'язок між зміщенням пар основ і скручуванням спіралі (енергія U_3 у виразі (2)). Цей взаємозв'язок добре відомий з експерименту по В-А переходам у ДНК [41,44,45].

У моделюванні енергії конформаційного переходу не врахована залежність від гетерогенності пружних констант s_1 і s_2 . Ця залежність пов'язана з можливою чутливістю цих констант до послідовності нуклеотидів. Але це ефекти другого порядку малості і їх вплив на динаміку структури макромолекули буде відчутним тільки на швидкості переміщень конформаційних збуджень уздовж ДНК.

Важливо відзначити, що завдяки переходу до сумісних рухів масові коефіцієнти кінетичної енергії конформаційного переходу стають нечутливими до гетерогенності нуклеотидів у ДНК. Окрім цього, оскільки конформаційне перетворення проходить без значних змін відстані між нуклеозидами ($\delta \approx 0$), потенційна енергія збудження макромолекули теж стає незалежною від гетерогенності ДНК, а модель динаміки конформаційного переходу (10) приймає гомогенний вигляд.

Плавлення

Іншим структурним перетворенням, яке привертає широку увагу у фізиці ДНК є плавлення. Цей процес представляє собою конформаційну перебудову, в результаті якої розриваються водневі зв'язки у парах і нуклеїнові основи вивертаються назовні подвійної спіралі. Такі переходи проходять кооперативно при підвищенні температури розчину до температури плавлення або локально при зміні зовнішніх умов [13,14,38,41].

Потенційна енергія плавлення є функцією відстані між нуклеїновими основами у мономерній ланці і залежить від траєкторії руху нуклеозидів відносно остову та нуклеотидів як цілих. Звичайно вважають, що у процесах плавлення нуклеозиди залишаються жорсткими.

Розглянемо вигляд кінетичної енергії для опису процесів плавлення ДНК. З цією метою у моделі чотирьох мас введемо зміщення центрів мас нуклеотидів та зміщення центрів мас нуклеозидів відносно своєї маси остову.

Для рухливості центрів мас нуклеотидів та нуклеозидів i -ого ланцюжка відповідно запишемо наступне:

$$\begin{aligned} \mathbf{r} &= \frac{m_i \mathbf{r}_i + m_0 \mathbf{R}_i}{M_i}, & M_i &= m_i + m_0; \\ \mathbf{r}_i &= \mathbf{R}_i - \mathbf{r}, & \mu_i &= m_i \cdot m_0 / M_i, \end{aligned} \quad (11)$$

де M_i та μ_i - повна і приведена маса нуклеотида.

Візьмемо до уваги, що у процесах плавлення рухливість нуклеозидів звичайно зводиться до обертань як цілих відносно остову. Тоді:

$$\dot{\mathbf{r}}^2 \rightarrow l_i^2 \dot{\theta}_i^2, \quad \dot{\mathbf{r}} \sim 0, \quad (12)$$

де l_i - довжина маятника-нуклеозида, а θ_i - кут його відхилення від рівноважного стану (Рис. 16).

Моделювання великоамплітудної динаміки структури макромолекул ДНК

У наближенні (12) кінетична енергія системи приймає вигляд:

$$K = \frac{1}{2} \sum_{n,i} \left[M_i \dot{\varphi}_i^2 + \mu_i l_i^2 \dot{\theta}_i^2 \right]. \quad (13)$$

Вираз (13) залишається ще складним для моделювання динаміки процесів плавлення ДНК. Перейдемо до розгляду сумісних рухів структурних елементів. Для цього виділимо зміщення центру мас мономерної ланки та відносне зміщення нуклеотидів. Ці зміщення та відповідні вирази для мас мають вигляд:

$$\begin{aligned} \mathbf{R} &= \frac{M_1 \varphi_1 + M_2 \varphi_2}{M}, & M &= M_1 + M_2; \\ \xi &= \varphi_1 - \varphi_2, & \mu &= M_1 \cdot M_2 / M. \end{aligned} \quad (14)$$

Введемо також сумісні обертання нуклеозидів:

$$\begin{aligned} \Omega &= \frac{J_1 \theta_1 - J_2 \theta_2}{J}, & J &= J_1 + J_2 \quad (J_i = \mu_i l_i^2); \\ \sigma &= \theta_1 + \theta_2, & j &= J_1 \cdot J_2 / J. \end{aligned} \quad (15)$$

Тут параметри J та j мають зміст сумісного та відносного моменту інерції нуклеозидів у парі. При записі (15) прийнято до уваги, що кути θ_1 та θ_2 різнонаправлені (Рис. 16).

З урахуванням (14) та (15) кінетична енергія плавлення може бути представлена як:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \left\{ M \dot{\mathbf{R}}^2 + \mu \dot{\xi}^2 + J \dot{\Omega}^2 + j \dot{\sigma}^2 \right\}. \quad (16)$$

Значення параметрів кінетичної енергії (16) розраховані нами по даним моделі чотирьох мас для В-форми ДНК і наведені у Табл. 3. Суттєво, що ці параметри практично не залежать від сорту пар у ДНК. Таким чином, і в випадку плавлення при переході до розгляду сумісних рухів кінетична енергія гетерогенної системи набуває гомогенного вигляду.

Таблиця 3. Параметри моделі плавлення ДНК

Пара основ	M (а.о.м.)	μ (а.о.м.)	J (10^{-37} Г·см ²)	j (10^{-37} Г·см ²)
A·T	615	153.7	5.51	1.36
G·C	616	153.4	5.80	1.38

Перейдемо до розгляду певних траєкторій руху структурних елементів у процесах плавлення макромолекули. Розглянемо дві можливі траєкторії плавлення. Перша - це відкриття пари у бік великого жолобу: траєкторія "opening", друга - розтягування нуклеотидів у різні боки уздовж осі Х-ів (Рис. 16): траєкторія "stretching". В обох випадках будемо вважати, що справедливе континуальне наближення.

Траєкторія "opening". Траєкторія "opening" вважається однією з найбільш імовірних для плавлення ДНК [14,8,46]. Уздовж траєкторії "opening" рухи структурних елементів відбуваються таким чином, що: $\theta_1 \approx \theta_2$, $|\Omega| \ll |\sigma|$ ($\Omega \sim 0$).

Відомо також, що при відкритті пари у бік великого жолобу сама мономерна ланка зміщується і макромолекула згинається [46-48]. При цьому центри мас нуклеотидів переміщуються сумісно [44], тобто: $\varphi_1 \approx \varphi_2$, $|\xi| \ll |\mathbf{R}|$, $\mathbf{R} \rightarrow Y$, де Y - це координата зміщення у бік жолобів спіралі (Рис. 16).

Тоді вираз для кінетичної енергії плавлення ДНК по траєкторії "opening" набуває двокомпонентного вигляду:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \left[M \dot{Y}^2(n) + j \dot{\sigma}^2(n) \right]. \quad (17)$$

У виразі (17) фігурують вже тільки скалярні величини, які описують енергію зовнішньої та внутрішньої підградек. Повна енергія для траєкторії "opening" може бути записана наступним чином:

$$\begin{aligned} E &= \int \frac{dz}{2h} \left[j \left(\dot{\sigma}^2 + c_1^2 \sigma'^2 \right) + M \left(\dot{Y}^2 + c_2^2 Y'^2 \right) + \right. \\ &\quad \left. + M c_3^2 Y''^2 + \Pi(\sigma) + \chi \Psi(\sigma) Y' \right], \end{aligned} \quad (18)$$

де також враховано, що у процесах плавлення може відбуватися значне згинання макромолекули у бік жолобів [46-48], і тому у потенційній енергії необхідно включати доданок з похідною другого порядку. У виразі (18) c_1 , c_2 та c_3 - константи жорсткості, $\Pi(\sigma)$ - потенційна енергія розкриття пари по траєкторії "opening", а доданок з χ описує енергію взаємозв'язку між компонентами σ і Y .

При моделюванні динаміки плавлення ДНК в моделі (18) необхідно враховувати залежність енергії розкриття пари $\Pi(\sigma)$ від гетерогенності макромолекули, але кінетична енергія має гомогенний вигляд.

Траєкторія "stretching". У випадку плавлення макромолекули по траєкторії "stretching" маси мономерної ланки ДНК рухаються у бік тяжів подвійної спіралі таким чином, що: $\theta_1 \approx \theta_2 \approx 0$ ($\dot{\theta}_1 \approx \dot{\theta}_2 \approx 0$), $\dot{\Omega} \approx \dot{\sigma} \approx 0$, а зміщення мас мають ненульову компоненту уздовж осі X-ів: $\mathbf{R} \rightarrow X$, $\xi \rightarrow x$.

Тоді кінетична енергія системи приймає вигляд:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n [M \dot{X}^2 + \mu \dot{x}^2]. \quad (19)$$

За умов, коли центр мас мономерної ланки зміщується незначно, одержуємо найпростіший вираз для кінетичної енергії:

$$K = \frac{1}{2} \sum_n \mu \dot{x}^2, \quad \dot{X} \approx 0. \quad (20)$$

З урахуванням (20) загальна енергія конформаційного збудження для плавлення по траєкторії "stretching" набуває вигляд:

$$E = \int \frac{dz}{2h} \left[\mu (\dot{x}^2 + s^2 \dot{x}'^2) + U(x) \right], \quad (21)$$

де $U(x)$ - потенційна енергія розтягування пари уздовж осі OX.

Вираз (21) застосовувався у роботах [49-51] для моделювання плавлення ДНК без необхідного обґрунтування. По існуючим оцінкам відповідна енергія для розкриття пар по цій траєкторії дуже велика у порівнянні з траєкторією "opening" і тому цей процес вважається малоімовірним [8,46]. Окрім цього, потенційна енергія розкриття пари уздовж осі OX найбільш чутлива до гетерогенності [43]. Тому не можна вважати, що модель (21) описує реальний процес плавлення ДНК.

Висновки

Виконане дослідження показує можливість побудови відносно простих, двокомпонентних моделей для опису великоамплітудних конформаційних перетворень макромолекули ДНК. Важливо, що у побудованих моделях зовнішня підгратка описує ступені вільності пружного стержня, а внутрішня є фактично координатою структурного перетворення. Використовуючи той факт, що маси комплементарних пар ДНК практично однакові, і завдяки переходу до сумісних рухів вдається звести вирази для кінетичної енергії гетерогенної макромолекули та потенційної енергії конформаційного переходу до гомогенного вигляду. У той же час потенційна енергія плавлення залишається залежною від складу нуклеотидів. Аналіз енергії конформаційної рухливості ДНК показує, що в макромолекулі можуть існувати структурні збудження двох типів: чутливі та нечутливі до її гетерогенності. Динаміка таких збуджень може бути пов'язана з виконанням макромолекулою двох різних функцій, де потрібна чутливість до гетерогенності і де така чутливість непотрібна.

Автор вдячний Науково-виробничому центру "Ордана" за фінансову підтримку роботи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zimm B.H. // J.Chem.Phys. - 1960. - **33**. - P.1349-1356.
2. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. // Успехи Физ. Наук - 1971. - **105**. - С.479-519.
3. Shellman J.A. // Biopolymers - 1974. - **13**. - P.217-226.
4. Barkley M.D., Zimm B. // J. Chem. Phys. - 1979. - **70**. - P.2991-3007.
5. Франк-Каменецкий М.Д. // Теоретические методы исследования биополимеров - Ред. Волькенштейн М.В., Итоги науки и техники, сер. Мол.биол. ВИНТИ - 1979. - **15**. - С.42-73.
6. Allison S.A., Schurr J.M. // Chem. Phys. - 1979. - **41**. - P.35-59.
7. Hagerman P.J. // Ann. Rev. Biophys. Chem. - 1988. - **17**. - P.265-286.

8. Lavery R. // *Adv. Comput. Biol.* - 1994. - **1**. - P.69-145.
9. Auffinger P., Westhof E. // *Current Opinion Struct. Biol.* - 1998. - **8**. - P.227-236.
10. Lafontaine I., Lavery R. // *Current Opin. Struct. Biol.* - 1999. - **9**. - P.170-176.
11. Schlick T., Olson W.K. // *J. Mol. Biol.* - 1992. - **223**. - P.1089-1119.
12. Okonogi T.M., Reese A.W., Alley S.C., Hopkins P.B., Robinson B.H. // *Biophys. J.* - 1999. - **77**. - P.3256-3276.
13. Малеев В.Я. // *Биофизика* - 1965. - **10**. - С.729-734.
14. Urabe H., Tominaga Y., Kubota K. // *J. Chem. Phys.* - 1983. - **78**. - P.5937-5939.
15. Lindsay S.M., Powell J.W., Rupprecht A. // *Phys. Rev. Letters* - 1984. - **53**. - P.1853-1855.
16. Франк-Каменецкий М.Д. // *Молекулярная биология* - 1983. - **17**. - С.639-652.
17. Englander S.W., Kallenbach N.R. // *Quart. Rev. Biophys.* - 1984. - **16**. - P.521-655.
18. Prohofsky E.W., Lu K.C., Van Zandt L.L., Putnam B.F. // *Phys. Letters A* - 1979. - **70**. - P.402-496.
19. Wittlin A., Genzel L., Kremer F., Haeseler S., Poglitsch A., Rupprecht A. // *Phys. Rev. A* - 1986. - **34**. - P.493-500.
20. Волков С.Н., Косевич А.М. // *Молекулярная биология* - 1987. - **21**. - С.797-806.
21. Волков С.Н., Косевич А.М., Вайнреб Г.Е. // *Биополимеры и клетка* - 1989. - **5**. - P.32-39.
22. Volkov S.N., Kosevich A.M. // *J. Biomolec. Struct. Dynamics* - 1991. - **8**. - P.1069-1083.
23. Lisy V., Miskovsky P., Schreiber P. // *J. Biomolec. Struct. Dynamics* - 1996. - **13**. - P.707-716.
24. Krumhansl J.A., Alexander G.B. // *Structure and Dynamics: Nucleic Acids and Protein* - Eds. by Clementi E. and Sarma R.H. - Acad. Press - 1983. - P.61-80.
25. Волков С.Н. // *Биополимеры и клетка* - 1990. - **6**. - P.21-31.
26. Krumhansl J.A. // *Physica D* - 1993. - **68**. - P.97-103.
27. Gaeta G., Reiss C., Peyrard M., Dauxois T. // *Rev. Nuovo. Cimento* - 1994. - **17**. - P.1-48.
28. *Nonlinear Excitations in Biomolecules* / Ed. by Peyrard M. - Springer-Verlag, Les Editions de Physique - 1995.
29. Yakushevich L. *Nonlinear Physics of DNA*. - John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
30. Волков С.Н. // *Молекулярная биология* - 1992. - **26**. - С.835-846.
31. Gaudin F., Lancelot G., Genest D. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 1997. - **15**. - P.357-367.
32. Genest D. // *Eur. Biophys. J.* - 1998. - **27**. - P.283-289.
33. Bruant N., Flatters D., Lavery R., Genest D. // *Biophys. J.* - 1999. - **77**. - P.2366-2376.
34. Rudnicki W.R., Bakalarski G., Lesyng B. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2000. - **17**. - P. 1097-1108.
35. Maciejczyk M., Rudnicki W., Lesyng B. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2000. - **17**. - P.1109-1115.
36. Kim Y., Geiger J.H., Hahn S., Sigler P.B. // *Nature* - 1993. - **365**. - P.512-520.
37. Kim J.L., Nikolov D.B., Burley S.K. // *Nature* - 1993. - **365**. - P.520-527.
38. Зенгер В. *Принципы структурной организации нуклиновых кислот*. - Мир, М. 1987.
39. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // *Биофизика* - 1993. - **38**. - С.768-790.
40. Semenov M.A., Berezhnyak E.G. // *Comments Mol. Cel. Biophys.* - 2000. - **10**. - P.1-23.
41. Иванов В.И. // *Молекулярная биология* - 1983. - **17**. - С.616-621.
42. Нестерова Е.Н., Чуприна В.П., Полтев В.И. // *Молекулярная биология* - 1999. - **33**. - С.845-854.
43. Полтев В.И., Шулюпина Н.В. // *Молекулярная биология* - 1984. - **18**. - С.1549-1561.
44. Иванов В.И. // *Биополимеры и клетка* - 1990. - **1**. - P.21-31.
45. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Burckhard G., Birch-Hirschfeld E., Fritzsche H., Zimmer Ch. // *Biophys. J.* - 1996. - **71**. - P.3344-3349.
46. Ramstein J., Lavery R. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 1990. - **7**. - P.915-933.
47. Manning G.S. // *Biopolymers* - 1983. - **22**. - P.689-729.
48. Manning G.S. // *Structure and Dynamics: Nucleic Acids and Protein* - Eds. by Clementi E. and Sarma R.H. - Acad. Press - 1983. - P.289-300.
49. Forinash K., Bishop A.R., Lomdahl P.S. // *Phys. Rev. B* - 1991. - **43**. - P.10743-10750.
50. Dauxois T., Peyrard M., Bishop A.R. // *Phys. Rev. E* - 1993. - **47**. - P.684-695.
51. Peyrard M., Dauxois T., Hoyet H., Willis C.R. // *Physica D* - 1993. - **68**. - P.104-115.

УДК 577.3

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АКТИНОЦИНА С ДНК.

2. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКТИНОЦИЛ-БИС-(3-ДИМЕТИЛАМИНОПРОПИЛ) АМИНА С ТИМУСНОЙ ДНК.

М.А.Семенов, Н.Н.Сагайдакова, Т.В.Больбух, А.И.Гасан, Е.Б.Круглова,
Е.Г.Березняк, В.Я.Малеев, Е.Н.Глибин*, Д.В.Овчинников*, А.Н.Веселков**

Институт радиофизики и электроники им.А.Я.Усикова НАН Украины, Харьков-85, 61085, ул. Акад.Проскуры, 12,

E-mail: maleev@ire.kharkov.ua

*) Санкт-Петербургский государственный технический университет, Россия

**) Севастопольский государственный технический университет, Украина

Статья поступила в редакцию 18 октября 2000 г.

Методами ИК-, УФ- и спектроскопии в видимой области, а также пьезогравиметрии проведено исследование влияния воды на взаимодействие актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амин (лиганд L1) с ДНК во влажных пленках и растворах. Показано, что между ДНК и лигандом L1 возможно образование комплексов двух типов – внешнее связывание и интеркаляция. Интеркаляция феноксазиновых колец лиганда в уотсон-криковские пары азотистых оснований происходит, по-видимому, избирательно, неодинаково возмущая участки, обогащенные АТ- и GC-парами. Термостабильность комплекса ДНК - лиганд выше, чем термостабильность чистой ДНК. Полученные значения физических параметров взаимодействия ДНК с L1 отличаются от результатов, полученных ранее для комплекса ДНК с производным актиноцина, содержащим бензо-краун-группировку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, комплекс, гидратация, спектроскопия, актиноцин.

В предыдущей работе из этой серии [1] нами исследовалась система тимусная ДНК-лиганд-вода с переменным содержанием воды, где в качестве лиганда было взято производное актиноцина (L), содержащее в положениях 1 и 9 хромофора бензо-краун- и диметиламинопропил- группировки. Было показано, что наиболее вероятным механизмом связывания лиганда L с ДНК является интеркаляция феноксазиновых колец актиноцина в стопку азотистых оснований. При этом краун-эфирные группировки хромофора, взаимодействуя с противоionsами ДНК, связываются с молекулами воды и фосфатными группами, что не позволяет дезоксирибозе при высоких активностях воды принять C2'-эндо-конформацию. Тем самым наличие краун-группировки оказывает, по-видимому, разрыхляющее влияние на структуру комплекса ДНК-L-вода.

В настоящей работе исследуется система тимусная ДНК-лиганд-вода, где лиганд L1 (актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амин), структурная формула которого приведена на рис.1, относится к тому же ряду соединений, т.е. является производным актиноцина, но не содержит краун-эфирные группировки [2,3]. Известно, что в отличие от краун-содержащего соединения L лиганд L1 обладает противоопухолевой активностью в опытах *in vivo* [3-5]. В связи с этим представляет интерес выяснение различий в структурных и энергетических параметрах взаимодействия с ДНК лигандов L и L1 с учетом влияния водного окружения.

Объектами исследования являются сухие и влажные пленки тимусной ДНК в комплексе с лигандом L1, а также водные растворы этого комплекса. Как и в работе [1] в качестве методов исследования

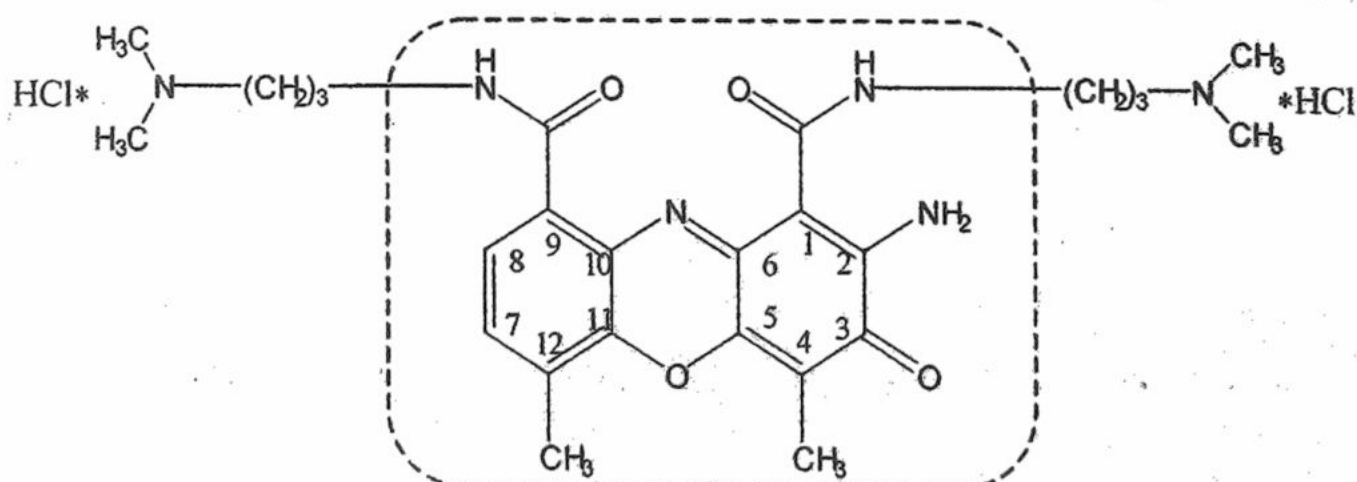


Рис.1. Структурная формула

актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амин (лиганд L1).

использованы ИК-спектроскопия и спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой области, а также пьезогравиметрия. Это позволило на основе анализа ИК-спектров ДНК, лиганда и комплекса при различном содержании воды в образце определить центры гидратации, а на основе анализа спектров в видимой и УФ-области найти условия образования комплекса ДНК-L1 в водном

растворе, определить константы связывания лиганда с ДНК и параметры, характеризующие термостабильность ДНК и комплекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась тимусная ДНК, выделенная в лаборатории проф. Ландо Д.Ю. (Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск) со следующими характеристиками: нуклеотидный состав АТ/ГС=1,36, молекулярная масса $M > 10^7$ D, гипохромный эффект $h=38-39\%$ при $\lambda=260$ нм. Спектральные и аналитические данные препарата актиноцил-бис-(3-диметиламинопропил)амин с молекулярной массой $M = 568$ D приведены в работах [2,3].

Для получения пленок ДНК и комплекса ДНК-L1 с P/D=4,8 (отношение молей фосфатов ДНК к молям лиганда L1) готовились водные растворы ДНК (концентрация 0,3%) и лиганда L1 (концентрация 0,17%). В раствор ДНК добавляли соль NaCl в таком количестве, чтобы избыточное содержание этой соли в пленке составляло 3-5% по отношению к сухому весу ДНК. Затем в раствор ДНК малыми объемами добавляли раствор лиганда при одновременном тщательном перемешивании и полученную смесь выдерживали в течение 1-2 суток.

Пленки лиганда L1 для получения ИК-спектров готовились также, как и пленки комплекса. Содержание лиганда в пленках комплекса и пленках лиганда было одинаковым ($\sim 0,67$ мг). Контроль содержания лиганда L1 осуществляли с помощью внутреннего стандарта, в качестве которого использовалась интегральная интенсивность полосы поглощения валентного колебания СН-групп атомов ДНК и лиганда в спектрах отдельных компонентов и комплекса.

Выращивание, увлажнение и дейтерирование пленок ДНК, лиганда L1 и комплекса ДНК-L1 осуществляли, как в работе [1]. Спектры растворов ДНК и комплекса ДНК-L1 в видимой и ультрафиолетовой области записывали на спектрофотометре UV-VIS Specord M40 при различных значениях P/D в 0,01 M SSC-буфере. ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре UR-20. Кривые плавления ДНК и комплекса ДНК-L1 получали с помощью специальной термостатированной кюветы на спектрофотометре Hitachi, mod.356 при pH=6,8 в 0,05 M растворе NaCl. Изотермы гидратации лиганда L1, ДНК и комплекса ДНК-L1 получали с помощью пьезограмметрической установки [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения смеси лиганда и ДНК в видимой области

На рис.2 представлены спектры поглощения смесей ДНК-L1 в зависимости от P/D в видимой области (360-500 нм). Видно, что в области низких значений P/D ($P/D \leq 3$) поглощение смесей ДНК-L1 существенно уменьшается во всей области рассматриваемых длин волн, что указывает на образование агрегатов лиганда L1 за счет внешнего связывания с ДНК. Начиная со значений $P/D \geq 4$ увеличивается поглощение в длинноволновой области спектра, сопровождающееся длинноволновым смещением (до 25 нм) полосы поглощения смесей. Это связано с увеличением количества интеркалированного красителя. Описанный характер спектральных изменений от P/D подобен изменениям для ряда катионных красителей [5] и свидетельствует, как и в случае с бензо-краун-актиноцином L [1], об интеркаляции феноксазиновых колец в двойную спираль ДНК.

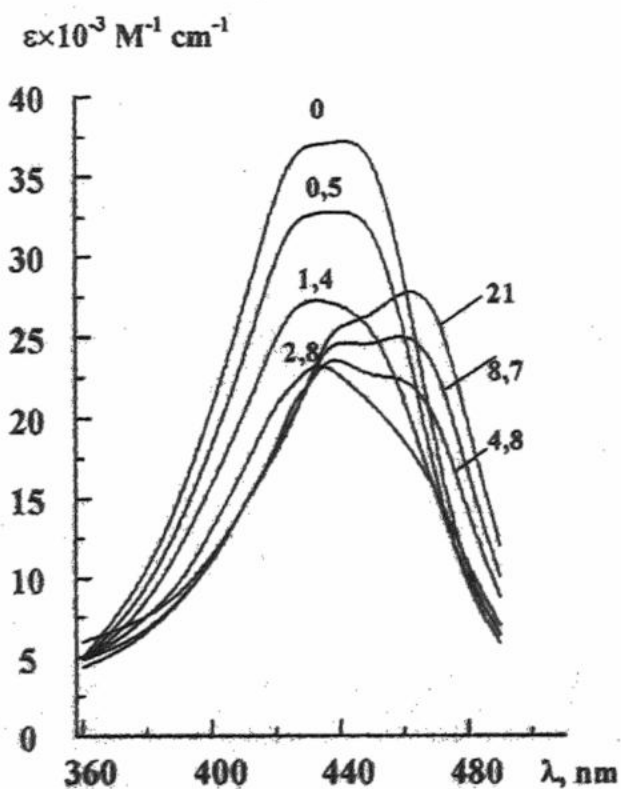


Рис.2. Спектры поглощения смесей тимусной ДНК с красителем L1 в зависимости от P/D в 0,01 M SSC буферном растворе (значения P/D приведены рядом с кривыми, концентрация красителя $C_D = 1,8 \times 10^{-5}$ M).

Оптимизация спектров поглощения смесей ДНК-L1 осуществлялась в широкой области длин волн (230-300 нм и 390-490 нм) и концентраций ДНК по уравнению МакГи и фон Хиппела [8,9] с учетом двух типов связывания: внешнего связывания с $p_1=2$, где p_1 - количество фосфатов ДНК, приходящихся на одну молекулу связанного лиганда, и $p_2=1$, где p_2 - количество пар оснований, приходящихся на одно место связывания лиганда по типу интеркаляции. С учетом такой модели получены следующие оптимальные значения параметров связывания: $\omega=150$, $\lg K_1=3,4$; $\lg K_{\text{инт}}=5,04$, где ω - фактор кооперативности, K_1 - константа мономерного связывания лиганда, $K_{\text{инт}}$ - константа интеркаляции. Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции в видимой и ультрафиолетовой области для различных форм связанного красителя на матрице ДНК приведены на рис.3. Достато

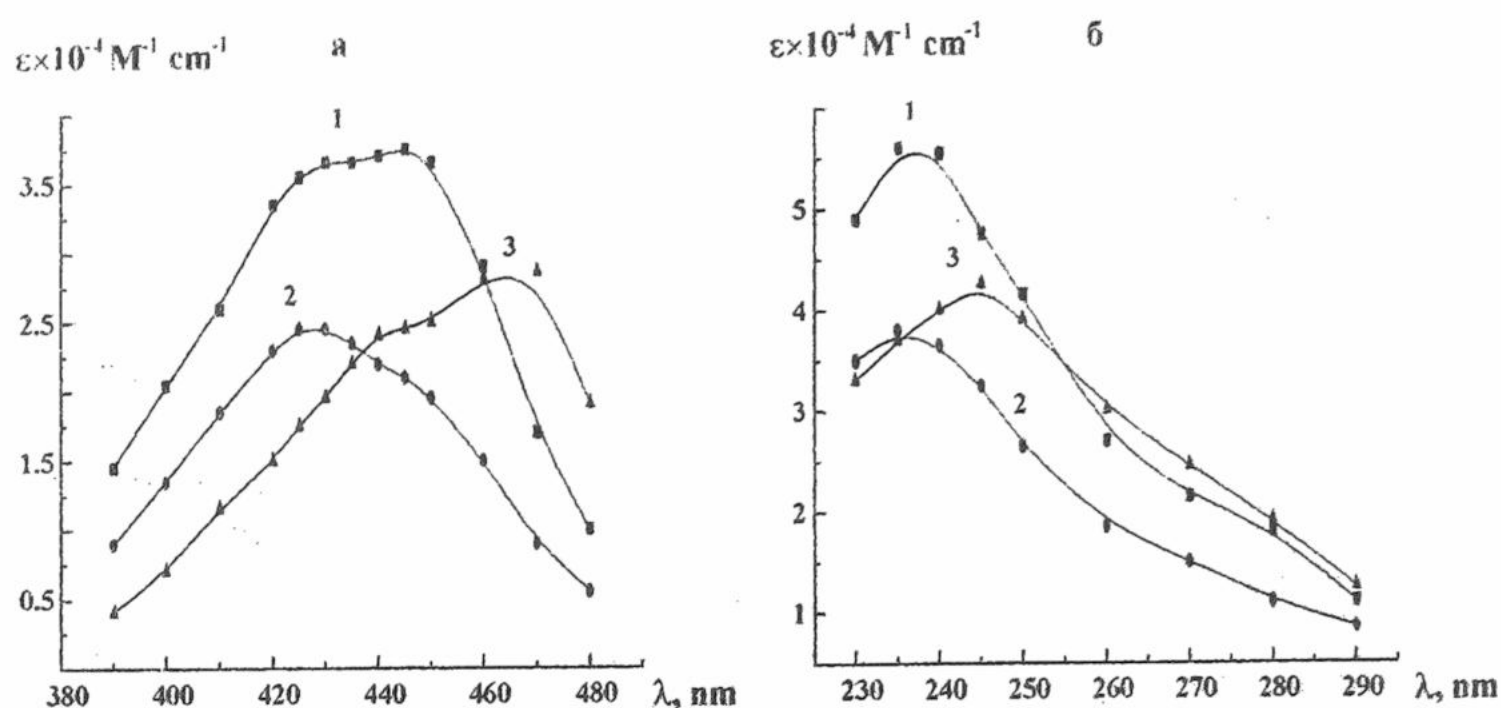


Рис.3. Оптимальные значения спектров поглощения разных форм красителя L1, связанного с матрицей ДНК: свободный краситель (1), агрегированный краситель (2), интеркалированный краситель (3), полученные как оптимальные значения для параметров связывания $\omega=150$, $K=2500$, $K=1,09 \times 10^5$ в видимой (а) и УФ (б) областях.

$\omega \times K_1$ указывают на большой вклад комплексов лиганда по типу внешнего связывания в каждую из смесей ДНК-L1, особенно в области низких значений P/D и/или в условиях растворов с низкими ионными силами.

Можно также отметить, что величина константы интеркаляции $K_{\text{инт}}$, полученная для этого лиганда, практически не отличается от такой же величины, определенной нами ранее для лиганда L — производного актиноина с бензо-краун-группировками ($\lg K_{\text{инт}}=5,17$). Тем не менее, наличие объемного бензо-краун-заместителя в молекуле этого соединения, как показала оптимизация спектрофотометрических концентрационных зависимостей, существенно уменьшает его склонность к агрегации на матрице ДНК, а выход из программы оптимизации удовлетворителен даже при учете только одного типа связывания — интеркаляции лиганда.

Таким образом, исследование спектров в видимой области смесей ДНК-L1 в широком интервале P/D позволяет сделать вывод об образовании двух типов комплексов между ДНК и лигандом L1.

Изотермы гидратации комплекса ДНК-L1

Для выяснения влияния воды на структуру и стабильность комплекса ДНК-L1 в качестве объекта исследования использована система ДНК-L1-вода с переменным содержанием воды. На рис.4 представлены изотермы гидратации, т.е. зависимости отношения массы сорбированной воды к массе сухого образца от относительной влажности (ОВ), для лиганда L1, чистой ДНК (н-ДНК) и их комплекса, а также расчетная изотерма, полученная суммированием изотерм гидратации лиганда L1 и н-ДНК с весами, равными массовым долям лиганда и ДНК в исследуемом комплексе. Видно, что уровень сорбции воды комплексом при 60% ОВ на 24% ниже, чем ДНК, и на 15% ниже суммы уровней сорбции воды отдельными компонентами. Это свидетельствует о том, что в образовавшемся комплексе ДНК-L1 лиганд своими гидрофобными группами затрудняет доступ молекул воды к центрам гидратации ДНК.

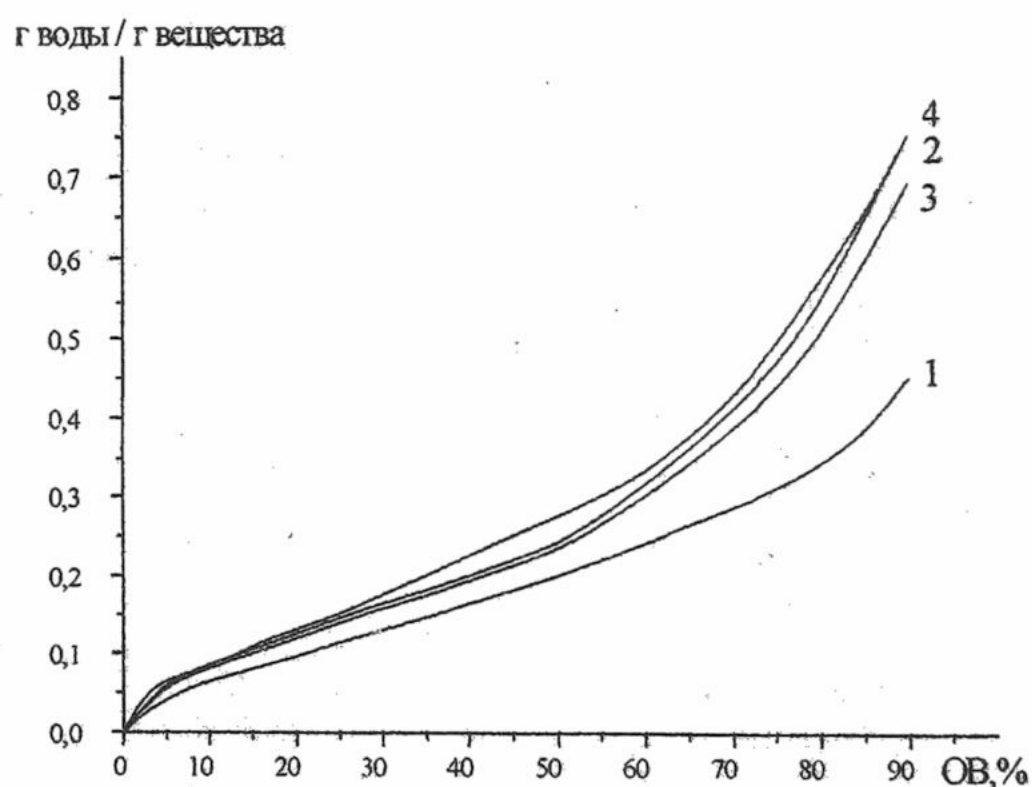


Рис.4. Изотермы гидратации: (1) - красителя L1; (2) - чистой н-ДНК; (3) - суммы ДНК+L1; (4) - комплекса ДНК-L1.

ИК-спектры поглощения лиганда, н-ДНК и комплекса ДНК-L1.

Для определения структурного состояния ДНК в комплексе, а также нахождения гидратно-активных центров исследуемых объектов были получены ИК-спектры пленок лиганда L1, чистой н-ДНК и их комплекса в сухом состоянии и при 56, 76 и 92% ОВ в недеирированном и дейтерированном состояниях. Анализ спектров в области поглощения сахарофосфатного остова ДНК ($900-1300 \text{ см}^{-1}$) в H_2O и в области поглощения кратных связей азотистых оснований в D_2O ($1400-1800 \text{ см}^{-1}$) проводили как в работе [10] по надежно отнесенным полосам поглощения ДНК и лиганда, весьма чувствительным к гидратации и конформационному состоянию нуклеиновой кислоты.

ИК-спектры пленок лиганда L1. В области $900-1300\text{ см}^{-1}$ лиганд L1 в недейтерированном состоянии имеет слабые полосы поглощения (рис.5,а) и, следовательно, существенным образом не искажает полосы поглощения сахарофосфатного остова ДНК в комплексе (рис.6,б).

Для полос поглощения лиганда L1 в спектральной области $1350-1700\text{ см}^{-1}$ надежные отнесения к настоящему времени отсутствуют. Анализ ИК-спектров лиганда L1 при различных значениях ОВ, а также данных ИК-спектроскопического исследования amino- и гидроксипроизводных феноксазона [11] позволил заключить, что область поглощения $1575-1660\text{ см}^{-1}$ связана с валентными колебаниями двойных внутри- и внекольцевых связей $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ и $\text{C}=\text{O}$ (рис.5,а). В дейтерированном состоянии лиганда L1 (D-форма) полосы поглощения при 1642 см^{-1} и 1631 см^{-1} (рис. 5,б), по-видимому, связаны с колебаниями различных карбонильных групп. В недейтерированном состоянии лиганда L1 (H-форма) этим колебаниям соответствуют полосы поглощения при 1636 см^{-1} и 1646 см^{-1} . В наиболее интенсивную полосу поглощения при $\nu \approx 1600\text{ см}^{-1}$ для D-формы и $\nu \approx 1607\text{ см}^{-1}$ для H-формы лиганда, связанную, в основном, с колебаниями $\text{C}=\text{N}$ групп атомов [11], по-видимому, вносят вклад и колебания карбонильных групп $\text{C}_3=\text{O}$, включенных во внутримолекулярную водородную связь по типу $\text{C}_3=\text{O} \dots \text{H}-\text{N}-\text{C}_2-$.

Область поглощения $1440-1480\text{ см}^{-1}$ (рис.5,б) относится к деформационному колебанию ND_2 -групп атомов. При увеличении влажности до 92% эта спектральная область значительно возрастает по интенсивности и смещается в высокочастотную область на $\Delta\nu = 3\text{ см}^{-1}$. Это свидетельствует о связывании молекул воды с этими группами. Рост интенсивности полосы при 1603 см^{-1} (рис.5,б) при увеличении ОВ до 76% также связан с гидратацией $\text{C}=\text{N}$ и, возможно, $\text{C}=\text{O}$ - групп атомов. Однако дальнейший рост ОВ до 92% приводит к гипохромизму полосы поглощения этих групп, что может быть объяснено резонансным взаимодействием моментов перехода $\text{C}=\text{N}$ и $\text{C}=\text{O}$ колебаний в упорядоченных агрегатных структурах молекул лиганда. Подобное состояние карбонильных колебаний в стопках азотистых оснований нами рассмотрено ранее [9].

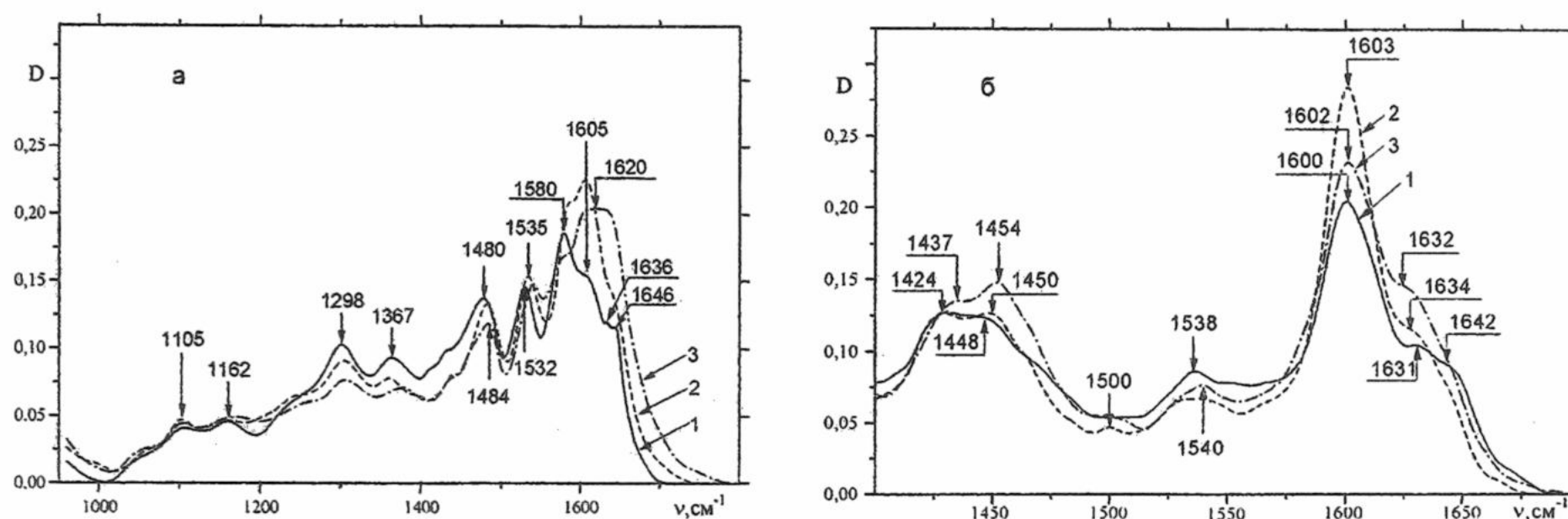


Рис 5. ИК-спектры лиганда L1 в недейтерированном (а) и дейтерированном (б) состоянии при ОВ: 0% (1), 76% (2) и 92% (3).

ИК-спектры чистой н-ДНК и комплекса ДНК-L1 в недейтерированном состоянии. Полосы поглощения ДНК в области поглощения сахарофосфатного остова и азотистых оснований весьма чувствительны к конформационному состоянию ДНК. Для структуры типа В характерно наличие полос поглощения азотистых оснований при 1714 см^{-1} и антисимметричного колебания PO_2^- -групп при 1223 см^{-1} , а для спиральной структуры типа А - полос поглощения с максимумами при 1709 и $1230-1234\text{ см}^{-1}$ [1]. Как видно из ИК-спектров н-ДНК (рис.6,а), эти полосы поглощения при 56, 76 и 92% ОВ имеют частоты, характерные для А- и В-спиральных форм ДНК.

На рис.6,б при тех же значениях ОВ приведены спектры комплекса ДНК-лиганд L1. Видно согласие частот полос поглощения сахарофосфатных групп ДНК в комплексе и чистой н-ДНК (рис.6,а). Таким образом, в отличие от лиганда L [1], лиганд L1 не оказывает существенного влияния на сахарофосфатный остов, сохраняющий для ДНК в комплексе конформации, близкие к А- и В- формам. Однако частоты конформационно-чувствительной полосы поглощения азотистых оснований ДНК в комплексе с лигандом L1 (1706 см^{-1} при 56% ОВ и 1707 см^{-1} при 76% ОВ) отличаются от соответствующих частот для чистой н-ДНК (рис.6,а), что свидетельствует о том, что при интеркаляции лиганда изменяется структура стопок азотистых оснований ДНК.

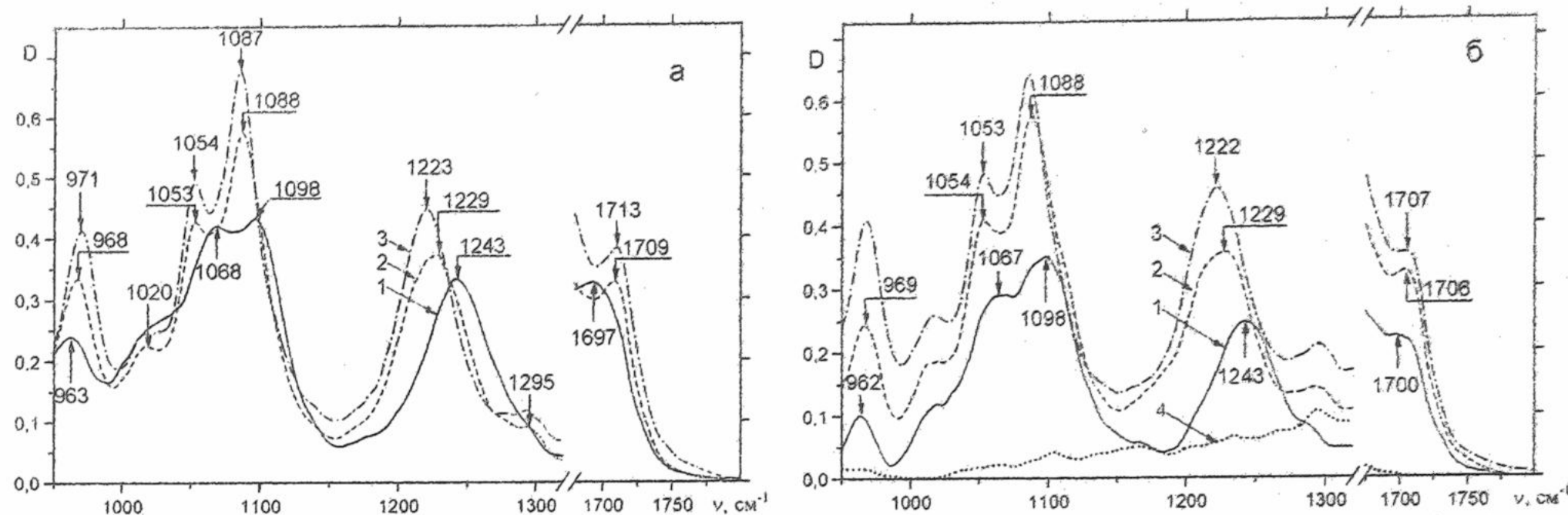


Рис.6. а - ИК-спектры чистой н-ДНК в недеутерированном состоянии при ОВ: 0% (1), 56% (2) и 76% (3); б - ИК-спектры комплекса ДНК-лиганд L1 в недеутерированном состоянии при ОВ: 0% (1), 56% (2) и 76% (3), ИК-спектр лиганда L1 при 0% ОВ (4).

ИК-спектры чистой н-ДНК и комплекса ДНК-L1 в дейтерированном состоянии. Для детального выяснения особенностей интеркаляции феноксазиновых колец в пары азотистых оснований спиральной структуры ДНК нами были получены спектры н-ДНК и комплекса ДНК-L1 в дейтерированном состоянии (рис.7).

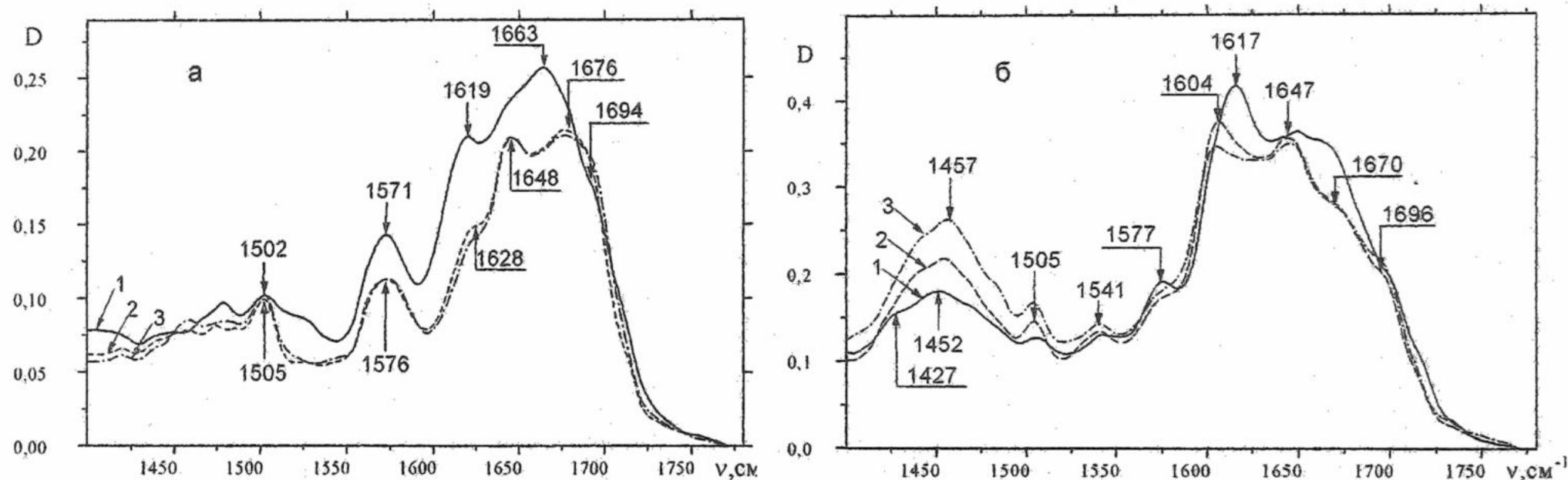


Рис 7. ИК-спектры чистой н-ДНК (а) и комплекса ДНК-лиганд L1 (б) в дейтерированном состоянии при ОВ: 0% (1), 76% (2) и 92% (3).

Из рис.7,б видно, что в спектре комплекса при 0%ОВ наблюдается полоса с максимумом поглощения при $\nu_1=1617 \text{ см}^{-1}$. В спектрах н-ДНК (рис.7,а) и лиганда L1 (рис.5,б) она отсутствует. Однако в этой области спектра н-ДНК (рис.7,а) и лиганда (рис.5,б) имеются полосы с максимумами поглощения при $\nu_2=1619 \text{ см}^{-1}$ и $\nu_3=1600 \text{ см}^{-1}$. Не исключена возможность образования полосы поглощения с максимумом при $\nu=1617 \text{ см}^{-1}$ в результате наложения полос поглощения ДНК (ν_2) и лиганда (ν_3). Прояснить эту ситуацию можно путем построения суммарного спектра с соответствующими комплексу молярными вкладами ДНК и лиганда. На рис. 8 приведены суммарные спектры при 0, 76 и 92% ОВ.

Видно, что при 0% ОВ полоса поглощения при $\nu=1617 \text{ см}^{-1}$ отсутствует, а наложение полос ν_2 и ν_3 дало уширенное поглощение с максимумом вблизи 1610 см^{-1} , что на 7 см^{-1} меньше, чем наблюдается в

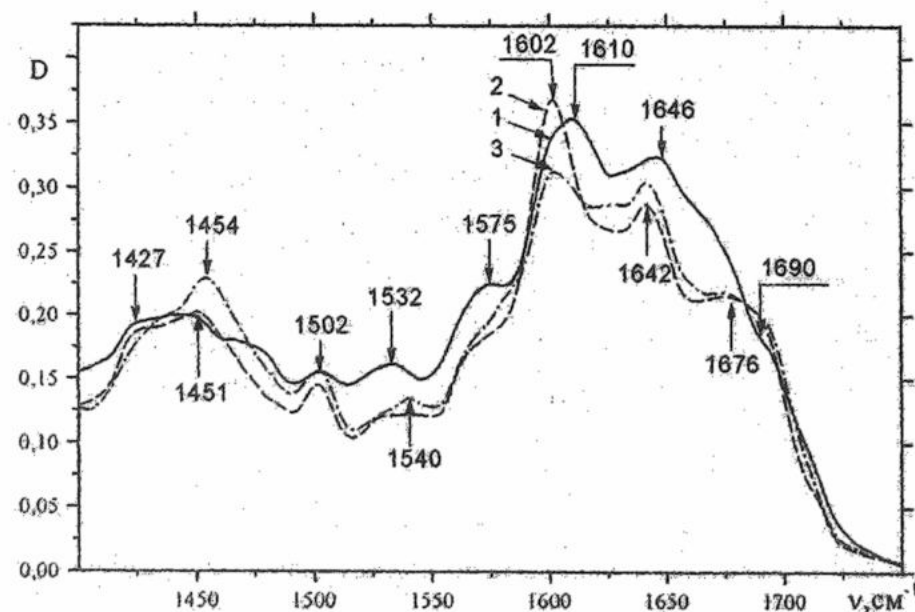


Рис.8. Сумма ИК-спектров чистой н-ДНК и лиганда L1 при ОВ: 0% (1), 76% (2) и 92% (3).

комплексе (рис.7,а). Аналогичная полоса поглощения с максимумом при $\nu=1618\text{ см}^{-1}$ была обнаружена нами и в комплексе ДНК-лиганд L [1]. Таким образом, можно предположить, что эти полосы появляются вследствие взаимодействия ДНК с феноксазиновыми кольцами.

При сравнении ИК-спектров в области $1400\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ чистой н-ДНК и комплекса (рис.7,а,б) наблюдаются существенные различия, которые хорошо видны на разностных спектрах (рис.9,а,б), полученных путем вычитания спектров сухих образцов из спектров влажных пленок. Почти во всей спектральной области $1400\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ полосы поглощения н-ДНК значительно уменьшаются по интенсивности (рис.9,а), что связано с переходом ДНК в спиральную конформацию [12]. Для комплекса ДНК-L1 характер изменений в этой спектральной области при увеличении ОВ (рис.9,б) существенно отличается от н-ДНК. На первом участке спектра ($1400\text{--}1550\text{ см}^{-1}$) наблюдается значительный рост интенсивности и высокочастотное смещение полосы поглощения деформационных колебаний ND_2 -групп атомов, а также других, пока не имеющих надежного отнесения полос поглощения лиганда, что связано, в частности, с гидратацией ND_2 -групп. На втором участке спектра ($1650\text{--}1750\text{ см}^{-1}$) наблюдается гипохромизм полос поглощения внутри- и внекольцевых колебаний азотистых оснований, но величина наблюдаемого эффекта значительно меньше, чем в случае н-ДНК.

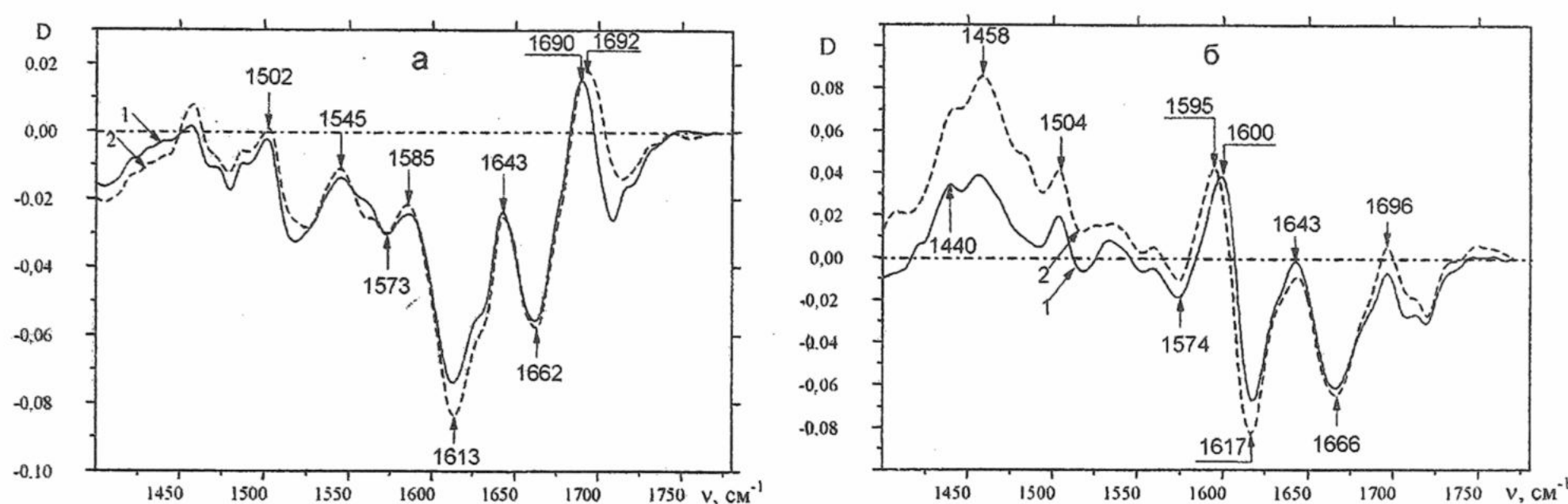


Рис.9. Разностные спектры для чистой н-ДНК (а) и комплекса ДНК-лиганд L1 (б), полученные путем вычитания спектров сухих образцов из спектров пленок при ОВ: 76% (1) и 92% (2).

Для комплекса ДНК-L на этом спектральном участке гипохромизм полос поглощения обнаружен не был, а наблюдался обратный эффект, т.е. значительное возрастание интенсивности полос поглощения, что связывалось с гидратацией внутри- и внекольцевых атомов азотистых оснований [1]. Эти спектральные различия, по-видимому, отражают структурные различия изученных комплексов ДНК-лиганд. Можно предположить, что структура комплекса ДНК-L более рыхлая, чем структура комплекса ДНК-L1. Это позволяет молекулам воды в первом случае связываться с азотистыми основаниями ДНК легче, чем во втором случае.

Гипохромизм полос поглощения ДНК в комплексе с лигандом L1 при увеличении содержания воды, как и в случае н-ДНК, связан с переходом ДНК в спиральное состояние. Появление полосы поглощения при 1707 см^{-1} в комплексе ДНК-L1 (рис.6,б) также свидетельствует об установлении водородных связей в уотсон-криковских парах оснований и образовании спиральных стопок азотистых оснований. Спирализация азотистых оснований ДНК и интеркаляция лиганда, а также гидратация $\text{C}=\text{N}$ и, возможно, $\text{C}=\text{O}$ и ND_2 -групп лиганда, о чем свидетельствуют низкочастотный сдвиг и увеличение интенсивности спектра в области поглощения этих групп (рис.7,б), приводят к формированию более жесткой и стабильной структуры комплекса ДНК-L1 по сравнению с комплексом ДНК-L.

Детальный анализ спектра дейтерированного комплекса ДНК-L1 проводился путем построения разностных спектров (рис.10), полученных путем вычитания из спектров комплекса при 0, 76 и 92% ОВ (рис.7,б) спектра лиганда L1 (рис.5,б) при тех же влажностях. Видно, что спектр ДНК в комплексе в области $1550\text{--}1750\text{ см}^{-1}$ в общих чертах совпадает со спектром поглощения н-ДНК в том же частотном диапазоне (рис.7,а). Однако интенсивности полос поглощения гуанина при 1571 см^{-1} и аденина при 1619 см^{-1} (колебание в основном $\text{C}=\text{N}$ -связей) существенно отличаются. ИК-гипохромизм гуаниновой полосы при 76 и 92% ОВ в комплексе (рис.7,б) не превышает 11%, в то время как у н-ДНК он равен 27%. ИК-гипохромизм адениновой полосы при 76 и 92% ОВ для н-ДНК составляет 41 и 49%, а в комплексе, соответственно, 33 и 59%. Существенное уменьшение гипохромного эффекта для полосы поглощения гуанина (в 2,5 раза) в комплексе по сравнению с н-ДНК в отличие от гипохромизма полосы поглощения

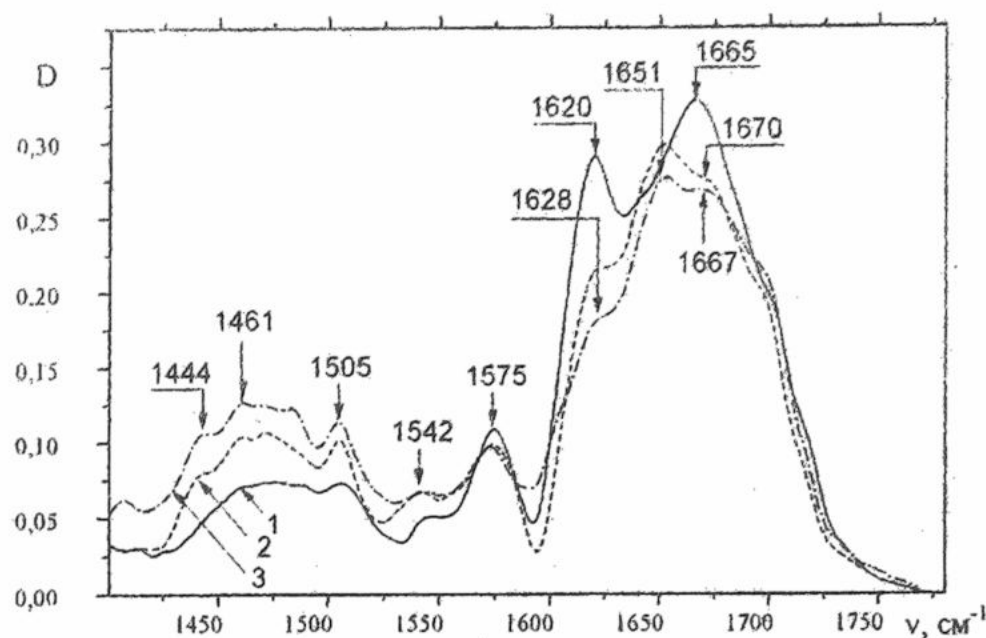


Рис.10. Разностные ИК-спектры, полученные путем вычитания из спектра комплекса ДНК-лиганд L1 спектра лиганда L1 при одинаковых значениях ОВ: 0% (1), 76% (2), 92% (3).

аденина свидетельствует о том, что интеркаляция лиганда L1 в пары азотистых оснований в большей степени повлияла на GC-пары, чем на AT-пары, что подтверждает ранее установленный факт взаимодействия актиноцина с GC-парами по типу интеркаляции [5,6].

Энергетические параметры взаимодействия ДНК и лиганда L1

Сведения о термостабильности гидратированного комплекса ДНК-L1 получены при сравнительном исследовании кривых "плавления" н-ДНК и ДНК в комплексе в 0,05М растворе NaCl. Как и в случае комплекса ДНК-L [1] в УФ-области спектра ($\lambda=242$ нм) наблюдается двухступенчатый характер плавления комплекса ДНК-L1 (рис.11), что свидетельствует о наличии, по крайней мере, двух типов взаимодействия лиганда L1 с молекулой ДНК.

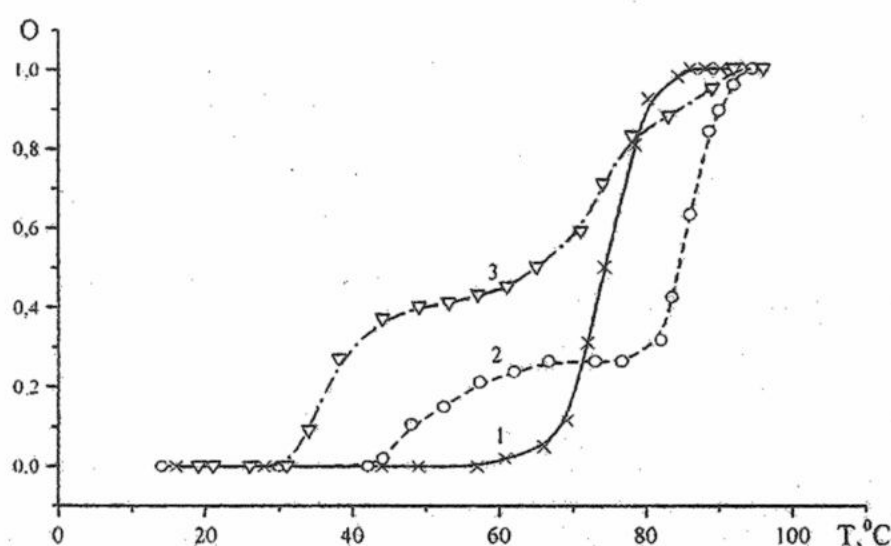


Рис.11. Кривые "плавления":
1 - чистый н-ДНК при $\lambda=260$ нм;
2 - комплекса ДНК-лиганд L1 при $\lambda=242$ нм;
3 - чистого лиганда L1 при $\lambda=447$ нм при P/D = 4,0 в 0,05М растворе NaCl.

По-видимому, первая ступень этой температурной зависимости связана с разрушением ассоциированных за счет внешнего связывания с ДНК молекул лиганда L1. Об этом свидетельствует приведенная на этом же рисунке температурная зависимость интенсивности поглощения чистого лиганда L1 в видимой области ($\lambda = 447$ нм). Вторая же ступень связана с разрушением вторичной структуры, т.е. плавлением ДНК. Отметим, что температура плавления ДНК ($T_{пл} = 85^{\circ}\text{C}$) в комплексе ДНК-L1 выше температуры плавления ДНК в комплексе ДНК-L на $\Delta T_{пл} = 8^{\circ}\text{C}$. Эти результаты свидетельствуют о том, что термостабильность ДНК в комплексе ДНК-L и ДНК-L1 выше, чем свободной ДНК ($T_{пл} = 74^{\circ}\text{C}$), и что энергии связывания лиганда с ДНК в изученных комплексах различаются.

Для того, чтобы получить значения энтальпий плавления ($\Delta H_{пл}$) ДНК в присутствии лигандов L[1] и L1 в растворе можно использовать теорию плавления ДНК со скрепками [15], согласно которой

$$\Delta H_{пл}^{ДНК} = \frac{\delta \Delta T_{пл}}{(\delta T_{пл})^2} \cdot R \cdot (T_{пл}^0)^2 \cdot 2 \frac{D}{P},$$

где $\delta T_{пл}$ - разница в температурах плавления ДНК в присутствии лиганда и чистой н-ДНК;

$\delta \Delta T_{пл}$ - соответствующая разница в интервалах плавления ДНК;

R - газовая постоянная;

$T_{пл}^0$ - температура плавления н-ДНК;

D/P - отношение молей лиганда в растворе к молям фосфатов ДНК.

На основании данных работы [1] и настоящей работы найдено, что в 0,05М растворе NaCl энтальпия плавления ДНК $\Delta H_{пл}^{ДНК}$ в комплексе с лигандом L равна 10,3 ккал/моль пар оснований (МПО), а в комплексе с лигандом L1 $\Delta H_{пл}^{ДНК} = 7,4$ ккал/МПО. Полученные данные свидетельствуют о том, что лиганды L и L1 по-разному влияют на плавление ДНК.

Таким образом, проведенные исследования влияния воды на взаимодействие производных актиноцина (типа L и L1) с ДНК показали, что феноксазиновая структура интеркалирует в уотсон-криковские пары азотистых оснований, но в зависимости от типа боковых радикалов лиганда по-разному воздействует на двойную спираль ДНК. Лиганд L1 интеркалирует, по-видимому, избирательно, неодинаково возмущая участки, обогащенные АТ- и GC-парами азотистых оснований в спиральной структуре ДНК. Однако оба лиганда L и L1 при образовании комплексов с ДНК взаимодействуют с ее ион-гидратной структурой и оказывают стабилизирующее влияние. Термостабильность комплекса ДНК-L1 выше, чем термостабильность комплекса ДНК-L, что определяется различными механизмами взаимодействия этих лигандов с ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке по программе INTAS'97, грант 31753.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов М.А., Гасан А.И., Малеев В.Я. и др. // Вісн. ХДУ №488. Біофізичний вісник 2000, Вип. 6(1), С. 14-18.
2. Глибин Е.Н., Цукерман В.Б., Гинзбург О.Ф. // ЖОрХ. 1981. Т17., В.3, С. 657-663.
3. Гинзбург О.Ф., Глибин Е.Н., Коршунова З.И., Кривцова М.А., Яворская Н.П., Софьина З.П., Цимбалова С.С. А.С.№677293(СССР), БИ №15, 1992.
4. Яворская Н.П., Голубева И.С., Кубасова И.Ю., Глибин Е.Н. // Хим-фарм.ж. 1996. Т.30. №12. С.22-26.
5. Кривцова М.А., Морошкина Е.Б., Глибин Е.Н., Фрисман Э.В. // Мол. Биол., 1982. Т.16. №1. С.149-155.
6. Морошкина Е.Б., Кузьменко Е.А., Кривцова М.А., Глибин Е.Н. // Мол. Биол., 2000. Т.34. №3. С.448-455.
7. Lober G. // J. Luminescence. 1981, V. 22, P. 221-265.
8. Mc Ghee I.D., von Hippel P.H. // J. Mol. Biol. 1974, V. 86, P. 469-489.
9. Круглова Е.Б. // Молек. биология, 1990, Т.24, вып.2, С.514-523.
10. Semenov M.A., Berezhnyak E.G. // Comments Mol. Cel. Biophys. 2000, V. 10, No.1, P. 1-23.
11. Musso H. and Matthies H.G. // Chem. Ber. 1957. V.90. P.1814-1827.
12. Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я. // Биофизика. 1981, Т. 26, В. 4, С. 979-984.
13. Muller W., Crothers D.M. // J. Mol. Biol. 1968, V. 35, P.251-290.
14. Dervan P.B. // Science, 1986. V. 232, P.4747-4760.
15. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. // Успехи физ. наук, 1971, Т.105, вып.3, С.479-521.

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ γ -ОБЛУЧЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПЛАЗМУ И СЫВОРОТКУ КРОВИ ПО ДАННЫМ СВЧ-ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ

О.А. Горобченко, О.Т. Николов, С.В. Гаташ, В.П. Берест

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61077, Харьков

e-mail: Vladimir.P.Berest@univer.kharkov.ua

Поступила в редакцию 16 ноября 2000 г.

Исследовано влияния γ -облучения и температуры на структурные изменения компонентов сыворотки и плазмы крови методом СВЧ-диэлектromетрии на частоте 9,2 ГГц. Получены зависимости действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей диэлектрической проницаемости плазмы и сыворотки от температуры в интервале 0 – 70 °С при дозах облучения 10 – 80 Гр. Вычислены значения энергии активации дипольной релаксации молекул воды в исследованных системах. Предполагается, что выявленные структурные изменения облученной дозой 30 Гр плазмы, при температурах 37, 42 и 52 °С, сопровождающиеся изменением энергии активации, связаны с конформационными изменениями фибриногена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: плазма крови, сыворотка, γ -облучение, температура, диэлектрическая проницаемость, энергия активации, СВЧ-диэлектromетрия.

Стандартная процедура гемотрансфузии предполагает антибактериальную обработку продуктов, получаемых из донорской крови [1]. В частности, в целях снижения риска инфицирования и посттрансфузионного отторжения рекомендовано облучение продуктов плазмы крови дозами 5000 рад [2]. В предыдущем исследовании мы показали наличие структурных переходов в молекуле фибриногена при облучении дозами 10, 30, 50 и 140 Гр [3]. Эти переходы сопровождаются изменением гидратации белка и могут приводить к изменению функции последнего в русле реципиента после трансфузии. Поэтому целью данной работы являлось изучение структурных изменений белков плазмы крови при γ -облучении дозами 10–80 Гр. Для выяснения параметров этих переходов с использованием метода СВЧ-диэлектromетрии исследовалась температурная зависимость (в области 0–70 °С) диэлектрической проницаемости плазмы и сыворотки донорской крови в области дисперсии свободных молекул воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазму и сыворотку выделяли из донорской крови [4]. Образцы облучали дозами от 1 до 80 Гр источником ^{60}Co на установке типа "Исследователь". Мощность экспозиционной дозы составляла 380 Р/мин.

Измерение действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей комплексной диэлектрической проницаемости плазмы и сыворотки проводилось на СВЧ-диэлектromетре резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц [5] в области температур 0–70 °С. Значения ϵ' и ϵ'' находили по градуировочным кривым, полученным для водно-ацетоновых смесей по данным работы [6]. В величину ϵ'' была внесена поправка в связи с присутствием в растворе неорганических ионов. Для этого измерялась низкочастотная проводимость σ мостом переменного тока Р 586 на частоте 1000 Гц.

Вычислив время диэлектрической релаксации τ , изменение свободной энергии активации дипольной релаксации ΔF молекул воды в изучаемых системах находили из соотношения [7]:

$$\tau = \frac{h N_A}{RT} \exp \left[\frac{\Delta F}{RT} \right],$$

где h – постоянная Планка, R – газовая постоянная, N_A – число Авогадро, T – температура.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получены зависимости ϵ' и ϵ'' от температуры для нативных сыворотки и плазмы и облученных дозами 10, 15, 25, 30, 50 и 80 Гр (рис. 1 – 8). По полученным данным вычислено изменение энергии активации дипольной релаксации молекул воды в изучаемых системах при нагревании, соответствующие Аррениусовы зависимости времени релаксации представлены на рис. 9 – 15.

Для нативной сыворотки диэлектрическая проницаемость ϵ' увеличивается с ростом температуры. При

температуре 46 °С наблюдается излом на температурной зависимости ϵ' . При дальнейшем повышении температуры наблюдается понижение ϵ' и температурный переход при 60 °С, сопровождающийся изменением энергии активации (рис. 9). Понижение ϵ' может свидетельствовать об увеличении в системе количества связанной воды. Аналогичный переход для нативной плазмы, выраженный более явно, наблюдается при температуре 57 – 62 °С и, очевидно, обусловлен наличием фибриногена. Денатурация сопровождается более резким изменением энергии активации.

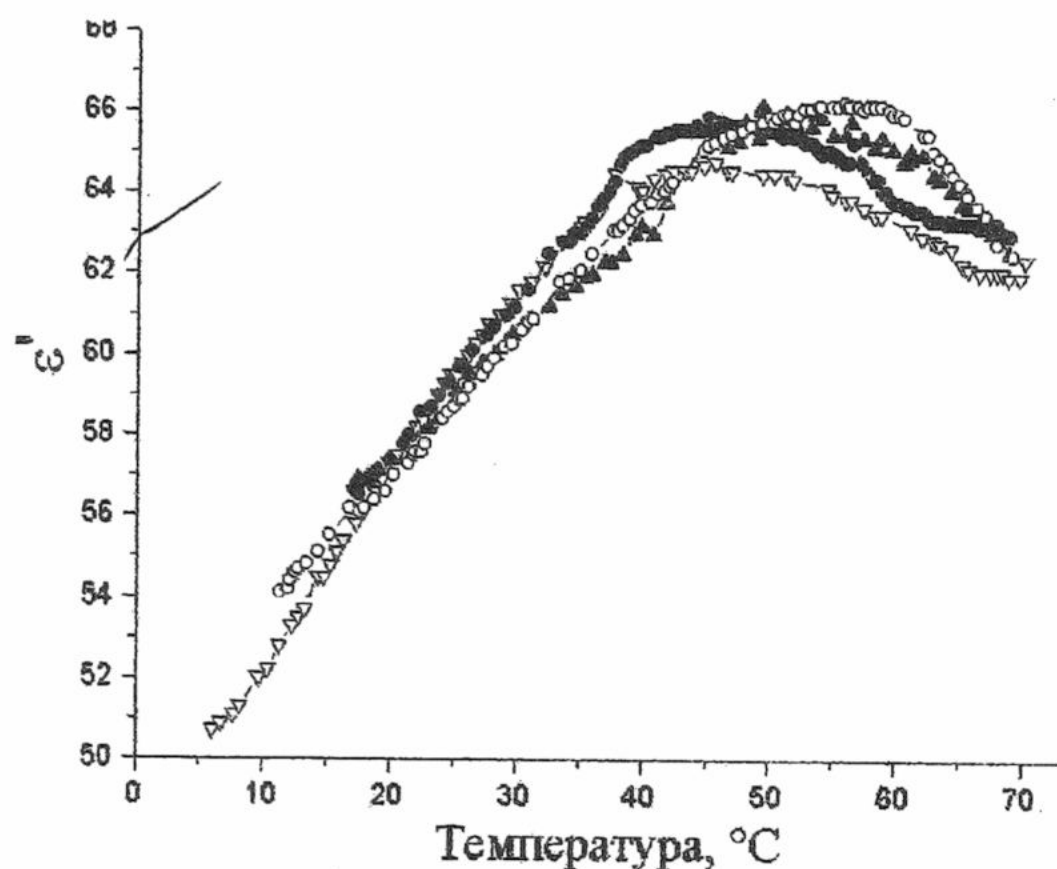


Рис.1 Зависимость ϵ' сыворотки от температуры: ● - необлученный образец, ○ - 10 Гр; ▲ - 15 Гр; ▽ - 25 Гр.

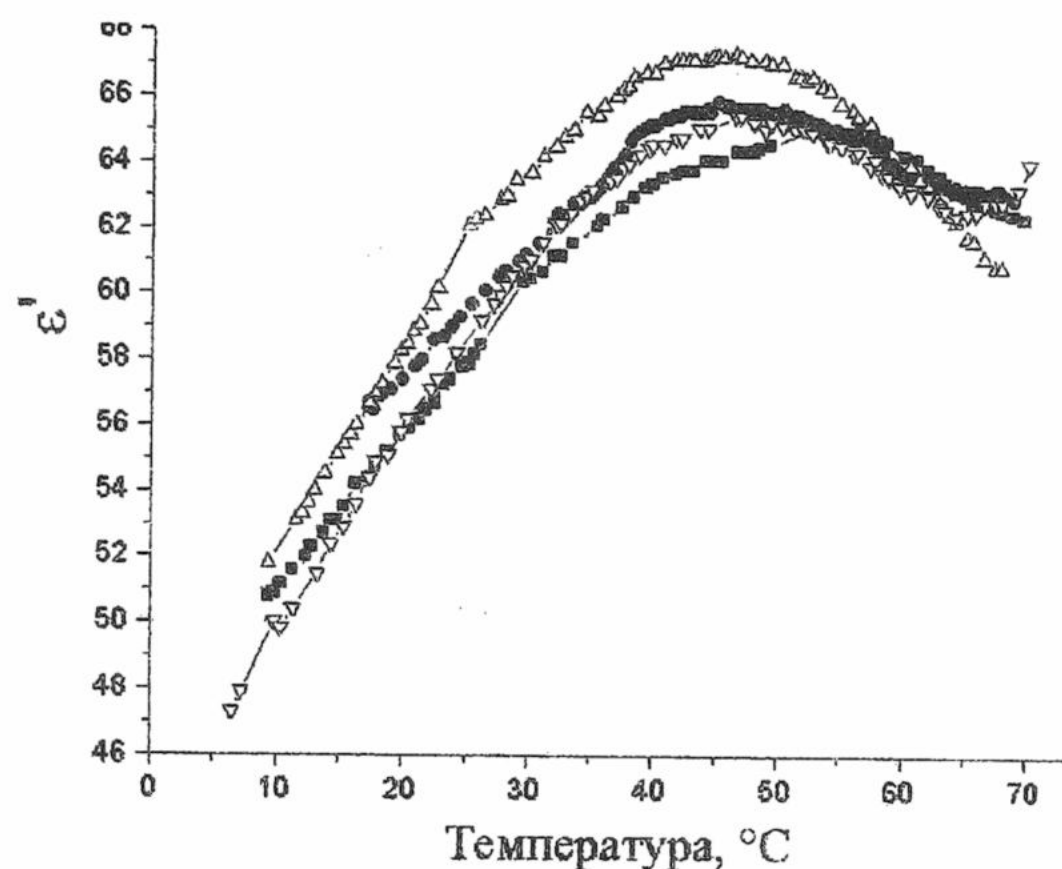


Рис.2 Зависимость ϵ' сыворотки от температуры: ● - необлученный образец, ■ - 30 Гр; Δ - 50 Гр; ▽ - 80 Гр.

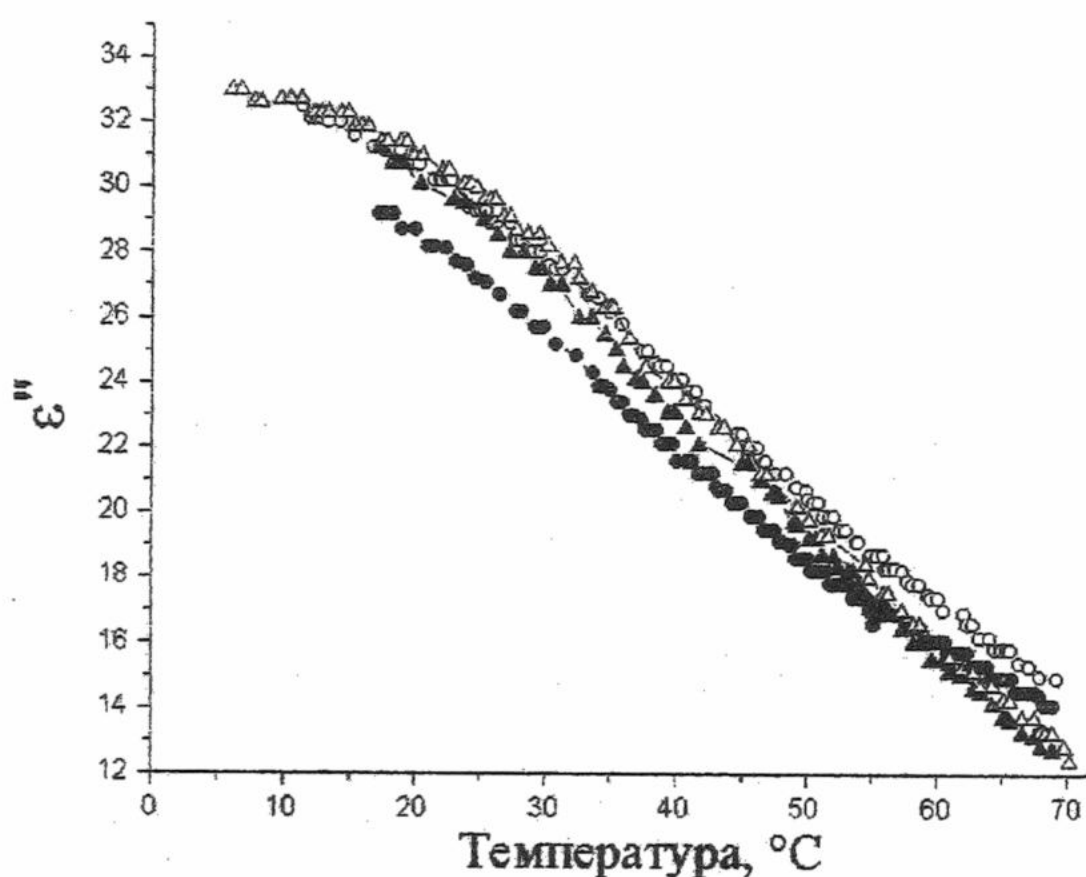


Рис.3 Зависимость ϵ'' сыворотки от температуры: ● - необлученный образец, ○ - 10 Гр; ▲ - 15 Гр; ▽ - 25 Гр

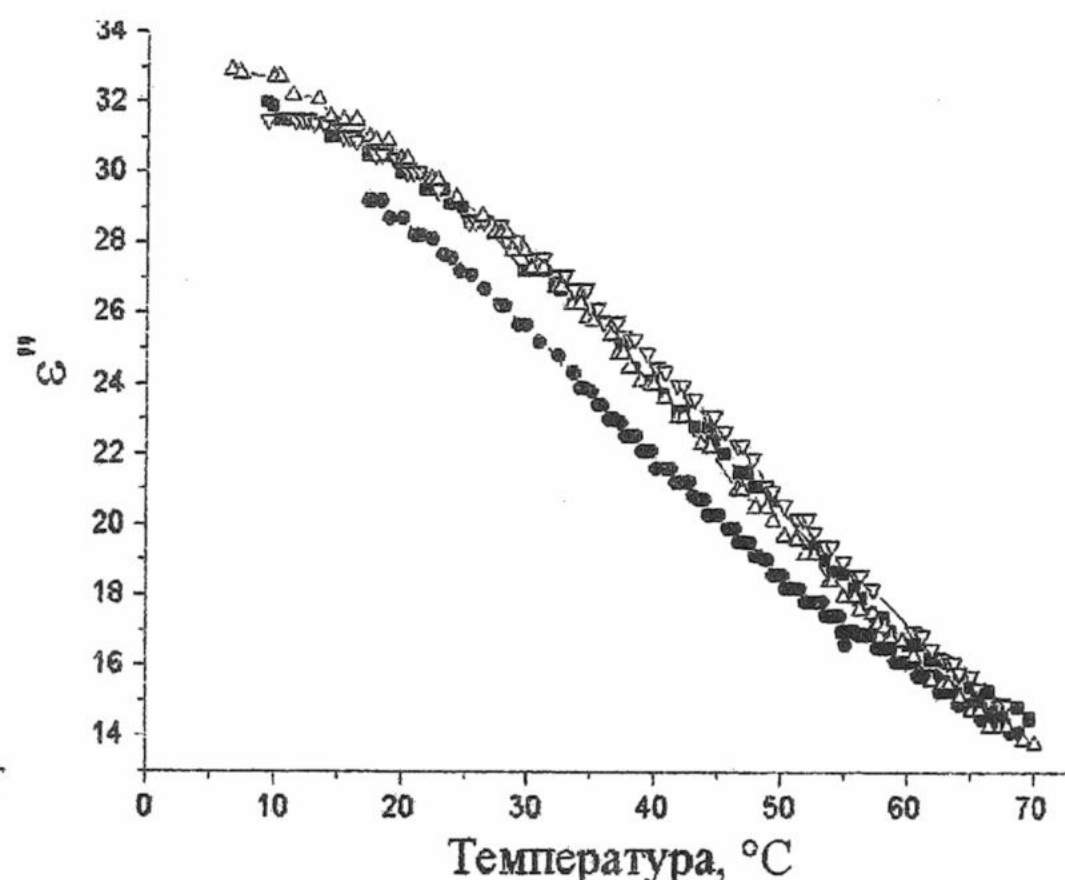


Рис.4 Зависимость ϵ'' сыворотки от температуры: ● - необлученный образец, ■ - 30 Гр; ▽ - 50 Гр; Δ - 80 Гр.

Для сыворотки, облученной дозами 10 и 15 Гр, излом на температурной зависимости действительной части комплексной диэлектрической проницаемости ϵ' смещается в область более высоких температур. Это может свидетельствовать о том, что облученные образцы более устойчивы к действию температуры, возможно в результате образования сшивок между участками белковых молекул. Высокотемпературный денатурационный переход не наблюдается. Учитывая обратимость структурных изменений некоторых белков крови при температурах ниже 50 °С [8], можно рекомендовать для стерилизации препаратов крови прогревать облученные продукты до температуры 50 °С.

Отмечено изменение энергии активации при облучении сыворотки дозами 15 и 25 Гр при 30 °С (рис. 11, 12), дозой 30 Гр - при температурах 30 и 62 °С (рис. 13). При облучении дозой 50 Гр ϵ' сыворотки по абсолютной величине практически во всем температурном интервале выше контроля, а энергия активации

при этой дозе и при дозе 80 Гр сохраняет постоянное значение (рис. 14 и 15). Зависимость диэлектрических потерь ϵ'' от температуры всех образцов сыворотки имеет сигмоидальную зависимость (рис. 7 и 8). По абсолютной величине ϵ'' облученных образцов сыворотки выше контроля, за исключением доз 15 и 25 Гр при высоких температурах, и практически совпадают в пределах погрешности.

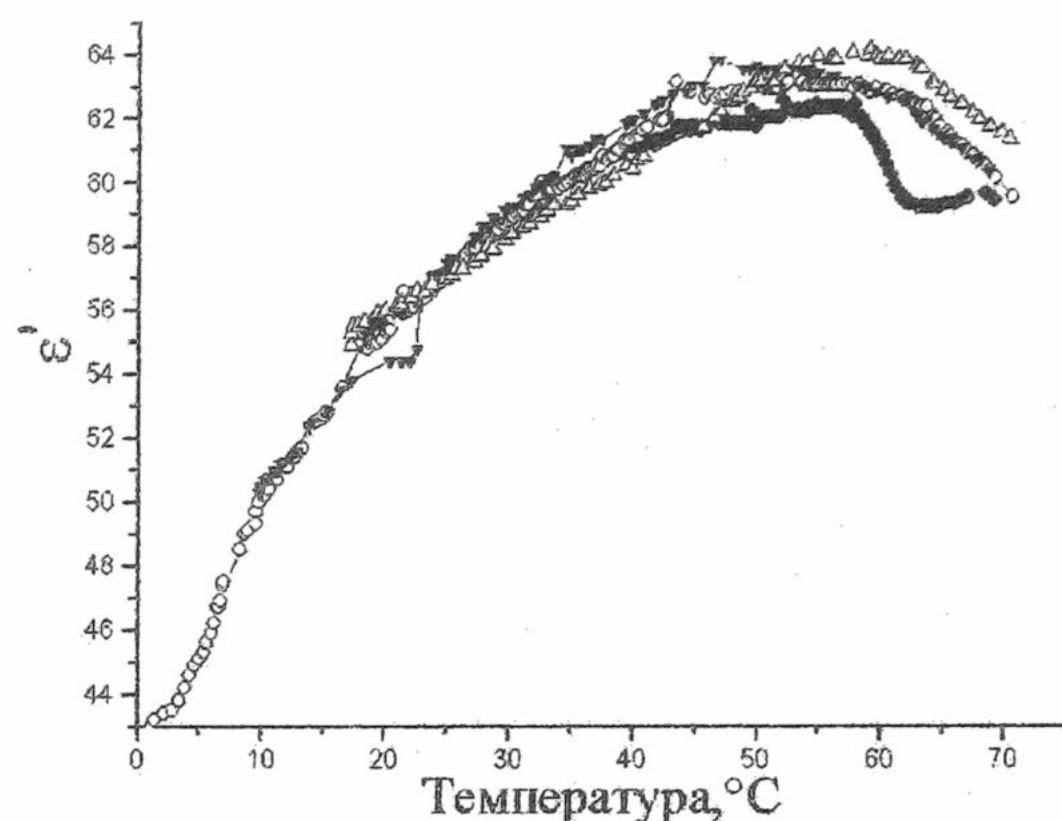


Рис.5 Зависимость ϵ' плазмы от температуры: ● – необлученный образец, ○ – 10 Гр; ▼ – 15 Гр; Δ – 25 Гр.

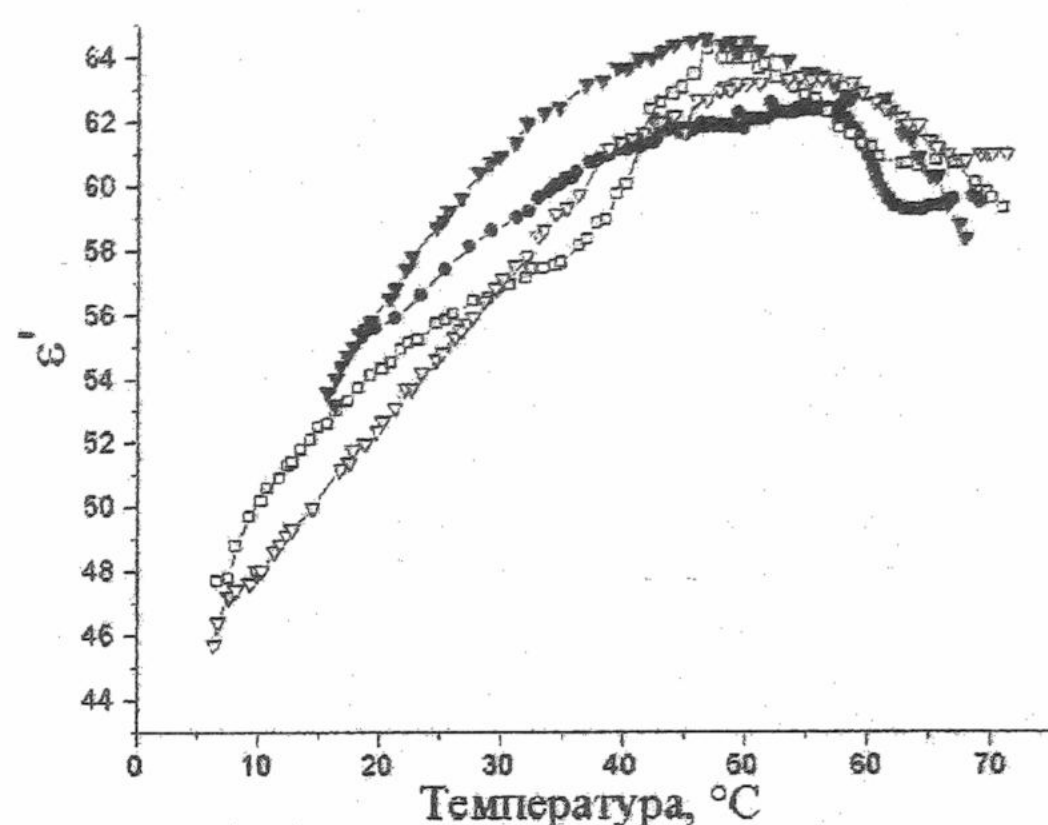


Рис.6 Зависимость ϵ' плазмы от температуры – необлученный образец, ■ – 30 Гр; ▼ – 50 Гр; ▽ – 80 Гр.

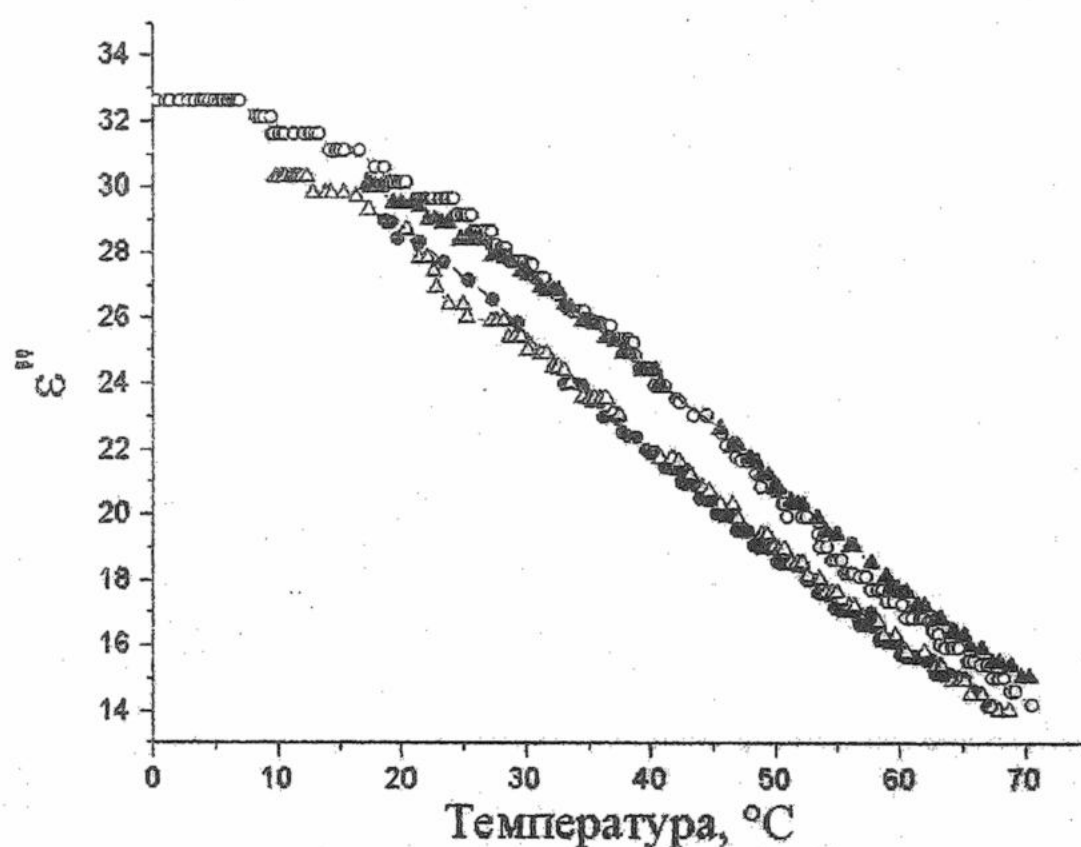


Рис.7 Зависимость ϵ'' плазмы от температуры: ● – необлученный образец, ○ – 10 Гр; Δ – 15 Гр; ▲ – 25 Гр

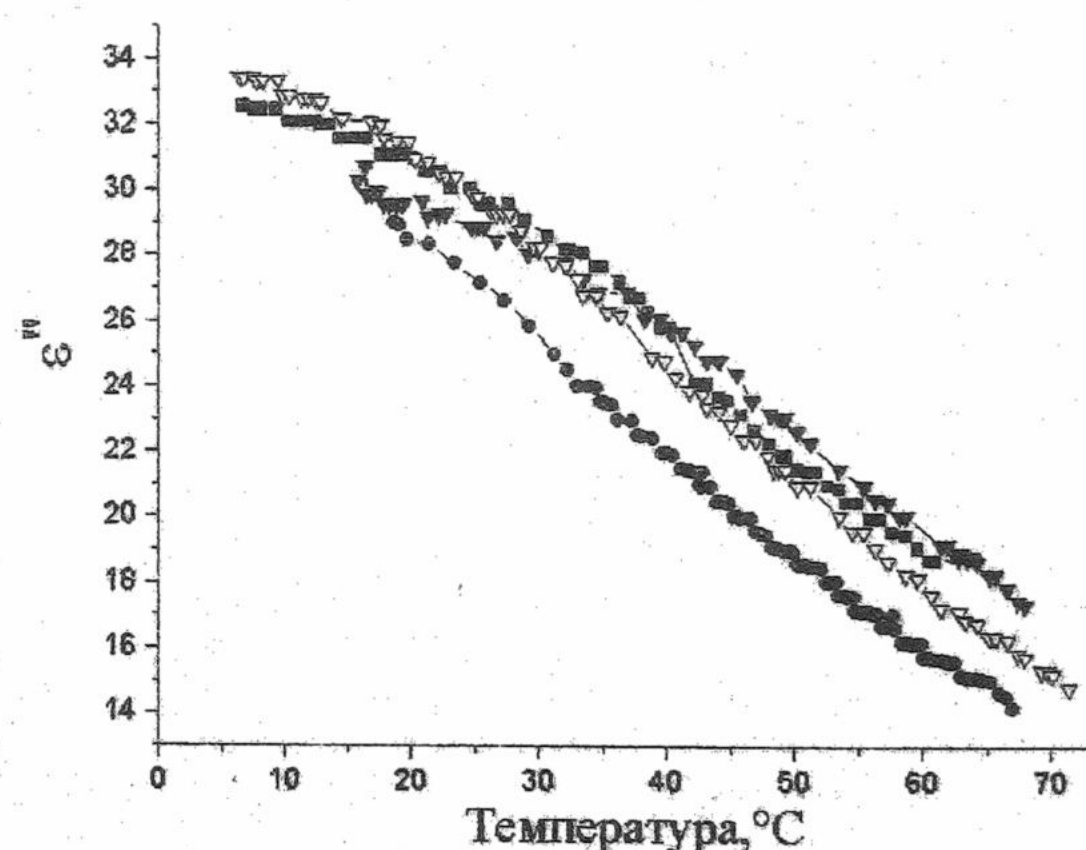


Рис.8 Зависимость ϵ'' плазмы от температуры: ● – необлученный образец, ■ – 30 Гр; ▼ – 50 Гр; ▽ – 80 Гр.

При облучении плазмы дозами 10, 15 и 25 Гр температурные зависимости ϵ' имеют одинаковый характер: ϵ' линейно увеличивается с повышением температуры, особенности отмечены при 55 – 60 °С. Отмечено несколько термотропных переходов белков плазмы с изменением энергии активации, так при облучении дозой 15 Гр излом на Аррениусовой зависимости времени диэлектрической релаксации наблюдается при 23 °С (рис. 11), при облучении плазмы дозой 30 Гр изломы на Аррениусовых зависимостях наблюдаются при 37, 42 и 52 °С (рис. 6, 13). Эти переходы, по-видимому, обусловлены структурными изменениями молекул фибриногена, поскольку в образцах сыворотки при этой же дозе аналогичные изменения не наблюдаются. При облучении дозами 50 и 80 Гр энергия активации во всем интервале температур остается постоянной. Диэлектрические потери плазмы, облученной дозой 15 Гр практически совпадают с контролем. Температурные зависимости ϵ' остальных облученных образцов плазмы выше контроля во всем температурном интервале.

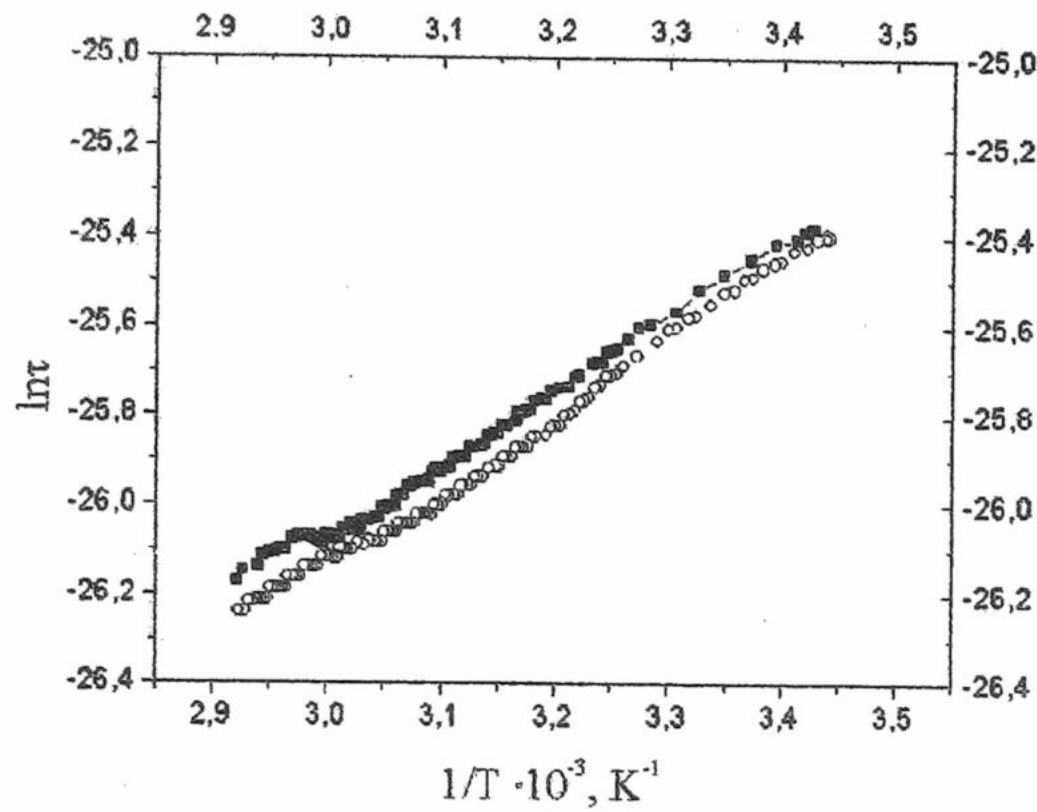


Рис. 9 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды: ■ – нативная плазма; ○ – нативная сыворотка.

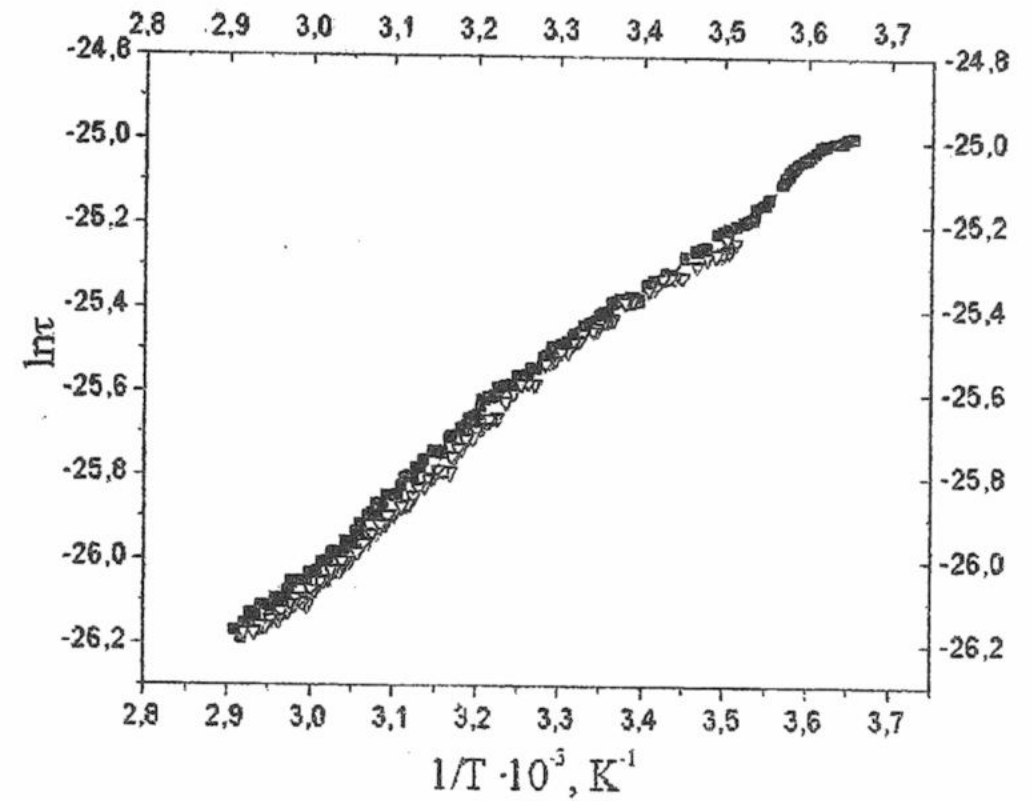


Рис. 10 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах ■ – плазмы и ▽ – сыворотки, облученных дозой 10 Гр.

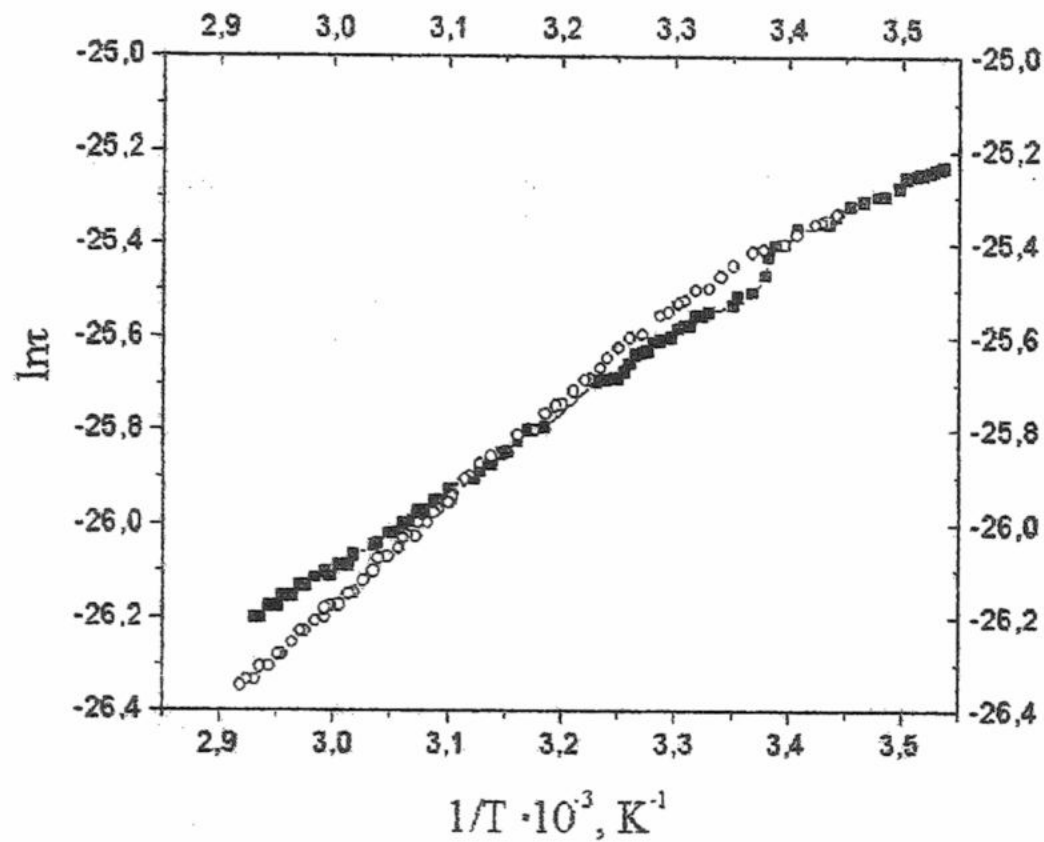


Рис. 11 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах ■ – плазмы и ○ – сыворотки, облученных дозой 15 Гр.

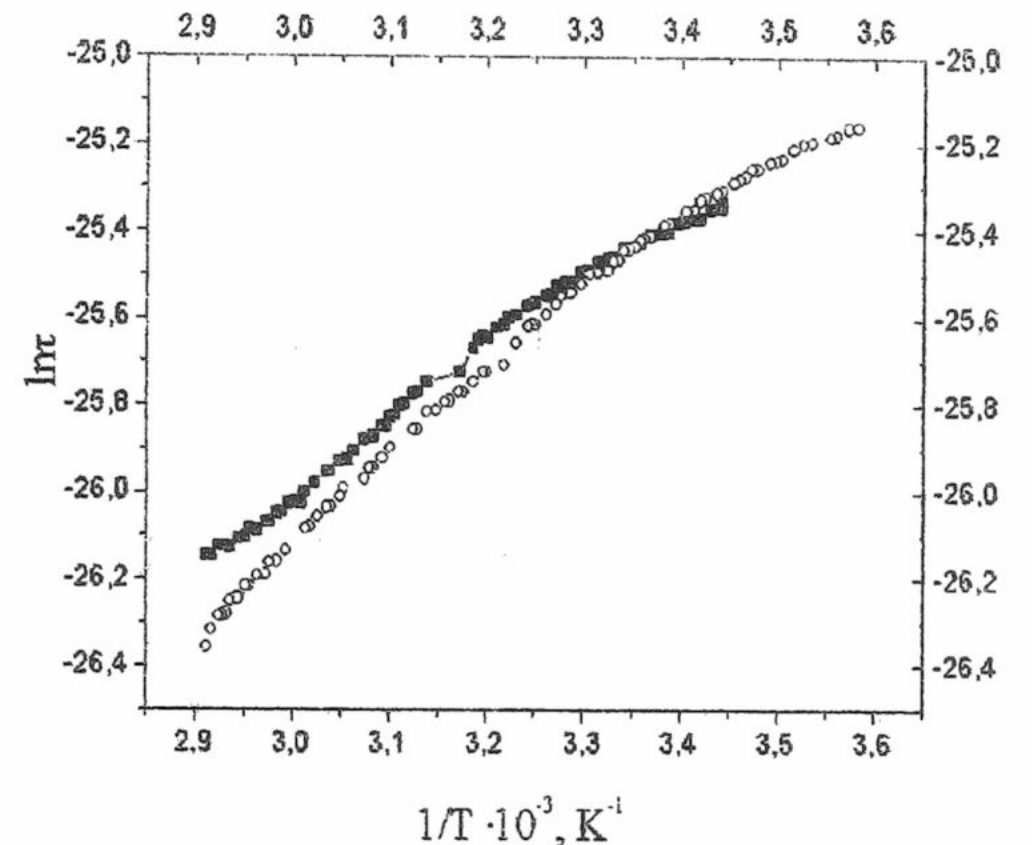


Рис. 12 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах ■ – плазмы и ○ – сыворотки, облученных дозой 25 Гр.

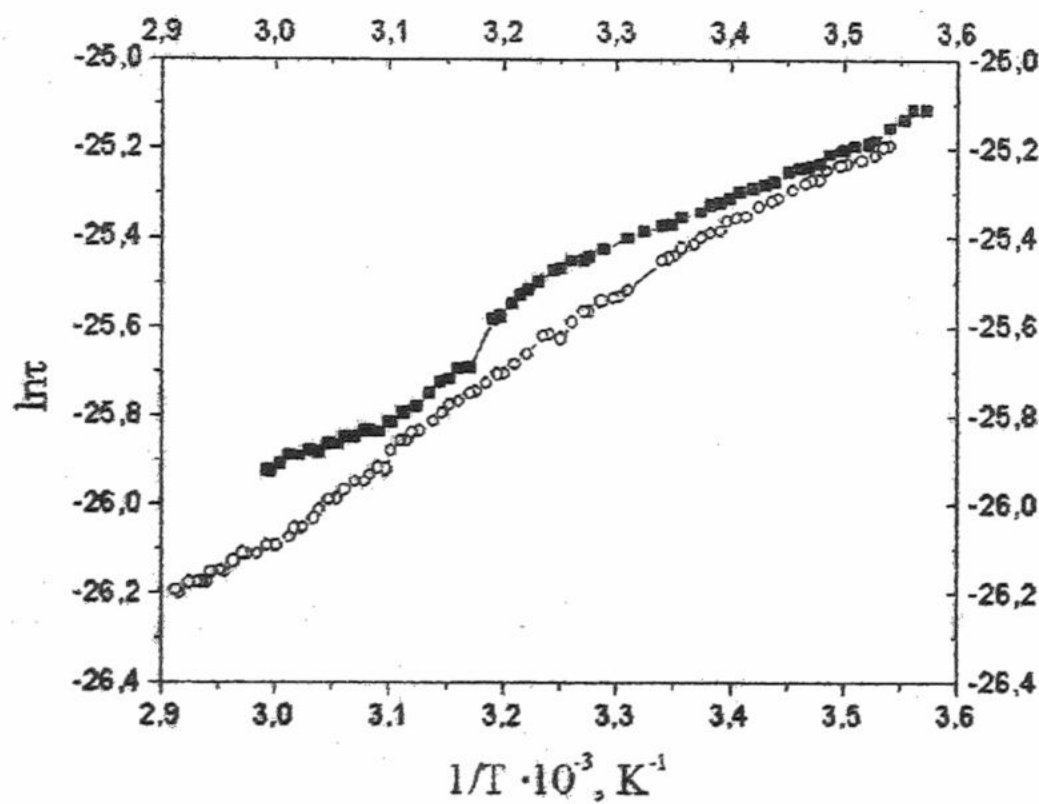


Рис. 13 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах ■ – плазмы и ○ – сыворотки, облученных дозой 30 Гр.

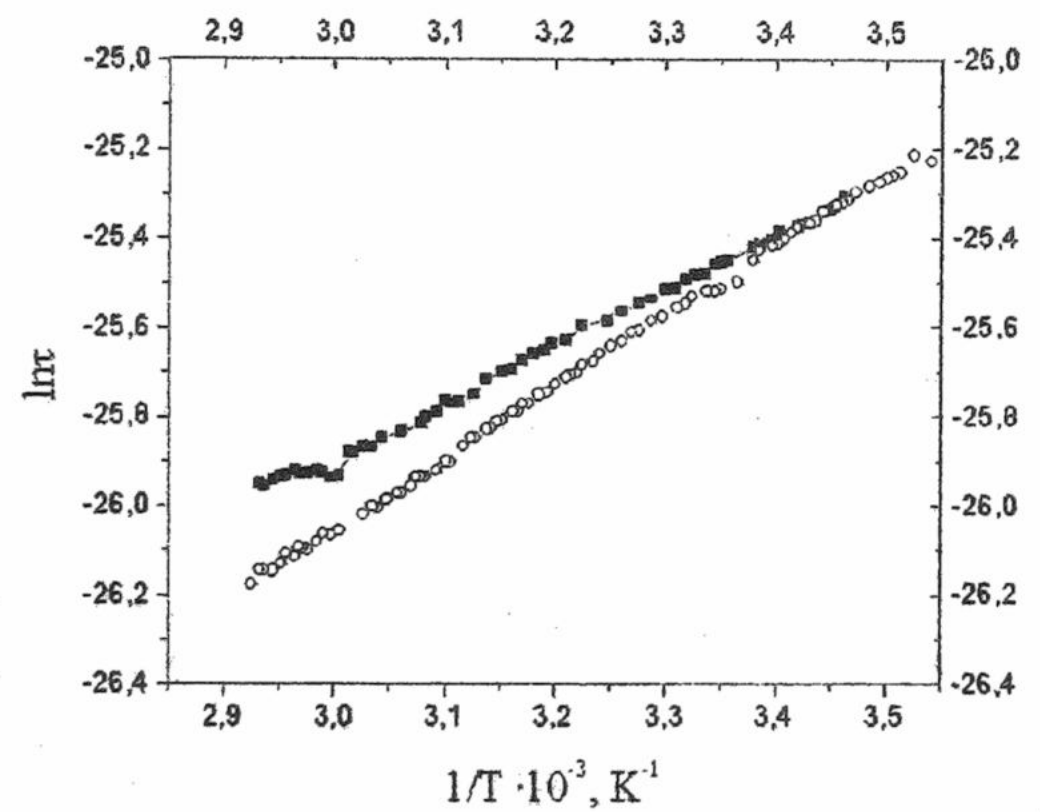


Рис. 14 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах ■ – плазмы и ○ – сыворотки, облученных дозой 50 Гр.

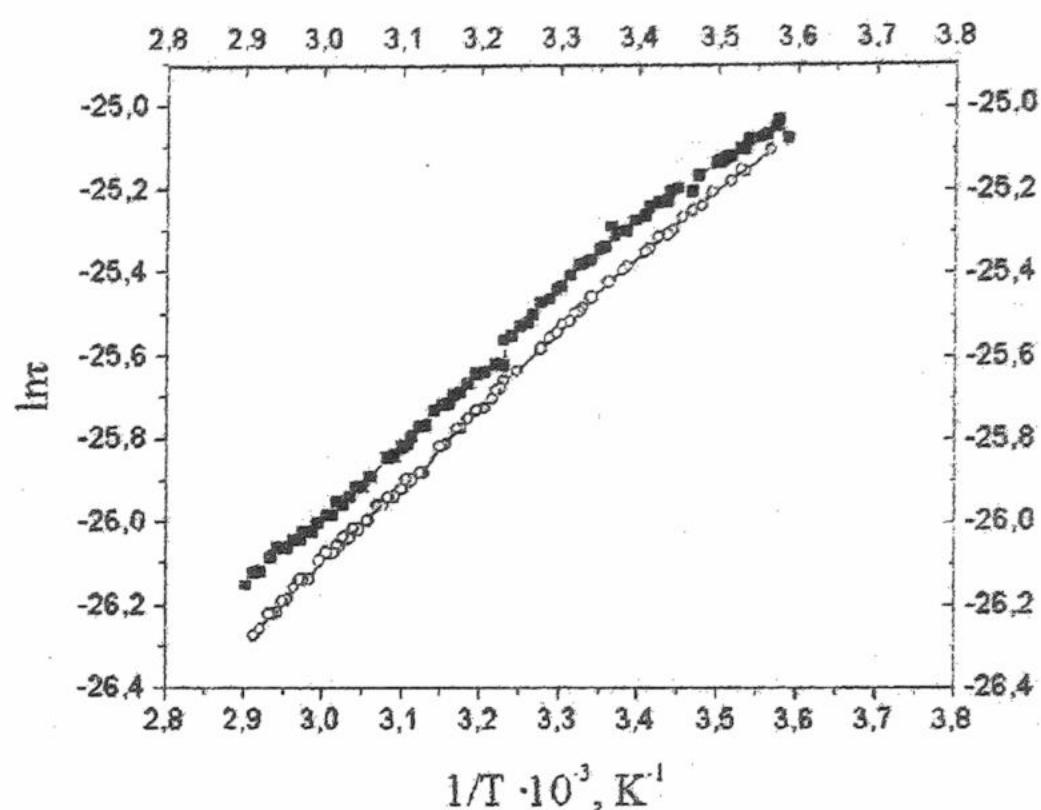


Рис. 15 Аррениусова зависимость времени диэлектрической релаксации воды в образцах ■ - плазмы и ○ - сыворотки, облученных дозой 80 Гр.

ВЫВОДЫ

1. Отмечено увеличение температуры денатурации белков облученных образцов сыворотки и плазмы, которое может быть использовано для усовершенствования методики консервирования препаратов крови.
2. Структурные изменения белков плазмы, облученной дозой 30 Гр, при температурах 37, 42 и 52 °С определяются наличием фибриногена.
3. Минимальное количество связанной белками крови воды наблюдается при дозе облучения 50 Гр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brand A. // Blood Reviews. 2000. V. 14, N 3. P. 130-144.
2. Moroff G., George V.M., Siegl A.M., Luban N.L. // Transfusion, 1986, V.26, №5, p. 453-456.
3. Горобченко О. А., Николов О. Т., Берест В. П., Гаташ С. В. // Вісник Харк. ун-ту, 2000, № 488, Біоф. вісн., вип.1(6), с. 108-111.
4. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. Под ред. Проф. В. В. Меньшикова, М., "Медицина", 1987.
5. Николов О.Т., Жилякова Т.А. // Журн. физ.хим., 1991, Т. 65, N 5, с. 1312-1316.
6. Шахпаронов М.И., Ахадов Я.Ю. // Журн. структур. хим., 1965, Т. 6, N 1, с. 21-26.
7. Глессстон С., Лейдер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М., ИИЛ, 1948.
8. Зима В.Л., Медвідь Л.В., Варецька Т.В., Коваль В.Г. // ДАН УРСР, Сер. Б. 1979. N 5. С. 378-381.

УДК 577.7

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

КВАНТОМЕХАНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ГИДРАТИРОВАННОГО БИСЧЕТВЕРТИЧНОГО АММОНИЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ ДЕКАМЕТОКСИНА

В.А. Пашинская, М.В. Косевич, С.Г. Степаньян

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,
пр. Ленина, 47, 61164, Харьков*

Поступила в редакцию 16 ноября 2000 года

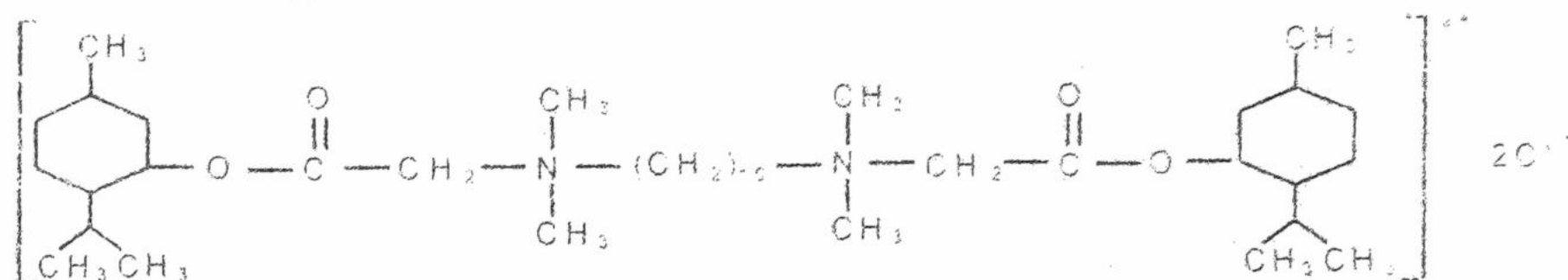
Проведено полумпирическое квантовомеханическое исследование структуры комплекса дикатиона антимиicrobialного бисчетвертичного аммониевого препарата декаметоксина с 36 молекулами воды, моделирующими первую гидратную оболочку дикатиона. Показано, что структура гидратированного дикатиона декаметоксина близка к наиболее энергетически выгодной конформации дикатиона в вакууме, соответствующей вытянутой конфигурации центральной углеводородной цепочки между четвертичными группами азота. Рассчитанная полная энергия межмолекулярных взаимодействий в гидратном комплексе декаметоксина составляет -1361.4 кДж/моль, в том числе -553.1 кДж/моль составляет энергия взаимодействия декаметоксин-вода. Расчет гидратного комплекса дикатиона декаметоксина в конформации с изогнутой центральной углеводородной цепочкой показал, что изменение геометрии органического дикатиона, связанное с изгибом углеводородной цепочки, вызывает увеличение полной энергии системы. Результаты исследования позволяют предположить, что важнейшим фактором, стабилизирующим вытянутую структуру дикатиона декаметоксина как в отсутствие растворителя, так и в гидратном окружении, является электростатическое отталкивание между положительно заряженными четвертичными группами дикатиона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: декаметоксин, гидратация, квантовомеханические расчеты

Одной из актуальных задач молекулярной биофизики является выявление молекулярных механизмов действия биологически активных соединений, применяемых в качестве фармакологических препаратов. Среди них значительный интерес вызывают бисчетвертичные аммониевые соли, некоторые из которых успешно используют в медицине в качестве химиотерапевтических средств [1]. В ходе систематического изучения структуры и физико-химических свойств широко применяемого в Украине антимиicrobialного бисчетвертичного аммониевого препарата декаметоксина [2] была рассчитана геометрия наиболее стабильной структуры дикатиона декаметоксина в вакуумном приближении, определен характер его масс-спектрометрической фрагментации, коррелирующий с наиболее вероятными путями распада препарата в различных средах [3,4]. В работах [5,6] предложен молекулярный механизм антимиicrobialного действия этого препарата, состоящий в образовании невалентных комплексов дикатиона декаметоксина с фосфолипидами мембран клеток бактерий и влиянии таких взаимодействий на параметры фазовых переходов мембранного фосфолипидного матрикса. На основании экспериментальных исследований методами масс-спектрометрии и дифференциальной сканирующей калориметрии, а также квантовомеханических расчетов показано [5,6], что дикатион декаметоксина взаимодействует преимущественно с полярными головками фосфолипидов и предложена модель такого взаимодействия, в которой дикатион декаметоксина в вытянутой конформации углеводородной цепочки (наиболее энергетически выгодной в вакуумном приближении) координируется с полярными головками двух молекул одного из наиболее распространенных фосфолипидных компонентов мембран грамположительных бактерий - дипальмитоилфосфатидилхолина. В связи с предложенной моделью закономерен вопрос, будет ли изменяться конформация дикатиона декаметоксина в присутствии молекул воды (что более адекватно физиологической ситуации) и правомерна ли предложенная с использованием вакуумной конформации модель взаимодействия декаметоксина с головками дипальмитоилфосфатидилхолина для случая гидратированного дикатиона декаметоксина. Поиск ответа на этот вопрос и составил предмет настоящего квантовомеханического исследования, а цель работы можно сформулировать как определение структуры дикатиона бисчетвертичного аммониевого соединения декаметоксина в водном окружении, моделирующем первую гидратную оболочку.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлся представитель класса бисчетвертичных аммониевых соединений - декаметоксин, структурная формула молекулы которого имеет вид



Как видно из структурной формулы дикатион декаметоксина имеет в своем составе два четвертичных азота, разделенных углеводородной цепочкой из 10 метиленовых групп, и терминальные ментильные кольца. Общее число атомов в дикатионе декаметоксина - 118. Для установления влияния воды на структуру декаметоксина проведен расчет комплекса дикатиона с 36 молекулами воды, моделирующими его первую гидратную оболочку. Количество молекул воды, вводимое в начальную геометрию комплекса для расчета, определялось необходимостью гидратации всех атомных групп дикатиона, несущих наиболее существенный избыточный положительный заряд, обусловленный зарядом дикатиона в целом, а также протоноакцепторных групп $-\text{CO}-\text{O}-$. Число атомов в комплексе дикатион декаметоксина + 36 H_2O составляет 226.

Поскольку количество атомов в системе дикатион декаметоксина и 36 молекул воды исключает возможность использования неэмпирических методов расчета для определения структурных параметров системы, оптимизация геометрии гидратированного комплекса дикатиона проводилась полуэмпирическим квантовохимическим методом AM1 (Austin Model). Полуэмпирические методы успешно применялись для расчета гидратных комплексов протонированных молекул фармакологических препаратов грамицидина, брадикинина, иона тетраметиламмония [7].

Выбор в качестве метода исследования AM1, основанного на приближении MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), обусловлен тем, что энтальпии образования и геометрии молекул, рассчитанные этим методом, находятся в лучшем согласии с экспериментом по сравнению с другими полуэмпирическими методами расчета [8], причем метод AM1 основан на приближении нулевого двухцентрового дифференциального перекрывания, которое приводит к значительному сокращению числа двухэлектронных интегралов и более простой вычислительной процедуре. Отмечается также эффективность метода AM1 при расчетах органических катионов с гетероатомами [8], что особенно важно при выборе расчетного метода для дикатионов бисчетвертичных аммониевых соединений. Следует также подчеркнуть, что метод AM1 дает результаты, не уступающие по точности данным неэмпирических расчетов методом HF/4-31G, причем затраты времени ЭВМ в 1000 раз меньше [8].

Расчеты методом AM1 проводились на PC Pentium II 400 с использованием пакета программ GAMESS [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геометрия дикатиона декаметоксина в водном окружении

В результате расчета с полной оптимизацией геометрии получена структура комплекса дикатиона декаметоксина с 36 молекулами воды, представленная на рис.1. Гидратированный органический дикатион имеет геометрию, соответствующую вытянутой конформации углеводородного радикала между четвертичными азотами и сходную с наиболее энергетически выгодной геометрией изолированного дикатиона в вакуумном приближении, описанной в [3]. В таблице 1 приведены некоторые структурные параметры рассчитанных геометрий дикатиона декаметоксина в изолированном состоянии и в комплексе с водой. Сравнение этих данных показывает, что эти параметры при гидратации дикатиона практически не изменяются. Расстояние между четвертичными азотами в дикатионе при гидратации 36 молекулами воды уменьшается на величину 0,36 Å. Уменьшение средней длины $-\text{C}-\text{C}-$ связи при гидратации дикатиона не превышает 0,01 Å, а угла между связями в углеродной цепочке - 0,1°. Приведенные данные свидетельствуют о сохранении в гидратированном дикатионе декаметоксина вытянутой конформации полиметиленовой цепочки $-(\text{CH}_2)_{10}-$.

Метильные заместители при четвертичных азотах, как для изолированного декаметоксина, так и для гидратированного ориентированы в противоположных направлениях относительно оси полиметиленовой цепочки, также как и ментильные кольца находятся в *транс*-положении относительно оси.

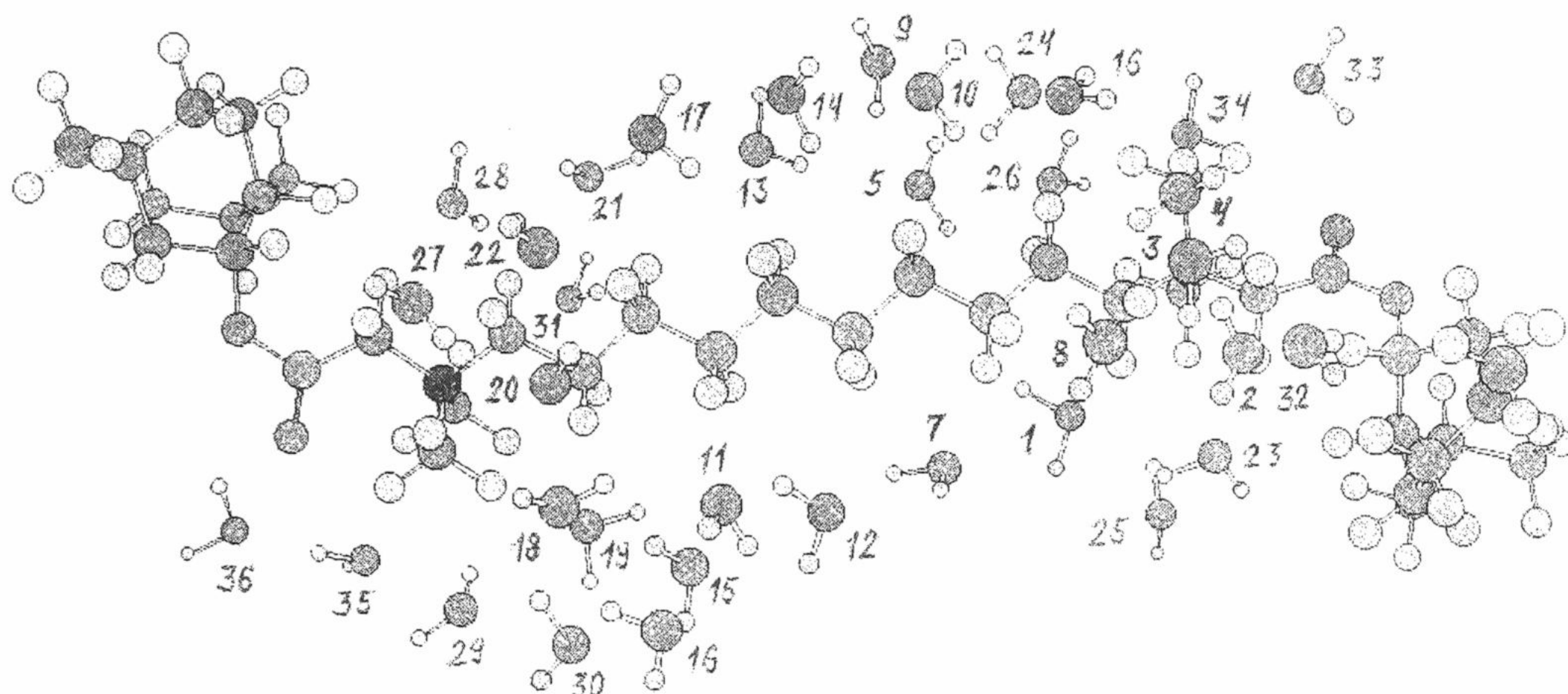


Рис.1. Структура комплекса дикатиона декаметоксина с 36 молекулами H_2O . Номера молекул воды соответствуют таковым в табл. 2.

Таблица 1. Структурные параметры дикатиона декаметоксина в изолированном состоянии и в комплексе с 36 молекулами воды.

Параметр	Дикатион декаметоксина в вакуумном приближении	Гидратированный дикатион декаметоксина
Расстояние между четвертичными азотами $r_{\text{N-N}}$, Å	13,87	13,51
Средняя длина связи -C-C- в углеводородной цепочке, Å	1,518	1,515
Средний угол между атомами углерода в цепочке, град	110,47	110,37

Факт сохранения вытянутой конформации декаметоксина при его взаимодействии с водой позволяет сделать вывод, что решающий вклад в конформацию органического дикатиона вносит электростатическое отталкивание между положительно заряженными четвертичными группами, которое слабо экранируется в присутствии 36 молекул воды.

Энергия межмолекулярных взаимодействий в комплексе декаметоксин + 36 молекул воды составляет -1361,4 кДж/моль, причем -553,1 кДж/моль приходится на взаимодействие декаметоксин-вода и -808,3 кДж/моль на взаимодействие вода-вода.

Для выявления возможности реализации других конформаций дикатиона декаметоксина в гидратном окружении проведен расчет комплекса 36 молекул воды с дикатионом декаметоксина с изогнутой конформацией центрального углеводородного радикала (при задании начальной геометрии перегиб в центре цепочки дикатиона декаметоксина составлял 120° по сравнению с вытянутой конформацией дикатиона). Полная энергия гидратного комплекса дикатиона декаметоксина в вытянутой и изогнутой конформации углеводородного радикала составляет -739,820704 а.е. и -739,791291 а.е. соответственно. Эти данные показывают, что изгиб углеводородной цепочки в органическом дикатионе, уменьшающий расстояние между четвертичными азотами ($r_{\text{N-N}}$ в вытянутой конформации составляет 13,87 Å в сравнении с 13,23 Å в изогнутой конформации гидратированного дикатиона), приводит к значительному увеличению энергии системы на величину 77,1 кДж/моль.

Проведенные расчеты свидетельствуют о том, что более выгодной в гидратном окружении является структура дикатиона декаметоксина, близкая к наиболее вытянутой конформации углеводородной цепочки дикатиона.

Характеристика гидратного окружения дикатиона декаметоксина

Из рисунка 1 видно, что в комплексе декаметоксин +36 H_2O , молекулы воды, моделирующие первую гидратную оболочку, располагаются в основном вдоль оси дикатиона, гидратируя группы четвертичных азотов и центральной углеводородной цепочки, несущие избыточный положительный заряд, а также протоноакцепторные центры $-\text{CO}-$ групп.

Анализ характера взаимодействия молекул воды в комплексе с дикатионом декаметоксина позволяет утверждать, что структура первой гидратной оболочки полностью определяется характером распределения заряда в дикатионе декаметоксина. В работе [2] показано, что положительный заряд четвертичных групп в дикатионе не концентрируется на атомах азота, а распределяется по атомам водорода заместителей при четвертичном азоте. Причем около 83% единичного положительного заряда локализуется на водородах двух метильных и двух метиленовых групп, ближайших к азоту, а остальные 17% заряда распределены по другим атомам водорода центрального и терминального радикалов (около 11% из них приходится на цепочку $-(\text{CH}_2)_4-$, лежащую между ближайшей к азоту $-\text{CH}_2-$ группой и центром дикатиона). Таким образом, факт распределения положительного заряда сдвигает гидрофильно-липофильный баланс в углеводородной цепочке $-(\text{CH}_2)_{10}-$ между четвертичными азотами в декаметоксине в сторону меньшей липофильности по сравнению с таковым для гидрофобной полиметиленовой цепочки $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$. Даже минимальный из всех зарядов на водородах в цепочке декаметоксина - заряд на атомах водорода при центральных атомах C цепочки - углеродах C5 и C6 - составляет +0,088, а в полиметиленовой цепочке заряд на всех атомах водорода одинаков и составляет +0,079. Проведенные методом АМ1 дополнительные расчеты комплексов дикатиона декаметоксина с одной молекулой воды и полиметиленовой цепочки с одной молекулой воды, локализованной вблизи одного из центральных атомов - углероде C5 цепочки $-(\text{CH}_2)_{10}-$, показали, что меньшая гидрофобность цепочки у декаметоксина приводит к значительному возрастанию по абсолютной величине энергии взаимодействия декаметоксина с молекулой воды по сравнению с таковой для $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$. Так, энергия межмолекулярного взаимодействия полиметиленовой цепочки с одной молекулой воды составляет -5,5 кДж/моль, а энергия взаимодействия дикатиона декаметоксина с молекулой воды практически в три раза больше по абсолютной величине: -15,4 кДж/моль.

Для энергетического описания характера взаимодействия молекул воды в комплексе с дикатионом проведены расчеты энергии взаимодействия каждой молекулы воды из гидратного окружения с дикатионом. Данные расчетов, приведенные в табл. 2, показывают, что наибольшая энергия взаимодействия у молекул воды, локализованных вблизи кислородов карбоксильных групп дикатиона (атомы кислорода O57 и O88 дикатиона) и углеводородных групп, ближайших к четвертичным азотам (атомы C1, C2, C9, C10, C32, C33, C34, C45, C46, C47 дикатиона). Ряд молекул воды имеют очень малую энергию взаимодействия с дикатионом, сравнимую с величиной энергии взаимодействия молекулы воды с полиметиленовой цепочкой $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$.

Приведенные выше данные о характере делокализации заряда в дикатионе декаметоксина хорошо объясняют факт наибольшей гидратации в рассчитанной геометрии атомов первой координационной сферы четвертичных азотов в дикатионе и присутствия молекул воды вдоль углеводородной цепочки между четвертичными азотами.

На рис.2 представлена гистограмма распределения молекул воды гидратного комплекса дикатиона декаметоксина по энергиям их взаимодействия с дикатионом. Из гистограммы видно, что семь молекул воды имеют энергию взаимодействия с дикатионом меньше по абсолютной величине, чем -5 кДж/моль (энергия взаимодействия молекулы воды с гидрофобной полиметиленовой цепочкой). Эти молекулы слабо взаимодействуют с дикатионом и могут не рассматриваться при моделировании первой гидратной оболочки дикатиона декаметоксина.

Наибольшее количество молекул воды (18) из гидратного окружения декаметоксина имеет энергию взаимодействия с дикатионом, лежащую в интервале от -5 кДж/моль до -20 кДж/моль. Одиннадцать молекул воды имеют энергию взаимодействия по абсолютному значению превышающую величину -20 кДж/моль (средняя энергия взаимодействия молекул воды в димере), что позволяет отнести их к числу сильно связанных молекул гидратного окружения. Из них энергия пяти молекул воды лежит в интервале от -20 кДж/моль до -30 кДж/моль, а шесть молекул воды, гидратирующих наиболее гидрофильные группы дикатиона, имеет энергию взаимодействия от -30 кДж/моль до -40 кДж/моль.

Квантовомеханическое исследование структуры ...

Таблица 2 Структурные и энергетические параметры гидратного окружения дикатиона декаметоксина

Номер молекулы воды	Положение молекулы воды относительно дикатиона				Энергия взаимодействия с дикатионом, кДж/моль
	N^A	$R_{O-C}^B, \text{\AA}$	N^C	$R_{H-H}^D, \text{\AA}$	
1	1	3,19	11	2,61	-25,9
2	1	3,41	12	2,31	-24,3
3	1	4,99	12	3,97	-10,4
4	2	3,76	12	2,34	-33,1
5	2	3,62	14	2,35	-6,42
6	2	3,35	13	2,41	-3,9
7	3	3,41	16	2,35	-11,9
8	3	3,57	15	2,42	-23,1
9	4	4,32	17	2,41	1,4
10	4	3,24	18	2,07	0,4
11	5	4,24	23	2,93	-14,4
12	5	3,29	20	2,45	-5,8
13	6	3,39	21	2,46	-10,8
14	6	3,54	17	2,56	-1,8
15	7	3,84	27	2,57	-4,2
16	7	5,43	23	4,48	-1,9
17	8	3,17	21	2,24	-11,3
18	9	3,37	27	2,39	-17,9
19	9	2,96	28	2,23	-31,7
20	10	3,67	29	2,32	-7,9
21	10	3,62	17	2,17	-8,4
22	32	3,14	43	2,42	-38,1
23	33	3,20	40	2,29	-18,3
24	34	4,11	43	2,51	-8,5
25	34	2,65	40	2,10	-15,9
26	45	3,23	50	2,71	-36,1
27	45	3,20	29	2,37	-35,9
28	46	3,69	30	2,28	-4,0
29	46	4,12	53	2,33	-16,4
30	47	3,06	56	2,69	-17,2
31	46	2,84	53	2,29	-25,8
32	47	3,15	51	2,47	-8,4
33	62	3,80	79	2,17	-7,6
	N^E	$R_{H-O}^F, \text{\AA}$	N^C	$R_{H-H}^D, \text{\AA}$	
34	57	3,05	38	2,5	-25,1
35	88	2,21	54	2,54	-31,7
36	88	2,21	54	3,1	-11,5

 N^A - номер атома С дикатиона декаметоксина; R_{O-C}^B - расстояние атома О молекулы воды до ближайшего атома С дикатиона; N^C - номер атома Н дикатиона; R_{H-H}^D - расстояние атома Н молекулы воды до ближайшего атома Н дикатиона; N^E - номер атома О дикатиона; R_{H-O}^F - расстояние атома Н молекулы воды до ближайшего атома О дикатиона.

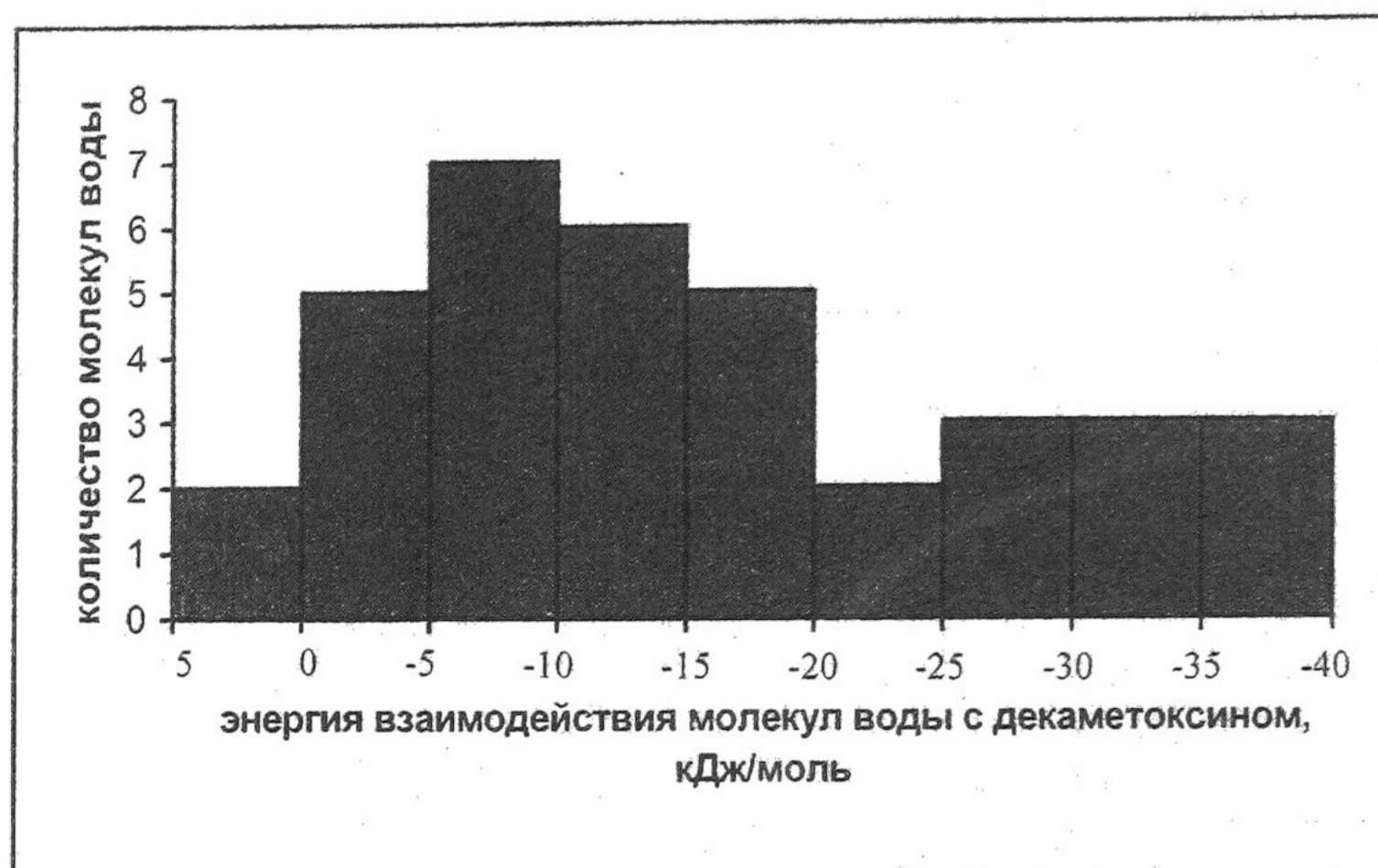


Рис.2. Распределение молекул воды гидратного окружения дикатиона декаметоксина по энергиям взаимодействия с дикатионом.

ВЫВОДЫ

Проведенное в данной работе квантовомеханическое исследование комплекса дикатиона декаметоксина с 36 молекулами воды, моделирующими его первую гидратную оболочку, позволило сделать следующие выводы:

- 1) Структура дикатиона декаметоксина в присутствии 36 молекул воды близка к наиболее энергетически выгодной конформации изолированного дикатиона в вакуумном приближении и соответствует вытянутой геометрии углеводородной цепочки между четвертичными группами азота.
- 2) Характер взаимодействия молекул воды гидратного окружения дикатиона декаметоксина определяется характером делокализации зарядов в дикатионе. Наиболее гидратированными оказываются атомные группы, имеющие наибольшую плотность заряда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виевский А.Н. Механизмы биологического влияния катионных поверхностно-активных веществ. - М.:Б.И., 1991. - 250 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Часть 2. - М.: Медицина, 1978. - 560 с.
3. Косевич М.В., Пашинская В.А., Шилаги З., Векей К., Шелковский В.С., Благый Ю.П. // Вісник Харк. ун-ту № 422. Біофізичний вісн. - 1998. - Вип.2. - С.15-23.
4. Kosevich M.V., Pashinskaya V.A., Stepanian S.G., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. // Вісник Харк. ун-ту № 434. Biophys. Bulletin. - 1999. - Вип. 1. - Р. 31-38.
5. Пашинская В.А., Косевич М.В., Гомори А., Векей К., Корзовская О.В., Лисецкий Л.Н., Благый Ю.П. // Вісник Харк. ун-ту № 450. Biophys. Bulletin. - 1999. - Вип. 2. - С. 59-62.
6. Korzovskaya O.V., Pashinskaya V.A., Kosevich M.V., Lisetski L.N. // Вісник Харк. ун-ту № 450. Biophys. Bulletin. - 1999. - Вип. 2. - Р. 35-39.
7. Sang-Won Lee, Freivogel P., Schindler T., Beauchamp J.L. // J. Am. Chem. Soc. - 1998. - V.120. - P. 11758-11765.
8. Dewar M.J.S., Zorbish E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. // J. Am. Chem. Soc. - 1985. - V.107. - P. 3902-3909.
9. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J. // J. Comput. Chem. - 1993. - V.14. - P. 1347.

УДК 577.3

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

РОЛЬ ІОНІВ Ca^{2+} У РЕГУЛЯЦІЇ СКОРОЧЕННЯ ТА РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

Н.П. Семенова, Т.Л. Давидовська, І.Б. Філіппов,
К.І. Богуцька, М.С. Мірошніченко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська 64, Київ, 01033, Україна
e-mail: mirosh@biocc.univ.kiev.ua

Надійшла до редакції 21 жовтня 2000 р.

В огляді узагальнено результати досліджень щодо ролі іонів кальцію (Ca^{2+}) у функціональній активності гладеньком'язових клітин (ГМК). Розглянуто механізми, що забезпечують надходження та видалення іонів Ca^{2+} з клітини, перерозподіл даних катіонів всередині клітини, а також модифікацію вищезгаданих процесів під впливом різноманітних факторів, що дозволяє з'ясувати особливості функціонування ГМК.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: іони кальцію, саркоплазматичний ретикулум, гладеньком'язова клітина, кальцій-індуковане вивільнення кальцію, спарки, спонтанний тимчасовий вихідний струм.

В основі функціонування ГМК стінок кровоносних, лімфатичних судин, а також вісцеральних органів лежать процеси циклічного скорочення та розслаблення. Вони запускаються однаковими чинниками і протікають за схожими схемами.

Як відомо, основним фактором, що регулює функціональну активність гладеньких м'язів (ГМ), є зміна внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Загальновідома роль даних катіонів як вторинних посередників у процесі активації м'язового скорочення [1-4], а також у регуляції багатьох життєво важливих функцій організму [5-9].

Молекулярна схема механізму скорочення та розслаблення ГМ виглядає наступним чином [10]: збудження (нейрональне чи гормональне) ГМК призводить до підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ від 140 нМ у стані спокою до 500-700 нМ з їх подальшим зв'язуванням з кальмодуліном (КМ) у співвідношенні 4 іони Ca^{2+} на молекулу КМ. Це викликає конформаційні зміни кальмодуліну, внаслідок чого стає можливою його взаємодія з рядом білків, у тому числі з кіназою легких ланцюгів міозину (КЛЛМ). Утворюється комплекс $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-КМ-КЛЛМ}$, який являє собою активну форму міозину та каталізує перенос кінцевої фосфатної групи MgATP на Ser 19 у кожному з двох легких ланцюгів міозину. Ця проста реакція фосфорилування запускає циклічне зміщення міозинових містків уздовж актинових філаментів, що супроводжується генерацією сили та/або скороченням м'яза. Розслаблення міоциту відбувається внаслідок відновлення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у стані спокою шляхом видалення Ca^{2+} з клітини або закачування даних катіонів до саркоплазматичного ретикулуму (СПР). Внаслідок швидкої дисоціації комплексу відбувається інактивація КЛЛМ. Таким чином, один з можливих механізмів регуляції скорочення ГМ зводиться до контролю за $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Передбачається три можливих шляхи транслокації іонів кальцію, що призводять до підвищення його внутрішньоклітинної концентрації [11]: вхід позаклітинного (у тому числі і зв'язаного з поверхнею клітинної мембрани) кальцію через кальцієві канали плазматичної мембрани; вхід до міоциту мембранозв'язаної фракції кальцію, яка не видаляється безкальцієвим розчином, але видаляється під впливом ЕГТА або іонів лантану (La^{2+}); і нарешті, вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних кальцієвих запасників.

Шляхи входу до міоциту позаклітинного Ca^{2+} .

Болтон [2], ван Брімен [12] та Шуба [13] незалежно один від одного висловили припущення про те, що підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у ГМК може здійснюватися за двома різними механізмами: потенціалзалежним та рецепторкованим.

З усіх відомих на даний час типів потенціалзалежних кальцієвих каналів у ГМК переважають канали L-типу, які повільно інактивуються, та T-типу, які швидко інактивуються. У ГМ можуть переважати канали певного типу: так, наприклад, таенія солі морської свинки переважно містить кальцієві канали L-типу. Між даними типами каналів існує ряд фармако-біофізичних відмінностей: перш за все, канали T-типу активуються, інактивуються та досягають максимальної амплітуди струму при більш негативних значеннях мембранного потенціалу (МП), ніж канали L-типу, швидше інактивуються та повільніше повертаються до активного стану, а також помітно пригнічуються при збільшенні частоти електричного подразнення. Спостерігається різниця щодо чутливості до складу оточуючого середовища: так, заміна Ca^{2+} іонами Ba^{2+} або Sr^{2+} призводить до збільшення амплітуди та зміни кінетичних

характеристик струму кальцієвих каналів. Слід також зауважити, що канали Т-типу більш чутливі до неспецифічних органічних блокаторів та іонів Ni^{2+} , на відміну від каналів L-типу, що селективно блокуються іонами Cd^{2+} та дигідропіридинами [14]. Важливим регуляторним фактором кальцієвих каналів L-типу є $[\text{Ca}^{2+}]_i$, підвищення якої зворотно пригнічує вхід Ca^{2+} до клітини через даний тип каналів [15]. Проте, у ГМК шлунку жаби відзначалося Ca^{2+} -індуковане підвищення входу іонів Ca^{2+} через кальцієві канали L-типу, що пов'язують з участю Ca^{2+} -кальмодулінзалежної протеїнкінази II [16]. Слід зазначити, що форболові ефіри (активатори протеїнкінази C) також викликають підвищення входу Ca^{2+} завдяки активації даного типу каналів [17]. Основні кінетичні характеристики кальцієвих каналів L-типу були детально досліджені в лабораторії М.Ф. Шуби [18, 19].

Канали Т-типу широко розповсюджені у ГМ, де вважаються відповідальними за зміну судинного тону. Крім того, здатність даних каналів активуватися за досить негативних значень мембранного потенціалу свідчить про їхню участь у формуванні струмів, що забезпечують передачу збудження від пейсмейкерної клітини до інших клітин, що характерно для фазних ГМ, активація яких не залежить від рівня МП [20, 21].

Переважає більшість потенціалнезалежних кальцієвих каналів (рецепторкеровані) активуються в результаті зв'язування певних агоністів з рецепторами на поверхні сарколеми. Активація каналів може відбуватися також при подразненні рецепторів розтягнення, що розташовані на поверхні мембрани ГМК [22-24]. Слід додати, що рецепторкеровані канали розглядають як неселективні, що пов'язано з їхньою здатністю транспортувати одновалентні катіони.

Надходження кальцію до внутрішньоклітинних запасників.

Транспорт Ca^{2+} до клітини може відбуватися за двома механізмами: запасаючим, що призводить до заповнення внутрішньоклітинних кальцієвих запасників, та незапасаючим. Показано, що фармакологічно викликане виснаження внутрішньоклітинних запасників кальцію, а також тривала витримка ГМ у безкальцієвому розчині активують запасаючий шлях входження іонів Ca^{2+} до ГМК [25]. Виділяють три фази надходження іонів Ca^{2+} до внутрішньоклітинних запасників - це швидке первинне заповнення, яке надалі стабілізується на досить низькому рівні і з часом знову змінюється прискореним надходженням Ca^{2+} [26]. В експериментах на везикулах з ізольованого СПР ГМК було показано, що швидкість захоплення Ca^{2+} везикулами становила $1,6 \cdot 10^{-17}$ моль/(с·мг білку), на підставі чого була розрахована приблизна швидкість зниження концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі клітини, що дорівнювала 45 нМ/с. Таким чином, у граничних умовах градієнт концентрації Ca^{2+} на мембранах ретикулума оцінюється як 1:25000, причому всередині цистерн саркоплазматичного ретикулума повинний утримуватися запас Ca^{2+} , достатній для 10-кратного стимулювання активації міоцита [27, 28].

Для визначення концентрації іонізованого кальцію всередині цистерн СПР було проведено експерименти з використанням флуоресцентної мікроскопії [29]. Ізольовані культуральні ГМК з аорти навантажували флуоресцентним зондом фура-2АМ і визначали концентрацію іонізованого кальцію в СПР, яка становила 1200-1600 нМ і залишалася стабільною при перфузії АТФ-вмісним внутрішньоклітинним розчином із концентрацією іонів Ca^{2+} 100-200 нМ на протязі 20 хв. У тих же експериментах додавання до середовища 1 мкМ інозитол-1,4,5-трифосфату (ІТФ₃) призводило до біфазних відповідей: початкового короткочасного підвищення рівня концентрації Ca^{2+} у СПР із подальшим швидким зниженням на 80-90 %. Крім того, в експериментах з використанням аналогічної методики на ГМК сечовода морської свинки, навантажених Indo-1, кількість Ca^{2+} , який вивільнюється з СПР шляхом ІТФ₃-залежного викиду, була оцінена як 680 аттомоль ($6,8 \cdot 10^{-16}$) [30], що приймаючи об'єм цитоплазми рівним 3 піколітра ($3 \cdot 10^{-12}$ л), становить 230 мкМ.

СПР у судинних гладеньких м'язах (СГМ) функціонально можна поділити на два типи кальцієвих запасників, один із яких вивільнюється під впливом ІТФ₃, а інший – кофеїну та ріанодину. Ці запасники розділені функціонально, проте не розділені просторово, що підтверджується дослідженнями, проведеними Сомліо [31]. В ГМК аорти пацюка, за даними імуофлуоресцентної конфокальної мікроскопії, ріанодинові рецептори розподілені по всій поверхні СПР.

На процес запасання іонів Ca^{2+} СПР діє широкий спектр фізичних і хімічних чинників. Особливу роль у регуляції переміщення кальцію, пов'язаних із функціонуванням внутрішньоклітинних кальцієвих запасників, відіграє $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Кальцієві канали СПР чутливі до зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Незначне підвищення концентрації цих катіонів викликає звільнення кальцію з внутрішньоклітинних запасників (кальційіндуковане вивільнення кальцію (КІВК)), високі концентрації (вище мікромолекулярних) – навпаки пригнічують даний процес [32]. Так, 2 мкМ Ca^{2+} у присутності 10 нМ ІТФ₃ інгібує зв'язування його з везикулами СПР ГМК аорти собаки [33]. Крім того, було показано, що іони Ca^{2+} викликають модуляцію рецептора ІТФ₃ та/або каналу звільнення кальцію в СПР концентраційно-залежним шляхом [34]. Пізніше була продемонстрована значна подібність ріанодинового рецептора з рецептором ІТФ₃, які аналогічним чином беруть участь у КІВК [35], і, нарешті, підтверджено, що іони Ca^{2+} можуть прямим або

Роль іонів Ca^{2+} у регуляції скорочення та розслаблення гладеньких м'язів

непрямим шляхом, можливо, через кальсеквестрин, регулювати канали ріанодинового рецептора [36]. Крім того, слід зауважити, що активація механочутливих каналів мембрани викликає підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не лише за рахунок входу іонів Ca^{2+} із позаклітинного середовища, але й, у значно більшій мірі, за рахунок КІВК з ріанодинового запасника СПР [22].

На внутрішньоклітинну локалізацію кальцію впливає рівень рН. На ГМК detrusor морської свинки показано, що позаклітинне закислення призводить до пригнічення внутрішньоклітинних переміщень кальцію внаслідок зменшення трансмембранного входу через кальцієві канали L-типу, і навпаки, внутрішньоклітинне закислення підсилює карбахолін- та кофеїн-індуковані переміщення кальцію завдяки посиленню захоплення кальцію внутрішньоклітинними запасниками в результаті підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в спокої [37]. Крім того, показано, що внутрішньоклітинне закислення в ГМК міометрію збільшує тривалість і амплітуду потенціалу дії (ПД) шляхом посилення вхідного кальцієвого струму (підвищення рН має протилежний ефект) [38]. Вплив внутрішньоклітинної концентрації протонів модулює вхідний натрієвий струм [39].

Механізм вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних запасників.

Вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних запасників може відбуватися двома шляхами за електро- та рецепторкерованим механізмом. У першому випадку деполяризація сарколеми призводить до активації потенціалкерованих кальцієвих каналів, що викликає підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і подальше звільнення Ca^{2+} з СПР за механізмом КІВК. Цей процес модулюється, в першу чергу, факторами, що впливають на функціональний стан кальцієвих каналів сарколеми.

СПР гладеньком'язових клітин функціонально поділяється на 2 частини: чутливу до кофеїну або ріанодину (містить приблизно 45% запасуючого Ca^{2+}) та до ІТФ₃ (55 % запасуючого Ca^{2+}). Слід відмітити здатність кофеїну впливати на стан сарколеми: так, низькі концентрації викликають гіперполяризацію, високі – деполяризацію сарколеми [40], тому слід враховувати наявність певного електричного компонента при впливі кофеїну на міоцит. Втім, здатність кофеїну безпосередньо викликати вивільнення Ca^{2+} із СПР була підтверджена в експериментах на скінованих препаратах ГМ. Активація ІТФ₃-рецепторів призводить до вивільнення Ca^{2+} із ІТФ₃-чутливого депо СПР, який за механізмом КІВК спричиняє вихід цих катіонів з ріанодінчутливого депо СПР [40].

Активація G-протеїнів спряжених з фосфоліпазою C може призводити до звільнення іонів Ca^{2+} за двома механізмами: ІТФ₃-залежному і ІТФ₃-незалежному. В ГМ, на відміну від скелетних м'язів, саме ІТФ₃ є активатором скорочення по типу фармакомеханічного зв'язку [41].

Осциляції $[\text{Ca}^{2+}]_i$, що виникають під впливом агоністів (наприклад, карбахоліну, ацетилхоліну), можна поділити на два типи: пов'язані з входом позаклітинних іонів Ca^{2+} завдяки генерації ПД і періодичне звільнення кальцію з внутрішньоклітинних запасників, що потребує наявності позаклітинного кальцію для реалізації даного процесу [42, 43]. Більш докладно осциляції $[\text{Ca}^{2+}]_i$, що виникають під впливом карбахоліну (КХ), були досліджені Комочі з співавторами [44]. На ГМК клубової кишки морської свинки було показано, що карбахолін у концентрації 2 мкМ викликає осциляторні зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і МП, що пригнічуються блокатором Ca^{2+} -АТФази СПР тапсигаргіном. Іони La^{3+} відразу пригнічують розряди ПД, але осциляції внутрішньоклітинного Ca^{2+} спостерігаються певний час. При зниженні концентрації карбахоліну до 0,25-0,75 мкМ осциляції МП і $[\text{Ca}^{2+}]_i$ виникають приблизно в 20 % клітин. Осциляції МП відбуваються як наслідок розрядів потенціалів дії. Даний ефект блокується іонами La^{3+} . У ГМК, які не реагували на низьку концентрацію КХ, електричне подразнення викликало зміни МП і $[\text{Ca}^{2+}]_i$ аналогічні тим, що відбуваються внаслідок виникнення спонтанних ПД, але лише після підвищення концентрації іонів Ca^{2+} , або ІТФ₃, чи КХ у позаклітинному розчині Кребса. Експериментальні дані свідчать, що ці осциляції викликані виходом іонів Ca^{2+} із внутрішньоклітинних запасників. Деполяризація мембрани потенціює ІТФ₃-викликане звільнення іонів Ca^{2+} із внутрішньоклітинних запасників [45]. Протягом 20 мс після деполяризації плазматичної мембрани (ПМ) можна виявити підвищення локальної концентрації кальцію в 5-20 невеличких ділянках примембранної зони цитоплазми ГМК діаметром менше 2 мкм ("гарячих плям" - англ. hot spot). При ритмічній деполяризації кожні 30 с "гарячі плями" з'являлись на тих же місцях. Поява "гарячих плям" відбувається паралельно зростанню вхідного кальцієвого струму і досягає піка через 20 мс після початку деполяризації. Підвищення глобальної концентрації іонів Ca^{2+} по всій клітині відбувається значно повільніше. Ступінчата деполяризація ПМ змушує "гарячі плями" рости і зливатися, що призводить до підвищення глобальної $[\text{Ca}^{2+}]_i$ і скорочення. Наведені результати експериментів свідчать про те, що вхід іонів Ca^{2+} на початку ПД викликає КІВК із дискретних субплазмалемальних запасників кальцію і генерує "гарячі плями", які, розширюючись, ініціюють скорочення [46].

Кальцієві спарки.

У 1993 році були відкриті локальні підвищення $[Ca^{2+}]_i$ в кардіоміоцитах, названі кальцієвими спарками (англ. spark) [47]. Було показано, що спарки є результатом елементарного локального вивільнення іонів Ca^{2+} з СПР (шляхом відкривання одного або кількох кальцієвих каналів СПР), а також те, що загальне звільнення кальцію із СПР (наприклад, при звичайному спряженні збудження-скорочення) є результатом просторового і часового сумування кальцієвих спарків [48]. У 1997 р. було показано існування кальцієвих спарків у ізольованих поодиноких ГМК при спонтанному скороченні, що давало можливість припущення про виникнення спарків внаслідок спонтанної активації ріанодинових рецепторів СПР [49], а також як результату просторового накладення менших локальних подій, можливо, через КІВК [50]. Надалі наявність спарків було продемонстровано на ізольованих поодиноких вісцеральних і судинних ГМК з використанням конфокальної мікроскопії та методу фіксації потенціалу у конфігурації "ціла клітина". Отримані спарки за своїми характеристиками аналогічні таким, що були зареєстровані у кардіоміоцитах (тривалість 200 мс, аналогічні показники флуоресценції). Найчастіше поява спарків спостерігається в певних ділянках ГМК, названих ділянками частих розрядів (англ. frequent discharge site) [51, 52]. Деякі дослідники розглядають спарки як основу процесів спряження збудження-скорочення у м'язових клітинах [53, 54]. Результатом появи спарків є генерація спонтанних тимчасових вихідних струмів (СТВС), що проявляються через відкривання високопровідних Ca^{2+} -активних калієвих каналів (ВК-каналів) [55]. Існує ряд доказів калієвої природи СТВС. Перш за все, слід відзначити реверсію напряду струмів при зміщенні МП до рівня рівноважного калієвого потенціалу [55, 56], а також їхню здатність блокуватися 1 мМ тетраетиламонієм (ТЕА), іберіотоксином або чарібдотоксином [55, 57-60]. Зв'язок СТВС з внутрішньоклітинними запасниками Ca^{2+} було продемонстровано на вісцеральних та судинних ГМК у досліді з використанням кофеїну. Показано, що висока концентрація кофеїну (більше 1 мМ) викликає вихід Ca^{2+} з СПР і, як наслідок, виникнення швидких короткотривалих Ca^{2+} -активованих калієвих струмів; тоді як низькі концентрації кофеїну (нижче 1 мМ) викликають СТВС загальної форми, незважаючи на незначні індивідуальні відмінності [55, 57, 58]. Дані струми складаються з двох компонентів: початкового швидкого, переважно невеликої амплітуди вихідного струму та подальшого постійного тривалого струму більшої амплітуди [61, 62], причому початковий компонент розглядають як результат кофеїн-індукованого звільнення Ca^{2+} з СПР, а подальший – як результат КІВК. Подібні результати було отримано в досліді з використанням ІТФ₃.

Незважаючи на те, що СПР не пов'язаний морфологічно з сарколемою, показано, що ділянки частих розрядів (місця виникнення спарків) розташовані переважно у примембранній частині СПР [55]. Таким чином, спарки, що являють собою локальні спонтанні підвищення $[Ca^{2+}]_i$, можуть розглядатися як сигнал до запуску СТВС. Але навіть наближені розрахунки демонструють невідповідність між щільністю ВК-каналів та величиною СТВС [64]. Таким чином, було висловлене припущення про наявність значно менших за спарки елементарних подій вивільнення Ca^{2+} із СПР, які отримали назву кварків, та про здатність кількох кварків утворювати спарк [65]. Крім СТВС, спарки спроможні запускати спонтанні повільні вхідні струми, що проявляються через відкривання кальцій-активованих хлорних каналів, а також спонтанні двонаправлені повільні струми, що являють собою біфазні події, у яких вихідна фаза завжди передуює вхідній фазі. Поодинокий спарк виявляє обидві фази двонаправленого струму, причому спарки з однієї ділянки можуть запускати всі вищезгадані струми залежно від МП. Вважається, що вхідні струми більш точно відбивають часовий хід підвищення цитозольного кальцію протягом спарку (той же час напівзгасання при більш довгому часі досягнення піка) [51, 52].

Участь мітохондрій у внутрішньоклітинному перерозподілі Ca^{2+} .

На закінчення варто згадати про ще одне депо, що містить значну кількість кальцію, а саме про мітохондрії. Протягом довгого часу властивість мітохондрій ГМК накопичувати кальцій пов'язувалась лише з патологічними станами, а їхня участь у фізіологічній регуляції концентрації Ca^{2+} заперечувалась [41, 66]. Пізніше спроможність мітохондрій накопичувати значні кількості Ca^{2+} під час агоніст-індукованих кальцієвих викидів отримала підтвердження, про те була показана низька спорідненість захоплення Ca^{2+} мітохондріями [32, 67], внаслідок чого процес захоплення відбувається при дуже високих концентраціях даного катіона [68, 69]. Виміряна в ГМК коронарної артерії кроля швидкість захоплення іонів Ca^{2+} мітохондріями складала 250 нмоль Ca^{2+} /мг білка за 10 хв. [70], а концентрація Ca^{2+} у легеневій артерії становила 2,2 ммоль/кг сухої ваги [71]. На відміну від СПР ця концентрація не змінювалася при експозиції норепінефрину. Подальші дослідження показали значну роль мітохондрій у видаленні Ca^{2+} з цитоплазми ГМК [72], зокрема, при деполяризації ПМ, викликаній гіперкалієвим розчином [73]. Більше того, звільнення іонів Ca^{2+} із СПР є можливим пусковим механізмом для збільшення проникності мембрани мітохондрій і наступного вивільнення кальцію з них [74], що вказує на безпосередню участь мітохондрій у регуляції $[Ca^{2+}]_i$. Підтвердження участі мітохондрій у внутрішньоклітинній регуляції концентрації Ca^{2+} було отримано в досліді з використанням інгібіторів

Роль іонів Ca^{2+} у регуляції скорочення та розслаблення гладеньких м'язів

окисного фосфорилування (N_2 , динітрофенолу, азиду натрію), які підтвердили можливість генерації скорочення при вивільненні Ca^{2+} з мітохондрій [71, 74-77]. У ГМК Ca^{2+} , поглинений мітохондріями, при розслабленні після видалення кофеїну з середовища інкубації, переміщується в СПР [78], що, очевидно, пояснює просторове розташування мітохондрій поблизу СПР [79]. Додавання інгібіторів дихального ланцюгу збільшує час заповнення внутрішньоклітинних запасників після вивільнення, викликаного брадикініном [80]. Пов'язавши ці два процеси, можна припустити, що мітохондрії, захоплюючи іони Ca^{2+} і передаючи їх внутрішньоклітинним запасникам під час заповнення останніх, не лише прискорюють цей процес, але й збільшують його результативність. На жаль, досліджень участі мітохондрій у внутрішньоклітинній регуляції перерозподілу кальцію недостатньо, щоб зробити остаточні висновки – дане питання ще потребує подальшого дослідження.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Розвитку напруження ГМ передують деполяризація плазматичної мембрани ГМК, під час якої іони Ca^{2+} входять до клітини через потенціалозалежні кальцієві канали. Гіперполяризація, навпаки, спричиняє пригнічуючу дію і асоціюється зі зниженням м'язового напруження. У ГМ деполяризація виникає в результаті генерації ПД або з'являється у вигляді повільних хвиль. Інший механізм, що забезпечує вхід іонів Ca^{2+} до ГМК, запускається активацією рецепторів та механочутливих каналів плазматичної мембрани. Важливу роль у рецептор-спряженому механізмі підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відіграє Ca^{2+} -пірофосфатази-тидна месенджерна система. Спряжені з рецепторами агоністів G-білки можуть модулювати активність іонних каналів прямо чи опосередковано через фосфорилування. Поряд з регулюючими внутрішньоклітинну концентрацію іонів Ca^{2+} у ГМК існують опосередковані через G-білки та протеїнкінази механізми, здатні моделювати генерацію напруги або пригнічувати її, викликаючи релаксацію.

Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у ГМК за рахунок входу Ca^{2+} під час відкривання відповідних каналів або в результаті утворення ІТФ₃ при активації рецепторів може запускати процес КІВК з СПР. Відомо, що мітохондрії ГМК також беруть участь у регуляції $[\text{Ca}^{2+}]_i$, але вони не спроможні вивільняти його за механізмом КІВК, як це має місце в нейронах ЦНС.

На поверхні СПР присутні два типи рецепторів, а саме: ріанодинові та інозитол-1,4,5-трифосфатні. Елементарні події вивільнення Ca^{2+} з СПР – кварки – сумуючись, викликають появу спарків, які, в свою чергу, генерують у певних ділянках ГМК спонтанні повільні вихідні та/або вхідні струми. Ріанодинові рецептори розташовані по відношенню до кальцієвого потоку таким чином, що під час входу Ca^{2+} до ГМК через потенціалозалежні кальцієві канали підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ досягається в їхньому оточенні за рахунок КІВК із СПР. Крім того, потенціалозалежний вхід Ca^{2+} генерує “гарячі плями”, ідентифіковані як області “частих розрядів”. Подальше розповсюдження кальцієвої хвилі в інші ділянки клітини та ініціація скорочення відбувається за механізмом КІВК. При активації ІТФ₃-рецепторів на поверхні СПР із ріанодинчутливого депо також вивільнюється достатня кількість Ca^{2+} для активації КІВК.

На закінчення слід зазначити, що підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ через зворотній зв'язок впливає на електричну активність плазматичної мембрани ГМК шляхом збільшення вірогідності відкривання Ca^{2+} -залежних калієвих, хлоридних та катіонних каналів, які в свою чергу, вносять зміни в збудливість плазматичної мембрани та рівень напруги генерованої гладеньком'язовою клітиною.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Somlyo A.V., Somlyo A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1968. V.159. P.129-145.
2. Bolton T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle // Physiol. Rev. 1979. V.5. P.606-718.
3. Itoh T., Kuriyama H., Suzuki H. Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery // J. Physiol. (Lond.). 1981. V.321. P.513-525.
4. Van Breemen C., Cauvin C., Jones A.A., Leuten P., Yamamoto H. Ca^{2+} regulation of vascular smooth muscle // Fed. Proc. 1986. V.45. P.2746-2753.
5. Martinez-Zagulian R., Lynch R.M. Simultaneous measurement of calcium and pH in single insulin secreting cells by fluorescent spectroscopy // Biophys. J. 1994. V.66, N2, Pt.2. P.162.
6. Sullivan K.M.C., Busa W.B., Wilson K.L. Calcium mobilization is required for nuclear vesicle fusion in vitro: implications for membrane traffic and IP₃ receptor function // Cell. 1993. V.73, N 7. P.1411-1422.
7. Flaherty K.M., Zozulya S., Stryer L., McKay D.B. Three-dimensional structure of recoverin, a calcium sensor in vision // Cell. 1993. V.75, N4. P.709-716.
8. Sullivan K.M.C., Wilson K.L. Vesicle fusion during envelope assemble: Role of IP₃ receptors and Ca^{2+} mobilization // J. Cell. Biochem. 1994. Suppl.18. P.80.
9. Mitchell M.R., Powell T., Terrar D.A., Twist V.W. Electrical activity and contraction in cells isolated from rat and guinea-pig ventricular muscle: A comparative study // J. Physiol. (Lond.). 1987. V.391. P.527-544.
10. Walsh M.P. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction // Mol. Cell. Biochem. 1994. V.135. P.21-41.
11. Karaki H., Weiss G.B. Calcium channels in smooth muscle // Gastroenterology. 1984. V.84, N4. P.960-970.

12. Van Breemen C., Aaronson P., Loutzenhiser R. Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle // *Pharmacol. Rev.* 1979. V.30. P.167-208.
13. Kochemasova N.G., Shuba M.F. Possible ways of extracellular calcium influx necessary for inactivation of contraction // *Physiology and pharmacology of Smooth Muscle: Abstr. of papers. Varna, Publishing House of the Bulgar Academy of Sciences.* 1979. P.44.
14. McDonald T.F., Pelzer S., Trautwein W., Pelzer D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells // *Physiol. Rev.* 1994. V.74. P.365-507.
15. Ohya Y., Kitamura K., Kuriyama H. Regulation of calcium current by intracellular calcium in smooth muscle cells of rabbit portal vein // *Circ. Res.* 1988. V.62. P.375-383.
16. McCarron J.G., McGeown J.G., Reardon S., Ikebe M., Fay F.S., Walsh J.V.Jr. Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II // *Nature Lond.* 1992. V.357. P.74-77.
17. Vivaudou M.B., Clapp L.H., Walsh J.V.Jr., Singer J.J. Regulation of one type of Ca^{2+} current in smooth muscle cells by diacylglycerol and acetylcholine // *FASEB J.* 1988. V.2. P.2497-2504.
18. Ганиткевич В.Я., Смирнов С.В., Шуба М.Ф. Исследование входного кальциевого тока изолированной гладкомышечной клетки методом фиксации потенциала в условиях внутриклеточного диализа // *Биол. мембр.* 1985. Т.2, №12. С.1225-1233.
19. Ганиткевич В.Я., Смирнов С.В., Шуба М.Ф. Потенциалозависимый кальциевый ток изолированной ГМК коронарной артерии // *Биол. мембр.* 1987. Т.4, №6. С.664-666.
20. Huizinga J. D., Faraway L., Den Hertog A. Generation of slow-wave-type action potentials in canine colon smooth muscle involves a non-L-type Ca^{2+} conductance // *J. Physiol. Lond.* 1991. V.442. P.15-29.
21. Lee H.K., Sanders K.M. Comparison of ionic currents from interstitial cells and smooth muscle cells of canine colon // *J. Physiol. Lond.* 1993. V.460. P.135-152.
22. Guerrero A., Kirber M.T., Tuft R.A., Fay F.S., Singer J.J. Amplification of Ca^{2+} signals during stretch-activated channel in membrane patches in single smooth muscle cells // *Biophys. J.* 1994. V.66, N2, Pt.2. P.167.
23. Davis M.J., Meininger G.A., Zawieja D.C. Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscles // *Am. J. Physiol.* 1992. V.262. P. C1083-C1088.
24. Wellner M.C., Isenberg G. Stretch effects on whole cell current of guinea-pig urinary bladder myocytes // *J. Physiol. Lond.* 1994. V.480. P.439-448.
25. Taylor C.W., Byron K.L. Vasopressin stimulates capacitative and non-capacitative Ca^{2+} entry in rat A7r5 smooth muscle cells // *J. Physiol. Proc.* 1994. V.480. P.115-116.
26. Kamishima T., McCarron J.G. Ca^{2+} -removal mechanisms in rat cerebral resistance size arteries // *Biophys. J.* 1998. V.75, N4. P.1767-1773.
27. Kargacin M.E., Kargacin G.J. Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum of isolated smooth muscle cells // *Biophys. J.* 1994. V.66, N2, Pt.2. P.98.
28. Kargacin M.E., Kargacin G.J. Direct measurement of Ca^{2+} uptake and release by the sarcoplasmic reticulum of saponin permeabilized isolated smooth muscle cells // *J. Gen. Physiol.* 1995. V.106, N 3. P.467-484.
29. Sugiyama T., Goldman W.F. IP_3 induces a transient elevation of intra-sarcoplasmic reticulum free Ca^{2+} in cultured arterial smooth muscle cells // *Biophys. J.* 1994. V.66, N2, Pt.2. P.146.
30. Ganitkevich V.Ya. The amount of acetylcholine mobilizable Ca^{2+} in single smooth muscle cells measured with the exogenous cytoplasmic Ca^{2+} buffer, Indo-1 // *Cell Calcium.* 1996. V.20, N6. P.483-492.
31. Lesh R.E., Nixon G.F., Fleisher S., Airey J.A., Somlyo A.P., Somlyo A.V. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle // *Circ. Res.* 1998. V.82, N2. P.175-185.
32. Bootman M.D., Berridge M.J. The elemental principles of calcium signalling // *Cell.* 1995. V.83. P.675-678.
33. Watras J., Benevolensky D., Moraru I. Micromolar calcium reduces affinity of inositol triphosphate receptor in vascular smooth muscle // *Biophys. J.* 1994. V.66, N2, Pt.2. P.98.
34. Poledna J. Model of intracellular calcium oscillations activated by inositol triphosphate // *Gen. Physiol. and Biophys.* 1993. V.12, N4. P.381-389.
35. Berridge M.J., Dupont G. Spatial and temporal signalling by calcium // *Curr. Opinion Cell Biol.* 1994. V.6, N2. P.267-274.
36. O'Sullivan G.H., Heffron J.J.A. Regulation of Ca^{2+} release from the ryanodine receptor of sarcoplasmic reticulum // *Biochem. Soc. Trans.* 1995. V.23, N2. P.358S.
37. Wu C., Fry C.H. The effects of extracellular and intracellular pH on intracellular Ca^{2+} regulation in guinea-pig detrusor smooth muscle // *J. Physiol. (Lond.)* 1998. V.508, Pt.1. P.131-143.
38. Burdya T.V., Taggart M.J., Wray S. An investigation into the mechanism whereby pH affects tension in guinea-pig uretric smooth muscle // *J. Physiol.* 1996. V.493, N3. P.865-876.
39. Smith R.D., Eisner D.A., Wray S. The effects of changing intracellular pH on calcium and potassium currents in smooth muscle from the guinea-pig ureter // *Pflugers Arch.* 1998. V.435, N4. P.518-522.
40. Itoh T., Kuriyama H., Suzuki H. Differences and similarities in the noradrenaline- and caffeine-induced mechanical responses in the rabbit mesenteric artery // *J. Physiol. (Lond.)* 1983. V.337. P.609-631.
41. Somlyo A.P., Walker J.W., Goldman Y.E., Trentham D.R., Kobayashi S., Kitazawa T., Somlyo A.V. Inositol triphosphate, calcium and muscle contraction // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1988. V.320. P.399-414.
42. Kohda M., Komori S., Unno T., Ohashi H. Carbachol-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in single smooth muscle cells of guinea-pig ileum // *J. Physiol. (Lond.)* 1996. V.492, Pt.2. P.315-328.
43. Dessy C., Godfraind T. The effects of L-type calcium channel modulators on the mobilization of intracellular calcium stores in guinea-pig intestinal smooth muscle // *Br. J. Pharmacol.* 1996. V.119, N1. P.142-148.
44. Kohda M., Komori S., Unno T., Ohashi H. Carbachol-induced oscillations in membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in guinea-pig ileal smooth muscle cells // *J. Physiol. (Lond.)* 1998. V.511, Pt.2. P.559-571.
45. Ito S., Bolton T.B. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} -transient and outward K^+ current in single smooth muscle cells of guinea-pig small intestine // *Jpn. J. Pharmacol.* 1996. V.71, N1. P.1-10.

Роль іонів Ca^{2+} у регуляції скорочення та розслаблення гладеньких м'язів

46. Imaizumi Y., Torii Y., Ohi Y., Nagano N., Atsuki K., Yamamura H., Muraki K., Watanabe M., Bolton T.B. Ca^{2+} images and K^{+} current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder // *J. Physiol. (Lond.)*. 1998. V.510, Pt.3. P.705-719.
47. Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle // *Science*. 1993. V.262. P.740-744.
48. Cheng H., Lederer M.R., Lederer W.J., Cannell M.B. Calcium sparks and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes // *Am. J. Physiol.* 1996. V.270. P.C148-C159.
49. Coronado R., Morrisette J., Sukhareva M., Vaughan D.M. Structure and function of ryanodine receptors // *Am. J. Physiol.* 1994. V.266. P.C1485-C1504.
50. Gordienko D.V., Bolton T.B., Cannell M.B. Variability in spontaneous subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells // *J. Physiol. (Lond.)*. 1998. V.507, Pt.3. P.707-720.
51. Bolton T.B., Gordienko D.V. Confocal imaging of calcium release events in single smooth muscle cells // *Acta Physiol. Scand.* 1998. V.164, N4. P.567-575.
52. Zhu G.C., Sims S.M., Tuft R.A., Fogarty K.E., Walsh J.V.Jr. Ca^{2+} sparks activate K^{+} and Cl^{-} channels, resulting in spontaneous transient currents in guinea-pig tracheal myocytes // *J. Physiol. (Lond.)*. 1998. V.513, Pt.3. P.711-718.
53. Cannell M.B., Cheng H., Lederer W.J. Spatial non-uniformities in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes // *Biophys. J.* 1994. V.67. P.1942-1956.
54. Cannell M.B., Cheng H., Lederer W.J. The control of excitation-contraction coupling in heart // *Science*. 1995. V.268. P.1045-1049.
55. Benham C.D., Bolton T.B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of rabbit // *J. Physiol.* 1986. V.381. P.385-406.
56. Saunders H.H., Farley J.M. Spontaneous transient outward currents and Ca^{++} -activated K^{+} channels in swine tracheal smooth muscle cells // *J. Pharm. Exp. Ther.* 1992. V.257. P.1114-1120.
57. Ohya Y., Kiramura K., Kuriyama H. Cellular calcium regulates outward currents in rabbit intestinal smooth muscle cells // *Am. J. Physiol.* 1987. V.252. P.C401-C410.
58. Saunders H.H., Farley J.M. Pharmacological properties of potassium currents in swine tracheal smooth muscle // *J. Pharm. Exp. Ther.* 1992. V.260. P.1038-1044.
59. Henmi S., Imaizumi Y., Muraki K., Watanabe M. Time-courses of Ca^{2+} -dependent K^{+} and Cl^{-} currents in single smooth cells of guinea-pig trachea // *Eur. J. Pharmacol.* 1996. V.306. P.227-236.
60. Beech D.J., Bolton T.B. Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein // *J. Physiol.* 1989. V.418. P.293-309.
61. Komori S., Bolton T.B. Actions of guanine nucleotides and cyclic nucleotides on calcium stores in single patch-clamped smooth muscle cells from rabbit portal vein // *Br. J. Pharmacol.* 1989. V.97. P.973-982.
62. Komori S., Bolton T.B. Calcium release induced by inositol 1,4,5-triphosphate in single rabbit intestinal smooth muscle cells // *J. Physiol.* 1991. V.433. P.495-517.
63. Bolton T.B., Imaizumi Y. Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells // *Cell Calcium*.—1996. V.20, N2. P.141-152.
64. Lipp P., Neggli E. Submicroscopic calcium signals as fundamentevents of excitation-contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes // *J. Physiol.* 1996. V.492. P.31-38.
65. Somlyo A.P., Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle // *FASEB J.* 1989. V.3. P.2266-2276.
66. Ueno H. Calcium mobilization in enzymatically isolated single intact and skinned muscle cells of the porcine coronary artery // *J. Physiol. (Lond.)*. 1985. V.363. P.103-118.
67. Yamamoto H., Van Breemen C. Calcium compartments in saponin-skinned cultured vascular smooth muscle cells // *J. Gen. Physiol.* 1986. V.87. P.369-390.
68. Stout M.A. Calcium transport by sarcoplasmic reticulum of vascular smooth muscle: I. Magnesium ATP-dependent and magnesium ATP-independent calcium uptake // *J. Cell Physiol.*—1991.—Vol. 149.—P. 383-395.
69. Takeo S., Sakanashi M. Microsomal calcium-accumulating ability of bovine coronary artery and aorta // *Biochem. Pharmacol.* 1985. V.34. P.2417-2424.
70. Kowarski D., Shuman H., Somlyo A.P., Somlyo A.V. Calcium release by noradrenaline from central sarcoplasmic reticulum in rabbit main pulmonary artery smooth muscle // *J. Physiol.* 1985. V.358. P.153-176.
71. Drummond R.M., Fay F.S. Mitochondria contribute to Ca^{2+} removal in smooth muscle cells // *Pfluegers Arch.* 1996. V.421. P.473-482.
72. Groschner K., Schuhmann K., Baumgartner W., Pastushenko V., Grover A.K., Samson S.E. Pig coronary artery smooth muscle: substrate and pH dependance of the two calcium pumps // *Am. J. Physiol.* 1986. V.251. P.C529-C534.
73. Bowser D.N., Minamikawa T., Nagley P., Williams D.A. Role of mitochondria in calcium regulation of spontaneously contracting cardiac muscle cells // *Biophys. J.* 1998. V.75, N4. P.2004-2014.
74. Karaki H., Sato K., Ozaki H., Urakawa N., Ishida Y. Dissociation of K^{+} -induced tension and cellular Ca^{++} retention in vascular and intestinal smooth muscle in normotoxia and hypoxia // *Pfluegers Arch.* 1982. V.394. P.118-123.
75. Sakai K., Yamagishi T., Uchida M.K. Intracellular site of "calcium reversal": inhibition of uterine smooth muscle contraction in calcium-free medium by a minute amount of calcium ion released from mitochondria by drugs // *Gen. Pharmacol.* 1986. V.17. P.151-156.
76. Давидовська Т.Л., Зима В.Л., Хестанов С.О. Властивості внутрішньоклітинних пулів кальцію в інтактних та демембранованих гладеньких м'язах // *Мол. генетика и биофизика*. 1992. N17. С.37-42.
77. Bassani J.W.M., Bassani R. A., Bers D.M. Ca^{2+} cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes // *J. Physiol.* 1993. V.460. P.603-621.
78. Raeymaekers L., Wuytack F., Batra S., Casteels R. A comparative study of the calcium accumulation by mitochondria and microsomes isolated from the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli // *Pfluegers Arch.* 1977. V.368. P.217-223.
79. Landolfi B., Curci S., Debellis L., Pozzan T., Hofer A.M. Ca^{2+} homeostasis in the agonist-sensitive intestinal store: Functional interactions between mitochondria and the ER measured in situ in intact cells // *J. Cell Biol.* 1998. V.142. P.183-188.

ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ДИНАМІКУ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЗАРОДКІВ РИБ

Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський

Кафедра біофізики та математичних методів у біології

Львівський національний університет імені І. Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005

e-mail: biolog@franko.lviv.ua

Надійшла до редакції 23 жовтня 2000 р.

Досліджено вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) на ранніх стадіях розвитку. Показано, що присутність в середовищі інкубації іонів таких важких металів, як кобальт, нікель, манган, хром, цинк, олово, кадмій спричинює загальну деполяризацію мембран зародків, а також приводить до зменшення частоти коливань трансмембранного потенціалу, що означає зменшення частоти дроблень бластомерів, а отже – сповільнення розвитку зародків. Амплітуда коливань потенціалу також зменшується під впливом іонів важких металів, причому ці зміни проявляються більш виражено із збільшенням концентрацій металів у середовищі інкубації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: трансмембранний потенціал, зародки в'юна, дроблення бластомерів, іони важких металів.

Під час періоду дроблення бластомерів зародків риб рядом авторів були виявлені періодичні зміни рівня трансмембранного потенціалу (ТМП), які були синхронні з клітинними циклами поділу [1,2]. Пізніше було показано, що ці зміни корелюють з періодичними змінами активності Na^+ - K^+ -АТРази протягом клітинного циклу. Коливання рівня ТМП продовжувались протягом всього періоду дроблення бластомерів до стадії морули, після чого спостерігалась десинхронізація коливань, яка співпадала з початком десинхронізації поділу ядер [3].

Динаміка ТМП під час дроблення бластомерів є досить чутливим показником, який суттєво змінюється при різних зовнішніх впливах. Так, значні зміни ТМП проявляються при дії гормонів [4], антибіотиків, поліпептидних факторів росту [3]. Цікавим є дослідити, як цей чутливий показник реагує на такі фактори забруднення навколишнього середовища, як важкі метали.

Сполуки важких металів займають особливе місце серед забрудників. З одного боку, метали – речовини, які природньо існують в навколишньому середовищі, а не з'являються в природі лише внаслідок діяльності людини. Більшість важких металів є типовими мікроелементами (наприклад, такі як кобальт, нікель, цинк, молібден, кальцій, хром та ін.), вони входять до складу вітамінів, ферментів, гормонів, а отже, в невеликих (в окремих випадках – мікроскопічних) кількостях є необхідними для нормальної життєдіяльності біологічних об'єктів. З другого боку, підвищені концентрації металів мають токсичний вплив на живі організми, особливо на ранніх стадіях їх розвитку, викликаючи порушення життєдіяльності, функціонування живих систем і навіть загибель організму [5,6]. Високі дози важких металів мають патогенний, мутагенний, канцерогенний впливи на живі системи. Тому є важливим дослідити характер та механізми цих впливів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом досліджень були зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) в період від запліднення до закінчення стадії дроблення бластомерів. Яйцеклітини одержували і запліднювали за Нейфахом [7]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год. після стимуляції. Сім'яники одержували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 5-10 хв. після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20-22° С в фізіологічному розчині Гольфрета.

Відведення ТМП здійснювалось за допомогою стандартної мікроелектродної техніки [8], на зібраній нами установці. Зародок звільняли від перивітелінової оболонки механічним способом (за допомогою препарувальних голків) і поміщали в камеру експериментальної установки, заповнену розчином Гольфрета. Введення мікроелектрода, заповненого розчином KCl (3 М), здійснювали за допомогою мікроманіпулятора. Реєстрацію ТМП здійснювали за допомогою потенціометра КСП-4. На стадії 8 бластомерів розчин Гольфрета в камері, де знаходився зародок, заміняли на розчини солей важких металів різних концентрацій, зроблені на основі розчину Гольфрета.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Динаміку ТМП зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) досліджували на ранніх стадіях розвитку – під час дроблення бластомерів. Значення ТМП в нормі періодично змінюються, причому тривалість одного коливання співпадає з тривалістю мітотичного циклу дроблення бластомерів (рис. 1). Наростання абсолютних значень потенціалу – гіперполяризація мембрани – припадає на інтерфазу мітотичного циклу, а деполяризація – зменшення абсолютних значень ТМП – на мітоз. Максимальних значень ТМП досягає приблизно на стадії 128 бластомерів (VII поділ) і становить 64-66 мВ. Приблизно після дев'ятого поділу (512 бластомерів – стадія морули) починається десинхронізація коливань ТМП – спостерігається значне зменшення амплітуди і поступове зникнення синхронних коливань. Таке “згасання” коливань пов'язано із початком асинхронних дроблень ядер, який припадає на стадію морули.

Динаміка ТМП під впливом іонів важких металів в наших дослідженнях відрізнялась від динаміки потенціалу в нормі. В загальному це проявлялось в зменшенні абсолютних значень ТМП в порівнянні з контролем, тобто вплив іонів металів спричинював загальну деполяризацію мембран зародків (табл. 1).

Таблиця 1. Середні значення* потенціалу (мВ) в точках максимумів кривої динаміки ТМП зародків в'юна під час дроблення бластомерів в нормі та під впливом важких металів в різних концентраціях.

Кількість Ме- тали та їх концентрації	8	16	32	64	128	256	512
контроль	48	52	58	63	66	62	61
Co ²⁺ 10 ⁻⁵ М	47	48	53	58	60	59	56
Co ²⁺ 10 ⁻⁴ М	46	48	53	58	60	59	56
Ni ²⁺ 10 ⁻⁶ М	47	50	52	50	49	50	50
Ni ²⁺ 10 ⁻⁵ М	46	47	43	36	35	34	34
Cr ²⁺ 10 ⁻⁶ М	47	49	53	54	55	56	54
Cr ²⁺ 10 ⁻⁵ М	46	47	48	49	49	48	48
Cd ²⁺ 10 ⁻⁶ М	47	51	54	58	59	58	56
Cd ²⁺ 10 ⁻⁵ М	46	50	51	52	48	47	43
Mn ²⁺ 10 ⁻⁶ М	47	51	55	57	59	58	56
Mn ²⁺ 10 ⁻⁵ М	46	50	51	49	47	44	45
Sn ²⁺ 10 ⁻⁵ М	47	51	53	52	50	49	48
Sn ²⁺ 10 ⁻⁴ М	46	50	49	47	42	40	39
Zn ²⁺ 10 ⁻⁶ М	47	49	50	51	52	54	53
Zn ²⁺ 10 ⁻⁵ М	46	48	47	44	46	45	45

* – значення округлені до цілих.

При впливі іонів олова спостерігається деполяризація мембрани до –50-51 мВ при концентрації 10⁻⁶ М і до –35-40 мВ при концентрації 10⁻⁵ М, в той час як в контролі значення ТМП становили –60-66 мВ (рис. 4). Вплив іонів кадмію в концентрації 10⁻⁵ М приводять до деполяризації мембрани до –49-50 мВ, вплив іонів кобальту – до –38-40 мВ при концентрації 10⁻⁴ М (рис. 2), а вплив іонів нікелю в концентрації 10⁻⁵ М (рис. 1) – майже до –35-34 мВ.

Присутність в інкубаційному середовищі іонів важких металів помітно змінювало такий показник, як амплітуда коливань ТМП. При впливі іонів кадмію в концентрації 10⁻⁵ М амплітуда коливань зменшувалась майже в 1,5 рази. Таке ж зменшення амплітуди спостерігалось при впливі іонів олова в концентрації 10⁻⁵ М, а при збільшенні концентрації до 10⁻⁴ М (рис. 4), амплітуда зменшувалась майже в 2,5 рази. В присутності іонів мангану в концентрації 10⁻⁵ М (рис. 6), спостерігалось зменшення амплітуди майже в 2 рази, а в присутності іонів хрому в концентрації 10⁻⁵ М (рис. 3) – в 2,5 рази. При впливах іонів важких металів в менших концентраціях амплітуда коливань також зменшувалась, хоча і менш виражено.

Крім того, під впливами іонів важких металів помітно збільшувався період коливань ТМП, а отже, зменшувалась частота поділів бластомерів. Як видно з рис. 6, в присутності в інкубаційному середовищі іонів мангану в концентрації 10⁻⁶ М період збільшувався майже в 1,5 рази порівняно з контролем, а при збільшенні концентрації до 10⁻⁵ М – майже в 2 рази в порівнянні з контролем. При впливі іонів цинку період коливань також збільшувався майже в 2 рази (рис. 5). Подібні ефекти спостерігались при впливах нікелю, хрому та олова (рис. 1,3,4).

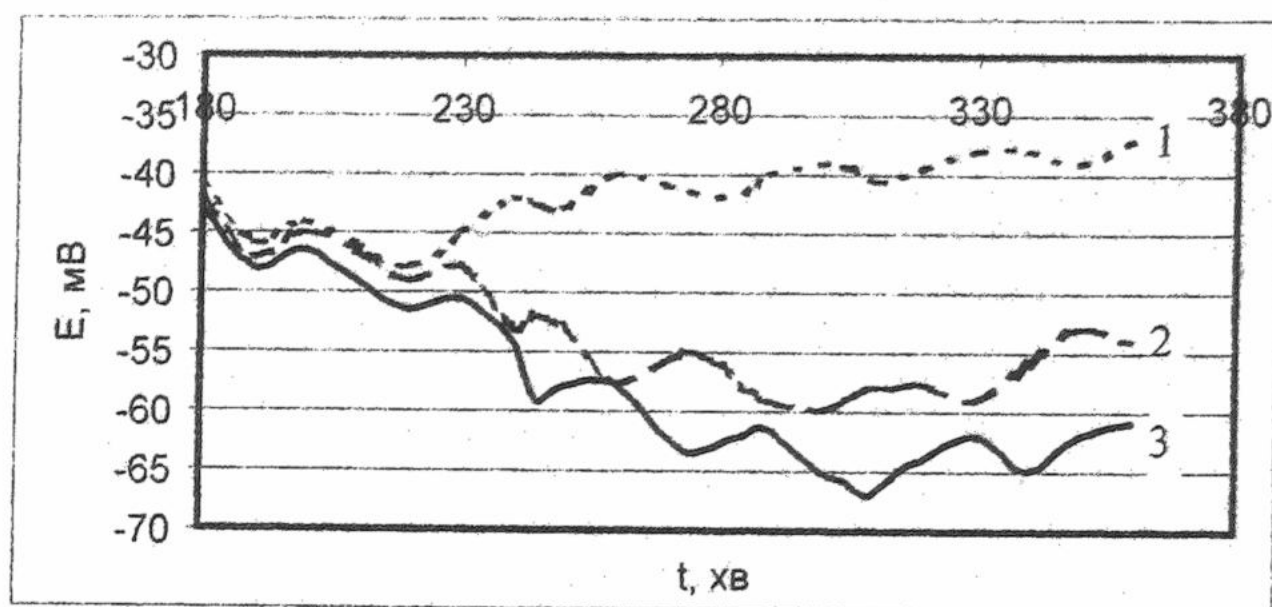


Рис. 1. Динаміка ТМП під впливом іонів нікелю в концентрації 10^{-5} М (1) та 10^{-6} М (2) у порівнянні з контролем (3).

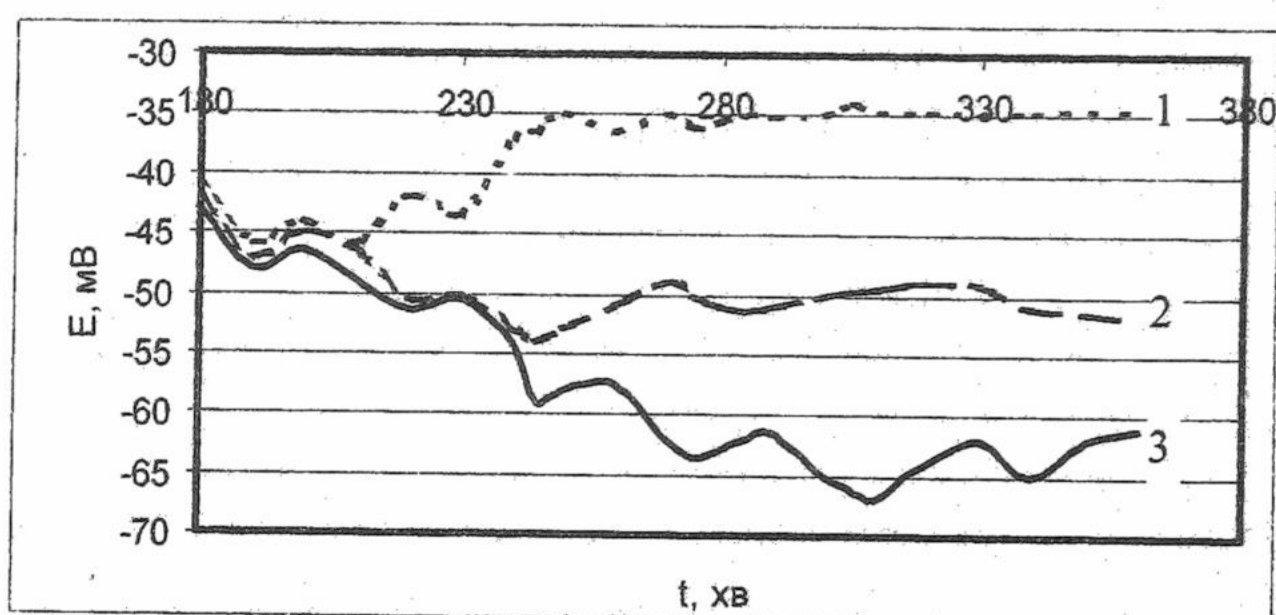


Рис. 2. Динаміка ТМП під впливом іонів кобальту в концентрації 10^{-4} М (1) та 10^{-5} М (2) у порівнянні з контролем (3).

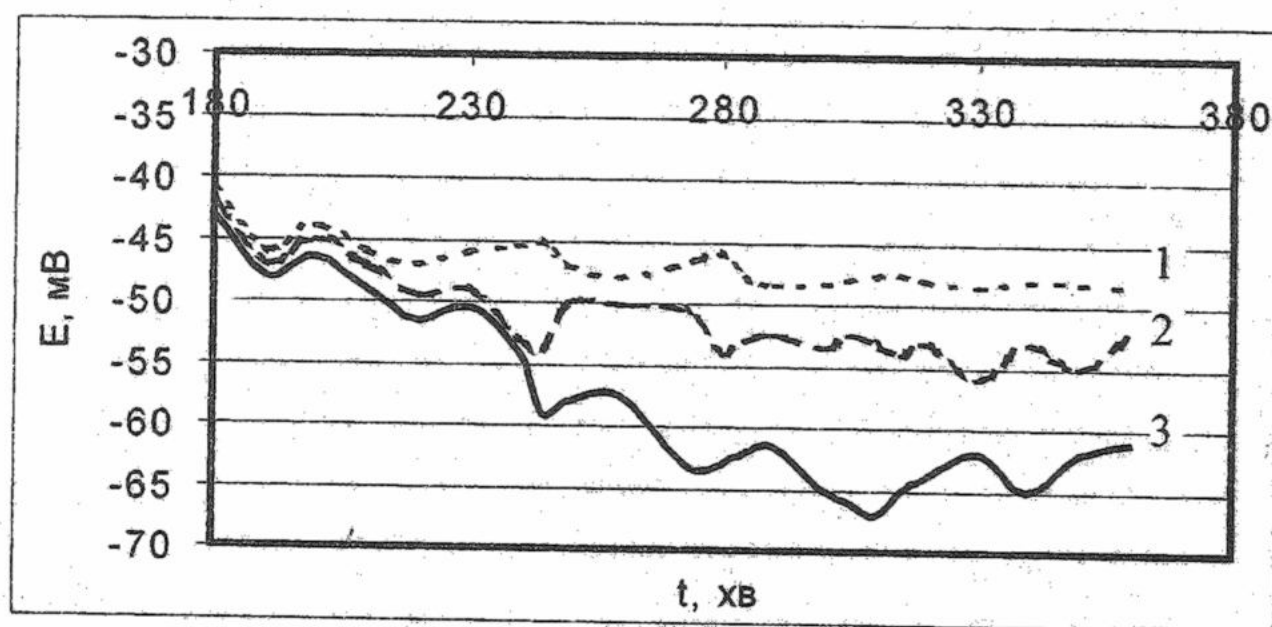


Рис. 3. Динаміка ТМП під впливом іонів хрому в концентрації 10^{-5} М (1) та 10^{-6} М (2) у порівнянні з контролем (3).

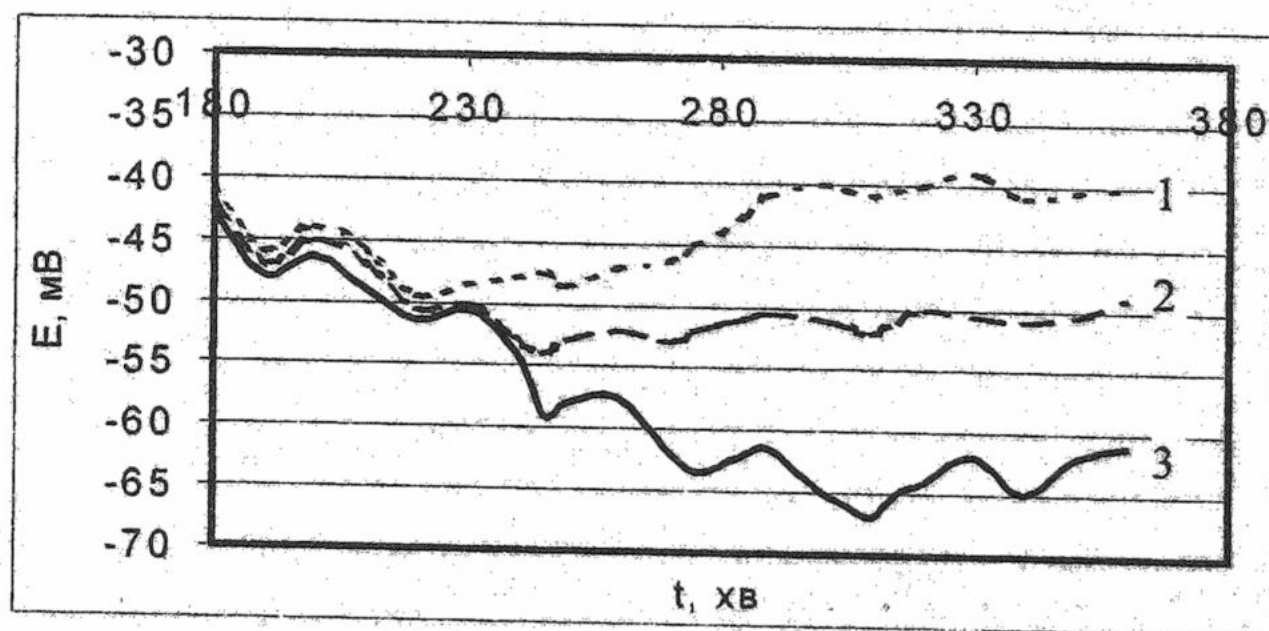


Рис. 4. Динаміка ТМП під впливом іонів олова в концентрації 10^{-4} М (1) та 10^{-5} М (2) у порівнянні з контролем (3).

Вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу ...

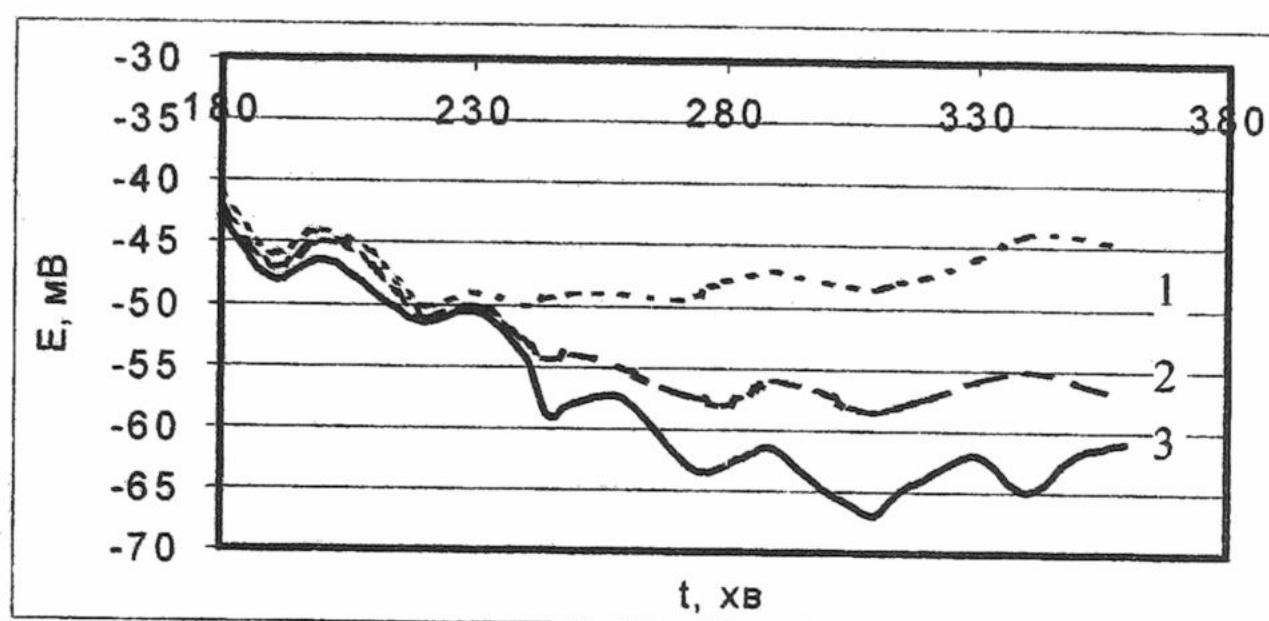


Рис. 5. Динаміка ТМП під впливом іонів цинку в концентрації 10^{-5} М (1) та 10^{-6} М (2) у порівнянні з контролем (3).

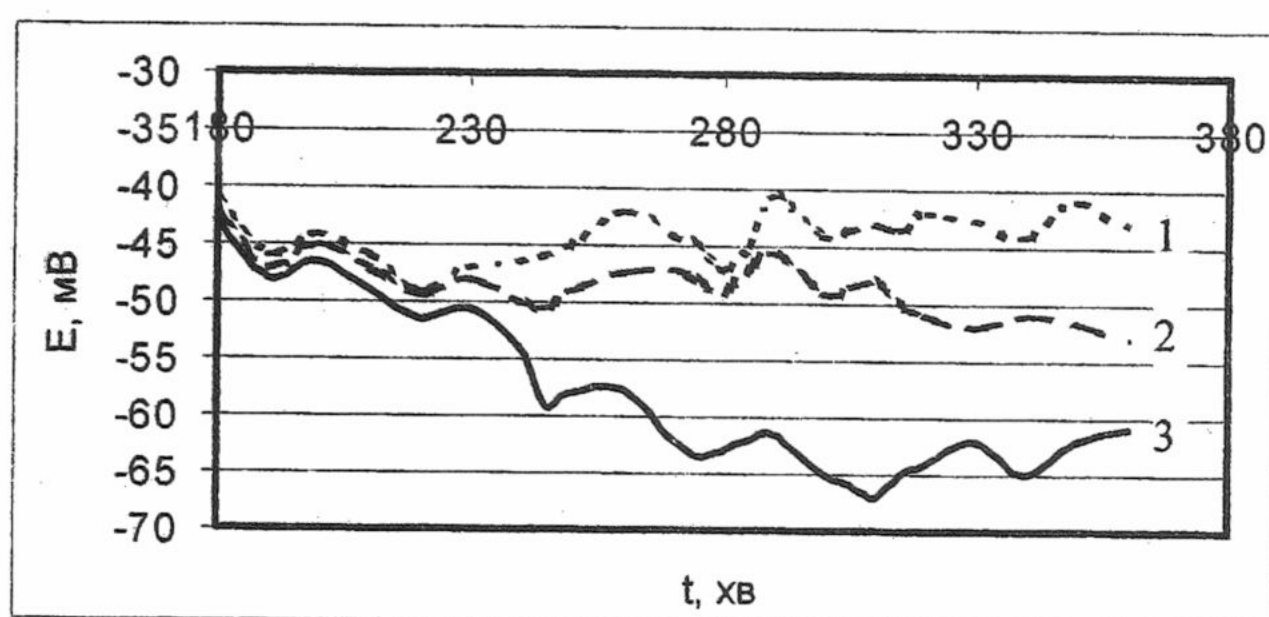


Рис. 6. Динаміка ТМП під впливом іонів мангану в концентрації 10^{-5} М (1) та 10^{-6} М (2) у порівнянні з контролем (3).

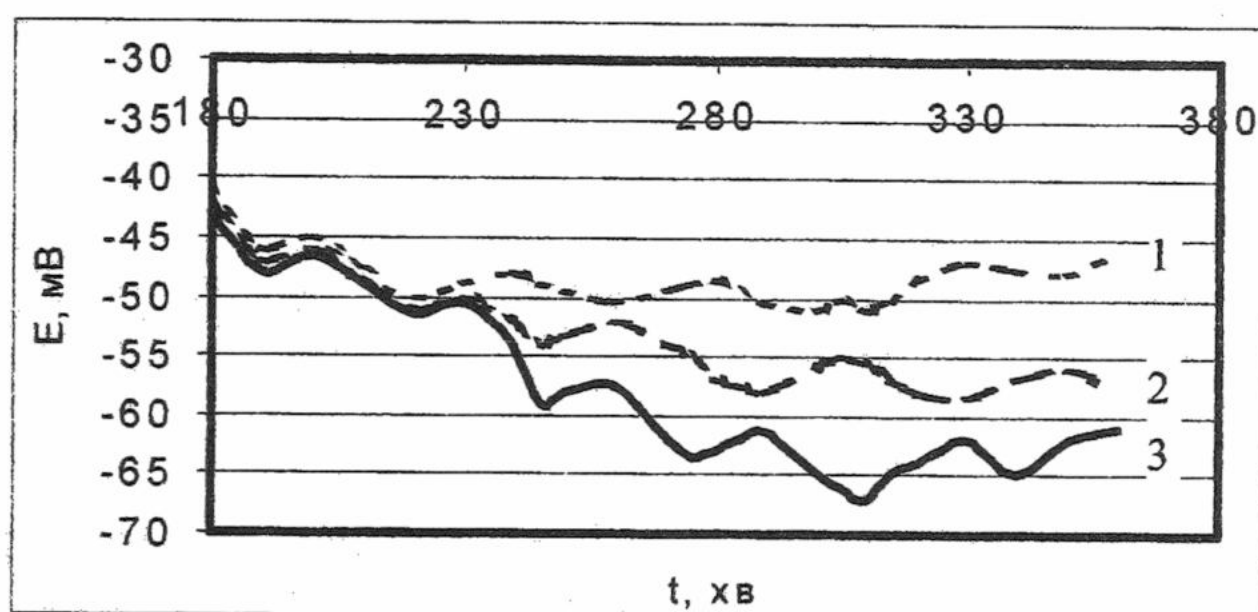


Рис. 7. Динаміка ТМП під впливом іонів кадмію в концентрації 10^{-5} М (1) та 10^{-6} М (2) у порівнянні з контролем (3).

Оскільки періодичні коливання ТМП співпадають з поділами бластомерів, зменшення частоти коливань говорить про сповільнення ритму розвитку зародків. Значне відставання у розвитку було виявлено при подальшому спостереженні за зародками та личинками в'юна, які розвивались в присутності іонів важких металів, в порівнянні з контролем. При подальшому розвитку тварин, в них було виявлено сповільнення серцевих скорочень, малорухливість, викривлення кісток, недорозвиненість зябер та інші аномалії розвитку.

Виходячи з одержаних результатів можна зробити припущення, що іони двовалентних металів здатні блокувати іонні канали, а також конкурувати з іонами кальцію при проходженні кальцієвих каналів, що і приводить до деполяризації мембрани та інших змін динаміки ТМП, які спостерігались в наших дослідженнях.

ВИСНОВКИ

Виходячи з одержаних даних можна зробити висновок, що присутність в інкубаційному середовищі іонів важких металів приводить до значних змін коливної динаміки трансмембранного потенціалу зародків в'юна, а саме – до значного зменшення амплітуди та частоти коливань, а також до загальної деполяризації мембрани, причому ці зміни проявляються більш виражено із збільшенням концентрацій металів. Отже такі зміни динаміки ТМП можуть служити своєрідним тестом на присутність іонів важких металів в воді відкритих водойм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Квавилашвили И. Ш., Божкова В. П., Чайлахян Л. М. Периодические изменения сопротивления и мембранного потенциала яиц вьюна, сопровождающие деления дробления. // Онтогенез. – 1971, Т.2, N 4. – С. 425 - 430.
2. Божкова В.П. Динамика изменений мембранных характеристик в процессе дробления зародышей вьюна и аксолотля. - Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М. – 1971. – 25 С.
3. Гойда О.А. Біофізичні аспекти раннього онтогенезу тварин. К.: Наук. думка, 1993, 224 с.
4. Санагурський Д.И. Трансмембранный потенциал в раннем эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) при гормональных воздействиях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Киев, 1982. – 145 с.
5. Динерман А. А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития. – М.: Медицина, 1990. – 190 с.
6. Бойко Н.М., Гойда О.А. Морфогенез та електричні параметри мембран зародків в'юна за умов наявності в середовищі важких металів. // Актуальні проблеми мед., біол., ветер. і сільськ. госп. – 1996. – С. 85-86.
7. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. - М.: Наука, 1977. - 311 с.
8. Костюк П.Г. Микроэлектродная техника. К.: Наукова думка, 1960. – 127 с.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 612.111:517.352.4

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТРАНСПОРТ ПРОТОНОВ В ЭРИТРОЦИТАХ, НАГРУЖЕННЫХ СУЛЬФАТОМ

Е. Б. Алмазова, М. Х. Румиех, В. В. Рамазанов, В. А. Бондаренко

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, Харьков, ул. Переяславская, 23*

Поступила в редакцию 24 октября 2000 г.

Исследована температурная зависимость транспорта протонов в клетку и из клетки в эритроцитах, нагруженных сульфатом. Установлено, что вход протонов в клетку менее чувствителен к температуре по сравнению с выходом протонов из клетки. Энергия активации входа протонов в клетку составляет 1.2 ккал/моль, энтропия активации отрицательна и равна -64 кал/(моль·град), тогда как энергия активации выхода протонов равна 33 ккал/моль, а энтропия активации составляет 36.35 кал/(моль·град). Такие различия значений термодинамических параметров указывают на то, что транспорт в клетку и из клетки происходит по различным механизмам. Полученные результаты позволяют предположить, что в первом случае транспорт протонов в клетку не сопровождается изменением конформации переносчика, тогда как во втором случае положительная величина энтропии указывает на конформационные преобразования структуры переносчика, что характерно для обменного типа транспорта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сульфат-нагруженные эритроциты, транспорт протонов, энергия активации.

Транспортные процессы и системы переноса ионов играют важную роль в механизмах адаптации клеток живого организма к изменениям в среде. Ранее было показано, что транспорт протонов в эритроциты, нагруженные сульфатом, активируется ингибитором анионного транспорта ДИДС и гипертоническим воздействием [1]. Этот результат позволил предположить существование противотранспорта протонов, который сопровождает транспорт хлорида в клетку по двум механизмам: котранспорт хлорида и протона в клетку и обмен хлорида на внутриклеточный сульфат и протон.

В работе [2] было показано, что в интактных эритроцитах, помещенных в сульфатную среду происходит последовательное двухфазное изменение рН суспензии клеток, представленное фазой закисления и фазой защелачивания. Было выявлено, что фаза защелачивания более чувствительна к изменению температуры, чем фаза закисления. Фаза защелачивания блокировалась полностью при 13° – 15°С. При этой температуре активность фазы закисления изменялась незначительно. Вычисление термодинамических параметров показало значительные различия между энтальпиями и энтропиями активации двух фаз. Это позволило предположить возможность транспорта хлорида из клетки по двум механизмам: выход хлорида с протоном по каналу и обмен хлорида на внеклеточный сульфат и протон.

В настоящей работе было исследовано влияние температуры на транспорт протонов в эритроцитах, нагруженных сульфатом, помещенных в хлоридные среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила донорская кровь II группы. Эритроциты четыре раза отмывали раствором, содержащем 0.08 M Na₂SO₄, 0.04 M K₂SO₄, 0.01 M TRIS (pH = 7.4) путем центрифугирования при 3000 об/мин по 5 минут. Затем эритроциты с 10 %-ным гематокритом нагружали сульфатом в указанном растворе посредством 3-х разовой инкубации по 15 минут (37° C) [3]. После инкубации клетки осаждали 3 минуты при 3000 об/мин. Осадок в последний раз отмывали в течение 5 минут раствором, содержащем 0.12 M Na₂SO₄ и помещали на ледяную баню.

Транспорт протонов в эритроцитах оценивали по изменению рН суспензии клеток в термостатируемой ячейке (объем = 2.5 мл). В ячейку помещали по 2 мл исследуемого раствора: 0.15 M NaCl (изотонический вариант); 0.4 M NaCl (гипертонический вариант), доводили рН раствором NaOH до рН (7.0 – 7.2), после чего в ячейку вносили по 50 мкл эритроцитов и фиксировали изменение рН.

Для блокирования анионного транспорта использовали ингибитор анионного транспорта ДИДС (4,4' – диизотиоциано стильбен – 2,2' – дисульфонат) в концентрации 0,2 мкМ, который добавляли в ячейку перед внесением эритроцитов.

Представленные результаты получены на основе усредненных экспериментальных значений. Эксперименты проведены на эритроцитах, взятых от 6 – 8 доноров.

Данные экспериментов по температурной зависимости транспорта протонов в клетку и из клетки при различных условиях обрабатывали следующим образом. Используя известное выражение для константы скорости реакции первого порядка [4] $k = 2.3 \{ \lg([H_0] / [H_t]) \} / t$, находили константу

скорости изменения концентрации протонов при различных температурах путем построения касательной к кривой $pH = f(t)$.

Далее строили графики температурных зависимостей в координатах Аррениуса: $\ln k$ от $1/T$. В уравнении Аррениуса

$$k = A \exp(-E_a/RT), \text{ где } E_a = \Delta H^* + RT \quad (1)$$

предэкспоненциальный член A вычисляли, исходя из теории переходного состояния Эйринга [4], следующим образом:

$$A = (\ln(k_b/h) + \ln T + (\Delta S^*/R) + 1), \quad (2)$$

где h - постоянная Планка; k_b - константа Больцмана; T - абсолютная температура; R - газовая постоянная; ΔS^* , ΔH^* , E_a - соответственно, энтропия, энтальпия и энергия активации.

Данные графики выявляют несколько линейных участков кривой, для каждого из которых методом наименьших квадратов вычисляли термодинамические параметры.

Свободную энергию активации определяли по формуле

$$\Delta G = \Delta H^* - T\Delta S^*. \quad (3)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано в [1], внесение сульфат-нагруженных эритроцитов в хлоридные среды приводит к защелачиванию суспензии клеток вследствие обмена внутриклеточного сульфата на внеклеточный хлорид. Исследования, проведенные в данной работе показали, что повышение температуры от 17°C до 50°C приводит к снижению уровня защелачивания суспензии эритроцитов во всех четырех экспериментальных средах (рис.1). Более выраженные различия в степени защелачивания отмечаются в интервале температур 33°C - 50°C .

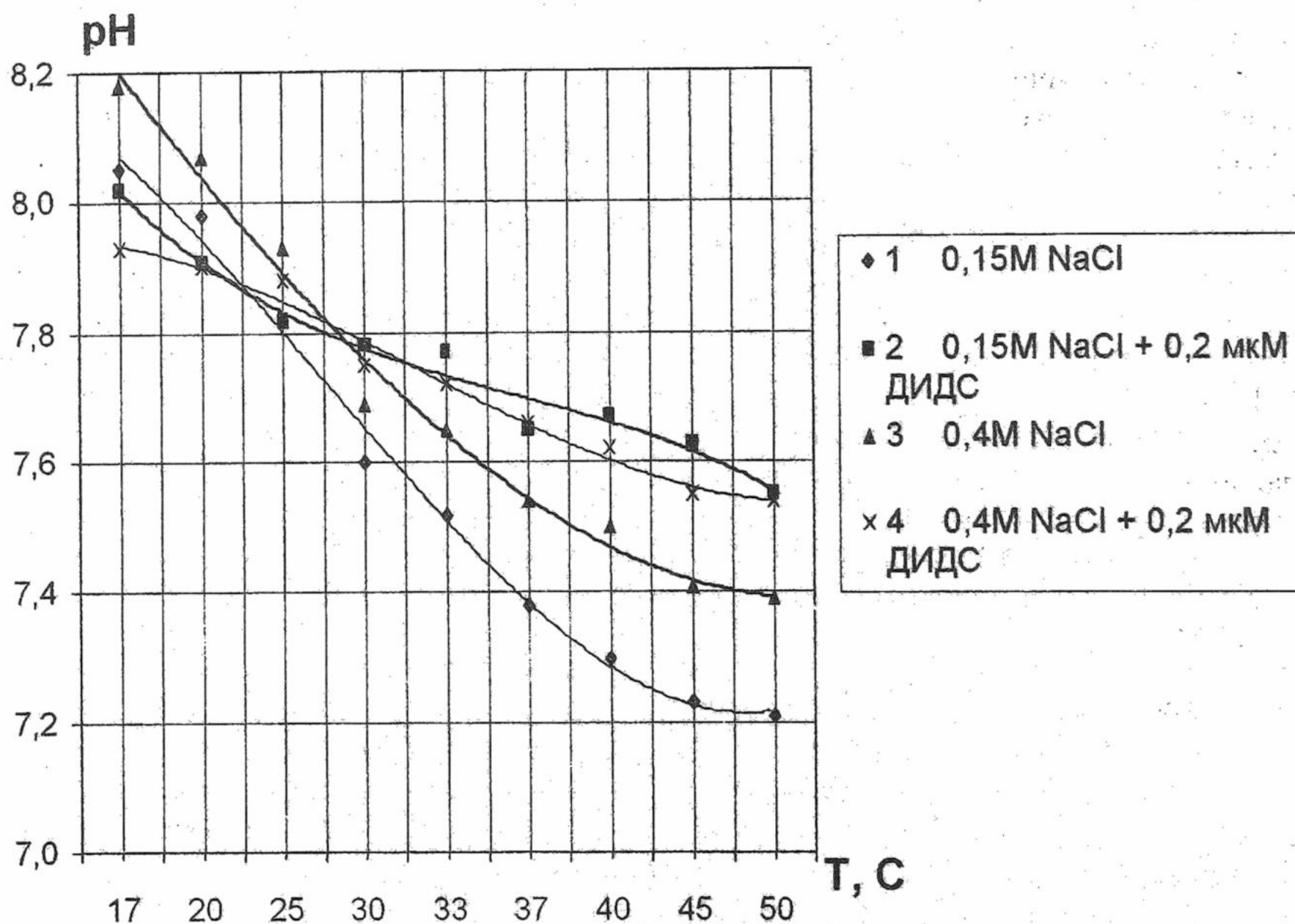


Рис. 1 Влияние ДИДС и осмотического стресса на степень защелачивания суспензии эритроцитов при изменении температуры.

Присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС (рис.1, кривая 2) или гипертоническое воздействие (рис.1, кривая 3) приводит к росту уровня защелачивания в указанной области температур. При этом эффект гипертонического воздействия несколько ниже, чем эффект ингибитора анионного транспорта. Комбинирование гипертонической среды с ДИДС приводит к тому, что изменение уровня защелачивания становится таким же, как и в присутствии ДИДС без гипертонического воздействия. Очевидно, что гипертоническое воздействие может обладать частично таким же действием как ингибитор анионного транспорта.

Построение температурной зависимости скорости транспорта протонов в координатах Аррениуса выявило следующие закономерности (рис.2). Кривая в физиологическом растворе может быть

Влияние температуры на транспорт протонов в эритроцитах ...

представлена тремя прямолинейными участками в интервалах температур 3°–15°C; 15°–30°C; 30°–50°C. Термодинамические параметры для указанных участков приведены в таблице 1.

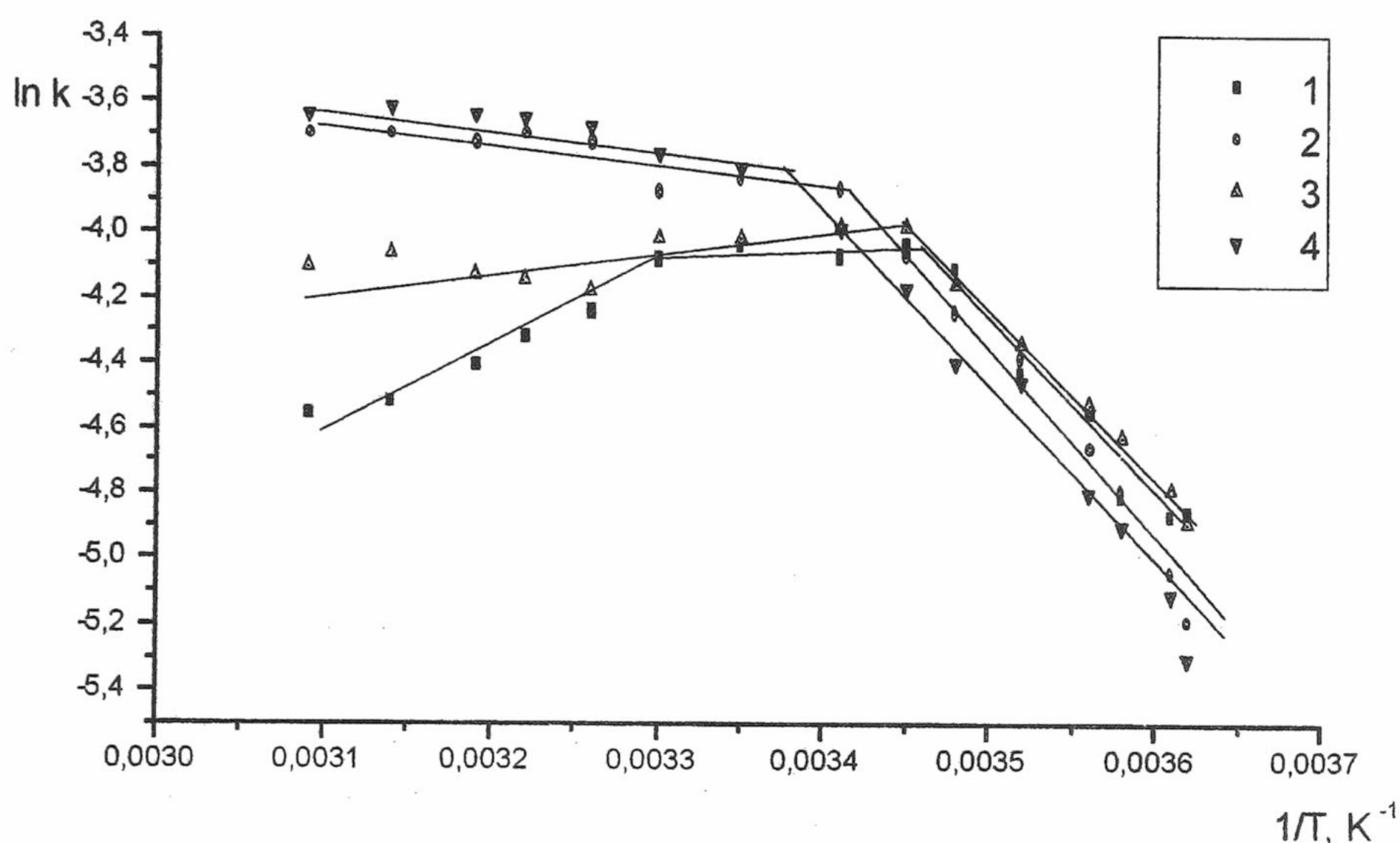


Рис. 2. Температурная зависимость транспорта протонов в клетку в различных средах. (1 - 0,15 M NaCl; 2 - 0,15 M NaCl + 0,2 мкМ ДИДС; 3 - 0,4 M NaCl; 4 - 0,4 M NaCl + 0,2 мкМ ДИДС).

Температурная зависимость транспорта протонов в физиологическом растворе в присутствии ДИДС может быть представлена двумя прямолинейными участками с интервалами температур: 3°–20° C; 20°–50° C. (Термодинамические параметры отражены в таблице 1)

Таблица 1

Термодинамические параметры транспорта протонов в клетку

Условия эксперимента	0.15 M NaCl			0.15M NaCl + 2 мкМ ДИДС		0.4 M NaCl		0.4 M NaCl + 2 мкМ ДИДС	
Интервал температур, °C	3-15.5	15.5-30	30-50	3-20	20-50	3-17	17-50	3-25	25-50
E_a , ккал/моль	10.5	-0.4	-4.5	12.4	1.2	10.2	-0.9	11.0	1.3
ΔS^* , кал/(моль·град)	-32.0	-69.8	-83.8	-25.7	-64.0	-32.9	-71.5	-31.0	-63.9
ΔG^* , ккал/моль	19.0	19.7	21.0	19.1	20.3	18.9	20.4	19.3	20.5

Отметим, что участки области низких температур двух описанных зависимостей значительно не отличаются между собой по энергиям активации, тогда как на участке повышенных температур выявляются значительные различия в термодинамических характеристиках двух сравниваемых участков. В присутствии ДИДС $E_a = 1.2$ ккал/моль, тогда как в контроле $E_a = -4.5$ ккал/моль.

В области низких температур транспорт протонов в растворе, содержащем 0.4 M NaCl значительно не отличается от такового в 0.15M NaCl. Выше точки излома (рис.2, кривая 3) повышение температуры также приводит к увеличению разности в скоростях транспорта между контрольной зависимостью и зависимостью в гипертоническом растворе. Термодинамические параметры области с низкими температурами значительно не отличаются от тех же параметров в контроле, тогда как в верхней области температур скорость переноса протонов практически не зависит от температуры (рис. 2, таблица 1). Термодинамические параметры описанной зависимости незначительно отличаются от зависимости

0.15 M NaCl в присутствии ДИДС. Такой результат указывает на то, что гипертоническое воздействие частично обладает действием подобным ингибитору анионного транспорта ДИДС.

Присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС в растворе, содержащем 0.4 M NaCl не вызывает заметных изменений зависимости в области низких температур (рис.2, кривая 4). Однако при температурах выше точки излома прямолинейный участок практически совпадает с участком температурной зависимости в 0.15 M NaCl в присутствии ингибитора ДИДС.

Таким образом, полученные результаты показывают, что, во – первых, повышение температуры приводит к тому, что степень защелачивания суспензии эритроцитов, которая отражает вход протонов в клетку уменьшается как в изотоническом, так и в гипертоническом растворах. Во - вторых, присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС заметно увеличивает не только степень защелачивания в интервале температур $33^{\circ} - 50^{\circ} \text{C}$ (рис.1), но и скорость защелачивания (рис.2). При этом, чем выше температура, тем больше разница в степени защелачивания (рис.1).

Подобным действием обладает среда, содержащая 0.4 M NaCl. Это указывает на то, что гипертоническое воздействие влияет на транспорт протонов действием, сходным с воздействием ДИДС.

Ранее было показано, что присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС приводит к возрастанию степени защелачивания суспензии сульфат-нагруженных эритроцитов [1]. Было показано, что указанный блокатор ингибирует транспорт протонов из клетки. При этом транспорт протонов в клетку становится более выраженным. Как указано выше (рис. 1,2) описанный эффект в присутствии ДИДС наблюдается в верхнем интервале температур.

Было показано, что в хлорид – нагруженных эритроцитах, внесенных в сульфатную среду происходят двухфазные изменения рН суспензии клеток [2]. При этом фаза защелачивания была намного чувствительней к температуре и ингибировалась практически при $13^{\circ} - 15^{\circ}\text{C}$, когда начиналось торможение фазы закисления [2]. Исходя из этого, заключили существование двух механизмов транспорта протонов, которые по разному чувствительны к температуре и, соответственно, имеют различные энергии и энтропии активации [2].

В настоящей работе были созданы такие экспериментальные условия, когда градиент сульфата был направлен не в клетку, а из клетки, а градиент хлорида в клетку.

Результаты исследования показали, что присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС в концентрации, которая максимально активирует фазу защелачивания [1] незначительно влияет на скорость транспорта протонов в интервале температур $3^{\circ} - 17^{\circ}\text{C}$ (рис.2) Это говорит о том, что выход протона из клетки в указанном интервале температур, практически заингибирован.

Вероятно, динамика защелачивания в присутствии ДИДС отражает полный транспорт протонов в клетку; при этом участок температурной зависимости от 17° до 50° является оценкой температурной зависимости транспорта протонов в клетку. Полученные термодинамические параметры описанного участка подтверждают это предположение. В данном случае E_a является незначительной и составляет 1.2 ккал/моль (таблица 1). Такая незначительная энергия активации характерна для котранспорта протонов и хлорида из хлорид-нагруженных эритроцитов в сульфатной среде [2]. В случае обменного типа транспорта, при обмене внутриклеточного хлорида на сульфат, энергия активации значительно выше и составляет 28 – 32 ккал/моль [5].

В нижнем участке температур транспорт протонов, который сопровождает транспорт анионов может контролироваться взаимодействием цитоскелета с мембраной, как указывалось ранее [2]. В указанном интервале температур E_a значительно превышает таковую в верхнем участке температур (таблица 1).

При гипертоническом воздействии (0.4 M NaCl) также происходит увеличение скорости транспорта по сравнению с контролем в интервале температур $17^{\circ} - 50^{\circ} \text{C}$. Однако эффект увеличения скорости менее выражен по сравнению с изотоническим раствором в присутствии ДИДС. Это говорит о том, что гипертоническое воздействие также может модифицировать анион-транспортную систему, в данном случае - блокировать обменный транспорт, хотя и в меньшей степени, чем ингибитор. Комбинирование ДИДС с раствором, содержащим 0.4 M NaCl приводит к дополнительному увеличению скорости транспорта протонов. В этой ситуации величины скоростей в 0.15 M NaCl и 0.4 M NaCl в присутствии ингибитора анионного транспорта в обоих случаях практически не отличаются.

С учетом того, что выявлен противотранспорт протонов, оценку выхода хлорида можно произвести следующим образом. Если скорость потока протонов в клетку обозначить через J_1 , а скорость потока протонов из клетки обозначить через J_2 , то результирующий поток при условии $J_1 > J_2$ будет равен $J_1 - J_2 = J_{\text{результ.}}$. Если J_1 – это скорость потока протонов в клетку в присутствии ДИДС, а $J_{\text{результ.}}$ – в отсутствии ДИДС то J_2 – это скорость потока протонов из клетки, $J_2 = J_1 - J_{\text{результ.}}$

Представление в координатах Аррениуса данной разности в области температур $17^{\circ} - 50^{\circ}\text{C}$ и вычисление термодинамических параметров подтверждает то, что указанная разность констант скоростей может оценивать обменный тип транспорта при обмене внутриклеточного сульфата и протона на внеклеточный хлорид (рис.3).

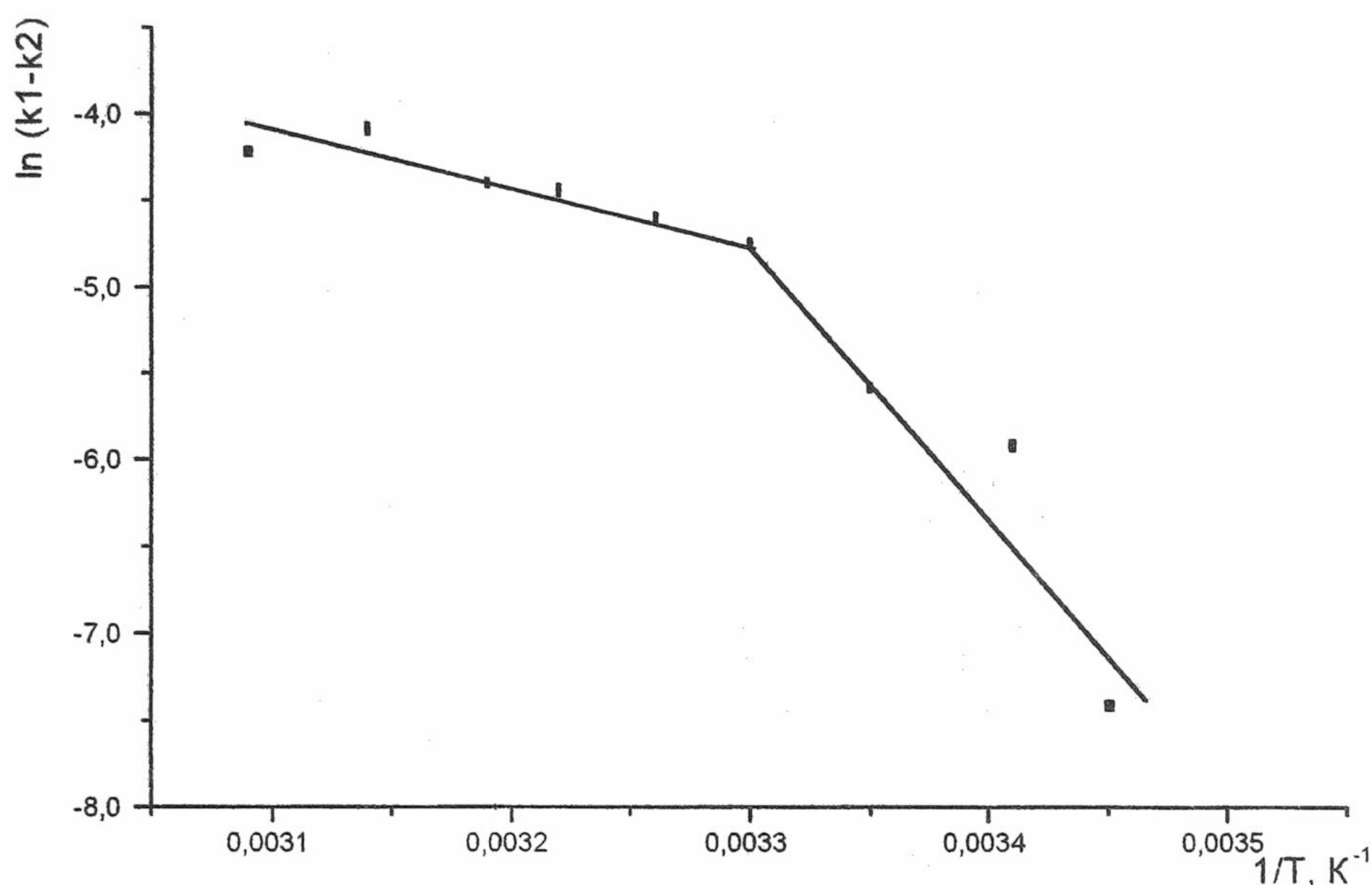


Рис. 3. Температурная зависимость логарифма разности констант скоростей между экспериментом в присутствии ДИДС и контролем

В данном случае для интервала $17^{\circ} - 30^{\circ} \text{C}$ $E_a = 33$ ккал/моль и энтропия активации составляет 36.35 кал/(моль·град). Такая значительная энергия активации и положительная энтропия активации характерна для обменного типа транспорта при обмене хлорида на сульфат [5].

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показывают, что транспорт протонов в клетку в интервале температур $20^{\circ} - 50^{\circ}\text{C}$ характеризуется невысоким значением E_a (1.2 ккал/моль) и отрицательной величиной энтропии активации (- 64 ккал/(моль·град)), тогда как транспорт протонов из клетки имеет значительную величину E_a (33 ккал/моль) в интервале температур $17^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$ и положительную величину энтропии активации (36.35 ккал/(моль·град)). В последнем случае такие термодинамические характеристики характерны для обменного типа транспорта, в котором положительная величина энтропии указывает на конформационные преобразования структуры переносчика в ходе транспорта [5]. В первом случае отрицательное значение энтропии может указывать на то, что транспорт протонов в клетку происходит по механизму, который не включает в себя изменения конформации переносчика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алмазова Е. Б., Рамазанов В. В., Бондаренко В. А. Транспорт протонов в сульфат-нагруженных эритроцитах при гипертоническом воздействии. // Биологический вестник. 1999. Т. 3. №1-2. С. 67-69
2. Лупілова Н. А. Вплив інгібіторів аніонного транспорту і модифікаторів цитоскелета на бар'єрні характеристики еритроцитів в умовах осмотичного стресу. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук. Харків. ІПК та К НАН України, 1999. 22 с.
3. Schnell K. F. Anion transport across the red blood cell membrane mediated by dielectric pores. // J. Membrane. 1977. V. 37. P. 39-136.
4. Герасимов Я. И., Древинг В. П. и др. Курс физической химии. Т. 2. М. Химия, 1973. 624 с.
5. Glibowika M., Winckler B., Aranibar N. Temperature dependence of anion transport in the human red blood cell. // Biochem. Biophys. Acta. 1988. № 948. P. 345 - 358.

УДК 577.352.4:611.018.51

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

ОПТИМАЛЬНЫЙ РЕЖИМ БЫСТРОГО ДВУХСТУПЕНЧАТОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ

М.В.Останков, Е.А.Гордиенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков, ул.Переясловская, 23, 61015
поступила в редакцию 1 ноября 2000 г.

Теоретически рассчитано переохлаждение внутриклеточного раствора костного мозга мыши при охлаждении клеточной суспензии с постоянной скоростью и при быстром двухступенчатом замораживании. На основании проведенных расчетов предсказаны оптимальные условия низкотемпературного консервирования этих клеток под защитой диметилсульфоксида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: быстрое двухступенчатое замораживание, переохлаждение, внутриклеточная кристаллизация, диметилсульфоксид.

Одним из ведущих факторов, который приводит к повреждению клеток при их низкотемпературной консервации, является внутриклеточная кристаллизация, вероятность которой экспоненциально возрастает с увеличением переохлаждения внутриклеточного раствора. Поэтому при оптимальных режимах их охлаждения, прежде всего, необходимо, чтобы переохлаждение внутриклеточного раствора в процессе криоконсервации клеточных суспензий было небольшим и достигалось только на как можно более короткий промежуток времени.

Цель этой работы – теоретически рассчитать и сопоставить зависимости переохлаждения внутриклеточного раствора, объема клеток и концентрации растворенных внутри них веществ от температуры при охлаждении клеток костного мозга мыши с постоянной скоростью и при быстром двухступенчатом замораживании. Последнее осуществляется погружением контейнера с клеточной суспензией в предварительно охлажденную до заданной (обычно в области от -25°C до -35°C) субнулевой температуры жидкость на определенный промежуток времени (обычно от 5 до 30 мин.) с последующим погружением непосредственно в жидкий азот.

Будем рассчитывать указанные зависимости, исходя из следующих предположений:

1) перераспределением растворенных веществ между клетками и окружающей их средой в процессе кристаллизации пренебрегаем, полагая, что клеточные мембраны проницаемы только для молекул растворителя, то есть воды;

2) считаем, что до начала кристаллизации в охлажденной клеточной суспензии концентрации криопротектора вне и внутри клетки были одинаковы за счет предварительной (до начала охлаждения) эквивибрации клеток в криозащитном растворе при положительной температуре;

3) считаем, что внеклеточный раствор в процессе кристаллизации находится в термодинамическом равновесии со внеклеточным льдом и, вследствие этого состав внеклеточного раствора изменяется с температурой в соответствии с диаграммой плавления этого раствора;

4) для определенности полагаем, что клетки костного мозга замораживаются под защитой раствора 1,5M диметилсульфоксид – 0,15M NaCl – вода;

В силу предположения 1 изменение относительного объема клеток y со временем t описывается обыкновенным дифференциальным уравнением [1]:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} [\hat{C}^{\text{in}} - \hat{C}^{\text{out}}] \quad (1)$$

где $\tau_0 = [S/V(0) L_p RT(0)C^{\text{in}}(0)]^{-1}$, S – площадь поверхности клеточной мембраны, $V(0)$ и $C^{\text{in}}(0)$ – начальные значения объема клетки и суммарной концентрации (моль/объем) растворенных в ней внутриклеточных веществ, L_p – коэффициент фильтрации клеточной мембраны, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, C^{in} и C^{out} – текущее значение суммарных концентраций растворенных внутри и вне клеток веществ, $\hat{C}^{\text{in}} = C^{\text{in}}/C^{\text{in}}(0)$, $\hat{C}^{\text{out}} = C^{\text{out}}/C^{\text{in}}(0)$.

Очевидно,

$$\hat{C}^{\text{in}} = (1 - \alpha) / (y - \alpha) \quad (2)$$

где α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ. Если клеточная суспензия охлаждается с постоянной скоростью $T = \beta$, то $\beta dt = dT$ и

$$\frac{dy}{d\tilde{T}} = \frac{T(0)}{\beta\tau_0} [(1-\alpha)/(y-\alpha) - \hat{C}^{out}] \quad (3)$$

где введено обозначение $\tilde{T} = T / T(0)$.

Зависимость параметра τ_0 от температуры будем считать аррениусовой во всем исследуемом диапазоне температур, то есть

$$\tau_0(T) = \tau_0(T(0)) e^{-\frac{U}{RT(0)}} \left(1 - \frac{1}{\tilde{T}}\right) \quad (4)$$

где U – энергия активации переноса воды через клеточную мембрану.

Для тройного раствора 1,5М диметилсульфоксид – 0,15 NaCl – вода диаграмма плавления $\tilde{T} = \tilde{T}(C)$ известна [2]. По данным этой работы с учетом предположения 2 имеем:

$$\hat{C}^{out} = -78,56 + 206,43\tilde{T} - 126,78\tilde{T}^2$$

Для клеток костного мозга мыши параметр τ_0 мы оценили по времени обезвоживания клеток в растворе указанного выше состава путем наблюдения под микроскопом при температуре 37°C . Это время составляет $\tau_0 \approx 38 \div 40$ сек. Энергия активации этого процесса для указанных клеток в области температур $37-20^\circ\text{C}$ составляет около $U \approx 45$ кДж / моль. Кроме того, для клеток костного мозга мыши в среднем $\alpha \approx 0,2$. С учетом этих данных можно, решая уравнение (3) при различных значениях параметра $T(0) / (\beta\tau_0)$, найти зависимость относительного объема клеток от приведенной температуры $y = y(\tilde{T})$. В силу предположения 1 диаграмму плавления внутреннего раствора можно считать практически совпадающей с диаграммой плавления внеклеточного раствора. Однако, концентрация внутриклеточных растворенных веществ при каждой данной температуре не совпадает с концентрацией в жидкой фазе кристаллизующего внеклеточного раствора, поскольку при достаточно быстрых скоростях охлаждения осмотическое равновесие между вне- и внутриклеточным растворами не успевает установиться. За счет этого эффекта во внутриклеточном растворе возникает эффективное переохлаждение

$$\delta T = \tilde{T}^*(\hat{C}^{in}) - \tilde{T} \quad (5)$$

где $\tilde{T}^*$ – приведенная температура плавления внутриклеточного раствора при значении приведенной концентрации $\hat{C}^{in}$. Таким образом, из (5) с учетом (2) и решения уравнения (3) можно рассчитать зависимость эффективного переохлаждения внутриклеточного раствора δT от приведенной температур. Результаты расчетов при трех значениях параметра $T(0) / (\beta\tau_0)$ для клеток костного мозга мыши приведены на рис.1.

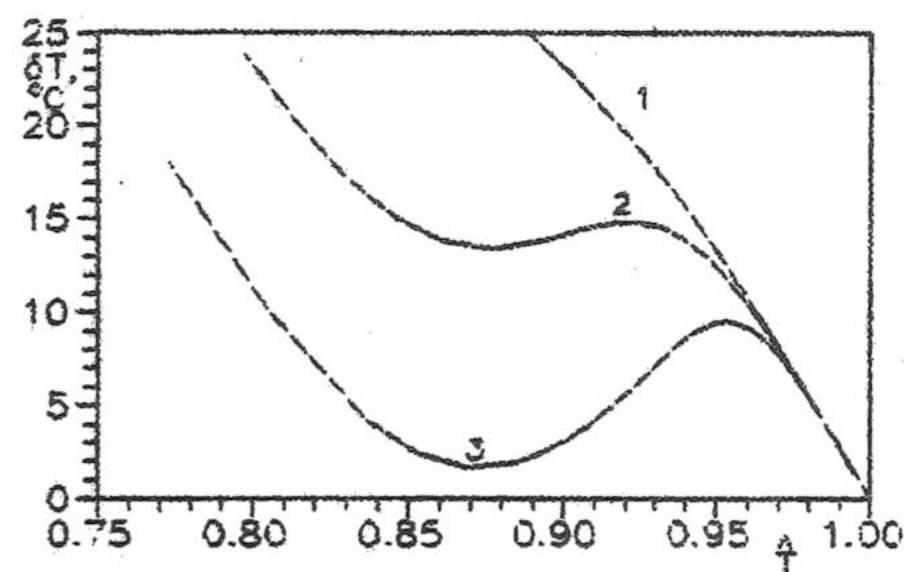


Рис.1 Зависимость эффективного переохлаждения внутриклеточного раствора клеток костного мозга мыши ($U / RT_0 = 20$, $\alpha = 0,2$) от приведенной температуры при охлаждении с постоянной скоростью 1) $T_0 / (\tilde{T}\tau_0) = 10$, 2) $T_0 / (\tilde{T}\tau_0) = 15$ 3) $T_0 / (\tilde{T}\tau_0) = 25$.

Значение параметра $T_0 / (\tilde{T}\tau_0) = 25$ (кривая 3 на рис.1) соответствует скорости охлаждения порядка $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Как видно из представленных на рис.1 данных, при этой скорости охлаждения внутриклеточное переохлаждение не превышает 10°C вплоть до области эвтектической температуры. При этом увеличение переохлаждения до указанного значения в области температуры $\tilde{T} \approx 0,95$ является недостаточным для того, чтобы внутри клетки при таком переохлаждении образовались кристаллы льда. Охлаждение с более высокими скоростями (кривая 1 и 2) приведут к более значительному переохлаждению внутриклеточного раствора, и, следовательно, гибель клеток становится неизбежной. Результаты расчета вполне удовлетворительно согласуются с данными литературы о том, что оптимальная (постоянная) скорость охлаждения клеток костного мозга мыши составляет $0,5-1^\circ\text{C}/\text{мин}$ [3].

В случае быстрого двухступенчатого замораживания температура охлажденной клеточной суспензии изменяется по закону:

$$T = T_{\infty} + (T(0) - T_{\infty}) e^{-t/\theta},$$

где T_{∞} - температура жидкости, в которую погружается контейнер при быстром двухступенчатом замораживании. Следовательно,

$$\frac{dy}{dT} = \frac{\theta}{\tau_0 (T(0)) (\tilde{T}_{\infty} - \tilde{T})} e^{\frac{U}{RT(0)}} \left(1 - \frac{1}{\tilde{T}}\right) [(1-\alpha)/(y-\alpha) - \hat{C}^{out}]$$

Решая это дифференциальное уравнение, с учетом (4) и (5) получаем зависимость переохлаждения внутриклеточного раствора клеток костного мозга мыши от температуры на первой стадии двухступенчатого замораживания (от температуры, при которой начинается кристаллизация внеклеточного раствора до температуры адаптации T_{∞}). Результаты расчетов при разных значениях параметра θ / τ_0 приведены на рис.2.

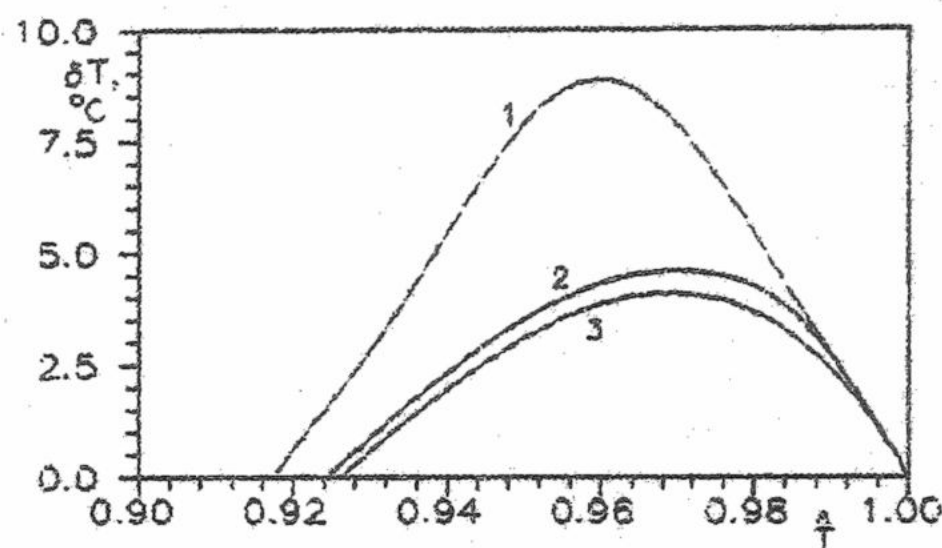


Рис.2 Зависимость эффективного переохлаждения внутриклеточного раствора клеток костного мозга мыши ($U / RT_0 = 20$, $\alpha = 0,2$) от приведенной температуры при быстром двухступенчатом замораживании 1) $\theta / \tau_0 = 2$, 2) $\theta / \tau_0 = 10$, 3) $\theta / \tau_0 = 100$.

Как следует из представленных на этом рисунке данных, при быстром двухступенчатом замораживании эффективное переохлаждение после погружения образца в жидкость, охлажденную до -30°C , во всех рассмотренных случаях лишь на небольшой промежуток времени достигает значения около 5°C , а затем падает до нуля. Эти случаи более оптимальны с точки зрения предотвращения внутриклеточной кристаллизации, чем охлаждение с постоянной скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Однако наряду с этим они имеют и другие значительные преимущества. При $\theta \geq 20$ мин., время, за которое переохлаждение внутреннего раствора падает до нуля не превышает 12 мин. Таким образом, оптимальным временем выдержки образца в жидком криостате можно считать 15 мин. Последующее погружение образца в жидкий азот не приведет к повреждению клеток, поскольку даже если при этом цитоплазма клеток переохлаждается снова, внутриклеточные кристаллы не образуются из-за большой вязкости внутриклеточного раствора при температурах $T < T_{\infty}$. Легко определить, что указанная оптимальная процедура быстрого двухступенчатого замораживания осуществляется за время, не превышающее 25 мин., тогда как продолжительность замораживания с оптимальным постоянным значением скорости $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ составляет не менее 100 мин. Кроме того, поскольку при быстром двухступенчатом замораживании время замораживания сопоставимо с характерным временем проникновения воды через клеточные мембраны (более 10 мин.) и значительно меньше, чем характерное время проникновения криопротектора в клетку, быстро оттаянные клетки костного мозга мыши будут более устойчивы к постгипертоническому лизису, чем замороженные со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Таким образом расчетным путем установлено, что оптимальным с точки зрения предотвращения повреждения клеток внутриклеточными кристаллами режимом быстрого двухступенчатого замораживания клеток костного мозга мыши является погружение контейнера с клеточной суспензией в жидкий криостат с температурой -30°C на 15 мин. с последующим перемещением контейнера непосредственно в жидкий азот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев, Наук. Думка, 1994, 143 с.
2. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationships in cryobiology. Cryobiology, 11, 1974, p. 340-358.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий. (под ред. А. А. Цуцаевой), Киев, Наук. Думка, 1983, 240 с.

УДК 57.081.4:616-006

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

ДИФФУЗИЯ КИСЛОРОДА В ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ НА
РАННЕМ ЭТАПЕ ЕЕ РАЗВИТИЯ (ЭТАПЕ СФЕРОИДА)

В. Г. Книгавко, М. А. Бондаренко, В. Г. Буц

Харьковский государственный медицинский университет, пр. Ленина, 4

11 сентября 2000 г.

Работа посвящена математическому моделированию диффузии кислорода в злокачественной опухоли на раннем этапе ее развития, когда опухоль может рассматриваться как сфероид.

Ставилась задача определения распределения кислорода в опухоли в зависимости от расстояния до центра сфероида.

Опираясь на уравнение диффузии и методы математического моделирования, были получены три модели, основанные на различных предположениях о характере потребления кислорода опухолью. Эти модели позволяют оценить такие параметры, характеризующие состояние клеток опухоли, как распределение концентрации кислорода в опухоли, радиус гипоксической зоны, радиус сфероида, при котором она образуется и др.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: математическое моделирование, диффузия кислорода, злокачественная опухоль.

Распределение кислорода в опухоли определяет функциональное состояние ее клеток. При достаточном количестве кислорода клетки опухоли активно делятся, при недостаточном количестве кислорода - переходят в состояние покоя, при длительной гипоксии - отмирают [1-3]. С другой стороны, количество клеток, находящихся в том или ином функциональном состоянии, обуславливает кинетику развития опухоли, а также, что исключительно важно при лучевой терапии опухолей, ее радиочувствительность или радиорезистентность [1, 4, 5]. Поэтому для понимания закономерностей развития опухоли и выбора оптимальной терапевтической тактики необходимо знать распределение кислорода в опухоли.

Наиболее простым для моделирования случаем диффузии кислорода и его потребления опухолью является опухоль на начальном этапе ее развития до васкуляризации, когда она с хорошей точностью может рассматриваться как сфероид.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Мы исходили из того, что процессы диффузии кислорода в опухоли и его потребления клетками опухоли происходят значительно быстрее, чем процесс роста опухоли, т.е., рассматривая распределение кислорода в опухолевом сфероиде, можно пренебречь изменением его размеров со временем.

Пусть R - радиус опухолевого сфероида. Поскольку поступающий в сфероид кислород потребляется клетками опухоли, концентрация кислорода (c) в какой-либо точке сфероида тем меньше, чем дальше эта точка от поверхности опухоли. Если концентрация кислорода везде вокруг сфероида одинакова (обозначим ее c_0), то в этом случае концентрация кислорода в каждой внутренней точке опухоли зависит только от расстояния между этой точкой и центром сфероида, т.е. $c = c(r)$, где r - расстояние от данной точки до центра сфероида.

Задача определения зависимости c от r решалась нами при различных предположениях о характере потребления кислорода клетками опухоли. Во всех рассмотренных случаях мы исходили из стационарности моделируемых процессов, т.е. считали, что диффузионный поток кислорода (Φ) через сферическую поверхность радиуса r или, иными словами, скорость поступления кислорода в часть сфероида, внешней границей которой является сфера радиуса r , равен общей скорости потребления кислорода этой частью сфероида.

В соответствии с уравнением Фика

$$\Phi = \frac{dm}{dt} = D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr}, \quad (1)$$

где D - коэффициент диффузии кислорода в опухоли, dm - масса кислорода, проходящая при диффузии через сферическую поверхность радиуса r за время dt .

При описании процессов потребления кислорода опухолью анализировались следующие возможные модельные предположения о характере потребления кислорода клетками опухоли:

1. Клетки захватывают за единицу времени столько кислорода, сколько им необходимо для жизнедеятельности, остальной кислород, диффундируя, проходит через клетки.

2. Клетки захватывают долю диффузионного потока кислорода через них, причем эта доля для всех живых клеток одинакова.

3. В тех частях сфероида, где диффузионный поток кислорода велик, клетки захватывают столько кислорода, сколько им необходимо для жизнедеятельности, пропуская остальной кислород дальше, а в тех частях сфероида, где концентрация кислорода становится меньше некоторой величины (обозначим ее c_1), клетки захватывают только долю проходящего через них диффузионного потока.

1. При первом модельном предположении возможны две ситуации: если радиус опухоли не слишком велик, то кислород поступает во все части сфероида, если же радиус опухоли становится больше некоторой критической величины ($R_{кр}$), то внешние слои потребляют весь поступающий кислород и внутри сфероида создается зона радиуса R_n , в которую кислород вообще не поступает. В этой зоне клетки сначала прекращают деление, а затем - отмирают.

В обоих случаях клетки, потребляющие кислород, захватывают одинаковое его количество и скорость потребления кислорода оказывается пропорциональной объему потребляющих клеток, т.е.

$$\frac{dm_n}{dt} = \mu V, \quad (2)$$

где dm_n - масса кислорода, потребляемого объемом V опухоли за время dt , μ - некоторый коэффициент пропорциональности. При этом μ можно назвать удельной скоростью потребления кислорода клетками опухоли.

1.1. Пусть $R \leq R_{кр}$. Тогда из стационарности процесса потребления кислорода клетками вытекает:

$$D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr} = \mu \cdot \frac{4}{3} \pi \cdot r^3, \quad (3)$$

откуда с учетом того, что $c(R) = c_0$, получим

$$c = c_0 - \frac{\mu}{6D} (R^2 - r^2). \quad (4)$$

Очевидно, что, если $R = R_{кр}$, то $c(0) = 0$. Тогда

$$R_{кр} = \sqrt{\frac{6Dc_0}{\mu}}. \quad (5)$$

1.2. Пусть $R > R_{кр}$. Тогда

$$D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr} = \begin{cases} \mu \cdot \frac{4}{3} \pi (r^3 - R_n^3), & R_n \leq r \leq R \\ 0, & 0 \leq r \leq R_n \end{cases} \quad (6)$$

Интегрируя и учитывая, что $c(R) = c_0$, получаем

$$c = \begin{cases} c_0 - \frac{\mu}{6D} (R^2 - r^2) + \frac{\mu R_n^3}{3D} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{R} \right), & R_n \leq r \leq R \\ 0, & 0 \leq r \leq R_n \end{cases}, \quad (7)$$

где для оценки величины R_n , исходя из того, что $c(R_n) = 0$, можно получить уравнение

$$R_n^3 - \frac{3}{2} R_n^2 R + \frac{R^3}{2} - \frac{3DRc_0}{\mu} = 0. \quad (8)$$

2. При втором модельном предположении концентрация кислорода в центре сфероида хотя и минимальна, но не равна нулю. Поэтому опять необходимо рассмотреть два случая: если концентрация кислорода в центре опухоли больше некоторого критически минимального значения ($c_{кр}$), то все клетки опухоли живы и потребляют кислород, если же размеры опухоли велики и внутри сфероида есть область, в которой $c = c_{кр}$, то клетки в этой области отмирают и вследствие отсутствия потребления кислорода концентрация его во всей некротической области равна $c_{кр}$. Пусть и в этом случае R_n - радиус некротической области. Пусть также $R_{кр}$ - критическое значение радиуса сфероида, после превышения которого внутри сфероида появляется некротическая область.

Поскольку в рассматриваемой модели потребление кислорода клеткой пропорционально концентрации, то скорость потребления кислорода сферическим слоем радиуса r и толщины dr должна быть пропорциональна величине $c \cdot 4\pi r^2 dr$ и тогда в случае 2.1 внутренняя часть сфероида радиуса r потребляет кислород со скоростью

$$\frac{dm_n}{dt} = k \int_0^r c \cdot 4\pi \cdot r^2 dr, \quad (9)$$

где k - некоторый коэффициент пропорциональности.

2.1. Для $c(r)$ в этом случае получается интегро-дифференциальное уравнение

$$D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr} = k \int_0^r c \cdot 4\pi \cdot r^2 dr, \quad (10)$$

которое легко преобразуется в дифференциальное уравнение

$$\frac{d^2c}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dc}{dr} - \frac{kc}{D} = 0. \quad (11)$$

Пусть $\sqrt{\frac{k}{D}} = \alpha$. Тогда решение уравнения (11) имеет вид:

$$c = \frac{c_0 R \cdot \text{sh}(\alpha \cdot r)}{r \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R)}. \quad (12)$$

2.2. В этом случае уравнение для $c(r)$ имеет более сложный вид:

$$D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr} = \begin{cases} k \int_{R_n}^r c \cdot 4\pi \cdot r^2 dr, & R_n \leq r \leq R \\ 0, & 0 \leq r \leq R_n \end{cases} \quad (13)$$

С учетом того, что $c(R_n) = c_{кр}$, получаем

$$c = \begin{cases} \frac{c_0 R \cdot \text{sh}(\alpha \cdot r)}{r \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R)}, & R_n \leq r \leq R \\ c_{кр}, & 0 \leq r \leq R_n \end{cases} \quad (14)$$

При известном $c_{кр}$ величину R_n можно оценить из соотношения

$$c_{кр} = \frac{c_0 R \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R_n)}{R_n \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R)}. \quad (15)$$

Отметим, что случай 2.1 соответствует значениям $R \leq R_{кр}$, где величина критического размера $R_{кр}$ удовлетворяет соотношению

$$c_{кр} \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R_{кр}) = c_0 \alpha \cdot R_{кр}, \quad (16)$$

а случай 2.2 - значениям $R \geq R_{кр}$.

3. Третье предположение соответствует ситуации, когда клетка потенциально способна захватывать определенную долю диффундирующего через нее кислорода, но при этом скорость захвата не может превышать некоторой граничной величины. Таким образом, для внешних слоев опухоли справедлива модель, сходная с моделями, рассмотренными в случаях 1.1 или 1.2, а для внутренних слоев - сходная со случаями 2.1 или 2.2. Отметим, что при этом μ следует считать максимальной удельной скоростью потребления кислорода клетками опухоли, а радиус некротической зоны ($R_н$) здесь оценивается не из соотношений (8) или (15), а из соотношения, которое будет получено ниже.

3.1. При достаточно больших значениях c_0 в рассматриваемом случае значение $c(0)$ может быть больше или равно c_1 и тогда оказывается справедливым уравнение (3).

Этот случай соответствует ситуации, когда $c_0 > c_1$ и $R \leq R_{кр1}$, где $R_{кр1}$ - критический радиус сфероида, при превышении которого в нем может образовываться зона гипоксии.

$$R_{кр1} = \sqrt{\frac{6D(c_0 - c_1)}{\mu}}. \quad (17)$$

При этом зависимость концентрации кислорода в опухоли от r описывается уравнением (4).

При $R > R_{кр1}$ внутри сфероида может не быть, а может и быть некротическая зона.

3.2. При отсутствии некротической зоны величина c удовлетворяет уравнению

$$D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr} = \begin{cases} \mu \cdot \frac{4}{3} \pi (r^3 - R_1^3), & R_1 \leq r \leq R \\ k \int_0^r c \cdot 4\pi \cdot r^2 dr, & 0 \leq r \leq R_1 \end{cases} \quad (18)$$

где R_1 - радиус (внешний) зоны гипоксии. В этой зоне клетки уже испытывают некоторый недостаток кислорода.

Отсюда

$$c = \begin{cases} c_0 - \frac{\mu}{6D} (R^2 - r^2) + \frac{\mu R_1^3}{3D} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{R} \right), & R_1 \leq r \leq R \\ \frac{c_1 R_1 \cdot \text{sh}(\alpha \cdot r)}{r \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R_1)}, & 0 \leq r \leq R_1 \end{cases} \quad (19)$$

где величина R_1 оценивается путем решения уравнения

$$R_1^3 - \frac{3}{2} R_1^2 R + \frac{R^3}{2} - \frac{3DR(c_0 - c_1)}{\mu} = 0. \quad (20)$$

Рассмотренный случай справедлив при $R_{кр1} \leq R \leq R_{кр2}$, где $R_{кр2}$ - критический радиус опухоли, при котором в сфероиде образуется некротическая зона, что, в свою очередь, справедливо при $R_1 \leq R_{кр}$, где значение $R_{кр}$ определяется формулой (16). Отсюда следует, что величина $R_{кр2}$ может быть найдена при решении уравнения

$$R_{кр2}^3 - 3R_{кр2}(R_{кр}^2 + \frac{2D(c_0 - c_1)}{\mu}) + 2R_{кр}^3 = 0. \quad (21)$$

При $R > R_{кр2}$ внутри сфероиды существует некротическая зона радиуса R'_H .

3.3. В этом случае

$$D \cdot 4\pi \cdot r^2 \frac{dc}{dr} = \begin{cases} \mu \cdot \frac{4}{3} \pi (r^3 - R_1^3), & R_1 \leq r \leq R \\ k \int_{R'_H}^r c \cdot 4\pi \cdot r^2 dr, & R'_H \leq r \leq R_1 \\ 0, & 0 \leq r \leq R'_H \end{cases} \quad (22)$$

и

$$c = \begin{cases} c_0 - \frac{\mu}{6D}(R^2 - r^2) + \frac{\mu R_1^3}{3D}(\frac{1}{r} - \frac{1}{R}), & R_1 \leq r \leq R \\ \frac{c_1 R_1 \cdot \text{sh}(\alpha \cdot r)}{r \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R_1)}, & R'_H \leq r \leq R_1 \\ c_{кр}, & 0 \leq r \leq R'_H \end{cases} \quad (23)$$

где R'_H можно оценить, решая уравнение

$$c_{кр} = \frac{c_1 R_1 \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R'_H)}{R'_H \cdot \text{sh}(\alpha \cdot R_1)}. \quad (24)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из полученных математических моделей, можно сделать следующие выводы.

1. Созданные модели позволяют оценить следующие параметры, определяющие состояние клеток опухоли: а) распределение концентрации кислорода в опухоли, т. е. зависимость этой концентрации от расстояния до центра сфероиды; б) радиус сфероиды (размер опухоли), при котором внутри опухоли возникает гипоксическая зона, где клетки перестают делиться и затем отмирают; в) радиус самой гипоксической зоны и др.

2. Оценки вышеуказанных параметров требуют знания таких величин, как D , μ , k и др., которые могут быть различны для разных видов опухолевых клеток. Поскольку для большей части этих величин в медико-биологической литературе приводятся только приблизительные данные, точный расчет значений вышеуказанных параметров требует экспериментального определения этих данных для каждого типа опухоли.

3. Полученные результаты позволяют в дальнейшем рассчитывать кинетику развития опухоли с целью определения параметров, знание которых необходимо для выбора оптимальной терапевтической тактики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ярмоненко С. П., Вайнсон А. А., Магдон Э. Кислородный эффект и лучевая терапия опухолей.- М.: Медицина, 1980. -248 с.
2. Sutherland R. M. Tumour hypoxia and gene expression - implications for malignant progression and therapy // Acta. Oncol.- 1998.- V. 37, N6.- P. 567-574.
3. Price J. E., Bell C., Frost P. The use of a genotypic marker to demonstrate clonal dominance during the growth and metastasis of a human breast carcinoma in nude mice // Int. J. Cancer.- 1990.- P. 968-971.
4. Кудряшов Ю. Б., Беренфельд Б. С. Основы радиационной биофизики: Учебник. - М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1982.- 304 с.
5. Бак З., Александер П. Основы радиобиологии.- М.: Иностран. лит.- 1963.- 500 с.