

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 577.3

О ВОЗМОЖНОМ СЦЕНАРИИ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ
ЭВОЛЮЦИИ САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД**В.П. Шестопапов***Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины,
ул. Академика Проскуры, 12, г. Харьков, 61085, Украина**Статья поступила в редакцию 4 декабря 1999 г.*

Результаты стационарной теории дифракции, спектральной теории открытых систем и теории морсовских критических точек дисперсионных уравнений краевых самоорганизующихся биосред позволили установить аналитические законы дисперсии и на их основе построить нелинейные эволюционные уравнения, описывающие локальные пространственно-временные процессы сплошной среды биомакромолекул. На простейших примерах решения нелинейных эволюционных уравнений для плоских границ раздела сред показано многообразие динамических явлений при самоорганизации макромолекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дифракция, дисперсия, катастрофа, граница, самоорганизация, хиральность.

Активные биологические среды прошли временную добиологическую (химическую), самоорганизующую (появление реплицирующихся структур) эволюцию и эволюцию отдельных видов (фазы). Теория самоорганизации описывается обыкновенными нелинейными дифференциальными уравнениями, получение и решение которых связано с определенными модельными представлениями и определяются постоянными или зависящими от времени коэффициентами, а также начальными условиями. При таком подходе реальная эволюция биологических сред, образованных совокупностью макромолекул, может быть изучена только частично. Для ее более полного исследования требуется учитывать не только временные, но и пространственные характеристики динамического поведения системы, что возможно при использовании дифференциальных уравнений в частных производных. С их помощью можно сформулировать краевую задачу, в которой учитывается влияние границ среды на весь процесс пространственно-временной эволюции биосред. Поэтому поиск методов построения (и решения) нелинейных эволюционных уравнений (НЭУ) граничных активных кооперативных сред и использования их для анализа процесса самоорганизации на макромолекулярном уровне является актуальной, но очень трудной задачей, поскольку необходимо правильно выявить физические особенности исследуемого процесса, а также найти математические процедуры их описания. И, пожалуй самое важное, установить связь между макроскопическими параметрами, с помощью которых необходимо исследовать проблему, и свойствами среды, образованной биомакромолекулами.

В этой работе предпринята попытка построения НЭУ для определенных биосред и возможность их решения для одно, двух и трехмерных систем с простейшими граничными условиями. Разработанный подход основывается на исследовании задач стационарной теории дифракции, спектральной теории открытых (диссипативных) структур, теории морсовских критических точек дисперсионных уравнений, построения сначала линейных, а затем и нелинейных эволюционных уравнений и их изучения в случае плоского раздела активных и пассивных сред. Хотя хорошо известно, что макромолекулы имеют определенную хиральность, мы в дальнейшем ограничимся случаем, когда образованная из таких молекул непрерывная среда обладает только диэлектрическими изотропными (в крайнем случае анизотропными) свойствами.

При получении НЭУ сначала будем считать, что основным свойством самоорганизующейся биосреды является ее эволюция, а динамика процесса имеет стационарный характер и осуществляется плавно за счет внутреннего развития; стационарность же обозначает их периодическую повторяемость во времени и пространстве. Это позволяет ввести в рассмотрение вместо времени и координат такие фундаментальные величины как частоту и волновой вектор и сформулировать для них линейную спектральную задачу.

Исследование спектральной задачи связано с решением однородных линейных дифференциальных уравнений в частных производных с заданными граничными условиями и условием на бесконечности для функции, зависящей от частоты и пространственных координат. Условие на бесконечности играет определяющую роль, поскольку связано с конкретными свойствами биосреды. Конечной целью решения спектральной задачи является определение спектра и его локализации в пространстве спектральных

(частота) и неспектральных (волновой вектор, свойства среды, управляющие величины) параметров, что позволяет установить дисперсионные уравнения. Мы ограничимся изучением динамических систем с дискретным комплекснозначным спектром, присущим диссипативным средам, свойства которых описываются несамосопряженными операторами. Обычно дисперсионные уравнения имеют очень сложный вид и нахождение их корней (спектра) представляет трудную задачу. Дисперсионные кривые (законы дисперсии) для регулярных точек спектра имеют классическую форму нормальной или аномальной дисперсии. Отметим, что дисперсионные закономерности можно получить любым другим способом, например, используя результаты экспериментов. Что же касается рассмотренной спектральной теории, то она может быть развита для таких активных (в том числе и биологических) сред, для которых справедливы исходные уравнения типа уравнений Максвелла в электродинамике.

Второй важной чертой эволюции биосред является взаимодействие ее частей: оно может быть линейным, когда части среды существуют фактически независимо и нелинейной, когда эта зависимость существенна. Если иметь в виду последнее, то НЭУ получаются как результат баланса дисперсии и нелинейности (при этом дисперсия играет деструктивную, а нелинейность - созидательную роль). При дальнейшем установлении НЭУ главное внимание уделяется процессам дисперсии, а нелинейность вводится обычным путем, предполагая ее слабой. Для классических законов дисперсии эволюция протекает плавно. Поэтому длительное и нормальное развитие самоорганизации биосистем происходило по законам классической дисперсии. Возникающие катастрофические ситуации и их влияние на дальнейший ход эволюции требовали специального исследования. Одной из возможных причин катастроф при самоорганизации биосистем является наличие критических точек спектра в дисперсионных уравнениях и, в частности, изолированной невырожденной морсовской критической точки (МКТ). Исследованию самоорганизации биосистем вблизи МКТ посвящена данная работа.

ТЕОРИЯ ДИФРАКЦИИ

Будем считать, что самоорганизующаяся биосистема представляет собой сплошную среду, в которой бесконечно большое число макромолекул бесконечно малых размеров образуют активный конгломерат. При таком подходе детальное описание пространственно-временных процессов внутри каждой макромолекулы отсутствует, а распространение взаимодействия может происходить от молекулы к молекуле, т.е. здесь внешняя среда, в которую погружен конгломерат, определяется поверхностями раздела. Наличие граничных условий приводит к принципиальным отличиям в изучении эволюционных процессов таких активных сред. Это касается и постановки краевой задачи, и методов их решения.

Рассмотрим более детально сначала линейные краевые задачи, обратив особое внимание на изучение дисперсионных закономерностей активной среды. С этой целью ограничимся пока стационарными процессами, и в качестве первого шага проанализируем рассеяние, возникающее при возбуждении среды стационарным источником. Это типичная задача дифракции. Ее решение позволит установить аналитические методы, которые затем могут быть перенесены при построении спектральной теории. Следует иметь в виду, что реальная самоорганизующаяся система построена из хиральных макромолекул, для которых характерным являются специфические поляризационные свойства среды, преобразующие скалярную функцию источника в циркулярно поляризованные колебания и волны. Однако, в данной работе мы ограничимся средами и границами раздела с чисто скалярными свойствами. Заметим, что хиральные биосреды наиболее приспособлены для структурных изменений. Эволюционные процессы будем описывать функцией $u(t, x, y, z)$, где u - концентрация молекул в среде; t - время; x, y, z - пространственные координаты. Для стационарного случая вводится безразмерная частота κ и искомая функция имеет вид $u(\kappa, x, y, z)$. Функцию источника обозначим через $u^0(\kappa, x, y, z)$. Предполагаем, что полная концентрация $\tilde{u} = u^0 + u$, а $\tilde{u}$ - удовлетворяет однородному уравнению Гельмгольца. Ограничимся граничными условиями $\tilde{u} = 0$ при $x, y, z \in S$, где S - поверхность раздела, условиями Мейкснера и условием Зоммерфельда на бесконечности. Для поставленной таким образом задачи решение существует и оно единственно.

Конструктивное строгое решение возможно только для определенного источника и граничных условий, которыми могут быть плоская волна концентрации и идеальные поверхности раздела. Разработанные [1] методы регуляризации позволяют получить вместо уравнений Гельмгольца функциональные уравнения второго рода $(I + H)x = b$, $x, b \in l_2$, допускающие аналитическое или с любой наперед заданной точностью решения (здесь I - единичный, H - компактные операторы в пространстве l_2 квадратично суммируемых последовательностей; x - безразмерная функция, с помощью которой определяется концентрация биомacroмолекул в среде; b - источник). Методом задачи Римана-

Гильберта теории аналитических функций или методом интегральных преобразований типа дробного интегрирования или дифференцирования удалось в явном виде построить оператор H . Полученные таким способом алгоритмы обладают уникальными свойствами, и, что самое важное, их можно применить к решению спектральных задач, построению теории МКТ и МКТ для самоорганизующихся биосред.

СПЕКТРАЛЬНАЯ ТЕОРИЯ ОТКРЫТЫХ СТРУКТУР

Для недиссипативных сред (в частности, закрытых) собственные частоты (и волновые векторы) - вещественны. Математически корректное "аналитическое продолжение" задачи дифракции в область комплексных значений частоты позволяет исследовать спектральные свойства диссипативных сред. Центральным при этом является вопрос замены условия на бесконечности Зоммерфельда условиями Рейхардта [1]. В этом случае краевая задача "аналитически продолжается" на поверхность Римана (функции $\ln \kappa$) комплексных значений κ с дискретным множеством $\{\kappa_n\}$ и единой точкой накопления на бесконечности ($\{\kappa_n\}$ - собственные значения однородной задачи, которым отвечают собственные функции ψ_n , причем κ_n являются полюсами аналитического продолжения резольвенты оператора исходной задачи дифракции [1]). Адекватным математическим аппаратом спектральной теории открытых структур является теория мероморфных оператор-функций; воспользоваться ее методами удалось с помощью процедур регуляризации.

Задача на собственные значения и собственные функции с условием Рейхардта сводится теперь к спектральной задаче для оператор-функции $I + H(\kappa)$, т.е. к определению множества таких чисел κ_n векторов ψ_n , при котором однородное уравнение имеет нетривиальное решение, т.е. $[I + H(\kappa)]\psi_n = 0$. Особенно важно, что спектральная задача для оператор-функции $I + H(\kappa)$ допускает эффективное аналитическое и численное решение. Традиционно используемые дисперсионные уравнения $\det[I + H(\kappa)] = 0$ в комплексной области изменения κ приобретают четкий математический смысл (также как и комплексные корни κ_n) и отвечающие им собственные функции: они ответственны за резонансное поведение полей при $\kappa \approx \text{Re} \kappa_n$ ($\text{Im} \kappa_n \ll 1$) (κ_n - лежат на "физическом" листе; имеют место резонансы для тех κ_n , которые лежат на других листах поверхности Римана). Эти результаты присущи как для координатных, так и некоординатных однородных краевых задач.

Задачи дифракции являются многопараметрическими: их решение зависит от геометрии рассеивателей, свойств материальной биосреды и др. Выделим один из них ω , исследуем свойства $\kappa_n = \kappa_n(\omega)$ и $\psi_n = \psi_n(\omega)$. Теперь ряд биофизических эффектов можно понять и обнаружить при анализе характеристического определителя задачи - аналитической функции двух комплексных переменных $F(\kappa, \omega) = \det[I + H(\kappa, \omega)]$ в области ее аналитичности. Анализ нормальных точек $F(\kappa, \omega)$ позволяет не только установить классические законы дисперсии, но в критических точках также и явления "взаимодействия" собственных колебаний при изменении ω , вскрыть ряд новых биофизических проявлений этого явления. Развитая спектральная теория является мощным инструментом анализа свойств сложных открытых самоорганизующихся биоструктур.

Решение спектральной задачи для простейшей активной среды, образованной идеально-отражающими цилиндрическими круговыми экранами с соосными им биообъектами имеет вид линейной суперпозиции рядов Фурье. При построении матричных оператор-функций необходимо удовлетворить всем условиям задачи, что приводит к связным парным сумматорным уравнениям с тригонометрическим ядром, которые методом задачи Римана-Гильберта сводятся к бесконечной системе алгебраических уравнений второго рода, которые эквивалентным образом можно преобразовать в операторные уравнения

$$[I + A(\kappa)]x = \theta, \quad (1)$$

где $A(\kappa)$ - оператор-функция исследуемой задачи, x - безразмерные фурье-компоненты функции концентрации u , θ - нулевой элемент.

Спектр открытой структуры совпадает с множеством характеристических чисел оператор-функции $I + A(\kappa)$ и является конечнократным, дискретным и расположен в области $\{\kappa : \text{Im } \kappa < 0\}$. Таким образом, для любых $R_1 > 0$ и $R_2 > 0$ в области $\{\kappa : \pi < \arg \kappa < 2\pi, R_1 < \kappa < R_2\}$ содержится лишь конечное число собственных частот спектральной задачи. Заметим, что при $\kappa \rightarrow 0$ - оператор $[I + A(\kappa)]^{-1}$ ограничен и собственные частоты отсутствуют. Кроме того, спектр задачи симметричен, т.е. если κ - спектральная точка, то и κ^* принадлежит спектру. Существенно, что рассматриваемая здесь биосреда обладает высокочастотными колебаниями, т.е. ее собственные частоты близко располагаются возле вещественной оси.

Спектральные характеристики исследуемой среды сведены к определению нетривиальных решений уравнения второго рода (1) для конечномерной функции $A(\kappa)$. Свойства $A(\kappa)$ (способность порождать матрицу Кох) позволяют строить алгоритм поиска спектра на приближенном решении характеристического уравнения

$$F(\kappa) \equiv \det[I + A(\kappa)] = 0. \quad (2)$$

Необходимо отметить, что в дисперсионном уравнении (2) уже заключены важные данные о свойствах исследуемой биосреды. Прежде всего это связано с линейными стационарными процессами, благодаря которым в фазовых переменных можно установить формирование потоков макромолекул при наличии границ среды и возможно связать их с генетическим кодом. И хотя (1), (2) описывает скалярное состояние, решение задачи для хиральной сплошной среды позволяет провести анализ преобразующего влияния хиральных биомолекул на превращение скалярной функции плотности в векторную. Кроме того, сами дисперсионные уравнения (2) в фазовых переменных дают картину процесса дисперсии в самоорганизующей системе, а также позволяют построить теорию критических точек этих уравнений и ввести в рассмотрение различные параметры, характеризующие свойства самоорганизующейся биосреды еще на уровне решения линейной стационарной спектральной задачи.

ТЕОРИЯ МОРСОВСКИХ КРИТИЧЕСКИХ ТОЧЕК ДИСПЕРСИОННЫХ УРАВНЕНИЙ

Если считать, что полюсы резольвенты задачи (1) простые, то появление вырождения собственной частоты означает выход на ситуацию, в которой одному собственному значению отвечает несколько независимых свободных колебаний поля в среде, что практически исключено при изменении параметров в физической области, но возможно в метрике комплексного пространства (двум собственным частотам κ_1, κ_2 соответствуют свободные колебания разных типов и одного класса симметрии). Свободные колебания начинают "взаимодействовать", что приводит к существенным локальным и глобальным изменениям их спектральных характеристик граничной сплошной биосреды. В частности, нарушается регулярный ход спектральных кривых $\kappa(\omega)$, на которых реализуются нулевые линии равного уровня функции $F(\kappa, \omega) \equiv \det[I + A(\kappa, \omega)]$ как отображения, $F : \mathbb{H} \times \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{C}$ ($\mathbb{C}$ - комплексная плоскость; $\mathbb{R}$ - пространство вещественных чисел изменения несектрального, в частности, параметра ω ; $\mathbb{H}$ - множество нетривиальных решений спектральной задачи). Это означает, что траектория $\kappa(\omega)$ проходит вблизи критической точки отображения $F(\kappa, \omega)$ [2]. Чтобы использовать результаты теории особенностей гладких отображений, продолжим оператор-функцию $A(\kappa, \omega)$ в область комплексных значений несектрального параметра ω и рассмотрим $F(\kappa, \omega)$ как отображение $\mathbb{C} \times \mathbb{C} \rightarrow \mathbb{C}$ с областью определения D , в которой $F(\kappa, \omega)$ является аналитической функцией двух комплексных переменных κ и ω .

Обозначим $\Omega(\omega) = \{\{\kappa, \omega\} \in D : F(\kappa, \omega) = 0\}$ аналитическое множество в D . Из теории функций многих комплексных переменных и теории особенностей гладких отображений известно, что вблизи $\Omega(\omega)$ существует изолированная особая (критическая) точка (κ_o, ω_o) и локальная система $\Omega(\omega)$ в ее окрестности определяется ее расположением относительно $\Omega(\omega)$ и типом. Вдали от (κ_o, ω_o) $\Omega(\omega)$ локально устроено как гиперплоскость. Взаимодействие свободных колебаний обнаруживает себя характерным законом дисперсии, т.е. особым поведением двух собственных частот

как функций $\kappa(\omega)$ при $\text{Im}\omega = 0$. Устройство $\Omega(\omega)$ как гиперплоскости не отвечает этому закону, поэтому считаем, что в зоне взаимодействия, продолженной на комплексные значения ω , находится критическая точка (κ_o, ω_o) отображения $F(\kappa, \omega)$, т.е. $F_\kappa = F_\omega = 0$ при $\{\kappa, \omega\} = \{\kappa_o, \omega_o\}$ (F_κ, F_ω - частные производные F). Если (κ_o, ω_o) изолирована в D и не вырождена (морсовская критическая точка - МКТ), т.е. $F_{\kappa\kappa}F_{\omega\omega} - F_{\kappa\omega}^2 \neq 0$, то уравнение $F(\kappa, \omega) = 0$ вблизи (κ_o, ω_o) с точностью до кубически малых членов $(\kappa - \kappa_o)^i (\omega - \omega_o)^m$, $i + m \geq 3$ можно записать в виде

$$\tilde{\kappa}^2 + \tilde{\omega}^2 + \delta = 0, \quad (3)$$

где согласно теореме Морса $\tilde{\kappa} = \varphi_1(\kappa, \omega)$, $\tilde{\omega} = \varphi_2(\kappa, \omega)$, а $\delta = F(\kappa_o, \omega_o) \neq 0$. При $\delta = 0$, $\tilde{\kappa} = \pm i \tilde{\omega}$, соответствующий корень двукратно вырожден, свободные колебания среды не взаимодействуют. Если $\delta \neq 0$, то (3) задает поведение дисперсионных кривых, характерное для взаимодействующих колебаний. Таким образом, $\delta = F(\kappa_o, \omega_o)$ определяет степень взаимного влияния колебаний при сближении их собственных частот в комплексном пространстве.

Теперь решение (3) достаточно рассмотреть как зависимости $\text{Re}\tilde{\kappa}(\tilde{\omega})$ и $\text{Im}\tilde{\kappa}(\tilde{\omega})$, когда $\tilde{\omega}$ заменяется вдоль прямых $\text{Re}\tilde{\omega} = \xi$ и $\text{Im}\tilde{\omega} = \alpha\xi + \beta$ (ξ - действительная переменная; α, β - вещественные параметры). Получаемые из (3) четырехпараметрические семейства кривых содержат при определенных α, β, δ типичные для взаимодействующих свободных колебаний образцы дисперсионных кривых.

Итак, существование изолированных МКТ отображения $F(\kappa, \omega)$ приводит к появлению вблизи $\{\kappa_o, \omega_o\}$ двух решений спектральной задачи (1), (2). Характер поведения этих решений при вариации ω определяется (3) и зависит от α, β, δ : при $\delta = 0, \beta = 0$ траектория ω проходит через МКТ, корень (κ_o, ω_o) двукратно вырожден; при $\delta = 0, \beta \neq 0$ траектория не проходит через МКТ, малое "шевеление" β может привести к вырождению собственной частоты; если $\delta \neq 0$ - вырождения нет.

Аппарат теории особенностей гладких отображений, использованный для аналитического описания процессов взаимодействия свободных колебаний, может быть применен при анализе сложного поведения возбуждения открытых структур, изучения эволюционных процессов и др. Эффективность такого подхода в том, что он позволяет заранее установить канонические формы поведения характеристик на тех локальных участках, где оно не может быть однозначно спрогнозировано на основе предшествующих данных.

АНАЛИЗ КОЛЕБАТЕЛЬНО-ВОЛНОВЫХ ПРОЦЕССОВ ВБЛИЗИ МОРСОВСКИХ КРИТИЧЕСКИХ ТОЧЕК

Уникальной особенностью МКТ дисперсионных уравнений линейной спектральной задачи является аналитическая природа, что позволяет записать эти уравнения относительно спектральных и неспектральных параметров в виде равенства нулю квадратичной формы (3), представляя тем самым специфические дисперсионные закономерности линейной стационарной биосистемы вблизи МКТ, которые существенно отличаются от обычного нормального или аномального законов дисперсии. Вблизи МКТ происходит резкий переход от нормальной к аномальной (и наоборот) дисперсии ("схлопывание" дисперсии), а в самой МКТ возникает бездисперсионная ситуация ("окно" дисперсии). Существенно, что дисперсионное уравнение (3) позволяет простым способом перейти к описанию линейных и, что особенно важно, нелинейных нестационарных (эволюционных) процессов, а также определить влияние биопараметров среды на дисперсию вблизи МКТ.

Таким образом, спектральные точки являются регулярными (им соответствуют линейные моностабильные колебания) или критическими - МКТ - (в МКТ образуется нестабильное гибридное колебание). Вблизи МКТ колебания взаимодействуют, и, согласно (3), существует три колебания, два из которых устойчивы и одно - неустойчиво. Одно из устойчивых колебаний - высокочастотное; второе - низкочастотное. Природа этих трех колебаний определяется чисто дисперсионными свойствами колебательной биосреды. В нелинейных системах нелинейный бистабильный элемент (триггер) возникает при нелинейном взаимодействии частей среды. Триггер обладает двумя устойчивыми состояниями, в каждом из которых он может находиться неограниченно долго, и только внешние воздействия могут переводить его из одного состояния в другое. Аналогично ведут себя два устойчивых

(высокодобротное и низкодобротное) колебания вблизи МКТ и переход из одного в другое осуществляется внешним воздействием: это бистабильное состояние – дисперсионное явление в линейной стационарной колебательной биосистеме.

Существенно, что наличие бистабильного состояния биосистемы вблизи МКТ позволяет на уровне линейного спектрального анализа ввести необходимые для дальнейшего изучения эволюционных процессов биопараметры, характеризующие свойства самоорганизующихся структур. С другой стороны, если нам удалось построить дисперсионные кривые вблизи МКТ, исходя, например, из естественных данных или эксперимента, то мы можем судить о свойствах тех биопараметров, которые привели к этим кривым (“обратная задача”).

Для чисто временной эволюции введение в рассмотрение биопараметров наиболее предпочтительно для случая, когда дисперсионное уравнение (3) разрешено относительно $\hat{K}$ и представлено в виде

$$\hat{K}_{1,2} = \pm i \frac{1}{2\sqrt{2\delta}} (\hat{\omega} + \delta), \quad (4)$$

где $\hat{K} = \lambda_1^{-1/2} \tilde{K}$; $\hat{\omega} = \lambda_2^{-1/2} \tilde{\omega}$; $\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left\{ a + b \pm \left[(a+b)^2 - 4c \right]^{1/2} \right\}$; $a = F_{\kappa\kappa}$; $b = F_{\omega\omega}$; $c = \lambda_1 \delta - \lambda_2^2$.

Теперь спектральный параметр $\hat{K}_{1,2}$ можно сопоставить с той индивидуальной генетической информацией, которой располагает исследуемая граничная самоорганизующая сплошная биосреда. Неспектральный параметр $\hat{\omega}$ связан с внутренней селективной ценностью $AQ - D$, где AQ и D – представляет метаболизм спонтанных образований и разложений Du – молекулярного вида (u – концентрация биомолекул). При этом $AQ - D - \bar{E} = \hat{\omega}$ ($\bar{E}$ – средняя избыточная продуктивность) и в (4) первый член определяет основные свойства дисперсии. Что же касается величины $\delta \equiv F(\hat{K}_0, \hat{\omega}_0) \neq 0$, то она задает темп мутаций, и $\delta \ll AQ$, т.е. скорость репродукции AQ обычно велика по сравнению со скоростью мутаций.

Введенные в (4) биопараметры среды, позволяют на уровне решения линейной стационарной спектральной задачи без дополнительных модельных построений рассмотреть дисперсионные закономерности вблизи МКТ. Заметим, что полученные данные отличаются от известных феноменологических подходов [3, 4] строгой в математическом отношении постановкой задачи и ее решения. Кроме того, ясно, что классическая дисперсия самоорганизующихся сред описывает поведение биосистемы, характерное для дарвиновской эволюции, когда сам нестационарный процесс протекает сравнительно плавно и за очень длительный промежуток времени. Оказывается, согласно (3), (4) могут возникать в дисперсии среды такие ситуации, когда дисперсия вблизи МКТ изменяется за сравнительно короткое время очень резко (катастрофически). Эту проблему мы и будем иметь в виду при переходе от дисперсии к эволюции.

В уравнениях (3), (4) неспектральным параметром является величина, связанная со свойствами биомолекул самоорганизующейся непрерывной среды. В таком же качестве может выступать, кроме $\hat{\omega}$, также и проекция волнового вектора γ_1 на выбранную ось. Тогда самое общее дисперсионное уравнение имеет вид $F(\kappa, \gamma, \omega) = 0$, а вблизи МКТ оно может быть представлено следующим образом

$$\lambda_1 \tilde{K}^2 + \lambda_2 \tilde{\gamma}_1^2 + \lambda_3 \tilde{\omega}^2 + \delta = 0, \quad (5)$$

где $\tilde{K} = \kappa - \kappa_0$, $\tilde{\gamma}_1 = \gamma - \gamma_0$, $\tilde{\omega} = \omega - \omega_0$, $\delta = F(\kappa_0, \gamma_{10}, \omega_0) \neq 0$; $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \in C$ – корни кубического уравнения; $(\kappa_0, \gamma_{10}, \omega_0)$ – МКТ, определяемая из системы уравнений $F_{\kappa} = F_{\gamma_1} = F_{\omega} = 0$ и условия неравенства нулю детерминанта матрицы Гессе.

В пространственном случае волновой вектор будет $\vec{\gamma}(\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3)$ и при наличии управляющего параметра ω дисперсионное уравнение можно записать в виде $F(\kappa, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \omega) = 0$. Функция F определена в пространстве C^5 , т.е. является функцией пяти комплексных переменных $\kappa, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \omega$. Вблизи МКТ $(\kappa, \gamma_{10}, \gamma_{20}, \gamma_{30}, \omega_0)$ отображения $F: C^5 \rightarrow C$ имеет вид

$$\{(\kappa_0, \gamma_{10}, \gamma_{20}, \gamma_{30}, \omega_0)\} = \{(\kappa, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \omega): F_{\kappa} = F_{\gamma_{10}} = F_{\gamma_2} = F_{\gamma_3} = F_{\omega} = 0, \det J_{\Gamma} \neq 0\}, \quad (6)$$

где J_{Γ} - матрица Гессе. Гиперповерхность $\Omega(\kappa, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \omega) = \{(\kappa, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \omega) : F(\kappa, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3) = 0\}$ вблизи МКТ с точностью до кубических малых членов представляется в виде канонической квадратичной формы, а дисперсионное уравнение запишется в виде

$$\lambda_1 \tilde{\kappa}^2 + \lambda_2 \tilde{\gamma}_1^2 + \lambda_3 \tilde{\gamma}_2^2 + \lambda_4 \tilde{\gamma}_3^2 + \lambda_5 \tilde{\omega}^2 + \delta = 0, \quad (7)$$

где $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5 \in \mathbb{C}$ - корни характеристического многочлена пятой степени.

Дисперсионные уравнения (5), (7) отличаются от (3), (4) тем, что с их помощью можно исследовать пространственные фазовые характеристики сплошной биосреды, и, наряду с колебательными, изучать также волновые процессы. Последнее позволит выяснить влияние границ среды на процессы самоорганизации биомакромолекул, и, в какой-то степени, дать ответ на вопрос: где же все-таки были наиболее благоприятными условия для возникновения жизни – в океане, море или луже и действительно ли во всех случаях требовалась столь продолжительная во времени эволюция, как это вытекает из дарвиновской теории эволюции.

НЕЛИНЕЙНЫЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ УРАВНЕНИЯ ВБЛИЗИ МОРСОВСКИХ КРИТИЧЕСКИХ ТОЧЕК СПЕКТРА

Существующие методы исследования динамических процессов базируются на установлении баланса нелинейности и дисперсии в системе: решение проблемы ограничивается случаем, когда законы дисперсии определяются только регулярными точками спектра, т.е. дисперсия является нормальной или аномальной. Этот подход существенно дополняется учетом дисперсии вблизи МКТ; для искомой величины можно получить НЭУ, а также ввести обобщенные параметры, исходя из анализа линейной спектральной задачи.

Рассмотрим сначала чисто временную эволюцию. Для получения сначала линейных, а затем и НЭУ воспользуемся дисперсионным уравнением (4), имея в виду, что $\hat{K}$ при этом можно заменить оператором дифференцирования $i \frac{d}{d\tau}$, где безразмерное τ линейно зависит от истинного времени t .

Теперь вместо (4) имеем

$$\frac{d u_{1,2}}{d\tau} = \mp i (\hat{\omega} + \delta) u_{1,2} + \mu, \quad (8)$$

где $u = u(\tau)$ - функция концентрации биомакромолекул, а $\mu = \text{const}$, введенная феноменологическим путем константа, характеризующая внешнее воздействие на среду.

Особенностью (8) является их локальный характер, т.е. протекание эволюции вблизи МКТ за сравнительно короткий промежуток времени, по сравнению с эволюционным процессом в целом. Поскольку при этом эволюция является катастрофической, то следует ожидать таких временных качественных изменений среды, которые требуют соответствующего описания. Если еще и иметь в виду нелинейность (8) (за счет того, что $\hat{\omega} = \hat{\omega}(u, t)$), то эволюционные процессы вблизи МКТ станут причиной возникновения уникальной ситуации, когда самоорганизация биомакромолекул происходит за очень короткий промежуток времени, а также предвестники жизни как гиперциклы [4] являются результатом этих катастрофических изменений среды (это, в какой-то мере, напоминает эволюцию оледенений в Северном полушарии Земли; оказывается этот процесс может протекать не только сотни и тысячи лет, а в течение 3 - 5 лет [5]).

Запишем теперь пространственно-временные эволюционные уравнения, сначала для одномерного, а затем трехмерного случаев. Для этого воспользуемся (5), заменяя $\hat{K} = i \frac{\partial}{\partial \tau}$ и $\hat{\gamma}_1 = -i \frac{\partial}{\partial \xi}$, где τ и

ξ - безразмерное время и пространственная координата, связанные с истинным временем t и координатой x линейными соотношениями $\tau = \alpha_1 x + \beta_1 t$; $\xi = \alpha_2 x + \beta_2 t$, где $\alpha_{1,2}$, $\beta_{1,2}$ определяются для каждого случая отдельно.

Теперь мы имеем эволюционное уравнение в частных производных

$$\lambda_1 \frac{\partial^2 u}{\partial \xi^2} - \lambda_2 \frac{\partial^2 u}{\partial \tau^2} = c u \quad (9)$$

Это линейное уравнение Клейна-Гордона, где $c = \omega + \lambda_1 \delta - \lambda_2^2$. При $\lambda_1 = \lambda_1(u)$, $\lambda_2 = \lambda_2(u)$ и $c = c(u)$ имеем НЭУ вблизи МКТ.

Используя (7), получим многомерное НЭУ, которое вблизи МКТ можно записать в виде

$$D(u) - s(|u|) \frac{\partial^2 u}{\partial \tau^2} = \varphi(|u|)u, \quad (10)$$

где D - нелинейный эллиптический дифференциальный оператор с коэффициентами, зависящими от $|u|$. Функции s и φ будем считать вещественнозначными, причем s должна принимать лишь положительные значения, т.е. полученное уравнение гиперболическое. Для упрощения будем далее рассматривать достаточно универсальный частный случай этого уравнения, сохраняющий его основные особенности,

$$\Delta u - s(|u|^2) \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = \varphi(|u|^2)u, \quad (11)$$

где Δ - оператор Лапласа. Это уравнение обобщает одновременно нелинейное волновое уравнение и уравнение Клейна-Гордона.

Существенно важно связать коэффициенты уравнений (9) - (11) со свойствами самоорганизующейся биосреды, т.е. характеристиками макромолекул. Здесь мы этим заниматься не будем, а только покажем, какова роль границ среды для одно-, двух- и трехмерных задач.

РЕШЕНИЕ НЕЛИНЕЙНЫХ ЭВОЛЮЦИОННЫХ УРАВНЕНИЙ

При определенных условиях решения (9) - (11) можно получить в замкнутой форме. Продемонстрируем это на примере одно-, двух и трехмерной эволюции.

А) Одномерная эволюция. Для решения этой задачи воспользуемся уравнением (9), предполагая, что λ_1 , λ_2 и c - вещественно аналитические функции $|u|$, определенные на полуоси R^1 , разложения в ряд Тейлора которых в окрестности начала координат имеют вид

$$\lambda_1(|u|) = \lambda_{10} + \lambda_{11}|u|^2 + \dots; \quad \lambda_2(|u|) = \lambda_{20} + \lambda_{21}|u|^2 + \dots; \quad c(|u|) = c_0 + c_1|u|^2 + \dots \quad (12)$$

Равенство нулю коэффициентов при первой степени вытекает из аналитичности $\lambda_1(|u|)$, $\lambda_2(|u|)$ и $c(|u|)$; кроме того $\lambda_{10}^2 + \lambda_{20}^2 \neq 0$.

Ограничимся автомодельным решением (9) при выполнении (12), т.е. считаем, что $u(\xi, \tau) = u(\eta)$, $\eta = \xi - v\tau$, где $v = \text{const}$. В результате вместо (9) получаем

$$\frac{d^2 u}{d\eta^2} = v(|u|)u; \quad v(|u|) = \frac{c(|u|)}{\lambda_1(|u|) - v^2 \lambda_2(|u|)}. \quad (13)$$

Ищем решение (13) в виде $u(\eta) = a(\eta) \exp(is(\eta))$ и для $a(\eta)$, $s(\eta)$ получаем связанную систему двух нелинейных вещественных уравнений

$$\begin{cases} 2 \frac{ds}{d\eta} \frac{da}{d\eta} + a \frac{d^2 s}{d\eta^2} = 0 \\ \frac{d^2 a}{d\eta^2} - a \left(\frac{ds}{d\eta} \right)^2 = av(a) \end{cases} \quad (14)$$

Решение этой системы известно [6] и записывается следующим образом:

$$\begin{aligned} \eta &= \pm \int_{a_0}^a \left[M - \frac{N^2}{a^2} + 2 \int_{a_0}^a av(a) da \right]^{-1/2} da; \\ s &= s_0 \pm \int_{a_0}^a \left[M - \frac{N^2}{a^2} + 2 \int_{a_0}^a av(a) da \right]^{-1/2} da, \end{aligned} \quad (15)$$

где $N = a^2(0)s'(0)$, $M = [a'(0)]^2 + [s'(0)]^2 a^2(0)$; $s_0 = (0)$. Заметим, что если $a(0) = 0$, то либо $a(\eta) \equiv 0$, либо $s(\eta) \equiv s_0$.

Предполагая, что $|u|$ мало, можно считать, что

$$v(|u|) = \alpha + 2\beta|u|^2, \quad (16)$$

где

$$\alpha = \frac{c_0}{\lambda_{10} - v^2 \lambda_{20}}; \quad \beta = \frac{c_1 \lambda_{10} - c_0 \lambda_{11} (c_0 \lambda_{21} - c_1 \lambda_{20}) v^2}{2(\lambda_{10} - v^2 \lambda_{20})}. \quad (17)$$

При этом v выбираем так, чтобы $\lambda_{10} - v^2 \lambda_{20} \neq 0$.

Рассматривая только ограниченные решения (13) при выполнении (14) - (17) и определенных α , β , a_0 , a'_0 , s_0 и s'_0 , мы получим вблизи МКТ: кинк, солитон, антисолитон, монохроматическую или эллиптическую волну.

Таким образом, вблизи МКТ нелинейные эволюционные процессы, описываемые НЭУ (9), указывают на многообразие эффектов, среди которых имеются такие, которые будут наиболее благоприятствовать самоорганизации макромолекул сплошной биосреды.

Б) Двухмерная эволюция. Исследование этого эволюционного процесса проведем с помощью НЭУ (11) для случая плоской задачи, ограничиваясь поверхностными волнами. Пусть собственная волна, распространяется на плоскости xOy , разделенной осью Oy на две среды: линейную ($x > 0$), в которой волна плотности имеет вид $u = E_0 \exp\{-k_x x + i(k_y y - \omega t)\}$, где E_0 , k_x , k_y , ω - действительные величины, $E_0 > 0$, $k_x > 0$ (т.е. волна затухает при $x \rightarrow \infty$), и нелинейную ($x < 0$), в которой волна эволюционирует в соответствии с уравнением (9). На границе раздела сред выполняются граничные условия

$$\frac{\partial u}{\partial x}(-0, y) = \alpha \frac{\partial U}{\partial x}(+0, y); \quad u(-0, y) = \beta(+0, y), \quad (18)$$

где α , β - положительные константы (в частности, условие $\alpha = \beta = 1$ означает непрерывность поля волны и его нормальной производной на границе раздела сред). Нас интересует, при каких условиях волна распространяется в нелинейной биосреде со спаданием при $x \rightarrow -\infty$, т.е. $\lim_{x \rightarrow -\infty} u(x, y) = 0$.

Исходная волна удовлетворяет линейному волновому уравнению, а в нелинейной среде ее можно записать в виде $u(x, y) = f(x) \exp\{i(k_y y - \omega t)\}$, где для $f(x)$ и учтенных граничных условий получаем задачу Коши

$$f''(x) = f(x) \varphi_1(f^2(x)), \quad f(0) = \beta E_0, \quad f'_0 = -\alpha k_0 E_0, \quad (19)$$

где $\varphi_1(\xi) = k_y^2 - \omega^2 s(\xi) + \varphi(\xi)$.

Анализ задачи Коши (19) показал, что скорость спадания поверхностной плотности среды $u(x, y)$ (в физике такое нелинейное образование называется поляритон) вблизи плоской поверхности раздела асимптотически может быть как экспоненциальной (это характерно для классической дисперсии), так и степенной (дисперсия вблизи МКТ).

В качестве степенного спадания $u(x, y)$ можно рассмотреть случай, когда $\varphi(|u|^2) = 2|u|^2$; $s(|u|^2) = 3|u|^4 + \frac{1}{4} + \frac{1}{c^2}$ (c - скорость распространения). Пусть также $\alpha = \beta = 1$; $\omega = 1$; $k_x = \frac{1}{2}$;

$E_0 = \frac{1}{\sqrt{2}}$. Тогда $\varphi_1(\xi) = 2\xi - 3\xi^2$, т.е. $\varphi(0) = 0$, и решение задачи (19) имеет вид

$f(x) = (x^2 + 2x + 2)^{-1/2}$, т.е. при указанных условиях характер спадания плотности среды будет степенным.

Следовательно, в окрестности МКТ для двухмерных самоорганизующихся биосред возможны интенсивные кратковременные резкие изменения концентрации макромолекул в узком плоском слое раздела среды.

В) Трехмерная эволюция. Введем пространственные координаты x, y, z и будем считать, что верхнее полупространство ($z > 0$) - линейная, нижнее ($z < 0$) - нелинейная среды (плоскость xOy - граница раздела сред). Пусть на плоскость xOy из верхнего полупространства падает под углом θ плоская волна концентрации $u_0 = A \exp[i(k_x x + k_z z - \omega t)]$ (считаем, что u_0 не зависит от y ; $k_x = \omega \sin \theta$; $k_z = \omega \cos \theta$; ω - частота; u_0 - удовлетворяет линейному волновому уравнению).

Отраженная волна при $z > 0$ приобретает вид

$$u_+ = A[\exp i(k_x x + k_z z - \omega t) + R \exp i(k_x x - k_z z - \omega t)], \quad (20)$$

где R - коэффициент отражения.

Считаем, что при $z < 0$ преломленная волна u_- - эволюционирует согласно (11), причем на границе раздела сред заданы краевые условия

$$\left. \frac{\partial u_-}{\partial z} \right|_{z=0} = \alpha \left. \frac{\partial u_+}{\partial z} \right|_{z=0}; \quad u_-|_{z=0} = \beta u_+|_{z=0}, \quad (21)$$

где $\alpha, \beta = \text{const}$ и $\alpha, \beta > 0$.

Краевая задача (11), (12) не является однозначно разрешенной, т.е. возможны различные реализации преломленной волны. Мы должны выяснить условия, при которых преломленная волна в нелинейной среде может быть плоской, а также вычислить R . Предполагаем, что амплитуда преломленной волны имеет такой же вид как и в случае б) и для $f(z)$ получим уравнение (11), из которого находим, что

$$R = \frac{\rho_0}{\beta A} - 1, \quad (22)$$

где ρ_0 корень уравнения

$$\beta^2 \rho_0^2 (\omega^2 s(\rho_0^2) - \varphi(\rho_0^2) - \omega^2 \sin^2 \theta) = (2\beta A - \rho_0)^2 \alpha^2 \omega^2 \cos^2 \theta. \quad (23)$$

Так как, очевидно, $|R| \leq 1$, для существования плоской преломленной волны, должен существовать хотя бы один корень (23) на отрезке $[0; 2\beta A]$. Если такой корень единственный, то существует единственная реализация плоской волны в нелинейной биосреде.

Итак, в случае трехмерной эволюции в предложенной ситуации коэффициент отражения R может определить процесс самоорганизации макромолекул при воздействии на них плоской волной, отраженной от плоской границы раздела двух сред.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Построенная теория отличается от известных тем, что исследование пространственно-временной самоорганизации нелинейной биосреды макромолекул производится с учетом граничных условий строгими математически обоснованными методами, для чего сам эволюционный процесс потребовалось представить как цепочку взаимосвязанных стационарных линейных явлений, включающих в себя дифракцию волн, пространственно-временную дисперсию среды в регулярных и критических точках спектра. Аналитическая природа МКТ дисперсионных уравнений позволяет еще на линейном уровне феноменологически ввести в рассмотрение характеристики биомacroмолекул, установить правила отбора и, главное, для нелинейной среды построить НЭУ. Законы дисперсии вблизи МКТ и соответствующие им НЭУ описывают локальные дисперсионные и нелинейные эволюционные процессы. Их отличительной чертой является резкое (катастрофическое) изменение дисперсии при малых изменениях неспектральных параметров, чему в конфигурационном пространстве отвечают сильное изменение эволюции среды за малый промежуток времени.

Таким образом, наряду с дарвиновской эволюцией, когда за очень длительное время плавное изменение самоорганизации среды приводит к ее структурным перестройкам, вблизи МКТ имеет место резкие изменения в пространственной самоорганизации биомacroмолекул за короткое время. Роль граничных условий при этом является определяющей. Дарвиновская эволюция доказала, что неотъемлемым атрибутом жизни есть информация. Благодаря тому, что в процессе такой эволюции биосреды в состоянии продуцировать, перерабатывать, хранить и транспортировать информацию, создав тем самым генетический код, на нашей планете Земля возникла жизнь. Однако, по-видимому, наряду с дарвиновским эволюционным процессом в создании генетического кода могла возникнуть ситуация, когда определенная его часть появилась за сравнительно малые промежутки времени при эволюционных процессах вблизи МКТ.

О возможном сценарии пространственно-временной эволюции...

Еще в большей степени пространственные свойства эволюции проявляются вблизи МКТ. Здесь за короткое время в биосреде могут произойти структурные изменения, что связано со строением самих биомакромолекул. Если иметь в виду, что макромолекулы имеют киральную природу, то вторым важным условием существования жизни (наряду с генетическим кодом) является сравнительно быстрые эволюционные преобразования биомакромолекул для среды с дисперсией вблизи МКТ.

Теперь на вопрос о том, что такое жизнь, можно было бы ответить: это такое тесное переплетение генетического кода со структурными преобразованиями биомакромолекул вблизи МКТ, которое возможно при соответствующем скейлинге (временные и пространственные масштабы) в самоорганизующихся биомакромолёкулах сплошной биосреды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шестопапов В.П. Спектральная теория и возбуждение открытых структур. Киев: Наук.думка, 1987. 288с.
2. Шестопапов В.П. Морсовские критические точки дисперсионных уравнений. Киев: Наук.думка, 1992, 238с.
3. Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. М.: Мир, 1973, 216с.
4. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл - принципы самоорганизации макромолекул. М.: Мир, 1982. 270с.
5. Карнаухов В.Н., Карнаухов А.В. // Биофизика, 1999, т.44., N1, с.147-154.
6. Басс Ф.Г., Вербицкий В.И., Шестопапов В.П. // Докл.АН России, 1994. Т. 338, N4, с.468-473.

УДК 616-006:576.385.5:51-76

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

РОЛЬ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ В ЯВЛЕНИИ ДОМИНИРОВАНИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КЛЕТОК В ОПУХОЛИ

А.В.Колобов¹, А.А.Полежаев¹, Г.И.Соляник²

¹Физический институт им.П.Н.Лебедева АН России,

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины, Киев, Васильковская 45;
gis@onconet.kiev.ua

Поступила в редакцию 2 ноября 1999 г.

Явление доминирования метастатически активных клеток в опухоли исследовалось с помощью математической модели кинетики роста двух клеточных популяций, одна из которых состоит из быстроделющихся и неподвижных клеток, а другая - из медленноделющихся и подвижных. Продемонстрировано, что клеточная подвижность может обеспечить превосходство в росте медленноделющейся клеточной популяции. Показано, что явление доминирования медленноделющейся популяции в этом случае пороговым образом зависит от значения коэффициента подвижности ее клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: математическая модель, клеточная подвижность, гетерогенная опухоль, метастазирование.

Известно, что метастазирование злокачественных опухолей включает в себя комплекс последовательных событий, при котором отдельные опухолевые клетки отрываются от первичной опухоли и колонизируют ближайшие к опухоли и отдаленные от нее органы и ткани [1]. Важным свойством этого процесса является то, что метастазы возникают вследствие нескольких последовательных селективных этапов прогрессии опухоли, причем одним из первых и необходимых этапов является доминирование небольшого количества метастатических клеток в опухоли [2]. Обсуждению биологического значения явления доминирования метастатических клеток для биологии опухолей посвящено много работ [2,3]. Несмотря на огромное количество экспериментальных и теоретических исследований, касающихся преимуществ роста метастатических клеток, вопрос о ключевых механизмах, обуславливающих их доминирование в опухоли является все еще открытым.

С нашей точки зрения способность метастатических клеток доминировать в опухоли связана с их высокой (по сравнению с неметастатическими клетками) подвижностью [4,5]. При ограниченном уровне питательных веществ и их неоднородном распределении в опухоли подвижные клетки могут покидать зоны с неблагоприятными условиями и проникать (инвазировать) в другие области опухоли (или соседние ткани), в которых высокий уровень питательных веществ создает для них благоприятные условия роста и доминирования над субпопуляциями неподвижных клеток.

В этой связи цель предлагаемого исследования - проверить гипотезу, в рамках которой подвижность медленноделющихся клеток может обеспечить их доминирование над неподвижными, но быстроделющимися клетками при условии конкуренции клеток за общий субстрат. Проверка этой гипотезы осуществлялась при помощи математической модели кинетики роста гетерогенной опухоли с учетом клеточной подвижности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основе модели были положены следующие биологические и математические предположения.

- Опухоль растет как сферически симметричная колония опухолевых клеток.
- Микроокружение опухоли и опухолевых клеток не препятствует их росту и перемещению; это предположение основывается на хорошо известной высокой активности протеолитического каскада в метастатических клетках, обеспечивающего синтез достаточного количества протеолитических ферментов, необходимого для разрушения соседних клеток и тканей [6].
- Опухоль состоит из двух клеточных субпопуляций, отличающихся между собой кинетическими характеристиками роста; в свою очередь каждая из клеточных субпопуляций включает пул делющихся (X_i) и покоящихся клеток (Y_i); таким образом опухоль обладают и клеточной и пролиферативной гетерогенностью.
- При некоторых условиях клетки могут переходить из состояния деления в состояние покоя; скорость такого перехода зависит от внутриклеточного уровня критического питательного субстрата.

- Модель учитывает простейшую форму клеточной подвижности - диффузионную, которая, как предполагается, присуща только делящимся клеткам.
- Клеточные взаимодействия постулируются в виде конкуренции за критический питательный субстрат.
- Пространственное распределение субстрата определяется балансом между диффузией субстрата внутрь опухоли и потреблением его клетками.

В рамках сделанных предположений кинетика роста гетерогенной опухоли может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений для плотностей клеток:

$$\begin{cases} X_1' = b_1 X_1 - P_1(S) \cdot X_1 + D_1 \Delta X_1, \\ Y_1' = P_1(S) \cdot X_1, \\ X_2' = b_2 X_2 - P_2(S) \cdot X_2 + D_2 \Delta X_2 \\ Y_2' = P_2(S) \cdot X_2 \end{cases} \quad (1)$$

где b_i - скорость деления, а D_i - коэффициенты диффузии соответствующих клеточных субпопуляций. $P_i(S)$ - представляют функции перехода клеток из состояния деления в состояние покоя, зависящие от уровня субстрата S . В простейшем случае эта функция может быть записана в виде:

$$P_i(S) = b_i \cdot K_i \exp(-S / S_i) \quad (2)$$

Мы предположили, что параметры k_i и S_i в выражении (2) одинаковые для обеих субпопуляций: $k_1 = k_2 = k$ $S_1 = S_2 = S_0$.

Распределение субстрата может быть описано следующим уравнением:

$$S' = Q + D_S \Delta S \quad (3)$$

где D_S - коэффициент диффузии для субстрата, а Q - функция, отражающая скорость потребления субстрата опухолевыми клетками. Результаты экспериментальных исследований дают основание предположить, что основным критическим субстратом является кислород [7]. При этом скорость потребления кислорода одной клеткой является функцией концентрации кислорода типа Михаэлиса-Ментена. Поэтому мы предположили следующий вид функции Q :

$$Q = -q_s \cdot \frac{S}{S + S^*} \cdot (X_1 + k_{eff} \cdot X_2) \quad (4)$$

Мы пренебрегли потреблением кислорода покоящимися клетками обеих субпопуляций, которое по данным экспериментальных исследований более чем на порядок меньше, чем потребление делящимися клетками.

Уравнения (1) и (3) с функциями (2) и (4) решались в единице объема сферы с радиусом R при следующих граничных условиях:

$$\begin{aligned} (X_1')_r(0) &= (X_1')_r(R) = (X_2')_r(0) = (X_2')_r(R) = S'_r(0) = 0; \\ S(R) &= S_{ext} \end{aligned} \quad (5)$$

При численном интегрировании системы (3.11) принимался во внимание тот факт, что, в отличие от химических реагентов, клетки характеризуются конечным (и несжимаемым) объемом. Т.е. существует предельная плотность клеточной упаковки в единице объема опухоли:

$$\sum (X_i \cdot V_{xi} + Y_i \cdot V_{yi}) \leq 1 \quad (6)$$

где V_i - средний объем клетки соответствующей субпопуляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки гипотезы с помощью построенной математической модели мы исследовали динамику изменения клеточного состава гетерогенной опухоли, состоящей из двух субпопуляций: быстроделющейся с неподвижными клетками и медленноделющейся, но с клетками, способными двигаться. Если первая обладает выраженным преимуществом роста по сравнению со второй за счет клеточного деления, то предполагается, что вторая может перерасти первую за счет подвижности ее

клеток. Такая структура гетерогенной опухоли дает возможность проверить основную выдвигаемую нами гипотезу: именно клеточная подвижность и является той собственно клеточной характеристикой, которая может обеспечить доминирование метастатических клеток в опухоли над их неметастатическими контрпартнерами.

Таким образом в процессе исследования мы предположили, что скорость деления подвижной субпопуляции в двое меньше, чем скорость деления неподвижной: $2b_1=b_2$; $D_2=0$; $D_1 \neq 0$. Интегрирование модели проводилось при значениях параметров, представленных в таблице 1.

Таблица 1. Параметры математической модели кинетики роста двух клеточных субпопуляций с учетом подвижности.

Постоянные			
$q_s = 1.7 \cdot 10^{-17}$ $D_s = 3.0 \cdot 10^{-5}$ $S^* = 4.2 \cdot 10^{-6}$ $S_{ext} = 2.8 \cdot 10^{-4}$	моль/(клетку·сек) см ² /сек моль моль	Значение констант, взятые из литературных источников	
$D_c = 0$ $B_a = 0.03$ $B_c = 0.06$ $V_a = V_c = 10^{-9}$ $R_{max} = 1$ $k_{eff} = 2$	см ² /сек h ⁻¹ h ⁻¹ см ⁻³ см		Значение констант, предполагаемые для опухолевых клеток
Параметры, варьируемые при моделировании			
$D_a = 10^{-10}; 10^{-9}$ $S_0 = 5.6 \cdot 10^{-5}; 2.2 \cdot 10^{-4}$ $k = 1.2; 1.5$	см ² /сек моль		

Проведенное исследование показало, что динамика изменения композиционного состава опухоли значительно зависит от значения коэффициента диффузии подвижной субпопуляции, демонстрируя способность этой субпопуляции доминировать в опухоли, если коэффициент диффузии ее клеток превышает некоторое пороговое значение. Важно отметить, что при подвижности клеток первой субпопуляции выше порогового она доминирует в опухоли независимо от количества клеток этой субпопуляции в начальный момент роста опухоли (рис.1). И наоборот, при подвижности ниже пороговой даже при количестве подвижных клеток в начальной композиции большей, чем 99.9% у подвижной субпопуляции нет шансов стать доминирующей в опухоли (рис.2).

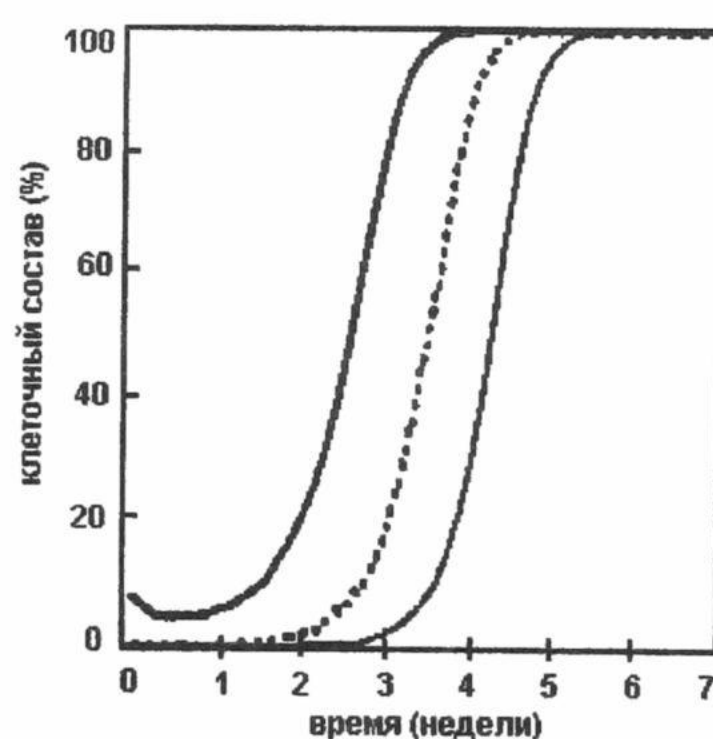


Рис.1

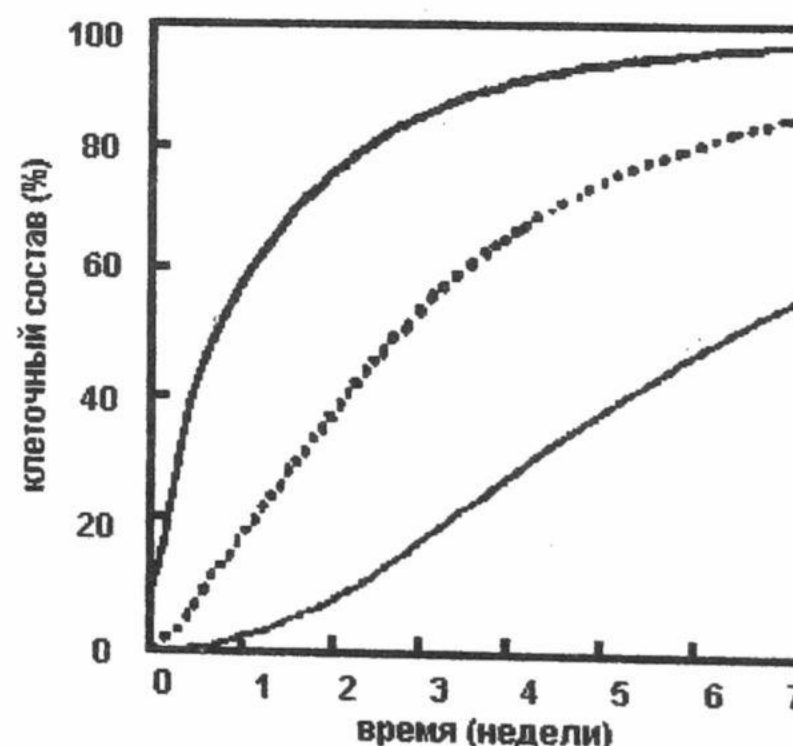


Рис.2

Рис.1,2. Динамика изменения композиционного состава делящихся клеток 1-ой (Рис.1) и 2-ой (Рис.2) субпопуляций при различных начальных композициях этих субпопуляций в гетерогенной смеси: 10% (1), 1% (2), 0.1% (3). Коэффициент диффузии клеток подвижной субпопуляции равен 10^{-9} см²/сек (Рис.1) и 10^{-10} см²/сек. (Рис.2).

Чувствительность клеток к нехватке основного субстрата S_0 и скорость переключения клеток из состояния деления в состояние покоя (вызванное нехваткой этого субстрата) k существенно не влияют

на динамику изменения композиционного состава. Значения этих параметров или влияют на скорость доминирования той или иной клеточной субпопуляции, или незначительно изменяют пороговое значение коэффициента диффузии подвижной субпопуляции (рис.3,4).

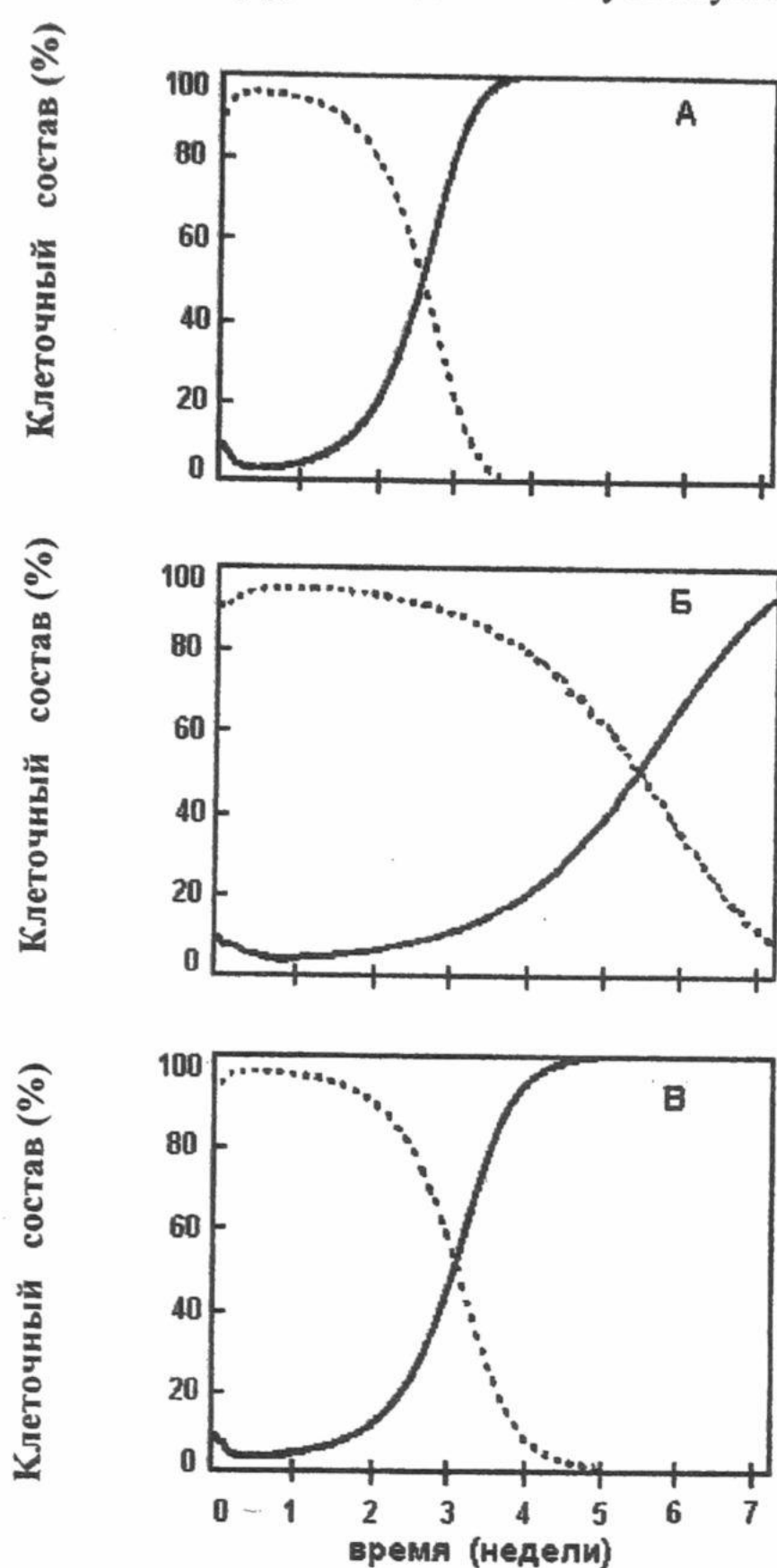


Рис.3

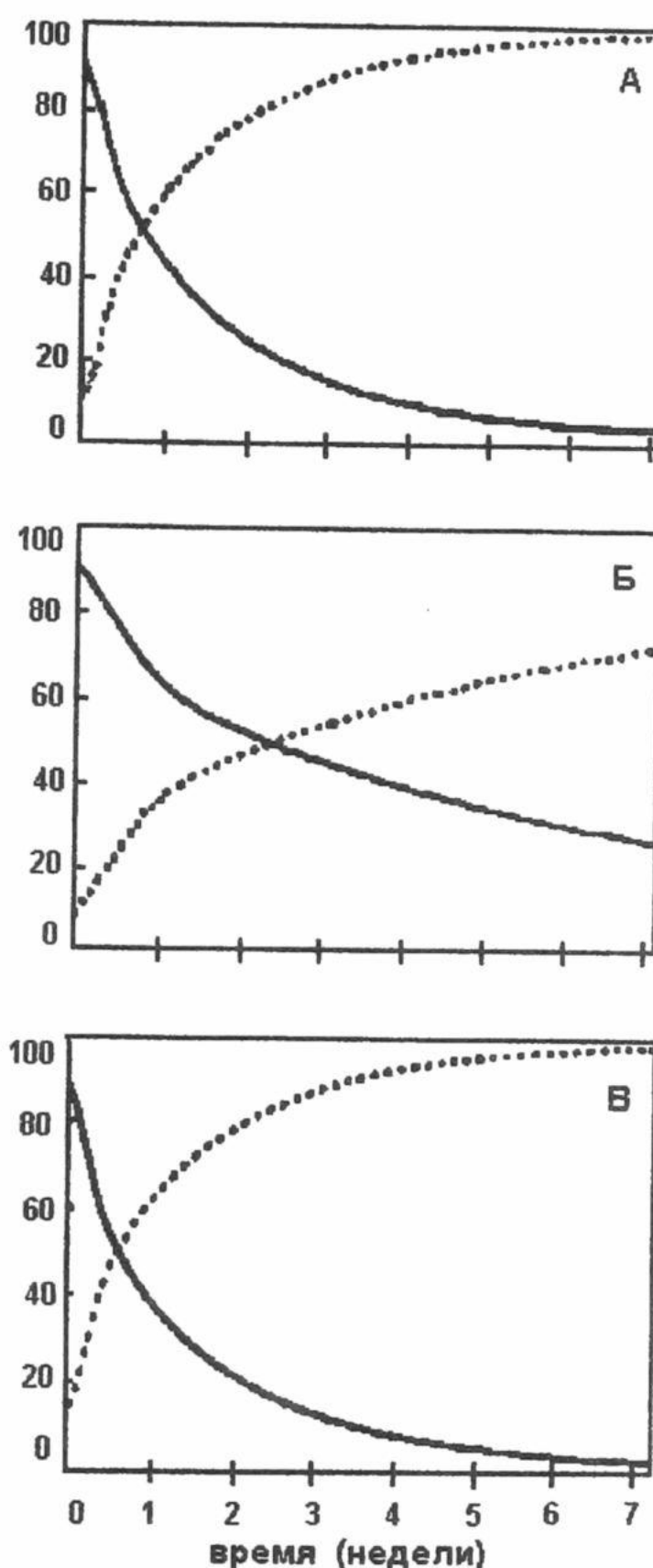


Рис.4

Рис.3,4.. Динамика изменения композиционного состава делящихся клеток 1-ой (сплошная линия) и 2-ой (пунктирная линия) субпопуляций при различных значениях коэффициента диффузии клеток подвижной 1-ой субпопуляции: 10^{-9} см²/сек (рис.3) ; 10^{-10} см²/сек (рис. 4). Параметры модели: (а) $k=1.5$; $S_0=0.2$; (б) $k=1.5$; $S_0=0.8$; (в) $k=1.2$; $S_0=0.2$.

ВЫВОДЫ

Таким образом построенная нами математическая модель кинетики роста гетерогенной опухоли описывает экспансию опухоли за счет и клеточного деления, и способности некоторых опухолевых клеток активно двигаться. Полученные в результате численного интегрирования модели результаты подтвердили высказанную нами гипотезу и продемонстрировали, что клеточная подвижность может обеспечить доминирование метастатически активной клеточной субпопуляции в гетерогенной опухоли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nicolson GL, Moustafa AS.//In vivo. 1998. V.12. P.579-588.
2. Kerbel RS. //Adv Cancer Res. 1990. V.55. P.87-131.
3. Rak JW, Kerbel RS.//In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1993. V.29A. P.742-748.
4. Solyanik G.I., Bulkewicz R.I., Kulik G.I.//Exp.oncol. 1995. V.17. P.158.
5. Solyanik G.I.//The Physics of Alive. 1998. V.6. P. 59-64.
6. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassara D, Nagase H, Vittorelli ML.// Anticancer Res. 1998. V.18. P.3433-3437.
7. Sutherland RM.//Acta. Oncol. 1998. V.37. P.567-574.

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 577.352+612.82

МОДЕЛЮВАННЯ РЕЦЕПТИВНИХ ПОЛІВ КЛІТИН ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА

Р.В.Ляховецький, Т.П.Палатний, Т.В. Коробко, В.Р. Ляховецький, В.Л. Зима*Київський національний університет ім. Т. Шевченка, 01033 м.Київ – 33, Володимирська 64, кафедра біофізики,**E – mail: zuma @ ruheas. freenet. viaduk. net**Надійшла до редакції 1 жовтня 1999р.*

Методом математичного моделювання створені точні карти рецептивних полів (РП) зорового аналізатора. Показано, що в електричному полі подвійного синцитію (фоторецептори – горизонтальні клітини) під дією точкового стимулу створюється вм'ятина у формі різниці гаусіанів. Це дозволяє прогнозувати РП фоторецепторів і задавати вимоги до "кристалу сітківки". Побудовані точні карти круглих та прямокутних РП, на основі яких описані властивості РП складної клітини та гіперколонки, в тому числі описана можливість нормування розміру вхідного сигналу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: клітини зорового аналізатора, моделі рецептивних полів, елементи нейрокомп'ютера.

Для автоматичного керування роботами, автомобілями, літаками і іншими складним динамічними об'єктами необхідні системи технічного зору. Щоб підвищити ефективність цих систем, розробники використовують нейрокомп'ютери, в яких моделюються деякі властивості клітин зорового аналізатора. Вважається, що зрозуміти роботу зорового аналізатора можна буде тоді, коли будуть створені точні карти рецептивних полів (РП).

Кругле РП гангліозної клітини сітківки вперше було зареєстроване С.Куффлером в 1952 р. Пізніше, в лабораторіях Гарвардського університету, Дж.Доулінг, Ф.Верблін та А.Канеко відкрили РП біполярних клітин, а Д.Х'юбел та Т.Візел отримали Нобелівську премію за дослідження РП клітин зорової кори. Згідно Д.Х'юбелу [1] і Глезеру В.Д. [2], декілька фоторецепторів конвергують на біполяр, утворюючи таким чином конус зв'язків центру РП біполяра. Горизонтальна клітина збирає збудження від більшої кількості фоторецепторів. Відповідь біполяра визначається різницею збуджуючих сигналів від фоторецепторів та гальмівних сигналів від горизонтальної клітини. Аналогічно гангліозна клітина збирає сигнали від декількох біполярів. Густина синаптичних зв'язків зменшується від центру до краю РП, тому профіль активності збуджуючої зони представляє собою гаусіан [2]. Тут функцію гальмування виконують амакринові клітини і профіль гальмівної зони теж є гаусіаном, але її діаметр приблизно в чотири рази більший за діаметр центру. Результируючий профіль РП гангліозної клітини має форму різниці гаусіанів. Відомо також, що РП сильно перекриваються і можуть змінювати свої розміри. Це означає, що кожен фоторецептор входить до складу багатьох РП, тобто повинен мати свій обернений конус зв'язків. Але в дійсності, в центральній ямці сітківки, де досягається максимальна роздільна здатність, кожна колбочка має лише один зв'язок із своїм біполяром і так само біполяр має один зв'язок з однією гангліозною клітиною [1, 3, 4]. Отже, конусу зв'язків немає. Виникають такі питання: де і яким чином створюються перші РП і чи не можна їх зареєструвати на рівні фоторецепторів? Як будувати точні карти круглих та прямокутних РП?

Щоб отримати необхідні відповіді клітин орієнтаційної колонки при зміні кута повороту смужки, мікроелектрод вводять в зону V1 майже горизонтально. Можна знайти ізоорієнтаційні напрямки горизонтального проходу мікроелектрода, коли орієнтація не змінюється. Це означає, що для гіперколонки можна побудувати ізоорієнтаційну карту (ізокарту) з простих клітин з прямокутними РП, для яких і орієнтація і ширина ліній будуть однаковими, а сусідні клітини своїми РП будуть контролювати відповідні сусідні ділянки вхідного зображення. Гіперколонка [2, 5] є найбільш важливим елементом зорової кори і для своєї ділянки поля зору має всі необхідні кути повороту та величини зсуву. Деякі зміни розмірів, рух стимула, колір, окодомінантність поки що не розглядаємо. Моделюючи гіперколонку [1,4], РП клітин орієнтаційної колонки позначають просто смужкою оптимальної орієнтації. Але питання, яку форму має РП гіперколонки, залишається відкритим.

Мета даної теоретичної роботи – виявити, де і яким чином створюється перші РП, побудувати шляхом математичного моделювання точні карти круглих та прямокутних РП, описати РП гіперколонки, показати, як можна нормувати розмір вхідного сигналу і, таким чином, задати вимоги до елементів нейрокомп'ютера.

ПОБУДОВА МОДЕЛЕЙ

Відомо, що горизонтальні клітини об'єднані в синцитій. Гіперполяризація фоторецептора викликає гіперполяризацію відповідної точки синцитію горизонтальних клітин і збудження поширюється в усі сторони по площині синцитію, спадаючи з відстанню по експоненті. Оскільки синцитій горизонтальних клітин, в свою чергу, гальмує фоторецептори, то чим далі розміщений фоторецептор від точки збудження, тим менше він гальмується. Таким чином створюється гальмівна периферія навкруги збудженого фоторецептора. Менше відомо про синцитій фоторецепторів [6, 7, 8, 9], в якому величина збудження із збільшенням відстані теж спадає по експоненті. Тут створюється збуджуюча зона РП, яка має менший діаметр, ніж гальмівна зона, але більшу амплітуду. Низькоамплітудний гальмівний гаусіан синцитію горизонтальних клітин віднімається від високоамплітудного збуджуючого гаусіану синцитію фоторецепторів. Ця різниця гаусіанів утворюється в електричному полі подвійного синцитію.

На рис.1 показана модель перерізу подвійного синцитію, тобто ділянка синцитію колбочок центральної ямки сітківки, три видимих знизу горизонтальні клітини (затушовані) і синцитій горизонтальних клітин, а також ланка з одного досліджуваного біполяра та однієї гангліозної клітини. Профіль електричного поля подвійного синцитію, що відображує рівень збудження або гальмування фоторецепторів, умовно винесено над ділянкою синцитію. Інтенсивність відповіді I кожного i -го фоторецептора можна б було позначати вертикальною лінією відповідної довжини точно напроти свого фоторецептора, але в традиційному вигляді різницю гаусіанів тут показано суцільною лінією. Вибираємо для дослідження один біполяр і подаємо точковий стимул (пучок світла діаметром приблизно $2\div 3$ мкм) на рецептор, який знаходиться на периферії РП досліджуваного біполяра, рис.1,а. Порівняно невелика інтенсивність світла, в даному випадку, дозволяє збудженню поширюватись по синцитію фоторецепторів. Збудження, яке поширюється по синцитію горизонтальних клітин, має меншу амплітуду і поширюється на більшу відстань. Отже, під дією точкового стимулу, в електричному полі подвійного синцитію створюється вм'ятину у вигляді різниці гаусіанів, свого роду деформований слід вхідного сигналу. Якщо центри точкового стимулу та досліджуваного біполяра співпадають, рис.1,б, то амплітуда відповіді біполяра буде максимальна, (показано стрілками). Тобто можна, пересуваючи точковий стимул по діаметру РП біполяра, отримати набір відповідей даного біполяра, який дозволить побудувати поверхню його РП. Але ця поверхня в дійсності є просто копією поверхні вм'ятини в електричному полі подвійного синцитію, яка утворюється під дією точкового стимулу.

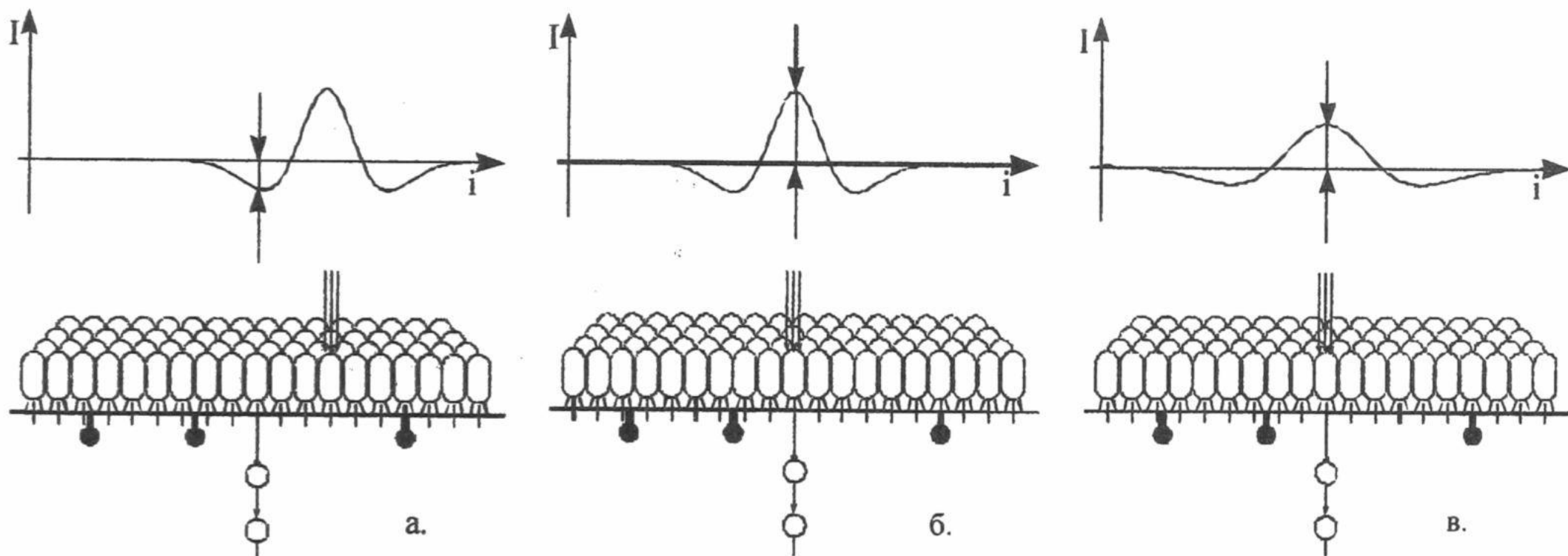


Рис.1. Модель перерізу подвійного синцитію. I - інтенсивність стимулу, i - номер фоторецептора

Знаючи інтенсивність точкового стимулу, можна задати діаметр збуджуючого n_1 та гальмівного n_2 гаусіанів (кількість одиничних діаметрів фоторецепторів) і можна розрахувати відповідь кожного фоторецептора, який попаде у вм'ятину, створену вхідним сигналом. Тип різниці гаусіанів будемо позначати як $P_{n1} - P_{n2}$, де P - величина імовірності. Потрібно також вказувати абсцису k та ординату l центру відповідного фоторецептора на площині подвійного синцитію. Тоді відповіді біполярої клітини, при зондуванні її РП точковим стимулом, можна визначити за формулою:

$$P_{n1} - P_{n2} = \frac{2}{\pi} \left[\frac{1}{n_1} e^{-\frac{2}{n_1}(k^2+l^2)} - \frac{1}{n_2} e^{-\frac{2}{n_2}(k^2+l^2)} \right].$$

Такий математичний підхід дозволяє отримати точну карту РП біполяра, на основі якої створюються точні карти круглих РП гангліозних клітин та, ретинотопічно зв'язаних з ними, нейронів зовнішнього колінчастого тіла і нейронів шару 4С α зони V1 зорової кори. Потрібно враховувати, що фоторецептори в сітківці мають гексагональну упаковку. До центрального фоторецептора щільно

прилягає 6 сусідніх фоторецепторів першого кола, 12 сусідніх фоторецепторів другого кола і т.д. Тому, якщо відстань по горизонталі між центрами сусідніх фоторецепторів взяти рівною одиниці, то по вертикалі вона буде рівною $\sqrt{3}/2$.

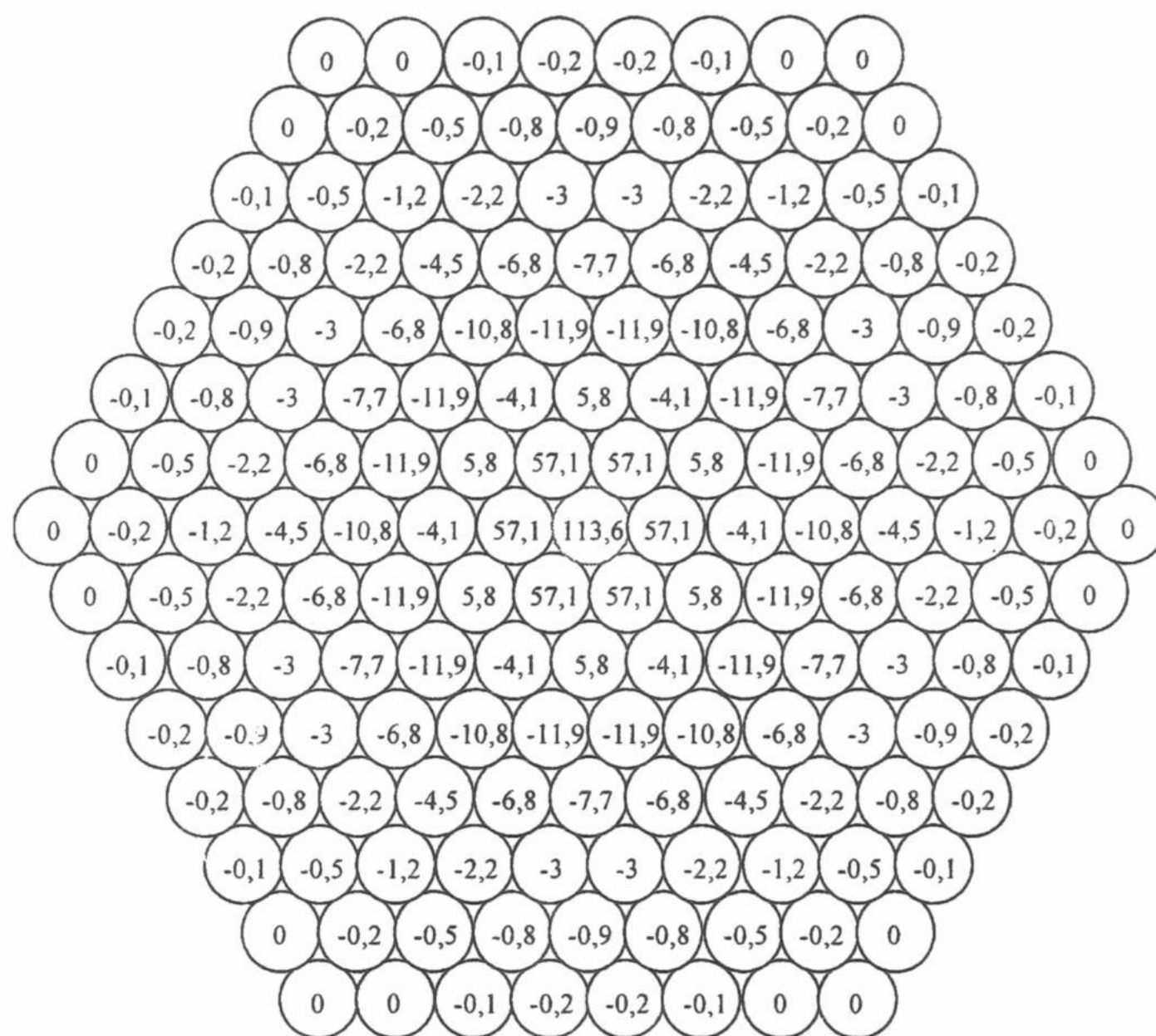


Рис. 2. Карта круглого рецептивного поля типу (P_4-P_{14}).

Маючи таку математичну модель круглого РП, нами створено відповідні комп'ютерні програми, які дозволяють будувати і роздруковувати по заданих величинах n_1 і n_2 , точні карти РП з гексагональною упаковкою фоторецепторів. На рис.2 показано результат побудови круглого РП біполяра типу P_4-P_{14} . В кожне кільце фоторецептора вписана відповідь (у відносних одиницях) біполяра на заданий точковий стимул. Для великих РП діаметром в сотні фоторецепторів, відповідь можна кодувати не цифрою, а кольором. Накладаючи п'ятнадцять круглих РП типу P_4-P_{14} (рис.2) по одній лінії, отримуємо прямокутне РП типу $15[P_4-P_{14}]$, як показано на рис.3. Такі РП мають прості клітини зони V1 зорової кори.

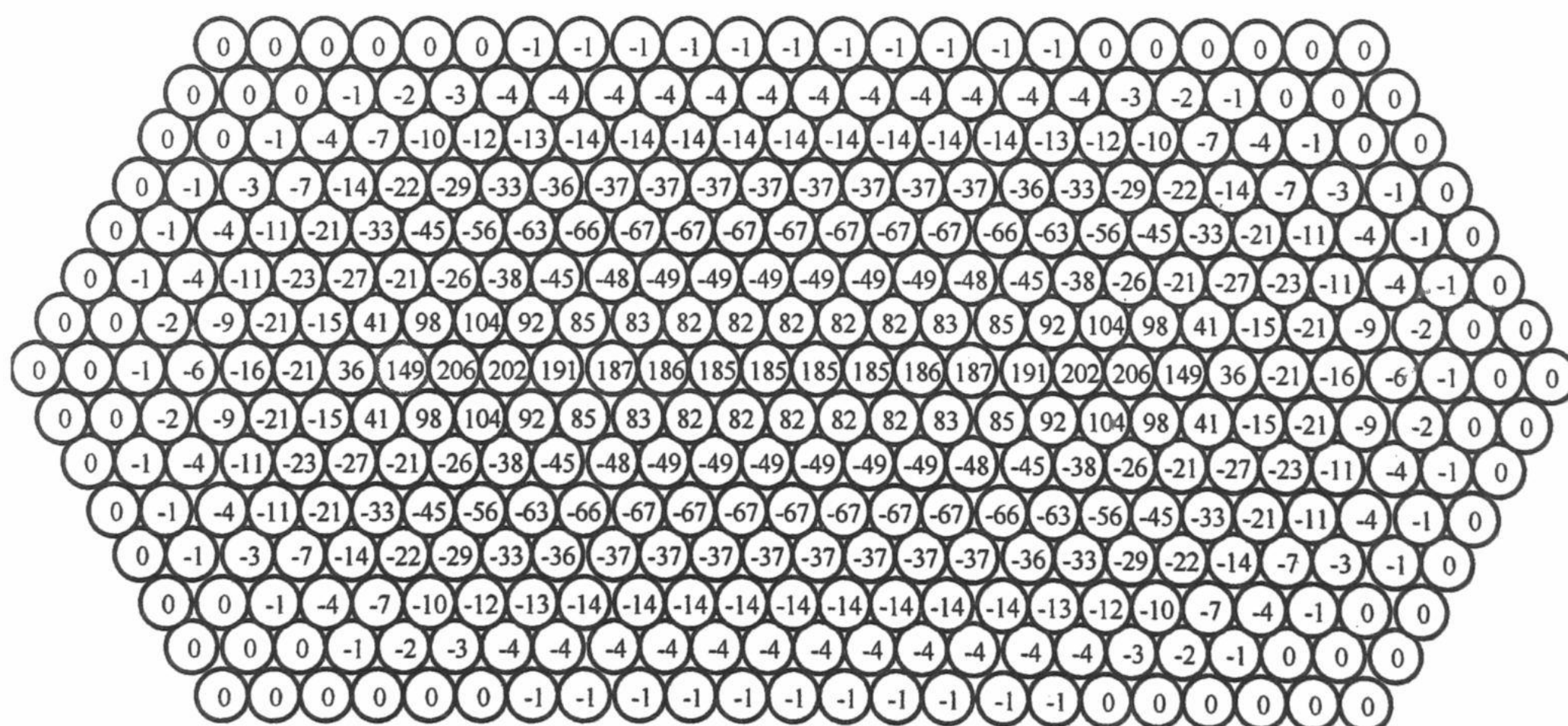


Рис. 3. Карта прямокутного рецептивного поля простої клітини типу $15[P_4-P_{14}]$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Використовуючи запропонований методичний підхід, можна побудувати профіль РП біполяра, пересуваючи точковий стимул по діаметру РП, тобто фактично пересуваючи вм'ятину від цього стимулу в електричному полі подвійного синцитію. Це дозволяє прогнозувати РП фоторецептора, яке, в даному випадку (гальмівний зв'язок до біполяра), мало б форму перевернутої по відношенню до РП біполяра, різниці гаусіанів. Гіпотеза вм'ятини також дозволяє задавати вимоги розробникам «кристалу сітківки».

Зникає необхідність використовувати конуси із тисяч зв'язків, з'являється можливість адаптуватись не лише до рівня освітленості, але і до розміру вхідного сигналу.

Чим інтенсивніший стимул, тим менший діаметр центру РП біполярної або, відповідно, гангліозної клітини [10, 11]. Тобто, із збільшенням гіперполяризації подвійного синцитію, величина його розподіленого опору також збільшується і тому збудження поширюється по синцитіях на менші відстані. І навпаки, при менших інтенсивностях стимулу, збудження «розпливається» по синцитіях, як і показано на рис.1,в. Це дозволяє підвищити чутливість сітківки до слабких стимулів за рахунок зменшення роздільної здатності. Таким чином, можна спостерігати ефект зміни розмірів РП, без конусів зв'язків.

Показано [12, 13], що розміри РП нейронів зовнішнього колінчастого тіла після пред'явлення стимулу або після сакади змінюються в перші 100 мс від $10 - 15^\circ$ до $10 - 30^\circ$. Спочатку розміри РП максимальні і аналізуються найбільші фрагменти зображення. Потім, при швидкому зменшенні розмірів РП "прорізуються" деталі, які далі стають ще дрібнішими. Після того, як з зображення добуто максимум даних, сприйняття закінчується і РП "розпливаються" до наступної сакади. Під час сакади, коли зображення "летить" по сітківці, око практично сліпне, а отримана інформація переробляється в корі. Щоб сприйнялась нова інформація, стара інформація повинна зникнути в короткочасовій пам'яті, після чого починається новий цикл аналізу. Це дозволяє нормувати розмір вхідного зображення, змінюючи розміри РП біполярів, а отже і розміри РП гангліозних клітин та нейронів зовнішнього колінчастого тіла по окремій програмі.

На рис.4,а представлено карту поверхні вм'ятини, створеної точковим стимулом такої високої інтенсивності, що сигнал по синцитію фоторецепторів практично не розпливається, працює тільки синцитій горизонтальних клітин. Ця карта, як і карта РП біполяра, описується формулою різниці гаусіанів типу $P_1 - P_4$. Стимул більшого діаметру, який накриє сім фоторецепторів, можна розглядати як сукупність семи точкових стимулів. Відповідно і вм'ятину, створену таким стимулом, можна описати суперпозицією семи вм'ятин від точкових стимулів. На рис.4,б представлена карта поверхні такої вм'ятини, типу $7(P_1 - P_4)$. Даний стимул більшого діаметру діє вже і на гальмівну периферію РП центрального фоторецептора і зв'язаного з ним біполяра. Тому його відповідь зменшилась від 97 до 85 умовних одиниць. Якщо діаметр стимулу збільшити так, щоб накривати 19 фоторецепторів, рис.4,в, то відповідь досліджуваного центрального фоторецептора і зв'язаного з ним біполяра ще зменшиться. Коли стимул накриє 37 фоторецепторів (рис.4,г), тобто все досліджуване РП, їх відповідь стане практично нульовою. Тут вона дещо більша за нуль через те, що формула Гаусса неточна для карт РП малого діаметра. Такі РП можна розраховувати по відомій формулі Бернуллі. Тоді б на рис.4,г в центральному фоторецепторі був би точний нуль. Але формула Бернуллі, точна для малих РП, стає надто громіздкою для великих РП з десятків та сотень фоторецепторів.

Отже, збільшення діаметру стимула високої інтенсивності призводить до зменшення відповіді біполяра і відповідних гангліозних клітин та клітин зовнішнього колінчастого тіла. Напевно, саме цим можна пояснити характерний візерунок відповідей на яскраве зображення букви К [11, с.263]. Ті фоторецептори, гангліозні клітини, а особливо клітини зовнішнього колінчастого тіла, які попадають на краї букви, добре реагують на зображення, а ті, чий РП майже повністю накривається вхідним сигналом, навпаки, не реагують.

Якщо ж інтенсивність стимулу зменшити, то включається синцитій фоторецепторів і розміри вм'ятини, а отже і РП, збільшуються. Наприклад, для точкового стимулу меншої інтенсивності, розмір РП типу $P_4 - P_5$ і його збуджуючого центру збільшився, як показано на рис.4,д. Якщо збільшити тепер діаметр стимулу так, щоб накривати 7 центральних фоторецепторів, то відповідь досліджуваного центрального фоторецептора і зв'язаного з ним біполяра зросте, як показано на рис.4,е, тому що стимул такого розміру накриває весь збуджуючий центр даного РП. Якщо і далі збільшувати діаметр стимулу, то відповіді біполяра будуть зменшуватись, тому що включиться гальмівна периферія.

Метод комп'ютерного моделювання дозволяє робити і інші експерименти з РП. Наприклад, насування на кругле РП темної або світлої смужки [11с.254], буде змінювати відповідь досліджуваного біполяра. Якщо ж змінювати кут повороту смужки, що лежить рівно посередині круглого РП, то відповідь біполяра не зміниться. На відміну від клітин з круглими РП, відповідь простої клітини з прямокутним РП при зміні кута повороту смужки різко змінюється. Максимальне значення відповіді буде лише в тому випадку, коли світла смужка повністю накриє лише збуджуючу зону прямокутного РП.

По вершині поверхні прямокутного РП, рис.3, можна провести лінію. Якщо тепер розглядати профіль (поперечний переріз) РП двох сусідніх складних клітин, показаний на рис.5а, то можна побачити лише крапки від перерізу ліній на вершинах профілів РП простих клітин. Ці лінії дозволяють показати РП складних клітин так, як на рис.5,б. Фактично тут показано спільне РП чотирьох складних клітин і показано, де зробити перетин, щоб отримати таку картину, як на рис.5,а. Зробимо заміну рис.5,б на рис.5,в, де те ж саме РП складної клітини зображено не п'ятьма лініями в квадратику РП, а однією смужкою в кільці. Отже, на рис.5,в зображено чотири РП складних клітин. Лінія оптимальної орієнтації, пред'явлена в будь-якому місці РП складної клітини, буде давати стандартну незмінну відповідь.

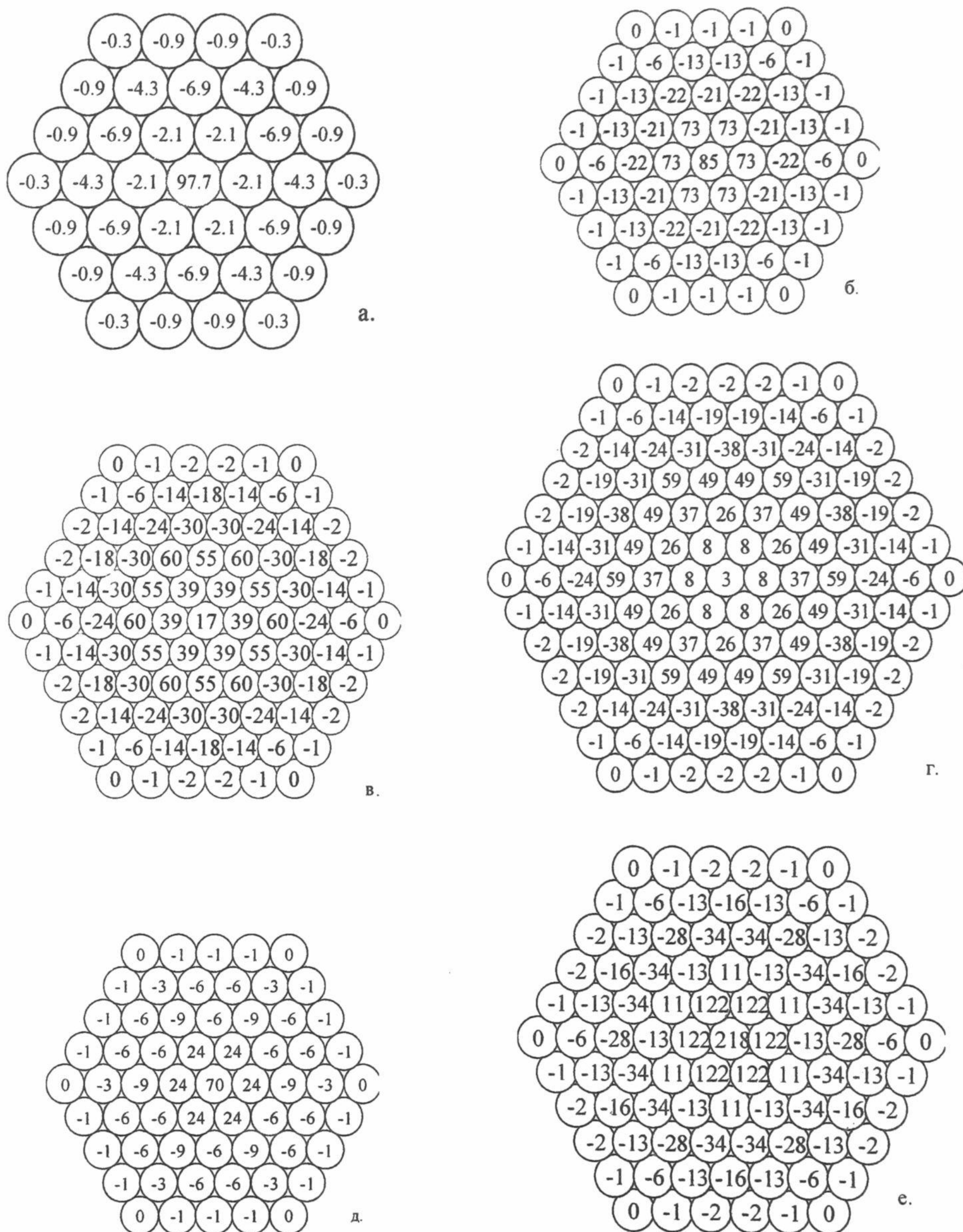


Рис. 4. Карти поверхонь вм'ятин типу: а) P_1-P_4 ; б) $7(P_1-P_4)$; в) $19(P_1-P_4)$; г) $37(P_1-P_4)$; д) P_4-P_5 ; е) $7(P_4-P_5)$.

Ті ж самі РП простих клітин, з яких побудовано РП складних клітин, входять і до складу орієнтаційних колонок. Задамо кут між оптимальними положеннями стимула для сусідніх клітин орієнтаційної колонки в 30° , як на рис.5,г. Якщо РП першої ізокарти будуть мати вертикальну орієнтацію, то РП другої ізокарти будуть повернуті на 30° , третьої - на 60° і т.д. Сьома ізокарта мала б вертикальну орієнтацію. Тут розмір квадратної ізокарти для розпізнавання букв можна взяти 5×5 діаметрів складної клітини. В дійсності, не лише круглі РП, але і орієнтаційні колонки, повинні мати гексагональну упаковку з великим перекриванням. Це означає, що і ізокарти можуть мати круглу форму і можуть сильно перекриватись. Проте таке спрощене зображення корисне тим, що можна розглянути детально, як накладається вхідний сигнал, наприклад, буква Щ, на окрему ізокарту (рис.5,г). Ця четверта

карта гіперколони з горизонтальною орієнтацією дасть відповідь: є довга горизонтальна лінія на своєму місці. Перша карта гіперколони з вертикальною орієнтацією дасть відповідь: є три довгі вертикальні лінії на своєму місці і справа внизу - коротка лінія. Ті орієнтаційні колонки, в які попадають перетини ліній букви, теж дадуть свої ознаки цієї букви. Нейрон-детектор букви Ц, сприйнявши свої ознаки сигналу, дасть відповідь і загальмує інші нейрони-детектори букв даної гіперколони.

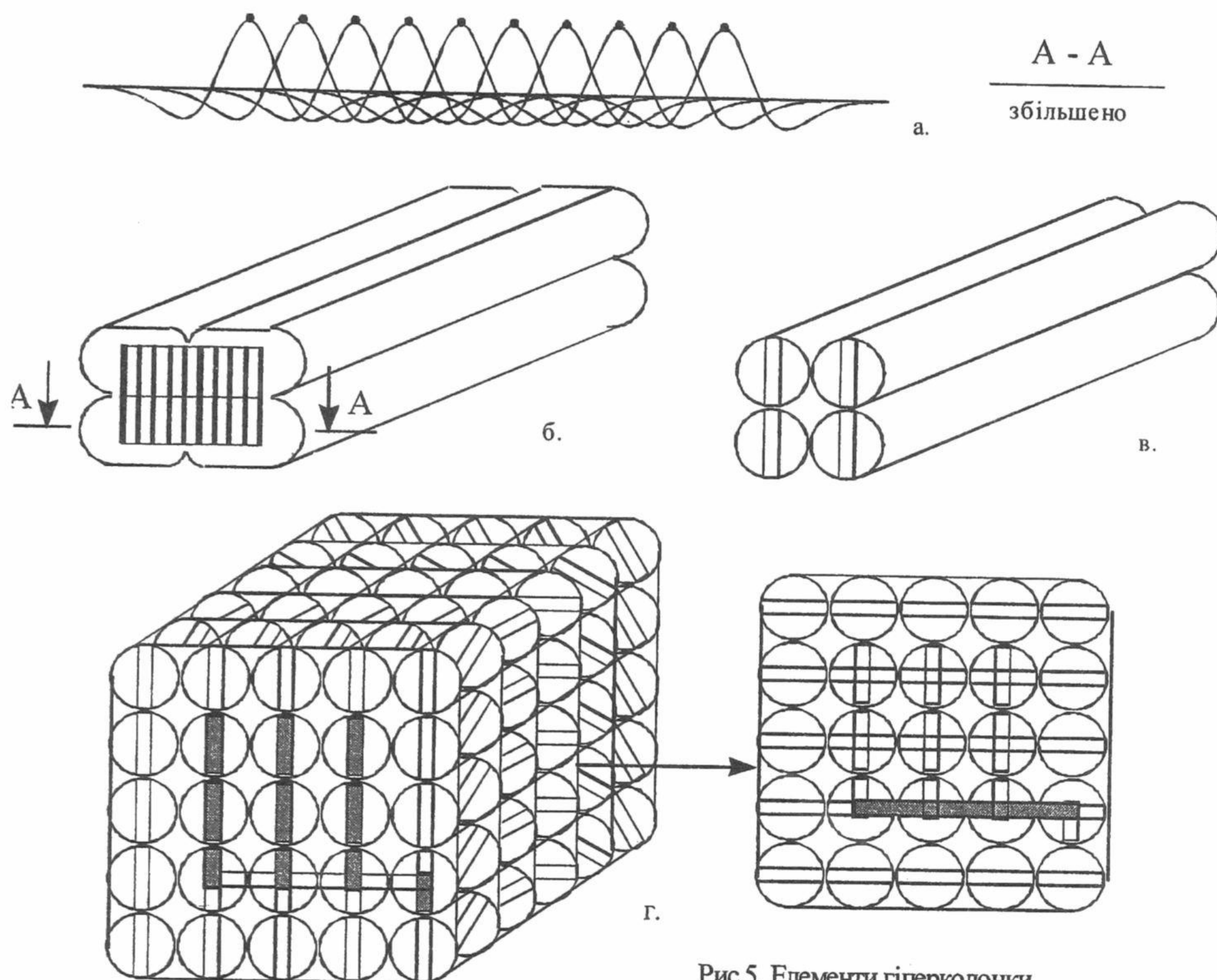


Рис.5. Елементи гіперколони

Запропоновано [14], з метою постановки задачі, чотири механізми для розпізнавання букв, які мали такі назви: демони сприйняття (фоторецептори), демони виділення ознак (карти РП), демони - класифікатори (нейрони-детектори) і демон прийняття рішення. Нами, використовуючи коефіцієнти Фур'є вхідного сигналу, була створена і запатентована модель локального аналізатора [15], яка має в собі всі названі чотири механізми. Але букви, а тим більше слова або сторінку тексту, розпізнавати традиційними методами, за допомогою коефіцієнтів Фур'є практично неможливо. Можна лише моделювати властивості клітин зони V5, щоб розпізнавати рух об'єкту і націлюватись на об'єкт. Коефіцієнти Фур'є дозволять вивести зображення букви в центр РП гіперколони і пронормувати її розмір. Можливо, що дуже економну при технічній реалізації систему базисних функцій для виділення коефіцієнтів Фур'є можна побудувати з ортогоналізованих карт прямокутних РП.

Згідно [14], використання контексту покращує надійність розпізнавання букв. Це означає, що повинні бути гіперколони слів, які отримують вхідні сигнали від гіперколонок букв через короткочасову пам'ять, свого роду константний екран. Якщо імпульсну відповідь гіперколони слова завести через зворотні зв'язки назад, до гіперколонок букв, отримаємо ефект "підсвітки". Силу зворотнього зв'язку потрібно підбирати індивідуально для кожного вхідного сигналу. Мала "підсвітка" потрібна тоді, коли вхідний сигнал не спотворений шумами. Велика "підсвітка", яка корисна тоді, коли немає окремих букв в слові або є лишні, може в деяких випадках бути недоліком, якщо з'являються галюцинації. "Підсвітка" по зворотніх зв'язках, наприклад, від зони V3 до зони V2 може дозволити побачити трикутник Каніша [16]. Використання гіперколонок слів, змісту і відповідних зворотніх зв'язків дозволить читати рукописний текст, креслення, слухати одну розмову на фоні інших розмов, допомагати в перекладі з однієї мови на іншу. Гіперколони змісту – це фактично система представлення знань, яка активно керує процесом розпізнавання і може виводити в короткочасову пам'ять не лише необхідні слова, букви, але і більш дрібні деталі зображення.

ВИСНОВКИ

Показано, що під дією вхідного сигналу, в електричному полі подвійного синцитію створюється вм'ятини у формі різниці гаусіанів. Окремий біполяри, який в fovea має зв'язок лише з однією колбочкою, при зміщенні вхідного сигналу по сітківці, може реєструвати лише зміщення цієї вм'ятини. Таким чином створюється видимість конусу зв'язків і відповідного йому рецептивного поля. Це дозволяє прогнозувати рецептивне поле фоторецептора і задавати вимоги до "кристала сітківки".

Створено математичну модель вм'ятини, тобто точну карту круглого рецептивного поля біполяра, яка не реагує на засвітку всього рецептивного поля і може бути основою для створення просторово-частотних фільтрів. Координати точок поверхні РП на екрані комп'ютера можна задавати цифрами або кольором. Простота створення таких моделей дозволяє використовувати їх в учбовому процесі.

Показано, що в деяких межах розмір рецептивного поля може змінюватись не лише при зміні освітленості, а і по окремій програмі, що можна використовувати для нормування розмірів вхідних сигналів.

Створена точна карта прямокутного рецептивного поля і описи карт рецептивних полів складної клітини та гіперколонки, які дозволяють пояснити процес розпізнавання деяких простих сигналів. Це дозволяє створити технічні вимоги до елементів нейрокомп'ютера.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Хьюбел Д. Глаз, мозг, зрение. – М.: Мир, 1990. – 240 с.
2. Глезер В.Д. Зрение и мышление. – Л.: Наука, 1985, - 248 с.
3. Костюк П.Г., Гродзинский Д.М., Зима В.Л. и др. Биофизика. – Киев: Вища школа, 1988. – 248 с.
4. Sekuler R., Blake R. Perception. N. Y.: Alfred A. Knopf, 1985. – 513p.
5. Соколов Е.Н. Теоретическая психофизиология. – М.: Изд-во Московского университета, 1986. – 107 с.
6. Измайлов И.А., Соколов Е.Н., Черноризов А.М. Психофизиология цветового зрения. – М.: Изд-во Московского университета, 1989. – 206 с.
7. Ноздрачев А.Д. Общий курс физиологии человека и животных. т.1, – М.: Высшая школа, 1991. – 512 с.
8. Лебедев Д.С., Бызов А.Л. Электрические связи между фоторецепторами способствуют выделению протяженных границ между разнояркими полями // Сенсорные системы. – 1998. – т. 12, №3. – с.329-342.
9. Hoyenga K. B., Hoyenga K.T. Psychobiology: the neuron and behavior. – Western Illinois University.: Brooks / Cole Publishing Company Pacific Grove, California, 1988. 516 p.
10. Yasui S., Furukawa T., Yamada M., Satio T. S/N-dependent modulation of centre surround opponent receptive fields: similarities in real and artificial neural networks // J. Physiol. (1992) Vol. 446. p.376.
11. Грюссер О. Й., Грюссер-Корнельс У., гл.11, Зрение // Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. т.1. – М.: Мир, 1996. – 328 с.
12. Подвигин Н.Ф., Вист Е., Шлыкова Л., Келлер И. Временные характеристики вызванного потенциала в ответ на движущийся пространственно-частотный паттерн // Сенсорные системы. – 1997. – т.11, №2. – с.205-211.
13. Позин Н.В., Любинский И.А., Левашов О.В. и др. Элементы теории биологических анализаторов. – М.: Наука, 1978. – 360 с.
14. Линдсей П., Норман Д. Переработка информации у человека. – М.: Мир, 1974. – 550 с.
15. Ляховецький Р. В., Зима В. Л. Модель локального аналізатора // Фізика живого. – 1997т.5, №1.с.67 –71.
16. Зеки С. Зрительный образ в сознании и в мозге // В мире науки. – 1992. – №11-12. – с.33-41.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ПРИСУТСТВИИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

А.В. Финашин, В.Н. Ткаченко, В.В. Товстяк

Харьковский госуниверситет, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4. E-mail: tovstiak@pem.kharkov.ua

Поступила в редакцию 15 ноября 1999 г.

Проведено исследование изменений активности дихлорфенолиндофенол- и феррицианидредуктаз микросом при облучении ускоренными электронами в дозах 10^2 - 10^4 Гр. Достоверное ингибирование активности обеих оксидоредуктаз наблюдалось при дозе 10^4 Гр. Установлено, что радиационно-индуцированные эффекты не зависят от концентрации мембранного белка в диапазоне 0.23-2.3 мг/мл. Не обнаружено прямой корреляции между изменением активности ферментов и развитием процессов перекисного окисления липидов при облучении. Установлены закономерности влияния модификаторов структурного состояния мембран (третон X-100, глутаровый альдегид и бутанол) на радиочувствительность оксидоредуктаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксидоредуктазы микросом, облучение, модификация радиочувствительности ферментов.

На современном этапе развития радиобиологии факт того, что плазматическая мембрана клетки является одним из объектов для радиационного воздействия не вызывает сомнения. Процессы, индуцируемые в плазмалемме облучением, исследовались с применением различных экспериментальных подходов к проблеме расшифровки молекулярных механизмов поражающего действия радиации на организм [1-3]. Однако, сосредоточение усилий радиобиологов только на изучении пострадиационных изменений наружной клеточной мембраны, даже с учетом ее многосторонних функциональных и регуляторных связей с клеточным метаболизмом, ограничивает возможности решения данной проблемы.

В этом аспекте особо следует отметить тот факт, что облучение оказывает генерализованное действие на клеточные мембраны, т.е. затрагивает не только плазмалемму, но и приводит к существенным сдвигам в нормальном функционировании любых внутриклеточных мембран. Индикатором подобных сдвигов может служить изменение активности мембраносвязанных ферментов при радиационном воздействии. По величине этого изменения, а также его знаку (ингибирование или активация ферментативной активности) можно судить о степени поражающего действия радиации на организм. В связи с этим особую актуальность приобретает изучение действия облучения на ферментные системы клеточных органелл.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния ускоренных электронов на активность микросомальных оксидоредуктаз. Для выявления того, какой путь (прямой или опосредованный) преобладает в поражающем действии β -излучения на дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ)- и феррицианидредуктазу, исследовали зависимость степени радиационной инактивации данных мембраносвязанных ферментов от концентрации белка в суспензии микросом [4]. С целью ответа на вопрос о том, в какой мере за изменение активности оксидоредуктаз ответственны процессы радиационно-индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран эндоплазматического ретикулума, изучали влияние тиомочевины на функционирование этих белков при облучении мембранных суспензий. Исследовали также сдвиг пострадиационной активности микросомальных оксидоредуктаз в различные сроки после облучения (1 и 24 ч). Для лучшего понимания молекулярных механизмов, посредством которых структурно-динамическое состояние внутриклеточных мембран оказывает воздействие на наблюдаемые радиационные эффекты, был проведен ряд экспериментов с использованием мембранотропных агентов, таких как третон X-100, глутаровый альдегид и бутанол.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали микросомную фракцию, выделенную из печени кролика [5]. Микросомы суспендировали в 10 мМ трис-HCl буфере (pH – 7.4). Содержание белка определяли по методу Лоури и соавт. [6]. Мембраны подвергали облучению электронами с энергией 5МэВ в дозах 10^2 - 10^4 Гр. Перед измерением ферментативной активности оксидоредуктаз пробы инкубировали при 4°C в течение 1 или 24 ч. Ферментативную активность определяли как описано ранее [7]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу [8].

В качестве модификаторов структурного состояния мембран применяли третон X-100, глутаровый альдегид и бутанол, добавление которых к суспензии микросом производили за 24 часа до облучения до конечных концентраций третона X-100 – 0.05%, глутарового альдегида – 0.001% и бутанола – 0.3%. При выяснении вопроса о прямом или опосредованном пути воздействия радиации на микросомальные ферменты использовали суспензии с концентрацией мембранного белка 0.23 и 2.3 мг/мл. Интенсивность процессов

радиационно-индуцированного ПОЛ оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), используя коэффициент молярной экстинкции $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Для подавления процессов ПОЛ применяли тиомочевину, которую добавляли к суспензии микросом непосредственно перед облучением до конечной концентрации 100 мМ. Содержание МДА в мембранных препаратах определяли через 24 ч после радиационного воздействия по методу [5]. В течение этого времени пробы инкубировали при 4°C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из представленной на рис. 1 дозовой зависимости ферментативной активности, оксидоредуктазы микросомальных мембран характеризуются низкой чувствительностью к радиационному воздействию. Через 1 ч после облучения достоверное снижение активности обоих ферментов наблюдалось только при дозе 10000 Гр. При этом следует отметить, что активность исследуемых микросомальных оксидоредуктаз ингибируется практически на одну и ту же величину (36% ингибирования для ДХФИФредуктазы и 37% – для феррицианидредуктазы по сравнению с необлученным контролем).

Полученные нами данные по ингибированию активности феррицианидредуктазы под влиянием радиации находят подтверждение в работе И.Е. Довгого с соавторами [9], в которой изучались изменения активности данного фермента после облучения выделенных эритроцитарных мембран. Авторы наблюдали при использовании доз 200–1000 Гр уменьшение активности феррицианидредуктазы на 50 % после 4-часовой инкубации мембран при 37°C . Отличие в дозе, при которой наблюдается радиационный эффект от полученных нами результатов, очевидно, объясняется различиями в структуре эритроцитарных и микросомальных мембран, а также условиями пострadiационной инкубации исследуемых мембранных суспензий. В нашем случае микросомную фракцию после облучения инкубировали в течение 1 часа при 4°C , поэтому закономерно, что для проявления радиационного эффекта необходима более высокая доза облучения (рис. 1).

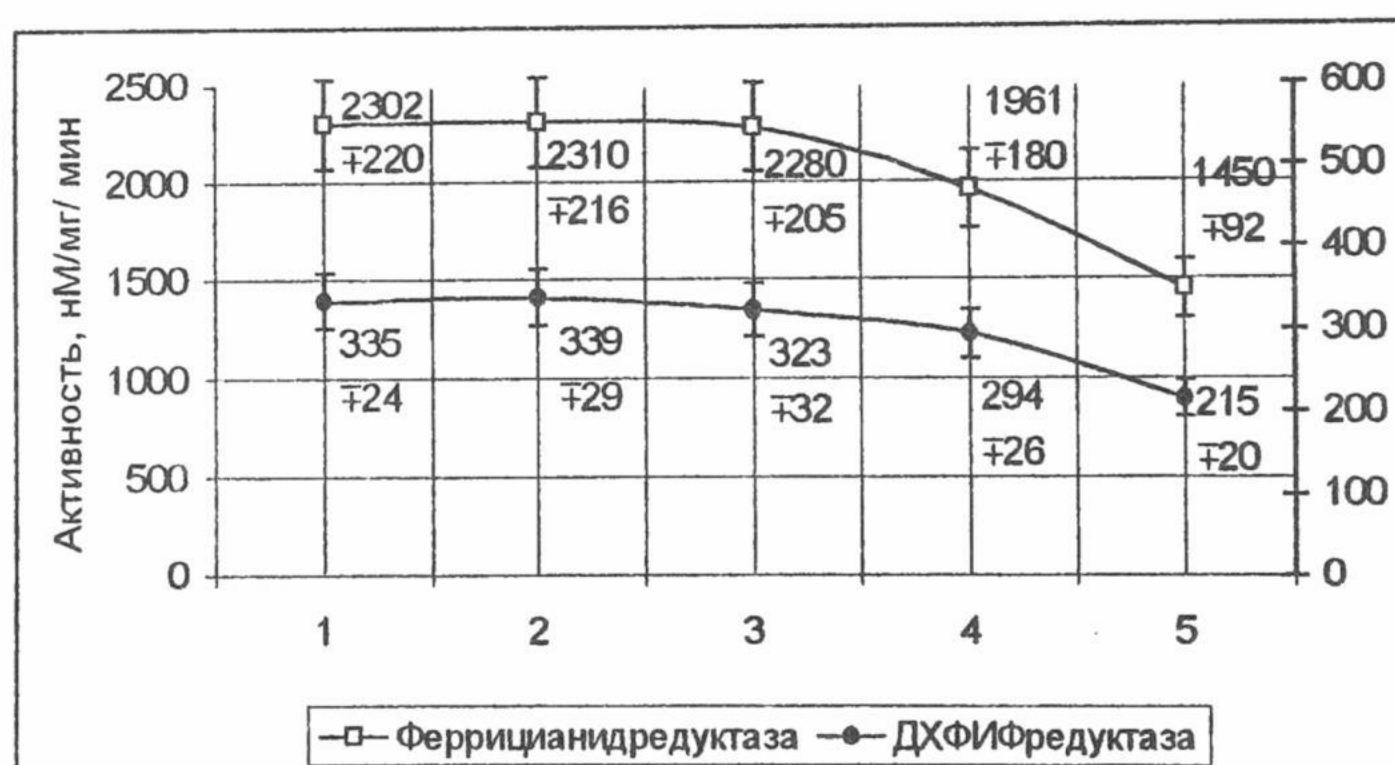


Рис. 1 Зависимость активности микросомальных оксидоредуктаз от дозы облучения
Доза облучения: 1 – контроль, 2 – 10 Гр, 3 – 10^2 Гр, 4 – 10^3 Гр, 5 – 10^4 Гр. Концентрация белка в облучаемой суспензии – 0.23 мг/мл.

Радиационно-индуцированные изменения активности мембранных ферментов могут объясняться влиянием различных факторов. Один из возможных молекулярных механизмов лучевого поражения клеточных мембран запускается посредством конформационных изменений мембранных белков. К выводу о решающей роли подобных конформационных изменений в реализации поражающего действия радиации в дозе 1000 Гр на мембраны эритроцитов пришли А.М. Тонгур с соавт. [10]. Следует отметить, что такие изменения конформации мембраносвязанных ферментов могут быть вызваны, в частности, разрушением определенных «ключевых» аминокислотных остатков при радиационном воздействии. Подтверждением этого может служить тот факт, что при использовании для образования планарных липидных мембран грамицидина Н⁺, вместо грамицидина А, радиорезистентность ионных каналов таких искусственных липидных мембран существенно увеличивается. Объясняется подобное снижение чувствительности к облучению тем, что в молекуле грамицидина Н⁺ один из остатков триптофана заменен на остаток фенилаланина [11]. Также Довгий и соавт. [9] считают, что в ингибировании пострadiационной активности мембранного фермента феррицианидредуктазы процессы ПОЛ эритроцитарной мембраны не играют существенной роли. Пострадиационная инактивация данного фермента, по мнению авторов, объясняется структурными изменениями, индуцируемыми прямым действием облучения на белковую макромолекулу или связанными с перестройками липидной составляющей клеточной мембраны.

Исследование пострадиационных изменений активности ...

Таким образом, одним из возможных путей радиационной инактивации для ДХФИФредуктазы и феррицианидредуктазы микросом может быть появление конформационных изменений в структуре этих белковых макромолекул, не связанное с перестройками липидной фазы микросомальных мембран под действием облучения. При этом действие радиации на ферменты может быть прямым или опосредоваться продуктами радиолиза воды. В связи с этим производили облучение быстрыми электронами в дозе 10000 Гр 2 типов суспензий микросом с концентрацией мембранного белка 0,23 и 2,3 мг/мл. Как следует из полученных данных (табл. 1) увеличение концентрации мембранного белка в 10 раз не приводит к статистически достоверным изменениям пострадиационной активности ДХФИФредуктазы. Ингибирование ДХФИФредуктазной активности под действием облучения составляет $\approx 33-36\%$ для обоих типов мембранных суспензий.

Исследование пострадиационных изменений активности другого изучаемого нами мембранного фермента микросом – феррицианидредуктазы, указывает на меньшую инактивацию в случае более концентрированной суспензии. Как видно из данных табл. 1, феррицианидредуктазная активность при облучении ингибируется в суспензии с концентрацией мембранного белка - 0.23 мг/мл на 35%. Для суспензии с концентрацией белка – 2.3 мг/мл этот показатель составляет 26%. Таким образом, понижение концентрации мембранного белка в облучаемой суспензии в 10 раз приводит к статистически достоверному увеличению ферментативной инактивации феррицианидредуктазы на 9%.

Таблица 1. Влияние концентрации мембранного белка и тиомочевины на степень радиационной инактивации ферментов.

Фермент	Состав среды суспендирования микросом	Концентрация белка, мг/мл	Ферментативная активность и ее относительное изменение	Контроль	Облучение в дозе 10^4 Гр
НАДН: 2,6-ДХФИФ-редуктаза	10 мМ трис-HCl	0,23	1	347 ± 47	234 ± 12
			2	100	67 ± 3
		2,3	1	340 ± 66	219 ± 19
			2	100	64 ± 6
	10 мМ трис-HCl + 100 мМ тиомочевины	0,23	1	339 ± 29	224 ± 12
			2	100	66 ± 3
		2,3	1	337 ± 12	221 ± 17
			2	100	65 ± 5
НАДН: $K_3[Fe(CN)_6]$ -редуктаза	10 мМ трис-HCl	0,23	1	3669 ± 359	2419 ± 101
			2	100	65 ± 3
		2,3	1	3697 ± 239	2724 ± 120
			2	100	74 ± 3
	10 мМ трис-HCl + 100 мМ тиомочевины	0,23	1	3280 ± 120	2085 ± 100
			2	100	64 ± 3
		2,3	1	3614 ± 239	2113 ± 239
			2	100	58 ± 7

Примечание: 1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

Ферментативную активность оксидоредуктаз регистрировали через 1 ч после облучения.

Однако, регистрируемое изменение столь мало, что не позволяет с полной уверенностью говорить о преобладании в действии быстрых электронов на феррицианидредуктазу продуктов радиолиза воды. Полученные экспериментальные данные не позволяют также абсолютизировать путь прямого влияния радиации на молекулы данного фермента. Аналогичные выводы можно сделать и в случае ДХФИФредуктазы.

Как уже говорилось выше, при рассмотрении вопроса о причинах радиационного поражения мембранных белков отсутствует единая, общепринятая точка зрения. Наряду с мнением об индуцировании структурных изменений при непосредственном действии радиации на молекулы ферментов, некоторыми исследователями выдвигается иное предположение. Суть его сводится к тому, что пострадиационная инактивация мембранных белков связана, главным образом, с радиационно-индуцированными перестройками в составе их непосредственного липидного окружения. Подтверждением такого объяснения молекулярных

механизмов воздействия лучевого фактора на активность мембраносвязанных ферментов служит тот факт, что внутренние интегральные мембранные белки, например, цитохром P_{450} , сенсibilизированы к действию облучения в гораздо большей мере по сравнению с внешними, типа цитохрома b_5 и других [12]. Такое парадоксальное, на первый взгляд, пострадиационное изменение активности внутренних интегральных белков связано с их большей подверженностью влиянию запускаемых при облучении процессов ПОЛ клеточной мембраны. В целях дальнейшего обоснования своей точки зрения на причины поражения мембраносвязанных ферментов под действием радиации, авторами были проделаны работы по исследованию пострадиационных изменений активности мембранных белков в реконструированных микросомах. Липиды и ферменты, служившие исходным материалом для реконструкции микросом, облучались или не облучались в дозах 200-1000 Гр отдельно друг от друга. При этом предварительное облучение только белков с их последующим встраиванием в необлученную липидную фазу не оказывало влияния на ферментативную активность по сравнению с контрольными образцами. В отличие от этого, предварительное облучение одних липидов и формирование микросом из них и необлученных белков приводило к достоверному ингибированию активности ферментов [13,14].

Таким образом, одной из возможных причин пострадиационных сдвигов активности ДХФИФ- и феррицианидредуктаз может быть ПОЛ микросомальных мембран. Перекиси липидов могут непосредственно воздействовать на каталитические центры фермента, изменять ригидность мембраны, выступать в роли ингибиторов или аллостерических активаторов ферментативной активности [15-17]. Следует также отметить, что работы Б.И. Поливоды с соотр. свидетельствует о развитии процессов ПОЛ после облучения в дозах 25,5 Гр и выше в клеточных мембранах, выделенных из различных объектов [18,19]. При этом характерно, что химические прооксиданты приводят к таким же изменениям электрических и эластомеханических свойств мембраны, которые можно наблюдать после радиационного воздействия на нее [19]. Анализируя причину подобной схожести эффектов влияния прооксидантов и облучения на мембраны клеток, авторы полагают, что основной вклад в развитие пострадиационных патологических процессов клеточной мембраны вносит увеличение концентрации перекисей в липидной составляющей мембранного матрикса после радиационного воздействия.

В связи с вышесказанным, нами был проведен ряд экспериментов по исследованию роли ПОЛ микросомальных мембран в инактивации ДХФИФ- и феррицианидредуктаз при облучении мембранных суспензий быстрыми электронами в дозе 10000 Гр. Развитие процесса ПОЛ регистрировали по накоплению вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида. Как следует из данных, представленных на рис.2, радиационное воздействие приводит к существенному увеличению содержания МДА в исследуемых микросомальных суспензиях. При этом следует отметить, что увеличение концентрации белка мембран приводит к снижению концентрации МДА.

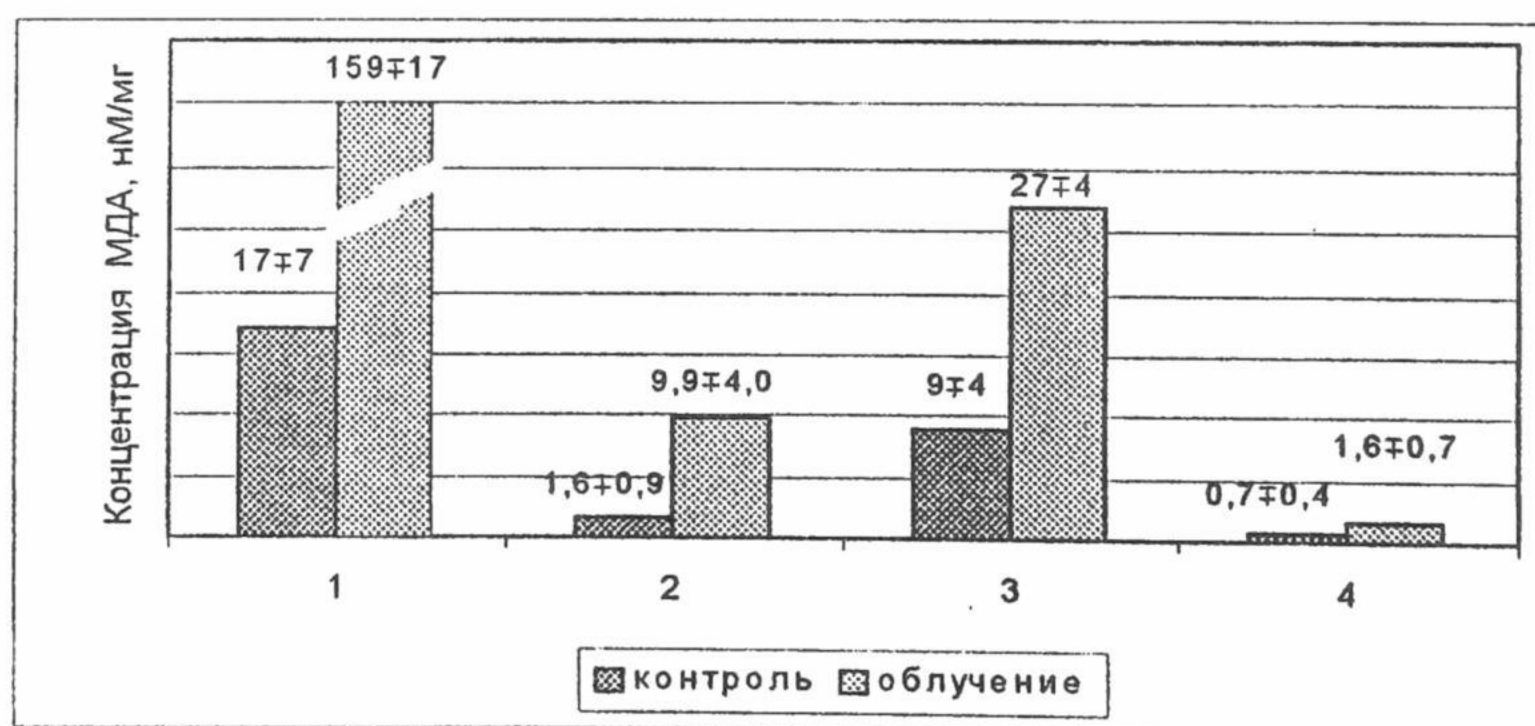


Рис.2. Изменение содержания МДА в облученных препаратах микросом в присутствии тиомочевины. Состав среды суспендирования: 1, 2 – 10 мМ трис-НСl; 3, 4 – 10 мМ трис-НСl + 100мМ тиомочевины. Концентрация белка мембран: 1, 3 – 0,23 мг/мл; 2, 4 – 2,3 мг/мл.

Так для суспензии с концентрацией белка – 0,23 мг/мл наблюдается увеличение содержания МДА по сравнению с необлученным контролем в 9,3 раза. Аналогичный показатель для более концентрированного раствора составляет – 6,2. При введении в среду инкубации антиоксиданта – тиомочевины, образование МДА в значительной степени подавлялось. Из данных, представленных на рис.2, следует, что в присутствии тиомочевины, содержание МДА в облученной суспензии возрастает лишь в 3 раза в случае менее концентрированного раствора микросом. Исследуемый показатель для суспензии с концентрацией

Исследование пострадиационных изменений активности ...

мембранного белка 2,3 мг/мл составляет величину 2,29. Таким образом, наблюдаемое снижение содержания МДА при добавлении 100 мМ тиомочевины свидетельствует о существенном подавлении радиационно-индуцированных процессов ПОЛ микросомальных мембран.

В тоже время исследование пострадиационных изменений ферментативной активности ДХФИФредуктазы не выявило влияния тиомочевины на характер этих изменений. Ингибирование активности данного фермента через 1 ч после облучения в присутствии тиомочевины сохраняется практически на прежнем уровне для обоих типов мембранных суспензий и составляет $\approx 34-35\%$ (табл. 1). В случае феррицианидредуктазы наблюдается модификация радиационного эффекта для суспензии с концентрацией белка 2,3 мг/мл (табл. 1), проявляющаяся в дополнительном снижении ферментативной активности на 16 %.

Изучался также временной аспект развития радиационного поражения ферментов микросомальной мембраны в суспензиях с концентрацией белка 0,23 мг/мл. Как следует из полученных экспериментальных данных (табл. 2) через 24 ч после облучения характер реакций обеих исследуемых оксидоредуктаз на радиационное воздействие отличается.

Таблица 2. Изменение активности оксидоредуктаз в различные сроки после облучения

Условия опыта	Ферментативная активность и ее относительное изменение	ДХФИФ-редуктаза	Феррицианид-редуктаза	ДХФИФ-редуктаза	Феррицианид-редуктаза
Контроль	1	347 ± 47	3669 ± 359	294 ± 20	1791 ± 120
	2	100	100	100	100
10^4 Гр	1	234 ± 12	2419 ± 101	214 ± 16	1530 ± 105
	2	67 ± 3	65 ± 3	73 ± 5	85 ± 6
Контроль + тиомочевина	1	339 ± 29	3280 ± 120	323 ± 30	1450 ± 150
	2	100	100	100	100
10^4 Гр + тиомочевина	1	224 ± 12	2085 ± 100	215 ± 24	768 ± 89
	2	66 ± 3	64 ± 3	67 ± 7	53 ± 6
Время пострадиационной инкубации, час		1		24	

Примечание: 1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

Для ДХФИФ-редуктазы не регистрируется статистически достоверное изменение ферментативной активности. В отличие от нее, в случае феррицианидредуктазы наблюдается уменьшение ингибирования на 20%. Внесение тиомочевины в инкубационную среду до облучения приводит к обращению наблюдаемого эффекта (табл. 2). Через 24 ч после радиационного воздействия активность феррицианидредуктазы дополнительно ингибируется на 11%. Пострадиационная активность ДХФИФредуктазы в указанном временной интервале в пробах со 100 мМ тиомочевинной остается практически на том же уровне.

При сопоставлении данных, представленных на рис.2 и в табл.2, становится очевидно, что радиационно-индуцированное изменение активности обоих исследуемых микросомальных ферментов не коррелирует с изменением содержания МДА через 24 ч после облучения пучком ускоренных электронов. В облученных пробах с концентрацией МДА – 159 нМ/мг белка (рис.2) ингибирование ДХФИФ- и феррицианидредуктаз составляет 27 и 15% соответственно (табл. 2). В то же время в суспензиях с концентрацией МДА – 27 нМ/мг белка (рис.2) наблюдается значительно большее снижение пострадиационной активности данных ферментов. Активность ДХФИФредуктазы при добавлении тиомочевины уменьшается на 33%, для феррицианидредуктазы этот показатель составляет 47% (табл. 2). Внесение тиомочевины в концентрации 100 мМ, существенно подавляющей процессы ПОЛ микросомальных мембран, что и регистрируется по значительному снижению содержания МДА (рис.2), теоретически должно было бы оказывать на исследуемые оксидоредуктазы протекторное действие. Однако, данное предположение верно только для случая, когда ключевую роль в радиационном поражении микросомальных ферментов играют именно липидные перекиси. Полученные экспериментальные данные (табл. 2) по ингибированию пострадиационной активности ДХФИФ- и феррицианидредуктаз в присутствии тиомочевины позволяют сделать вывод, что процессы ПОЛ могут воздействовать на эти мембранные ферменты лишь косвенным образом, а основной вклад в поражающее действие радиации вносят иные молекулярные механизмы

взаимодействия облучения с биомембранами, реализуемые опосредованно, через изменение структурно-динамического состояния липидной фазы микросом.

Роль вязкости мембранных липидов в регуляции активности мембраносвязанных ферментов уже обсуждалась нами при интерпретации механизмов модификации радиационного воздействия на Ca^{2+} -АТФазу тений эритроцитов [20]. Несомненно, что динамические свойства непосредственного липидного окружения мембранных ферментов накладывают свой отпечаток на функционирование белковых макромолекул. При этом следует отметить, что физико-химические характеристики аннулярного кольца определяются не только структурой составляющих его липидов, но и структурой внутримембранной части интегрального белка, вокруг которого данное кольцо формируется [21]. Молекулярные взаимодействия погруженного в мембрану фрагмента интегрального белка и липидов непосредственного его окружения (белок-липидные взаимодействия) вносят свой вклад в регуляцию активности мембраносвязанных ферментов.

Механизм подобной регуляции, в общих чертах, сводится к тому, что под действием различных факторов может изменяться структурная упорядоченность липидов аннулярного кольца. Такое изменение вязкости этой липидной области влечет за собой изменение характера белок-липидных взаимодействий, и, как следствие этого, переход мембраносвязанного фермента из прежней функционально-активной конформации в новую конформацию с измененными каталитическими свойствами. Таким образом, посредством изменения динамических свойств липидного микроокружения мембранных белков, осуществляется локальная липидная регуляция ферментативной активности. При этом следует отметить, что пограничные липиды могут оказывать воздействие на функционирование мембраносвязанных ферментов как за счет кулоновских взаимодействий в области заряженной «головки» фосфолипидов, так и за счет слабых гидрофобных взаимодействий, возникающих между иммобилизованными ацильными цепями липидов и внутримембранными фрагментами интегральных белков [22].

В связи с вышеизложенным исследовали действие мембранотропных агентов – тритона X-100, глутарового альдегида и бутанола на активность микросомальных оксидоредуктаз при облучении быстрыми электронами в дозе 10000 Гр. Предварительно было изучено влияние различных концентраций тритона X-100 и глутарового альдегида на функционирование этих ферментов в норме [7]. Выбор именно таких агентов определялся тем, что для них характерно разнонаправленное действие на вязкость липидной фазы клеточных мембран.

Как следует из данных табл. 3 внесение тритона X-100 в микросомальные суспензии модифицирует эффект воздействия облучения на активность исследуемых оксидоредуктаз. Пострадиационное изменение активности ДХФИФредуктазы в присутствии тритона X-100 выражено в гораздо большей мере и составляет 51% ингибирования, в отличие от 35%-ного ингибирования, наблюдаемого в отсутствие детергента. Таким образом, внесение тритона X-100 в среду инкубации в концентрации – 0,05 %, усиливает эффект лучевого воздействия $\approx$ в 1,5 раза. Аналогичная ситуация наблюдается и в случае радиационного поражения феррицианидредуктазы микросомальных мембран, предварительно проинкубированных с детергентом. При этом следует отметить, что тритон X-100 сенситивизирует данный фермент к действию облучения в существенно большей степени, чем ДХФИФредуктазу. Как видно из данных табл. 3 радиационная инактивация феррицианидредуктазы достигает при добавлении данного детергента величины 64%. В то же время немодифицированное тритоном X-100 облучение пучком ускоренных электронов, приводит к уменьшению ферментативной активности лишь на 38%. Полученные экспериментальные данные указывают на увеличение радиационного эффекта в присутствии данного детергента в 1.7 раза.

Вышеописанные явления хорошо укладываются в рамки той гипотезы о механизме модифицирующего действия тритона X-100, которая выдвигалась при интерпретации радиационного поражения Ca^{2+} -АТФазы эритроцитарных мембран, обработанных этим детергентом [20]. Очевидно, что в основе молекулярных механизмов повреждающего действия радиации в случае микросомальных оксидоредуктаз, также лежит изменение структурно-динамических свойств ближайшего липидного окружения данных мембраносвязанных ферментов, так как модификация этих свойств тритоном X-100 приводит к усилению радиационной инактивации. Тритон X-100, встраиваясь в микросомальные мембраны и модифицируя характер свойств ферменту в норме белок-липидных взаимодействий, дестабилизирует белковую макромолекулу, что влечет за собой снижение радиорезистентности. По-видимому, действие детергента, опосредованное ближайшим липидным окружением фермента, сводится к индуцированию конформационных изменений белковой глобулы. Измененная конформация, хотя и отличается большей каталитической активностью, в то же время характеризуется гораздо меньшей устойчивостью к повреждающему действию радиации (табл. 3).

Следует также отметить, что согласно имеющимся представлениям о роли липидов аннулярного кольца, эти липиды могут служить аллостерическими эффекторами [23]. Вытеснение тритоном X-100 липидов – ингибиторов из непосредственного окружения белковой молекулы могло бы, по принципу аллостерической регуляции, приводить к изменениям структурно – стерических свойств активного центра оксидоредуктаз, направленным на усиление каталитической активности. Как известно, взаимодействие пространственно разобщенных аллостерического и активного центров фермента может осуществляться лишь посредством конформационных изменений молекулы белка в целом. Возникающая при нарушении исходной

Исследование пострадиационных изменений активности ...

аллостерической регуляции под влиянием тритона X-100, измененная конформация оксидоредуктаз обладает большей чувствительностью к действию быстрых электронов. Однако, предположения о вмешательстве детергента в механизм аллостерической регуляции оксидоредуктаз микросомальных мембран требуют дополнительной экспериментальной проверки.

Таблица 3. Изменение пострадиационной активности микросомальных оксидоредуктаз в присутствии мембранотропных агентов

Мембранотропный агент	Условия опыта	Ферментативная активность и ее относительное изменение	ДХФИФ-Редуктаза	Феррицианид-редуктаза
Без добавки	Контроль	1	108,3 ± 0,8	1019 ± 83
		2	100	100
	10 ⁴ Гр	1	70,4 ± 3,2	632 ± 20
		2	65 ± 3	62 ± 2
Тритон X-100	Контроль	1	120 ± 1,0	1783 ± 107
		2	100	100
	10 ⁴ Гр	1	59 ± 2,4	642 ± 36
		2	49 ± 2	36 ± 2
Глутаровый альдегид	Контроль	1	107 ± 7	1015 ± 30
		2	100	100
	10 ⁴ Гр	1	60 ± 3	325 ± 30
		2	56 ± 3	32 ± 3
Бутанол	Контроль	1	172 ± 7	1421 ± 123
		2	100	100
	10 ⁴ Гр	1	94 ± 3	526 ± 65
		2	55 ± 2	37 ± 5

Примечание: 1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

Ферментативную активность измеряли через 1ч после облучения в пробах с концентрацией белка – 0,23 мг/мл.

Действие глутарового альдегида на клеточную мембрану, как уже упоминалось нами в работе [20], противоположно влиянию тритона X-100. Из данных табл. 3 видно, что, несмотря на то, что данный «сшивающий» мембранные белки агент, сам по себе угнетает ферментативную активность оксидоредуктаз [7], его модифицирующее воздействие на ДХФИФредуктазу при облучении выражено слабо. В присутствии глутарового альдегида ингибирование достигает 44%, т.е. увеличивается на 9% по сравнению с величиной радиационной инактивации в микросомальных суспензиях без добавки модификатора. В то же время чувствительность феррицианидредуктазы к облучению пучком ускоренных электронов, под влиянием глутарового альдегида существенно возрастает. При наличии в среде инкубации микросомальных суспензий 0,001%-ной концентрации глутарового альдегида, пострадиационное уменьшение активности данного фермента, достигает 68%. Таким образом, в случае феррицианидредуктазы, под действием модификатора наблюдается дополнительная радиационная инактивация на 30 %. Из данных табл. 3 следует, что эффект облучения, полученный в присутствии глутарового альдегида, для феррицианидредуктазы выражен в 1,5 раза больше, чем для ДХФИФредуктазы.

Как уже упоминалось [20], глутаровый альдегид, взаимодействуя с N-концевыми фрагментами мембранных белков, структурирует клеточную мембрану, модифицируя за счет этого характер белок-липидных взаимодействий. Эта модификация влияет, главным образом, на слабые, дисперсионные взаимодействия, ответственные за иммобилизацию ацильных цепей липидов, и приводит к более плотной упаковке «хвостов» жирных кислот в белково-липидном матриксе. За счет этого наблюдается усиление дисперсионных взаимодействий и ограничение всех видов подвижности белка в клеточной мембране. Молекулярный механизм влияния глутарового альдегида на активность микросомальных оксидоредуктаз сводится, по-видимому, к тому, что в структурированной модификатором мембране молекула белка, под действием увеличившихся дисперсионных сил, претерпевает конформационный переход. Конформационные изменения

распространяются, в том числе, и на активный центр, модулируя его структурно-стерические свойства таким образом, что каталитическая активность фермента уменьшается [7]. Такая измененная конформация белковой молекулы, очевидно, не является нативной, свойственной белку при нормальных условиях его функционирования в клеточной мембране. Поэтому чувствительность оксидоредуктаз к поражающему действию радиации под влиянием глутарового альдегида увеличивается, что особенно ярко выражено в случае феррицианидредуктазы. При этом следует отметить, что за счет «сшивания» N-концевых фрагментов мембранных белков и усиления дисперсионных взаимодействий с ацильными цепями липидов, молекула фермента, при ограничении различных видов подвижности белка в мембране, как бы «фиксируется» в данной измененной, сенсibilизированной к радиационному воздействию конформации. Подобная стабилизация радиочувствительной конформации оксидоредуктаз под влиянием глутарового альдегида, может вносить дополнительный вклад в снижение радиорезистентности этих мембраносвязанных ферментов.

В отличие от глутарового альдегида, мембранотропное действие бутанола на клеточные мембраны характеризуется снижением вязкости липидной фазы в присутствии данного органического растворителя. Как следует из данных табл. 3 внесение бутанола в инкубационную среду в концентрации 0,3% приводит к активации ферментативной активности оксидоредуктаз микросомальных мембран, которая более выражена для ДХФИФредуктазы. Под влиянием бутанола активность данного фермента возрастает на 59%, т.е. в 1,6 раза. В случае феррицианидредуктазы наблюдается увеличение активности на 39%. Таким образом, активирующий эффект бутанола для данного фермента в 0,7 раза меньше, чем для ДХФИФредуктазы.

Вышеописанное влияние бутанола на функционирование этих мембраносвязанных ферментов может объясняться тем, что в соответствии с данными литературы [24], органические растворители сами по себе взаимодействуют с белками за счет образования водородных связей с соответствующими группами, что сопровождается, в частности, разрывом гидрофобных контактов и водородных связей в белковой глобуле. Результатом этого может быть «разрыхление» молекулы энзима, сопровождающееся увеличением его каталитической активности.

Облучение микросомальных суспензий быстрыми электронами в дозе 10000 Гр резко изменяет наблюдаемую картину. Модификация радиационного воздействия 0,3%-ной концентрацией бутанола приводит к дополнительной инактивации исследуемых оксидоредуктаз, причем радиационный эффект более выражен в случае феррицианидредуктазы (табл. 3). Для ДХФИФредуктазы ингибирование пострадиационной активности в присутствии бутанола достигает 45%, т.е. увеличивается на 10% по сравнению немодифицированным действием облучения. Радиационная инактивация феррицианидредуктазы, при предварительном внесении в инкубационную среду органического растворителя, составляет 63%, таким образом наблюдается дополнительное уменьшение ферментативной активности на 25%. Из полученных экспериментальных данных следует, что радиационный эффект, наблюдаемый в присутствии бутанола, для феррицианидредуктазы в 1,4 раза больше по сравнению с ДХФИФредуктазой. При этом следует отметить, что дополнительное пострадиационное уменьшение активности феррицианидредуктазы, вызванное влиянием органического растворителя, в 2,5 раза больше аналогичного показателя другой исследуемой оксидоредуктазы.

Действие бутанола на липидную фазу клеточных мембран в определенной мере схоже с влиянием неионогенного детергента тритона X-100, за исключением невозможности встраивания данного органического растворителя в белково-липидный матрикс. При внесении бутанола в инкубационную среду микросомальных суспензий происходит ослабление липид-липидных взаимодействий клеточной мембраны, что приводит к уменьшению вязкости липидной фазы. Подвижность ацильных цепей белково-липидного матрикса вследствие этого возрастает. Можно предположить, что подобные изменения характера липид-липидных взаимодействий генерализуются и оказывают определенное влияние на непосредственное липидное окружение исследуемых оксидоредуктаз. Конечным результатом вышеописанных процессов является ослабление взаимодействия белковой макромолекулы с липидами аннулярного кольца, приводящее к увеличению внутримолекулярной подвижности глобулы белка. Конформационные переходы, которые может претерпевать при этом молекула фермента, приводят, по-видимому, к такому изменению ее структурной организации, что радиорезистентность белка уменьшается. Возможен также и другой механизм радиационной инактивации исследуемых оксидоредуктаз. Увеличение внутримолекулярной подвижности белковой молекулы служит основой для индуцируемых облучением конформационных изменений. Радиационные повреждения независимо от места их возникновения в белковой глобуле, за счет возросшей внутримолекулярной подвижности, преобразуют ее структурную организацию таким образом, что в конечном итоге повреждают активный центр фермента, вызывая уменьшение его каталитической активности. Вышеописанный механизм мог бы реализовываться при непосредственном действии быстрых электронов на мембраносвязанные белки в присутствии бутанола.

ВЫВОДЫ

В поражающем действии радиации на ДХФИФ- и феррицианидредуктазу микросомальных мембран процессы ПОЛ не играют существенной роли. Механизм влияния быстрых электронов на функционирование исследованных ферментных систем реализуется, главным образом, через липидную фазу внутриклеточных

мембран. К дополнительным факторам инактивации оксидоредуктаз относятся как непосредственное воздействие излучения на них, так и опосредованное продуктами радиолиза воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chandra S., Stefani S. // *Int. J. Radiat. Biol.*-1981.-V.40, N3.- P.305-311.
2. Павловская Т.Е., Тонгур А.М., Волкова М.С. // *Информ. бюл. Науч. совета АН СССР по пробл. радиобиологии.*-1983.-N 27.- С.32-34.
3. Рыскулова С.Т. Радиационная биология плазматических мембран.- М.: Энергоатомиздат, 1986.- 128 с.
4. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Радиационная биофизика – М.: Изд-во МГУ, 1979.- 240с.
5. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1987. – 391 с.
6. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // *J.Biol.Chem.*-1951.-V.193, N1.- P.265-285.
7. Ткаченко В.Н., Горбенко Г.П., Курилко С.А., Товстяк В.В. // *Укр. биохим. журн.*- 1996.-Т.62, № 4.- С. 105-108.
8. Кокунин В.А.// *Укр. биохим. журн.*- 1975.-Т. 47.- С. 776-791.
9. Довгий И.Е., Фоменко Б.С., Акоев И.Г. // *Радиобиология.*-1983.-Т.23, вып.1.-С.71-74.
10. Тонгур А.М., Павловская Т.Е., Губина Н.Б. // *Радиобиология.*-1983.-Т.23.-С.35-38.
11. Strussle M., Stark G., Wilhelm M.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1987.-V.51.- P.265-286.
12. Yukawa O., Nakazava T.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1980.-V.37.- P.621-631.
13. Yukawa O., Nagatsuka O., Nakazava T.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1983.-V.43.- P.391-398.
14. Yukawa O., Miyahara M., Shiraishi N., Nakazava T.// *Int. J. Radiat. Biol.*-1985.-V.48.- P.107-115.
15. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: - Наука, 1972.-252 с.
16. Каган В.Е., Котелевцев С.В., Козлов Ю.П. // *Труды АН СССР*, 1974.-Т. 217, № 1.-С. 213-216.
17. Туровецкий В.Б. Перекисное окисление липидов и функционирование дыхательной цепи митохондрий. Автореф. дис... канд. биол. наук.- М.: - МГУ, 1975.
18. Поливода Б.И., Конев В.В // *Радиобиология.*-1986.-Т.26, N 6.- С.803-805.
19. Поливода Б.И. Биофизические аспекты радиационного поражения клеточных мембран в ранние сроки после облучения. Автореф. докт. дис.- Обнинск, 1982.-43 с.
20. Финашин А.В., Товстяк В.В.// *Биофизический вестник*, 1999.- Вып.4(2).-С.45-52.
21. Текучесть мембраны в биологии: концепции мембранной структуры / Под ред. Р. Элойа.- Киев.: Наук. думка, 1989.-312 с.
22. Дергунов А.Д., Капрельянц А.С., Островский Д.Н. // *Усп.биол.химии.*-1984.-Т.25.-С.89-109.
23. Jurtshuck P., Sekuru I., Green D.E. // *Biochem.and Biophys. Res. Commun.*- 1961.- V 6., №1.-P.76-81.
24. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма.- М.:Мир, 1966.- 862 с.

УДК 577.3

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ В ЗОНЕ ЧЕРНОБЫЛЯ НА СТРУКТУРУ ДНК.

С. В. Корнилова

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, 310164, Харьков, пр. Ленина, 47, E-mail: kornilova@ilt.kharkov.ua

Методами вискозиметрии, термической денатурации, ИК-спектроскопии, электрофореза изучены свойства ДНК животных, подвергавшихся длительному облучению в условиях Чернобыльской зоны. В препаратах ДНК, выделенных из печени и селезенки, обнаружено аномально большое количество низкомолекулярной ДНК, количество которой увеличивается в последующих поколениях животных, а также с возрастом животного. Особенно сильно этот эффект выражен для ДНК, выделенной из печени. Показано, что низкомолекулярная ДНК обогащена ГЦ-парами и состоит из четырех фракций: 1) ~ 500 пар нуклеотидов (п.н.), 2) ~ 1,5~2 тыс. п.н., 3) ~ 4~5 тыс. п.н. и примеси с ~ 20 тыс. п.н. Обнаружено также, что препараты ДНК, полученные из тканей опытных животных, содержат в десятки раз большее количество железа, цинка, селена и других элементов по сравнению с контрольными препаратами. Добавление Cu в пищу животных, постоянно проживающих в зоне, усиливает влияние радиации. Модельные эксперименты при комбинированном воздействии облучения и ионов Cu на ДНК из лимфоцитов крови обнаружили синергизм их действия. В сравнении с ионами меди цинк оказывает меньшее воздействие на физико-химические свойства ДНК. Результаты экспериментов по изучению свойств ДНК из регенерировавших клеток печени после операции гепатэктомии у длительно облученных животных подтверждают увеличение замаскированных повреждений ДНК в результате облучения, что проявляется в появлении НМ фракции ДНК, количество которой достигает 65%. Предложена модель повреждения ДНК при действии малых доз ионизирующего излучения и ионов Mt^{2+} .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, хроническое облучение, низкомолекулярная фракция, вискозиметрия, ИК-спектроскопия, ионы металлов

В настоящее время актуальным является изучение длительного радиационного воздействия небольшой интенсивности на живой организм. Особенно существенны в этой связи данные о пострадиационных изменениях ДНК животных, помогающие понять механизмы повреждения генетического аппарата [1, 2]. Такие исследования в реальных условиях усложняются факторами, которые способны изменять действие радиации на геном животных. В частности, это могут быть ионы металлов, которые, как известно, имеют высокие константы связывания с нуклеиновыми кислотами и способны модифицировать действие радиации на ДНК [3, 4]. Особая роль в радиационном повреждении связей ДНК-белок и структуры хроматина отводится ионам Cu^{2+} . Частично это обусловлено тем, что участки ДНК, связанные с Cu^{2+} , становятся более радиочувствительными [5].

В связи с изложенным, нами изучалось влияние постоянного внешнего и внутреннего облучения, небольшой интенсивности, а также ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} на структуру ДНК белых беспородных крыс нескольких поколений, постоянно находившихся в Чернобыле. Для выяснения механизмов разрушения ДНК в этих условиях были проведены модельные эксперимент по облучению животных и культуры клеток лимфоцитов в присутствии ионов Cu^{2+} .

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Использовали белых беспородных крыс из четвертого - седьмого поколений различных возрастных групп, находившихся в зоне Чернобыля 1991-1992 гг. Первое поколение было размещено в зоне в марте 1989 г. Животные получали пищу, взятую из зоны. Специфическая активность дневного рациона, содержащего ^{134}Cs , ^{137}Cs , ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{40}K , составляла 80÷154 Bq/день. В течение жизни животные подвергались действию хронического комбинированного излучения. Полная доза внешнего γ излучения не превышала 2 cGy в течение жизни животных. В месте содержания животных доза γ -компоненты составляла 20-27 μ г/час. Специфические активности элементов, инкорпорированных в кости и печени животных не превышали 40 Bq/кг. Дозовые нагрузки от внутреннего облучения значительно превосходили дозы внешнего. Следует отметить, что дополнительное действие могли оказывать горячие частицы, учет которых представляет значительные трудности. Контролем служили животные тех же возрастов, содержащиеся в Харьковском виварии. Исследовали физико-химические свойства ДНК, выделенной из печени и селезенки животных. Получение ДНК и ее очистку производили несколькими методами [7, 8]. Примеси белка и РНК не превышали 1 и 3% соответственно. Величина гипохромного эффекта для

полученных образцов высокомолекулярных фракций ДНК контрольных и опытных животных составляла 38-40%. Молекулярную массу (М) ДНК определяли по значениям характеристической вязкости макромолекул $[\eta]$, измеряемой с помощью вискозиметра Зимма-Крозера [9]. Из сравнения молекулярных масс двунитевой и денатурированной ДНК рассчитывали число одонитевых разрывов в макромолекулах, f , [10]. Расчеты величины М производили по эмпирическим уравнениям [11]:

$$[\eta] = 1,05 \cdot 10^{-7} M^{1,32}; M < 2 \cdot 10^6$$

$$[\eta] = 6,9 \cdot 10^{-4} M^{0,7}; 2 \cdot 10^6 < M < 130 \cdot 10^6$$

В модельных экспериментах облучение животных и культуры клеток лимфоцитов проводили так, как это описано в [12, 4]. Микроэлементный состав образцов ДНК анализировали с помощью ядерно-физических методов - резерфордского обратного рассеяния ионов гелия и характеристического рентгеновского излучения, возбуждаемого протонами [13]. Кривые плавления регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS фирмы «Carl Zeiss», Jena, с абсолютной ошибкой в измерении температуры, не превышающей 0,3 °С, ИК-спектры регистрировали на инфракрасном спектрофотометре JR-20, «Carl Zeiss», Jena, с использованием герметических кювет при температуре $t=26^\circ\text{C}$. Тонкие пленки ДНК увлажняли и дейтерировали аналогично тому, как это было сделано в работе [14]. Среднее число молей воды на один моль нуклеотидов ДНК (n) определяли спектрофотометрически по полосам поглощения $\text{H}_2\text{O } \nu = 3400 \text{ см}^{-1}$ и $\text{PO}_2^{2-} \nu = 1224 \text{ см}^{-1}$ с соответствующими коэффициентами поглощения $\epsilon_{3400} = 101 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$, $\epsilon_{1224} = 520 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$. Определенную степень увлажнения пленок (относительная влажность, О.В., исследованных препаратов составляла 5-96%) получали с помощью набора насыщенных растворов солей. Сравнительный анализ проводили построением зависимостей частот и интенсивностей полос поглощения азотистых оснований и сахарофосфатного остова от числа молекул воды на нуклеотид. Интенсивность полос поглощения измеряли в относительных единицах $R = D_i/D_0$ где D_i , D_0 -оптические плотности в максимуме поглощения при i -ой и минимальной (5%) О.В. соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В процессе исследований было обнаружено, что ДНК, полученная из тканей черномыльских животных, состоит из 2-х фракций - высокомолекулярной (ВМ) и низкомолекулярной (НМ) - с молекулярным весом $\sim 10^7$ и 10^5 Да соответственно. Содержание НМ ДНК в первых исследованных поколениях животных составляло $\sim 25\%$ и увеличивалось с возрастом и номером поколения. Как можно видеть (рис. 1) для 12-месячного образца из печени F_6 и 6-месячного F_7

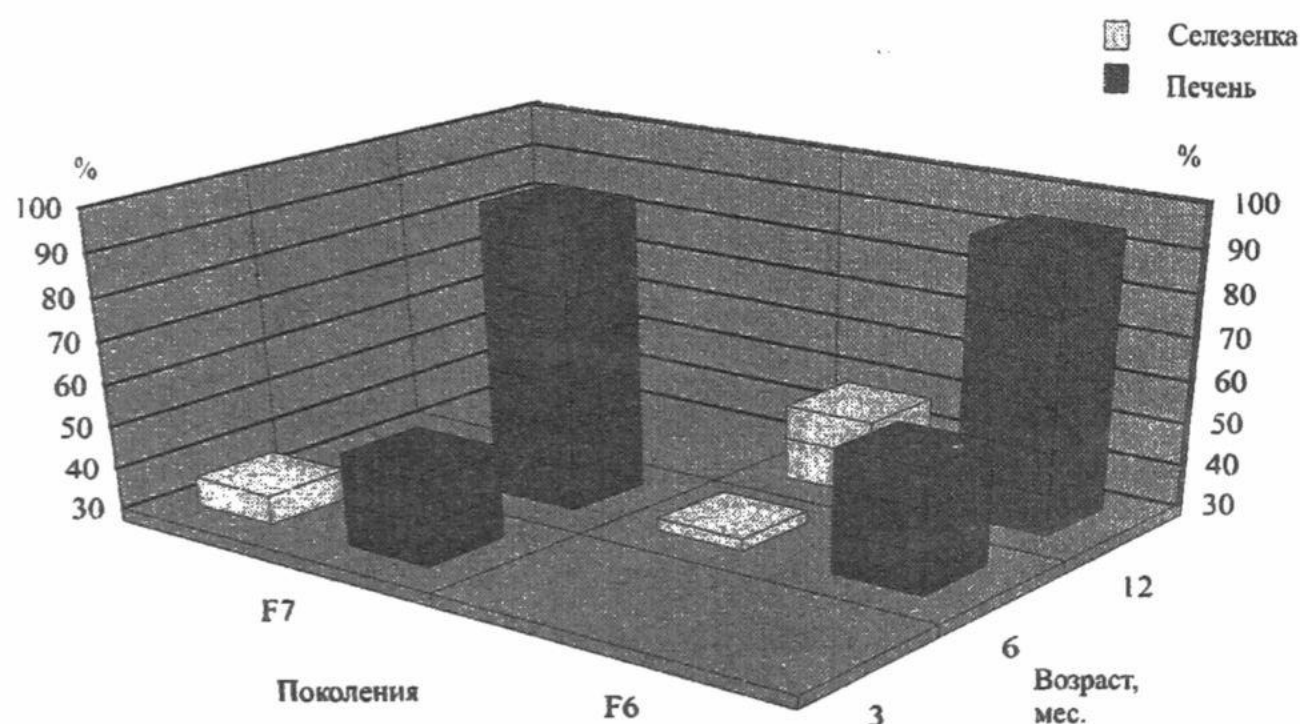


Рис. 1 Содержание НМ ДНК в 7- и 6-м поколениях

почти вся ДНК состоит из НМ-фракции. В то же время в контрольных препаратах как из печени, так и из селезенки содержание НМ фракции не превышало 4-6%. По данным вискозиметрических измерений, молекулярная масса НМ ДНК, лежала в пределах $3 \div 6 \cdot 10^5$ Да. В отличие от этого, для фракции ВМ ДНК наблюдалось существенное изменение молекулярной массы с возрастом и номером поколения животных разного возраста Эти данные приведены в таблице 1.

Особенно отчетливо это проявляется для ДНК из печени, масса которой изменяется более чем на порядок, что резко отличается от контрольных значений. Приведенные в таблице данные могут быть удобными характеристиками радиационных повреждений генетического аппарата клеток, определяющими возрастные изменения ДНК и ослабление процессов репарации в поколениях животных. Дополнительной характеристикой может быть число одонитевых разрывов, число которых для ВМ ДНК составляло 4 на молекулу, а в контроле их количество не превышало $0,3 \div 0,5$. Увеличение количества НМ ДНК и уменьшение молекулярной массы ВМ ДНК обусловлены, по-видимому, накоплением одно- и двунитевых разрывов в макромолекулах. Этот результат коррелирует с

данными работы [15] по увеличению числа хромосомных aberrаций в ряду поколений животных, постоянно находящихся в зоне ЧАЭС, и результатами исследований [1,2] по

Поколение	Орган	Возраст (мес.)			
		3	6	12	24
F4	П	—	—	1,1	0,11
F5	П	—	—	0,14	—
F6	П	2,5	1,5	0,09*	—
	С	—	8,5	2,9	—
F7	П	0,4	0,08*	—	—
	С	4,9	43,1	—	—
Контроль	П	3 - 5,5			
	С	4,6 - 6,2			

* - состав всего образца ДНК.

Таблица 1 Изменение молекулярной массы ДНК (ВМ) высоко -молекулярной фракции («средневязкостные» значения $M \cdot 10^7$ Да) из печени (П) и селезенки (С) животных различных возрастных групп (3-24 месяцев) и поколений (F4-F7).

накоплению с возрастом скрытых генетических повреждений в печени животных, подвергавшихся длительному γ -облучению.

Для более полной характеристики обеих фракций были проведены исследования методом электрофореза и пульс-фореза, которые выявили наличие 4-х подфракций в НМ ДНК. Разделение ДНК на несколько фракций и подфракций может быть обусловлено, с одной стороны, стимуляцией некоторых рестриктаз, дающих данный набор фрагментов, что было показано в работах [16], а, с другой, - влиянием радиации на определенные слабые участки молекул.

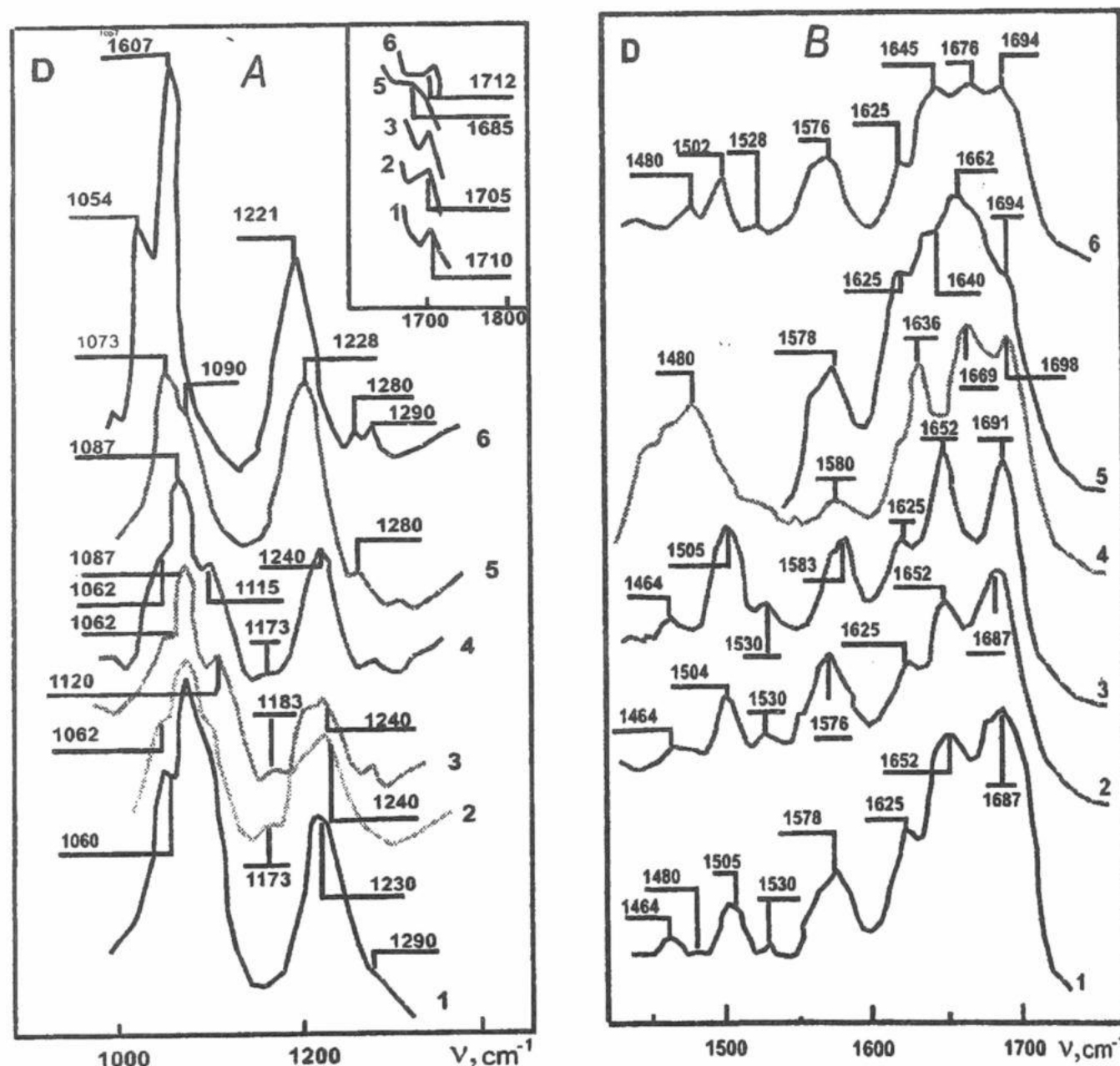


Рисунок. 2. ИК-спектры пленок высокомолекулярной (1) и низкомолекулярной (2) фракций ДНК выделенной из печени 6-месячных подопытных животных шестого поколения; polydG-polydC (3), polydA-polydT (4), денатурированная (5) и нативная (6) ДНК контрольных образцов в H_2O (1000-1300 cm^{-1}) (А) и D_2O (1400-1800 cm^{-1}) (В) для 96% относительной влажности.

Анализ ИК-спектров ВМ ДНК, НМ ДНК, poly dG-poly dC, poly dA-poly dC, денатурированной ДНК и контрольной ДНК (рис. 2) показал, что ВМ ДНК черномыльских животных имеет частичные нарушения во вторичной структуре. Об этом свидетельствуют смещения полосы поглощения рибозы до 1060 cm^{-1} , антисимметричных колебаний фосфатов до 1230 cm^{-1} . Наблюдается ряд отличий в области поглощения азотистых оснований, которые могут свидетельствовать о нарушении в связях, образующих АТ-пары: смещение полосы поглощения C=O колебаний G, T $\nu=1686$ cm^{-1} (нДНК 1766 cm^{-1}), уменьшение интенсивности C=O колебаний T $\nu=1690$ cm^{-1} (нДНК 1694 cm^{-1}), отсутствие полосы C=N A,T (нДНК 1480 cm^{-1}). Как можно видеть, частоты характеристических полос поглощения НМ ДНК существенно отличаются от полос поглощения денатурированной ДНК и poly dA-poly dT. При этом наблюдается согласование со спектром poly dG-poly dC. О нарушении структуры НМ ДНК свидетельствует также смещение частот характеристических полос поглощения сахарофосфатного остова к значениям, характерным для разупорядоченного состояния макромолекул: 1240 cm^{-1} (антисимметричные колебания фосфатов), 1060 cm^{-1} (рибоза). О нарушении структуры НМ ДНК

Влияние длительного хронического облучения...

свидетельствует также отсутствие гипохромного эффекта, который для нативной ДНК наблюдается в области поглощения азотистых оснований при относительной влажности 64-76%, когда формируется 2-спиральная структура биополимера (рис. 3.). Таким образом можно заключить, что НМ ДНК находится в частично денатурированном состоянии и обогащена GC-парами.

Результаты, полученные методом термической денатурации подтверждают эти данные [13]. Так в отличие от контрольных образцов, характеризующихся S-образной кривой плавления, ДНК, выделенная из тканей черномыльских животных, имеет в случае ВМ ДНК 2-ступенчатую кривую плавления, или в случае НМ ДНК, характеризуется непрерывным изменением гиперхромизма (h) во всем интервале плавления при пониженном его значении: $h \sim 15\%$. Причиной этого является наличие нескольких подфракций, которые имеют свою температуру плавления и частично разрушены, что ведет к размытию всего интервала плавления, а для ВМ ДНК - смещению НМ и ВМ ДНК, дающих две степени перехода. При этом первая ступень также размыта, что отражает неоднородность ее молекулярной массы и нарушение двойной спирали.

Существенные изменения наблюдаются и в микроэлементном составе образцов ДНК, полученных из тканей черномыльских животных. Данные, полученные с помощью ядерно-физических методов исследования [13], свидетельствуют о существенно большем содержании в опытных образцах ДНК: Zn - $\sim$ в 40 раз, Se - $\sim$ в 60 раз, Fe - $\sim$ в 24 раза, Cu, Sr $\sim$ в 5 раз, Cd. (рис. 4).

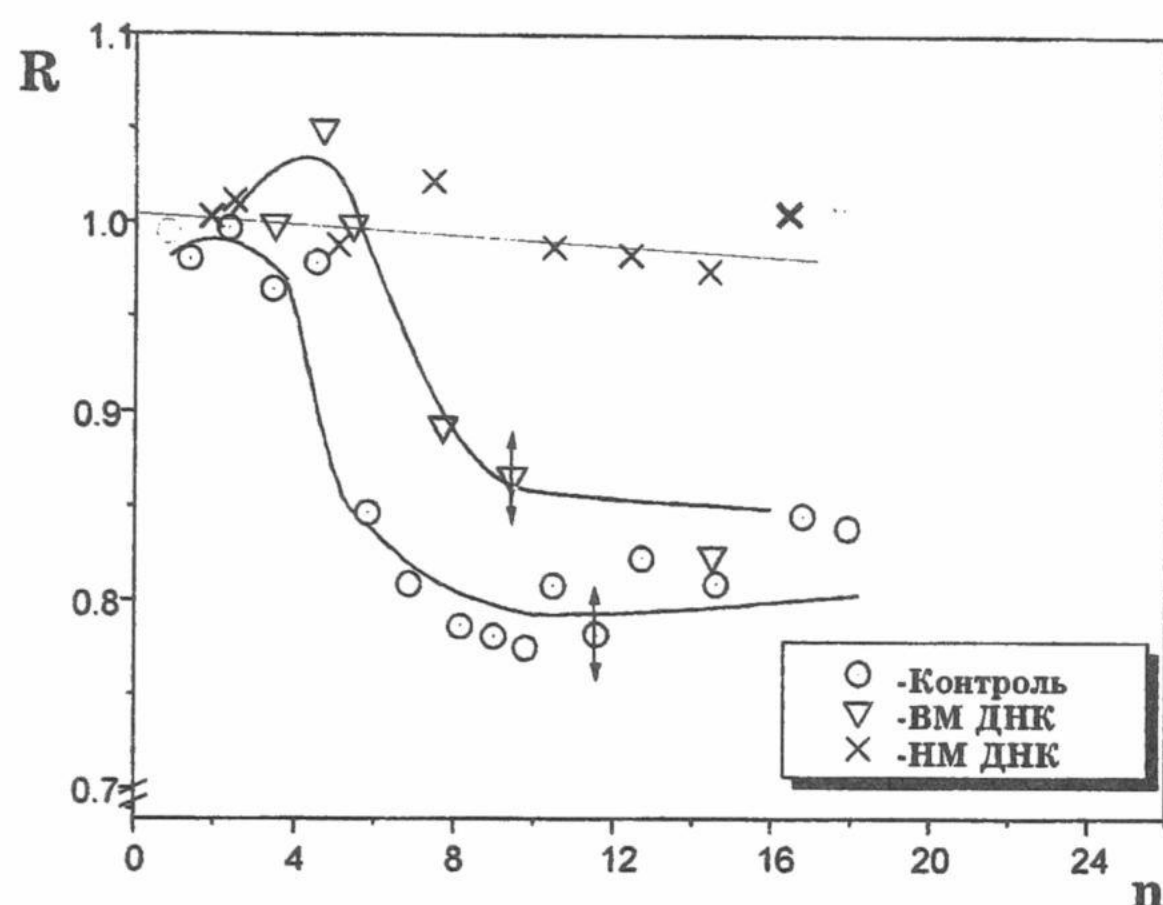


Рисунок 3. Зависимость интенсивности (R) от числа сорбированных молекул воды на нуклеотид для полосы поглощения $C=N$ групп гуанина в спектре ВМ ДНК, НМ ДНК и ДНК из тканей контрольных животных.

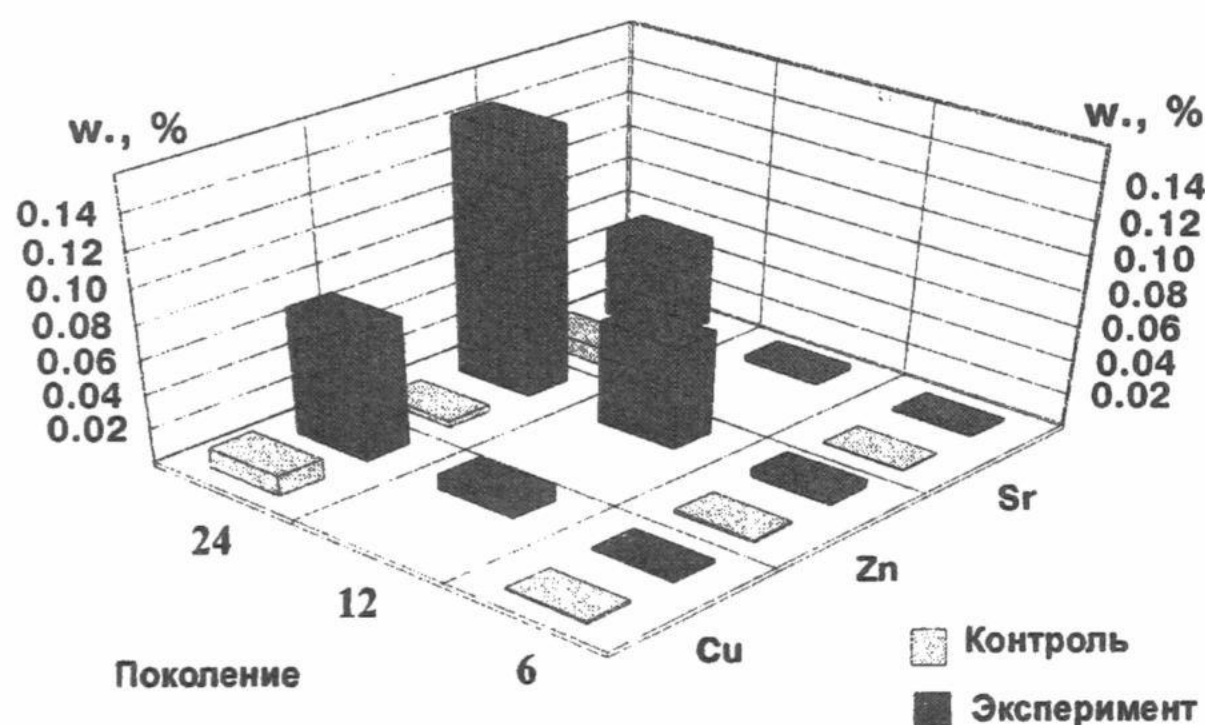


Рис. 4. Изменение содержания металлов в образцах ДНК.

ДНК [4, 5], вследствие чего их избыточное содержание может явиться одной из причин накопления повреждений в молекулах ДНК и образования НМ фракции при выделении препарата. Для выяснения механизмов изученных явлений интересно привлечь результаты модельных экспериментов. Так, при облучении в дозе 1 Gy культуры лимфоцитов в присутствии ионов Cu^{2+} в концентрации $10^{-4}M$ было установлено, что существенно увеличивался выход хромосомных aberrаций по сравнению с их количеством, полученным при облучении культуры без ионов Cu^{2+} , и числом aberrаций, вызванных действием меди в отсутствие облучения. Как видно, проявлялись эффекты синергизма, при которых суммарное количество aberrаций, полученных при действии ионов Cu^{2+} и облучения в отдельности, было значительно меньше числа aberrаций, полученных при одновременном воздействии Cu^{2+} и облучения (рис. 5) [4]. Молекулярная масса ДНК, выделенной из клеток, облученных в присутствии Cu^{2+} , была также существенно ниже, а макромолекулы характеризовались в 1,5 раза большим числом одонитевых разрывов. Такое действие ионов Cu^{2+} можно объяснить, если учесть, что константы связывания Cu^{2+} с ДНК велики и

Избыточное содержание металлов может свидетельствовать о нарушении ионного обмена и злокачественном перерождении в тканях животных, подвергнутых длительному облучению в черномыльской зоне. Такое перерождение тканей действительно наблюдалось у черномыльских животных [15]. Корреляция между злокачественным перерождением и накоплением металлов в клетках обнаружена в работах [17]. Известно также, что ионы металлов способны усиливать действие радиации на

при высоких концентрациях эти ионы оказывают дестабилизирующее действие, способны разрушать структуру ДНК, вызывая ее денатурацию при комнатных температурах [3].

Для выяснения механизмов фрагментации ДНК и возникновения большого количества НМ ДНК у чернобыльских животных нами были проведены эксперименты с длительным облучением животных [12]. Были изучены свойства ДНК, полученной из печени крыс линии Вистар разных возрастных групп, подвергавшихся γ -облучению в суммарной дозе 13 Гр (суточная доза 0,6 Гр) в течение 22 суток в условиях вивария и затем подвергнутых гепатектомии. Поскольку клетки печени обладают низкой пролифератической активностью после облучения, эта операция была необходима для стимуляции клеток к делению, в процессе которого могут обнаруживаться дефекты ДНК, накопленные за время облучения. В результате этого эксперимента было обнаружено большее количество НМ ДНК достигающее 65% для 9-месячных животных. В селезенке облученных животных количество НМ ДНК составило 41%. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в процессе облучения животных могут накапливаться скрытые повреждения генома, которые

проявляются после процедуры гепатектомии и о наличии которых может свидетельствовать НМ ДНК. Представляло интерес исследование совместного действие ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} и облучения в условиях Чернобыльской зоны на структуру ДНК животных. В этом эксперименте самцы белых беспородных крыс получали с 2-месячного возраста в 5 раз большее количество меди и цинка (в виде сульфата меди и хлорида цинка) с пищей на протяжении 4 месяцев. Результаты эксперимента представлены в таблицах 2 и 3.

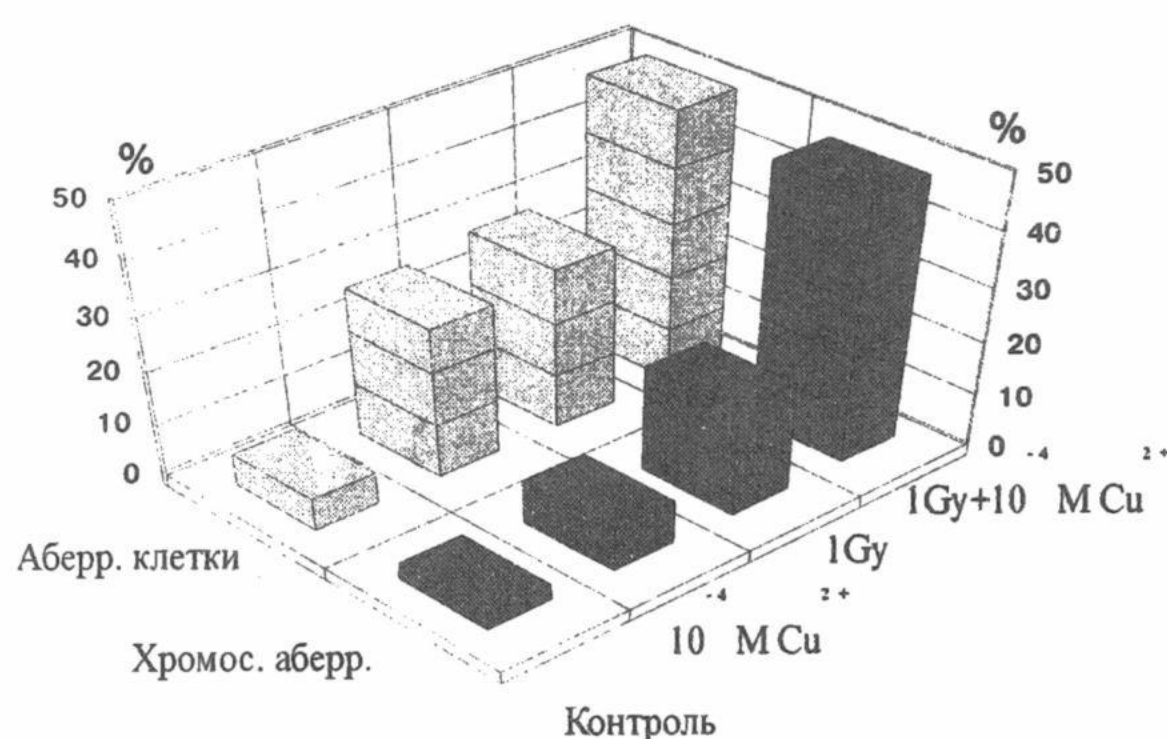


Рис. 5. Возрастание хромосомных aberrаций в облученных лимфоцитах в присутствии ионов меди.

Место содержания животных	Фракция	Возраст	Печень		Селезенка	
			$M_n \cdot 10^{-7}, \text{Да}$	$f, \text{повр./мол.}$	$M_n \cdot 10^{-7}, \text{Да}$	$f, \text{повр./мол.}$
Харьков	ВМ	4	5,5	0,0	4,8	0,4
		4*	4,8	1,0	2,9	2,3
ЧАЭС	ВМ	4	2,7	0,0	6,0	0,8
		4*	0,17	2,5	0,17	3,4
		6	4,5	1,8	7,7	2,4
		6*	2,6	4,4	6,7	2,5
	НМ	4	0,17	0,7	-	-
		4*	0,036	2,3	-	-
		6	0,077	0,0	-	-
		6*	0,19	1,0	-	-

M_n -- молекулярная масса нативной ДНК, * -- животные получавшие пищу с добавками меди.

Таблица 2. Изменение молекулярных параметров ДНК, выделенной из печени и селезенки крыс, которые потребляли медь.

Влияние длительного хронического облучения...

Место содержания животных	Фракция	Возраст	Печень		Селезенка	
			$M_n \cdot 10^{-7}, \text{Да}$	$f, \text{повр./мол.}$	$M_n \cdot 10^{-7}, \text{Да}$	$f, \text{повр./мол.}$
Харьков	ВМ	4	3,2	0,0	2,6	0,0
ЧАЭС	ВМ	4*	6,4	0,0	1,9	0,4
		4	21	1,4	4,0	2,1
		4*	13	1,5	3,8	0,2
		6	16	2,4	3,7	0,4
		6*	3	0,0	4,3	0,8
		6	0,5	1,4	-	-
	НМ	6*	0,5	4,4	-	-

M_n -- молекулярная масса нативной ДНК, * -- животные получавшие пищу с добавками цинка.

Таблица 3. Изменение молекулярных параметров ДНК, выделенной из печени и селезенки крыс, которые потребляли цинк

Как можно видеть совместное действие ионов Cu^{2+} и облучения вызывает возрастание примерно в 4 раза одонитевых разрывов ВМ ДНК в печени 6-месячных животных и примерно в 2,5 раза у 4-месячных [12]. В макромолекулах ДНК из селезенки количество одонитевых разрывов увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с контролем. При этом значительно увеличился выход одонитевых разрывов в ДНК животных, которые получали Cu^{2+} в отсутствие облучения.

Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что ионы Cu^{2+} имеют высокую константу связывания с ДНК, особенно с основаниями, сильно изменяют структуру ДНК при связывании, вызывая ее дестабилизацию [3] вследствие чего могут усиливать действие радиации. В случае Zn наблюдались меньшие эффекты, что коррелирует с его константами связывания с ДНК и может быть также обусловлено иммуномодуляторными свойствами цинка [12].

На основании полученных результатов можно предложить модель повреждений ДНК в условиях действия радионуклидов и ионов металлов [6] (рис. 9). У черномыльских животных повреждения ДНК могут быть особенно значительными вследствие связывания, наряду с Me^{2+} и ионов радионуклидов (Am^{n+} , Pu^{n+}) с линкерными участками нуклеосом, свободными от гистонов, что ведет к ионизации окружения, возникновению радикалов и появлению одно- и двунитевых нерепарируемых повреждений с последующим выходом НМ фракции ДНК в процессе ее выделения.

Также следует отметить, что наблюдаемые сильные повреждения ДНК могут являться следствием апоптоза [18] и для окончательного выяснения механизмов наблюдаемых явлений, особенно это касается накопления повреждений ДНК в ряду поколений животных, требуются дальнейшие исследования.

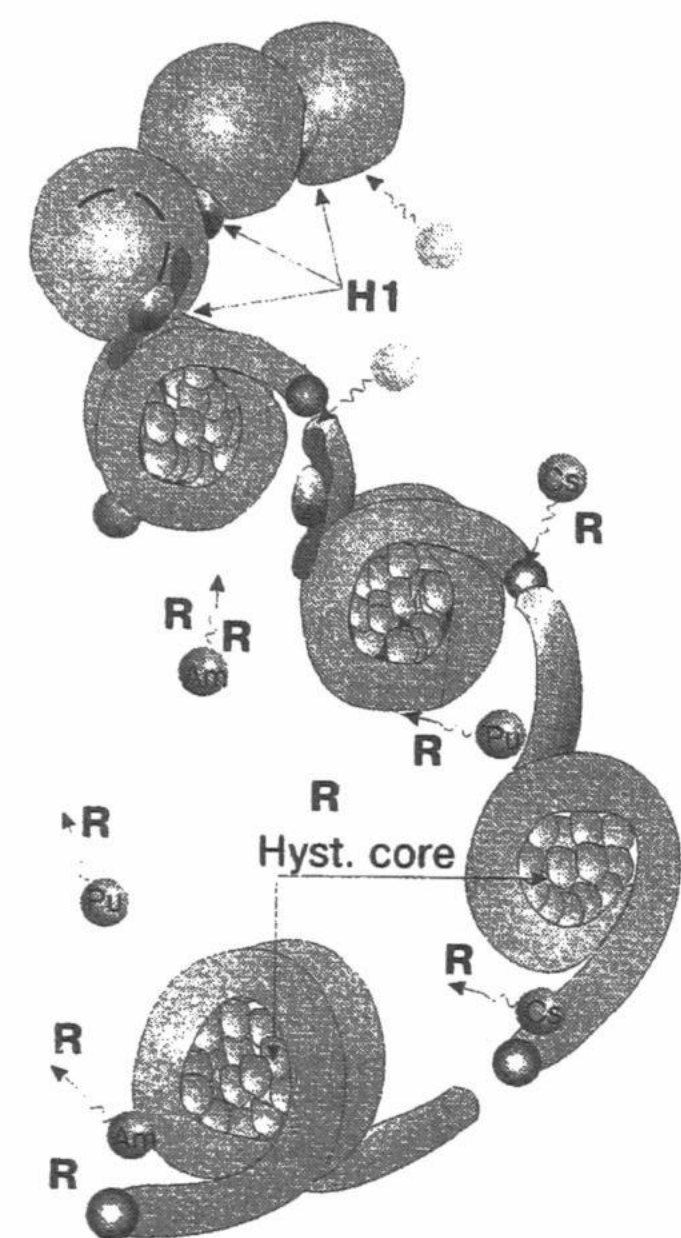


Рисунок 9. Схема повреждения ДНК при действии ионов металлов и радиации

ВЫВОДЫ

1. Воздействие хронического облучения на белых беспородных крыс, постоянно живущих в Чернобыльской зоне, приводит к деградации их ДНК. Появляется НМ фракции ДНК. Ее содержание увеличивается с возрастом и увеличением номера поколения животных.

2. Низкомолекулярная фракция ДНК обогащена ГЦ-парами и состоит из 4 подфракций: а) ~500 пар нуклеотидов, б) ~1500-200 п.н. в) ~4000-5000 п.н., г) смесь с 20000 п.н.

3. В ДНК животных, постоянно живущих в зоне, резко увеличивается содержание различных микроэлементов: Zn - ~ в 40 раз, Se - ~ в 60 раз, Cu , Fe - ~ в 6-7 раз по сравнению с контролем.

4. Добавление Cu в пищу животных, постоянно проживающих в зоне, усиливает влияние радиации. Модельные эксперименты при комбинированном воздействии облучения и ионов Cu на ДНК из лимфоцитов крови обнаружили синергизм их действия.

5. В сравнении с ионами меди цинк оказывает меньшее воздействие на физико-химические свойства ДНК

6. Результаты экспериментов по изучению свойств ДНК из регенерировавших клеток печени после операции гепатэктомии у длительно облученных животных подтверждают увеличение замаскированных повреждений ДНК в результате облучения, что проявляется в появлении НМ фракции ДНК, количество которой достигает 65%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Misurova E., Krivanova M., Kropasova K., Fabianova B. // Radiobiol.Radiother.1987.28, N1.P. 59-68.
2. Кропачова К., Мишурова Е. // Бюл. экспе-рим. биологии и медицины.1981. № 3.С. 359-361.
3. Благой Ю.П., Галкин В.Я., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наук. думка, 1991. 272 с.
4. Kornilova S. V., Blagoi Yu. P., Moskalenko I. P. at al. // Studia biophysica.1988.123, N 2.P. 77-84.
5. George A. M., Sabovliyev S. A., Cramp W. A. // Int. J. Radiat. Biol.1986. 50, N 5. P. 927.
6. Kornilova S.V., Kapinos L. E., Leontiev V. S., Grigoriev D. N., Blagoi Yu.P.// Physica Medica. 1997. V.13. S.1. P. 280-281.
7. Marmur J., Rownd R., Schildkmant C. // Progr. Nucleic Acids Res. 1963. V.7. P.232.
8. Kay E.R., Simmons N.S., Dounce N.LJ. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V.74. P.1724.
9. Благой Ю.П., Корнилова С.В., Сохан В.И. // Мол. биология. 1992. Т.16, N1. С.210.
10. Рябченко Н. И., Голубева Р. В., Иваннык Б. П // Радиобиология, 1973. 15. №2. С. 171-174.
11. Eigner J., Doty P. // J. Mol. Biol. 1965. V.12. P.549.
12. Ю.П.Благой, Д.М.Григор'ев, В.М.Індик, С.В.Корнілова, К.Кропачова, В.С.Леонтьєв, Е.Мишурова, Я.І.Серкіз. // Доповіді Нац. Акад. наук України. 1996. С. 110-112.
13. Благой Ю.П., Корнилова С.В., Леонтьев В.С., Сорокин В.А., Гладченко Г.О., Валеев В.А., Григорьев Д.Н., Капинос Л.Е., Бондаренко В.Н., Колод В.Я. // Биофизика.1994. 39, вып. 4. С. 637-645.
14. Semenov M. A., Sukhorukov B. I., Maleev V. Ya. // Biophysika. 1981. 26. P. 979.
15. Индык В.М., Парновская Н.В., Серкиз Я.Н. и др. П //Радиобиология. 1991. Т.31. С.663.
16. Хансон К. П.. Комар В. Е. Молекулярные механизмы • радиационной гибели клеток. М.: Энергоатомиздат, 1985.141 с.
17. Андроникашвили Э.Л. // Биофизика. 1987. Т.32, вып.5. С.728.
18. Бычковская И.Б., Комаров Е.Н. // Радиобиология. 1990. Т.30, вып.4. С.467.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.12:577.112:577.24+577.17.05

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ВЯЗКО-УПРУГИХ СВОЙСТВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВНЕШНЕГО МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ**А.Э. Кузьмис, О.Б. Гарбузенко, Е.Э. Перский, Л.А. Утевская***г. Харьков, 61077**пл. Свободы, 4,**ХНУ им В.Н. Каразина**25 ноября 1999*

Исследовали влияние механического напряжения на концентрацию, интенсивность синтеза коллагена и вязко-упругие свойства сухожилий, кожи и аорты крыс разного возраста *in vivo* и *in vitro*. Для этого использовали иминокислотный и радиоизотопный анализы. Конкретные величины вязко-упругих свойств тканей рассчитывали по соответствующим кривым напряжение деформация. Показано, что механическое напряжение, действующее на органы, приводит к изменению обменных процессов в их соединительной ткани и в конечном итоге к формированию вязко-упругих свойств оптимальных по отношению к данному воздействию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: механическое напряжение, вязко-упругие свойства, деформация, коллаген, синтез, возраст.

Механическое напряжение - постоянно действующий в соединительной ткани физический фактор. Естественно, что в определенной степени оно должно участвовать в формировании ее структурно-функциональных и, в первую очередь, вязко-упругих свойств. В каждой из разновидностей соединительной ткани эти свойства должны соответствовать величинам и распределению приходящихся на них механических нагрузок. Многочисленные экспериментальные данные подтверждают существование такого соответствия для различных соединительно-тканых структур [1, 2].

Однако до сих пор молекулярные механизмы подстройки структурно-функциональных свойств к действию внешней механической нагрузки практически не изучались. В связи со сказанным, настоящая работа посвящена изучению данного вопроса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на сухожилиях и аорте 1-, 3-, 12- и 24-месячных крыс *in vivo*, а также на коже и аорте 3-месячных крыс *in vitro*. Сухожилия извлекали из средней трети хвоста; образцы дермы кожи спины размером 20мм x 5мм вырезали с помощью специального штампа, так, чтобы длинная сторона образца была параллельна позвоночнику; аорту очищали от посторонних тканей и использовали в опыт целиком. Образцы всех тканей растягивали на установке с автоматической регистрацией растяжения в координатах сила-удлинение при скорости деформации 4 % в минуту. Предварительно было показано, что при этом не сказывается свойственная полимерам зависимость вязко-упругих свойств от скорости удлинения [3, 4]. Аорту и сухожилия растягивали в продольном направлении, кожу вдоль длинной стороны образца. На полученных кривых измеряли область нелинейной деформации и модуль Юнга в области упругой деформации [4]. В опытах *in vitro* образцы кожи и аорты предварительно инкубировали при различных напряжениях ($0-5 \times 10^5$ Н/м²) по методике [5, 6]. Изучали также интенсивность синтеза коллагена [7] и его концентрацию [8].

Полученные результаты обрабатывали стандартными статистическими методами [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены кривые напряжение-деформация для кожи и аорты, инкубированных при различных напряжениях по сравнению с аналогичными зависимостями для образцов, инкубированных без напря-

жения, а в табл. 1 величины модуля Юнга и участка нелинейной деформации для этих образцов, рассчитанные по соответствующим кривым.

Как видно, в обоих случаях повышение напряжения приводит вначале к уменьшению области неупругой деформации и увеличению крутизны кривых в области упругой деформации, что свидетельствует о росте жесткости тканей. Дальнейшее же повышение напряжения сопровождается релаксацией этих свойств – увеличением области неупругой деформации и снижением модуля Юнга, характеризующего жесткость. Необходимо подчеркнуть, что для образцов, инкубированных при изученных напряжениях во всех случаях жесткость остается большей, а область неупругой деформации меньшей, чем величины этих параметров для образцов, инкубированных без напряжения (табл. 1).

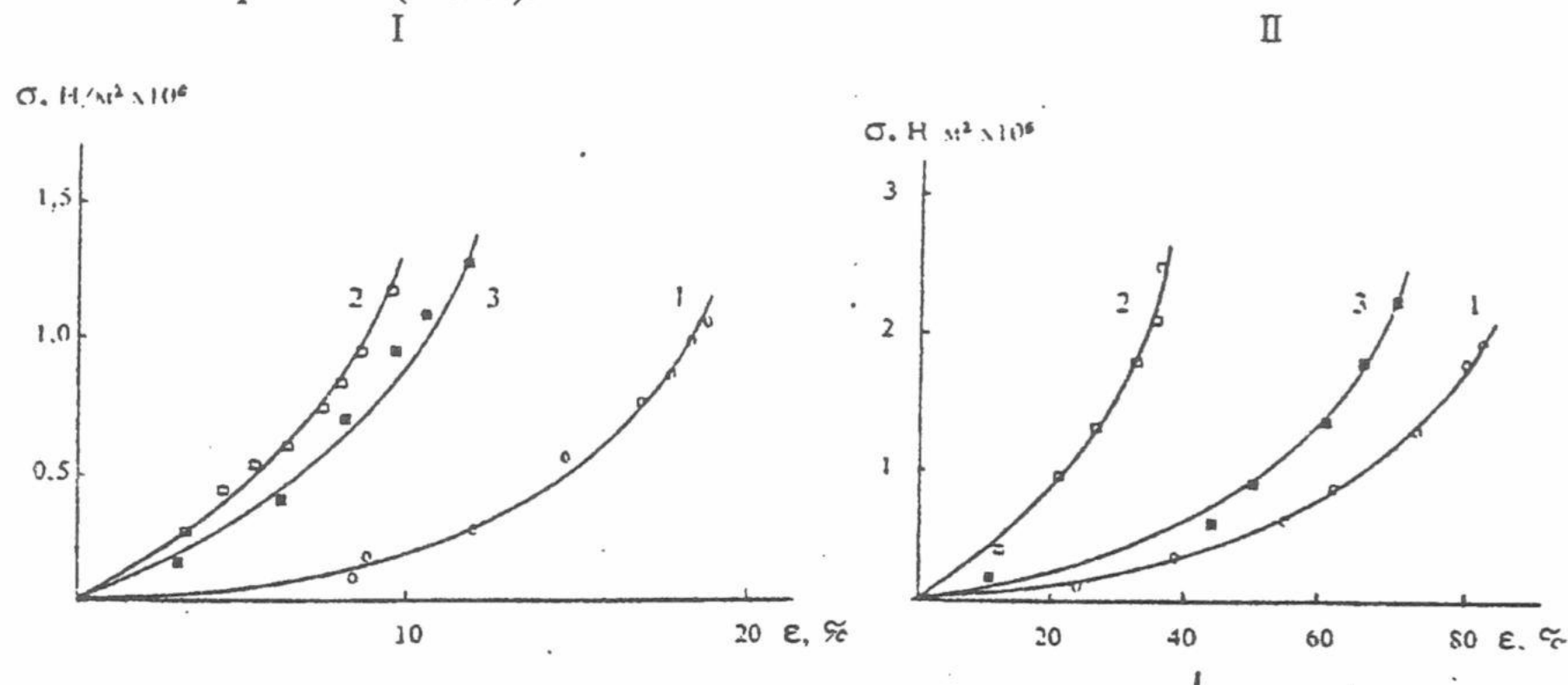


Рис. 1. Кривые напряжение-деформация для кожи и аорты 3-месячных крыс, инкубированных при различных напряжениях: кожа (I): 1) $\sigma=0$; 2) $\sigma=2,4 \times 10^5$ Н/м²; 3) $\sigma=4,8 \times 10^5$ Н/м²; аорта (II): 1) $\sigma=0$; 2) $\sigma=2,2 \times 10^5$ Н/м²; 3) $\sigma=4,4 \times 10^5$ Н/м²

Таблица 1
Модуль Юнга и величина нелинейной деформации кожи и аорты, инкубированных при различных напряжениях.

Параметры	КОЖА			АОРТА		
	$\sigma = 0$	$\sigma = 2,4 \times 10^5$ Н/м ²	$\sigma = 4,8 \times 10^5$ Н/м ²	$\sigma = 0$	$\sigma = 2,2 \times 10^5$ Н/м ²	$\sigma = 4,4 \times 10^5$ Н/м ²
Модуль Юнга, Е, Н/м ² x 10 ⁷	7,5 ±0,91	12,0±1,38	9,7±1,08	0,7±0,09	2,0±0,41*	1,8±0,36*
Неупругая деформация, ε, %	16	7	10	65	31	60

Примечание: Здесь и далее знаком «*» обозначаются результаты, разница между которыми не достоверна ($P > 0,05$)

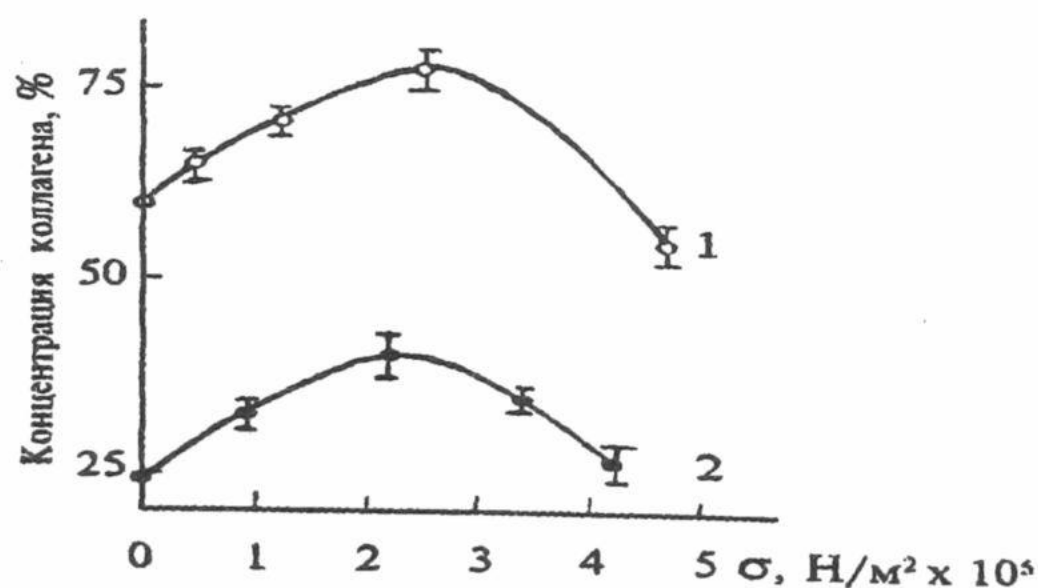


Рис. 2. Влияние механического напряжения на концентрацию коллагена в коже (1) и аорте (2) 3-месячных крыс (% на сухую массу)

На рис.2 приведены кривые зависимости концентрации коллагена в коже и аорте от напряжения. В соответствии с полученными результатами концентрация коллагена в обоих органах при инкубации увеличива-

ется с ростом напряжения, достигая максимума в области $(2,2-2,4) \times 10^5 \text{ Н/м}^2$, после чего начинает снижаться. Обнаруженные зависимости концентрации коллагена в коже и аорте от приложенного к ним напряжения являются результатом соответствующих изменений в интенсивности синтеза этого белка в процессе инкубации. Как видно из рис.3, повышение напряжения приводит вначале к резкому увеличению, а затем к медленному снижению удельной радиоактивности $^3\text{Н}$ -оксипролина в суммарном коллагене тканей. При этом максимумы интенсивности синтеза коллагена в обоих органах находятся в близких областях - $0,8 \times 10^5 \text{ Н/м}^2$ и $0,4 \times 10^5 \text{ Н/м}^2$ для кожи и аорты соответственно. Повышение интенсивности синтеза коллагена при деформации как изолированных фибробластов, так и в клеточной культуре было показано в работах [10, 11].

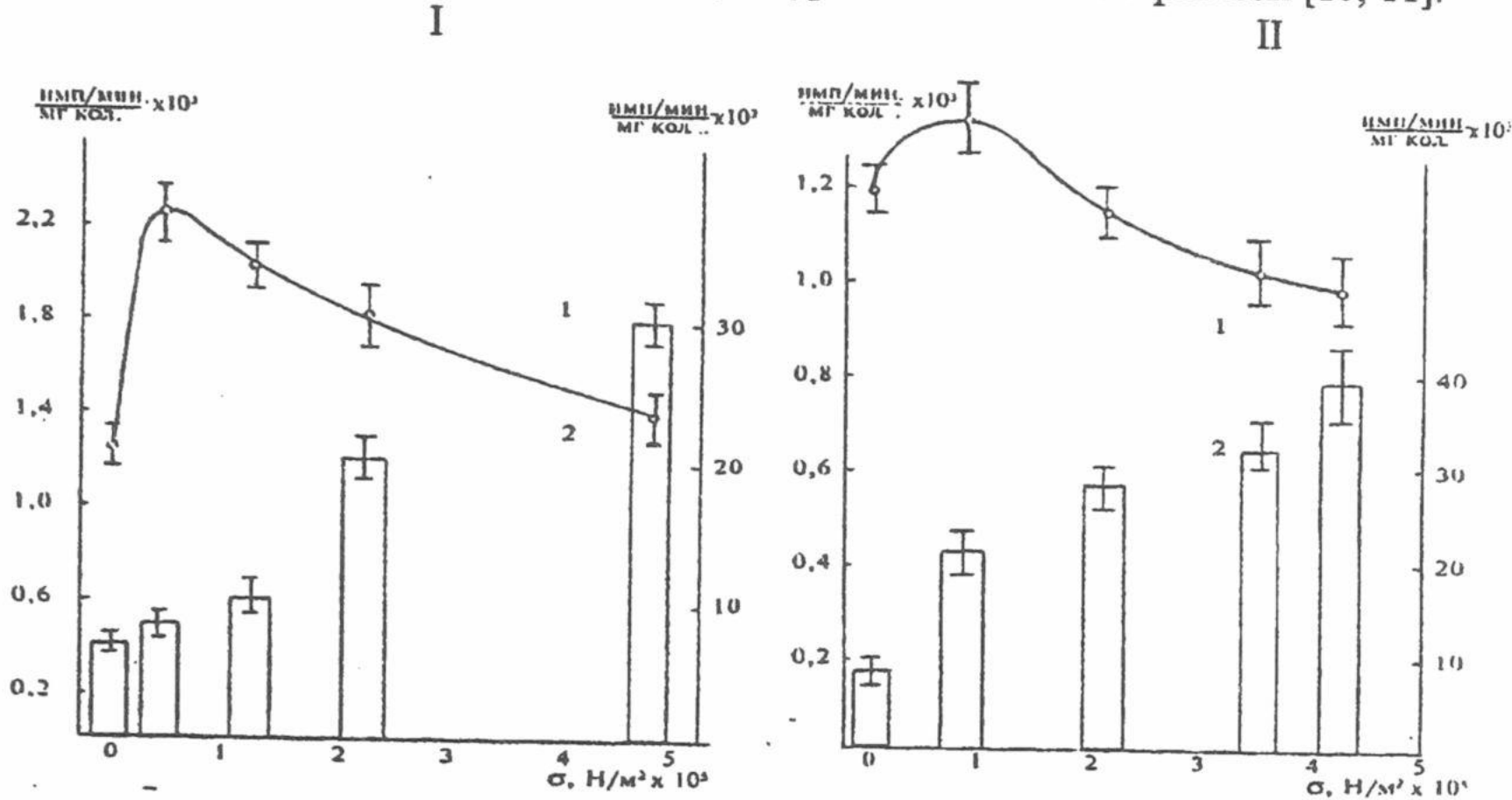


Рис. 3. Влияние механического напряжения на удельную радиоактивность $^3\text{Н}$ -Опро в общем (1) и свежесинтезированном (2) коллагене кожи (I) и аорты (II) 3-месячных крыс

Следует указать, что общая интенсивность синтеза коллагена в ткани - это интегральный показатель, зависящий как от всего количества клеток, так и от интенсивности синтеза в каждой из них. Данные рис.3 показывают, что в области $(0,9 - 5,0) \times 10^5 \text{ Н/м}^2$ на фоне снижения удельной радиоактивности $^3\text{Н}$ -оксипролина в общем коллагене кожи и аорты удельная радиоактивность свежесинтезированного коллагена продолжает повышаться. Такой эффект может свидетельствовать об увеличении интенсивности синтеза коллагена в отдельных клетках на протяжении всего исследованного диапазона напряжений. Снижение же общей интенсивности синтеза коллагена может быть связано с нарушением целостности части синтезирующих клеток или структуры межклеточного матрикса в процессе инкубации, или двумя этими эффектами одновременно.

Обнаруженное увеличение жесткости и снижение величины неупругой деформации обеих тканей может являться результатом ориентационного упорядочения надмолекулярных коллагеновых образований (фибрилл, волокон) в них. Такое упорядочение, в свою очередь, может быть результатом, во-первых, концентрационного эффекта - увеличения содержания надмолекулярных структур в единице объема ткани за счет интенсификации синтеза коллагена при деформации, во-вторых, - от остаточной деформации ткани после снятия нагрузки - эффект аналогичный происходящему в низкомолекулярных поликристаллических веществах.

По-видимому, оба эффекта имеют место *in vivo*, о чем свидетельствуют кривые напряжение-деформация для аорты и волокон сухожилий крыс, приведенные на рис.4 и данные, приведенные в табл.2.

Таблица 2

Модуль Юнга, величина нелинейной деформации и концентрация коллагена для аорты и сухожилий крыс разного возраста.

Параметры	АОРТА			СУХОЖИЛИЯ			
	1 мес.	3 мес.	24 мес.	1 мес.	3 мес.	12 мес.	24 мес.
Модуль Юнга, E, $\text{Н/м}^2 \times 10^7$	4,7±0,85	8,7±1,21	14,1±1,37	27,5± 5,12*	25,0± 3,21*	34,0± 1,91	38,2± 1,72
Неупругая деформация, ε, %	23,5	21,8	18,8	2,1	6,0	5,6	5,4
Концентрация коллагена, % на сырую ткань	11, 5±0,12	14,8 ± 0,10	16,3 ± 0,13	26,5 ± 1,12	32,4 ± 0,84	34,2 ± 0,64*	34,5 ± 0,71*

Как видно (табл.2), стенка аорты в течение всей жизни животного подвергается постоянному пульсирующему напряжению, с возрастом становится более жесткой и менее растяжимой. Аналогичные изменения наблюдаются и для сухожилий. Однако вклад концентрационного эффекта и эффекта остаточной деформации для этих тканей различен – в аорте первый эффект играет, по-видимому, большую роль. Концентрация коллагена в аорте повышается в течении всей жизни животного, а в волокнах сухожилий лишь до 12-месячного возраста (табл.2).

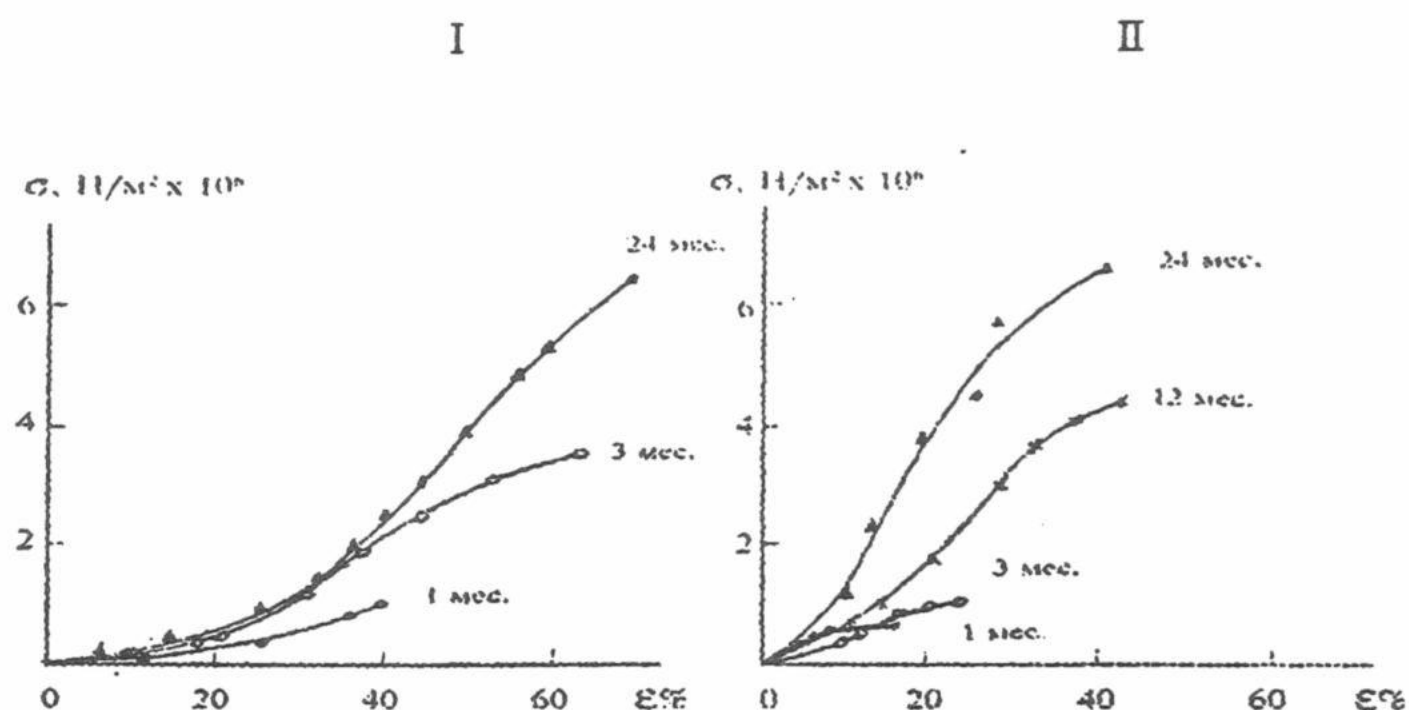


Рис. 4. Кривые напряжение-деформация для аорты (I) и сухожилий (II) крыс разного возраста

Таким образом в формировании вязко-упругих свойств соединительной ткани играет определенную роль положительная обратная связь: механическое напряжение – деформация ткани – деформация клеток – интенсификация синтеза коллагена – изменение вязко-упругих свойств ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Степанова О.В., Бирюкова К.Г., Ширинский В.Н., Ткачук В.А. Влияние периодического растяжения гладкомышечных клеток на экспрессию в них маркерных белков сократительного фенотипа// Физиол. ж. – 1996. – Т. 28, № 8-9. – С. 16-27.
2. Watson P.A. Function follows forms generations of extracellular signals by cell deformation //FASEB J. – 1991. – V. 5. – P. 2013-2019.
3. Александер Р. Биомеханика – М.: Мир. – 1970. – 339 с.
4. Перский Е.Э. Молекулярные механизмы возрастного развития и старения коллагена. Дис.... докт. биол. наук. – Харьков. – 1992. – 369 с.
5. Лебедев Д.А. Методы изучения обмена коллагена в коже человека// Вопр. мед. химии. – 1978. – № 5. – С. 708-712.
6. Гарбузенко О.Б., Емец Е.Б., Перский Е.Э. Влияние деформации на обмен белков и механические свойства аорты и кожи крыс in vitro// Вестн. пробл. биол. и мед. – 1997. – № 25. – С. 19-26.
7. Замараева Т.В. Определение ¹⁴C-оксипролина как метод для изучения синтеза коллагена в модельных системах// Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1977. – С. 265-270.
8. Stegemann H., Stalder K. Determination of hydroxyproline//Clin. Chim. Acta. – V. 18, № 2. – P. 267-273.
9. Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: ИЛ. – 1962. – 260 с.
10. Butt R.P., Bishop J.E. Mechanical load enhance the stimulatory effect on serum growth factor on cardiac fibroblasts procollagen synthesis// Mol. Cell Cardiac. – 1997. – V. 29. – P. 1141-1151.
11. Kolpakov V. Effect of mechanical force on growth and matrix proteins synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types// Circ. Res. – 1995. – V. 77. – P. 823-831.

УДК 577.32:[577.2:539.1.04]+577.346

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ СМЕСЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ДНК КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ В МОЛЕКУЛАХ ДНК

Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская

*Институт радиопластики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры 12, г. Харьков, 310085,
kruglova@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 4 октября 1999 г.

Недавно мы обнаружили, что молекулы ДНК, выделенные из эпидидимуса крыс популяции Вистар, подвергавшихся гамма-облучению в низких дозах, и контрольные молекулы ДНК по-разному взаимодействуют с некоторыми пиримидиновыми нуклеозидами (NUC). Используя кривые плавления смесей ДНК-NUC для модельных образцов ДНК в УФ-области можно показать, что эти различия связаны с конформационными изменениями молекул ДНК. Модельные образцы ДНК были получены путем частичной денатурации тимусной ДНК в бессолевых водных растворах. Уровень повреждений молекул ДНК в таких растворах зависит от концентрации ДНК. Показано, что такие повреждения в ДНК приводят к изменениям в кривых плавления смесей ДНК-NUC, которые подобны таким же для ДНК из облученных тканей. Также мы показываем, что механизмы связывания цитозина арабинозида (Ara-C) и 6-азацитидина (6AZC) с молекулами ДНК, имеющими модифицированную вторичную структуру, различны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, малые дозы радиации, кривые плавления, спектрофотометрия, цитозин арабинозид, 6-азацитидин, бессолевые растворы ДНК.

Ранее нами было показано [1,2], что молекулы ДНК, выделенные из эпидидимуса семенников крыс популяции Вистар, подвергавшихся γ -облучению в низких дозах в условиях Чернобыльской зоны, по-разному взаимодействуют с рядом биологически активных нуклеозидов (NUC). Также было показано, что наблюдаемые различия связаны с нарушением системы водородных связей и стекинга оснований, с модификацией сахарофосфатного остова при больших дозах облучения (25-50) сГр, что приводит к структурной деградации молекул ДНК [3]. Хорошо известно, что возникающие в геноме животных при радиационном воздействии разные типы повреждений, зависят от дозы и характера облучения. Одно-и двухнитевые разрывы [4], образование ДНК-ДНК и ДНК-белковых сшивок [5], появление химически модифицированных оснований [6-8], образование апуриновых мест [9] и пр. могут приводить к существенным структурным изменениям в хроматине. Однако, в процессе выделения ДНК в местах таких точечных повреждений могут образовываться локально нестабильные участки в виде петель, смешанных пар, шпилек, существенно изменяющих вторичную и третичную структуру молекул ДНК. Целью данной работы было (1) определить, как такие неспецифические изменения в конформации молекул ДНК, моделируемые путем частичной денатурации ДНК в бессолевом водном растворе, влияют на связывание различных терапевтически активных нуклеозидов, (2) выяснить, могут ли такие изменения в конформации молекул ДНК моделировать эффекты, наблюдаемые нами при изучении связывания ДНК с NUC для образцов ДНК из эпидидимуса облученных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе были использованы тимусная ДНК фирмы "Serva", а также образцы ДНК, выделенные из эпидидимуса семенников крыс популяции Вистар, подвергавшихся хроническому γ -облучению в условиях зоны Чернобыльской АЭС. Методика выделения препаратов ДНК и контроль их качества описаны ранее [1,2].

Биологически активные нуклеозиды цитозин арабинозид (Ara-C) и 6-азацитидин (6AZC) синтезированы в институте Молекулярной биологии и генетики НАН Украины г. Киева и использовались нами без дополнительной очистки. Спектрофотометрические измерения кривых плавления ДНК и смесей ДНК-NUC проводили в 0.01SSC буферном растворе (1SSC - 0,15 М NaCl + 0.015 М цитрата Na) и в растворах NaCl в интервале концентраций (6×10^{-4} - 6×10^{-3}) М. Модельные образцы деградированной ДНК готовили путем добавления фиксируемых объемов бидистиллированной воды к точным объемам концентрированного водного раствора тимусной ДНК при температуре 20 °С. Затем в полученные бессолевые водные растворы ДНК с концентрацией C_p^W добавлялся раствор NaCl для создания необходимых концентраций ионов Na^+ . Конечная концентрация ДНК в солевом растворе составляла $C_p^S = (1-1,2) \times 10^{-4}$ М. К полученным растворам ДНК добавлялись микроколичества исследуемых нуклеозидов Ara-C и 6AZC (NUC). Поскольку конечные концентрации ДНК и NUC во всех смесях выдерживались практически постоянными, сравнение получаемых кривых плавления при одних и тех же ионных силах позволяло оценивать влияние степени расплетения молекул ДНК в бессолевом водном растворе на характер связывания ДНК с рассматриваемыми NUC.

Кривые плавления свободных образцов ДНК и смесей ДНК-NUC были получены в УФ-области спектра путем выдерживания растворов в каждой из температурных точек в течение 8 минут (точность измерения

температуры ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$). Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевых термостатированных кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре "Specord M40". Концентрацию ДНК и лигандов рассчитывали используя следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{260}(\text{P}) = 6400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для ДНК, $\epsilon_{270} = 9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для Ага-С и $\epsilon_{265} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для 6AZC. Величины гиперхромных эффектов для свободных образцов ДНК и их смесей с NUC рассчитывались, как было описано в [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Для оценки степени влияния разных типов повреждений в молекулах ДНК на связывание ряда биологически активных нуклеозидов, мы исследовали кривые плавления свободной ДНК и ее смесей с NUC при одних и тех же концентрациях компонентов. На рис.1 и рис.2 приведены кривые плавления ДНК из разных тканей для двух NUC: Ага-С и 6AZC, отличающихся строением фуранозного кольца и основания [1,2]. Хорошо видно, что рассмотренные лиганды связываются только с образцами ДНК, выделенными из эпидидимуса облученных животных, что выражается в смещении кривых плавления смесей ДНК-NUC относительно кривой плавления соответствующей свободной ДНК в область более высоких температур (рис.1, 2, в).

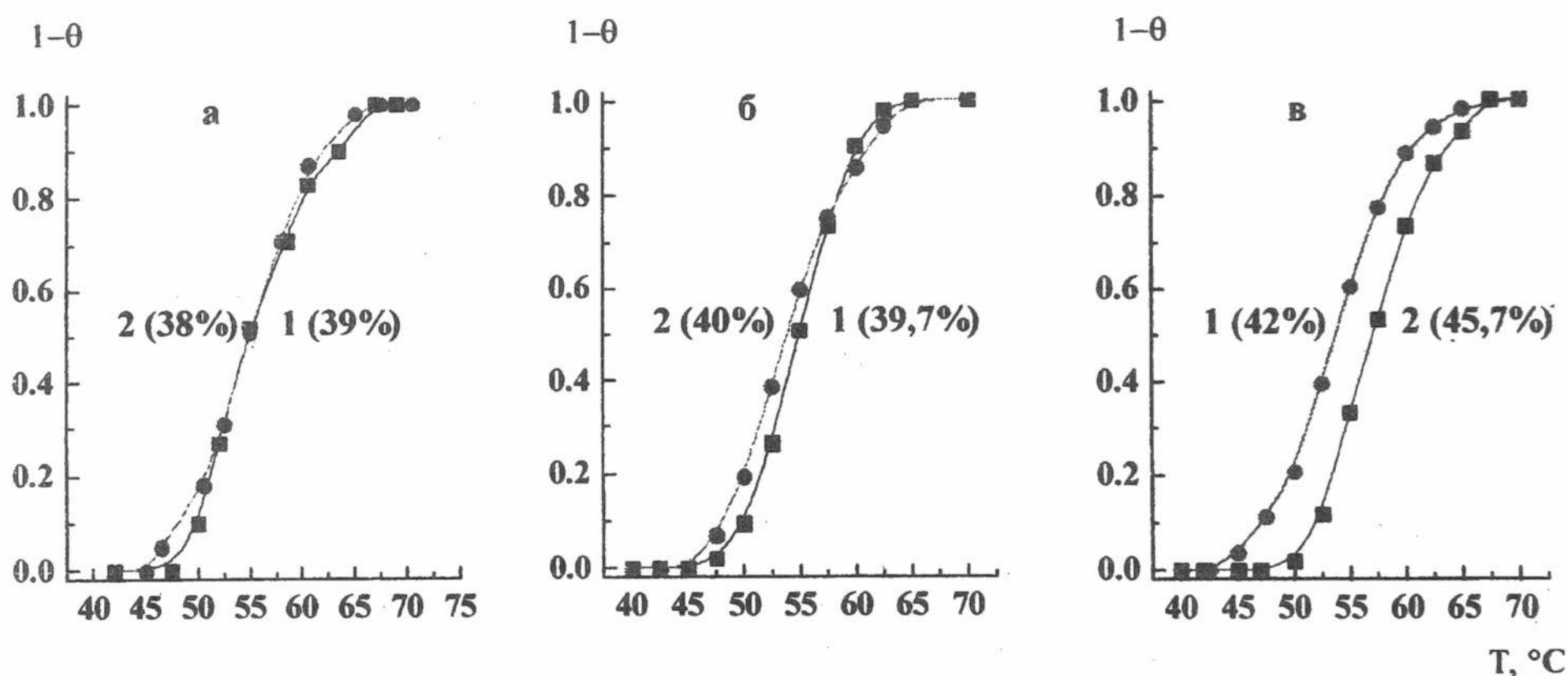


Рис.1. Кривые плавления тимусной ДНК (а) и ДНК, выделенной из эпидидимуса семенников 12-ти месячных контрольных (б) и облученных с ПД=57 сГр (в) крыс в отсутствие (1) и в присутствии (2) 6AZC (0.01 M SSC , $C_p = (1.0 - 1.1) \times 10^{-4} \text{ M}$, $C_{6\text{AZC}} = 6.4 \times 10^{-5} \text{ M}$)

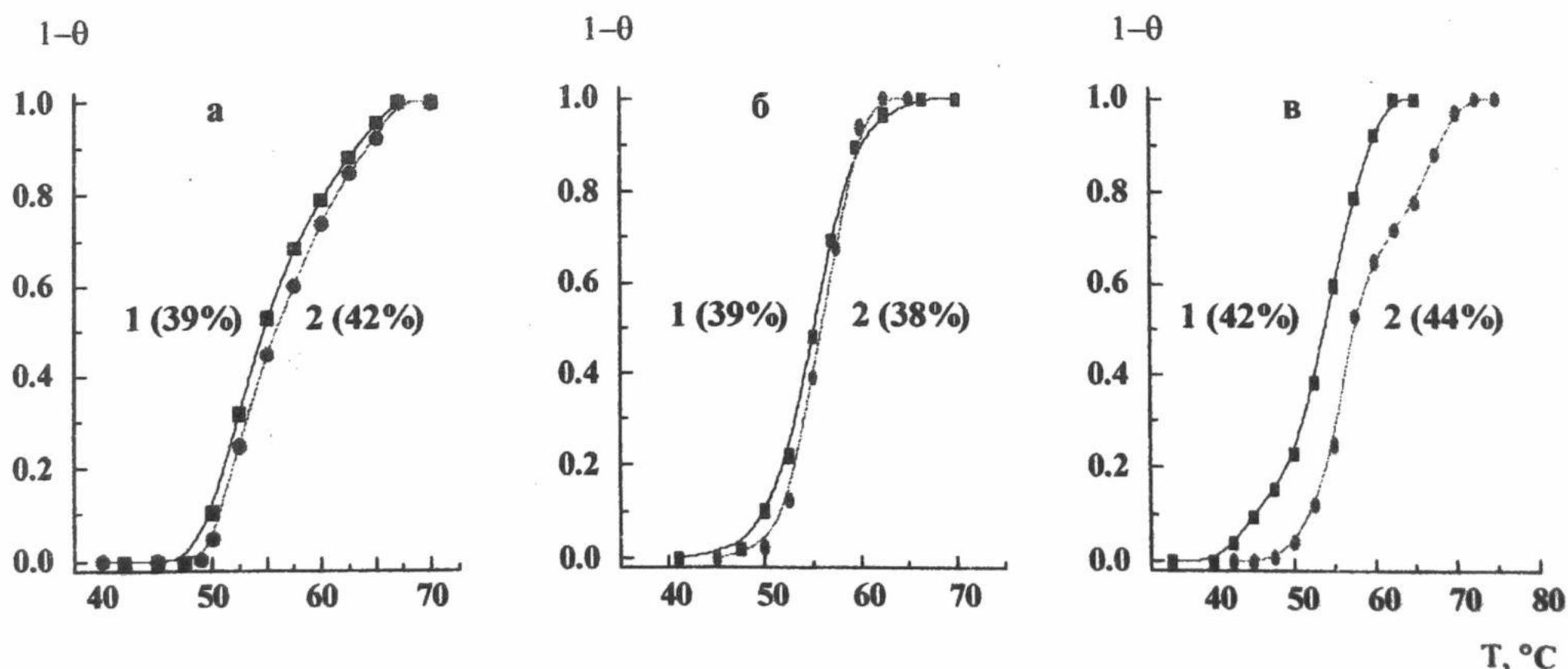


Рис.2. Кривые плавления тимусной ДНК (а) и ДНК, выделенной из эпидидимуса семенников 12-ти месячных контрольных (б) и облученных с ПД=57 сГр (в) крыс в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ага-С (0.01 M SSC , $C_p = (1.0-1.2) \times 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{Ага-С}} = 10^{-4} \text{ M}$).

Для двух контрольных образцов ДНК (ДНК из тимуса теленка и ДНК из эпидидимуса необлученных 12-ти месячных крыс) практически не наблюдается изменений в кривых плавления смесей ДНК-NUC по сравнению с кривыми плавления свободной ДНК (рис.1, 2, а, б). Величины гиперхромных эффектов (указаны в скобках у каждой кривой) также меняются незначительно. Различия в профилях кривых плавления и величинах смещения ΔT_m в случае облученных образцов ДНК (рис.1, 2, в), указывают на разный механизм связывания Ага-С и 6АЗС с деградированной при облучении животных матрицей ДНК. Поскольку температура плавления смесей ДНК-NUC для этих образцов ДНК повышается по сравнению с такой же для свободной ДНК, можно заключить, что при связывании лигандов происходит стабилизация локально неустойчивых участков ДНК [10].

Для более детального ответа на вопрос, как различные типы повреждений в двойной спирали ДНК могут влиять на процесс связывания рассмотренных нуклеозидов, мы исследовали кривые плавления модельных, деградированных в бессолевых водных растворах, образцов ДНК. Модельные образцы ДНК получали как описано в разделе "Материалы и методы".

Как было показано нами ранее [11], степень расплетения тимусной ДНК в бессолевом водном растворе, выраженная как $\gamma_T = (A_T^W - A_T^S) / A_T^S \times 100$ (%), где A_T^W и A_T^S - поглощения водного и солевого растворов ДНК при одной и той же концентрации и температуре, меняется с ростом концентрации ДНК при $T=20^\circ\text{C}$ следующим образом: в интервале $C_p^W = (0-2) \times 10^{-4}$ М наблюдается некоторый рост степени расплетения, который достигает максимальной величины в области концентраций $C_p^W = (2-3) \times 10^{-4}$ М, а затем при дальнейшем росте концентрации ДНК величина γ постепенно уменьшается.

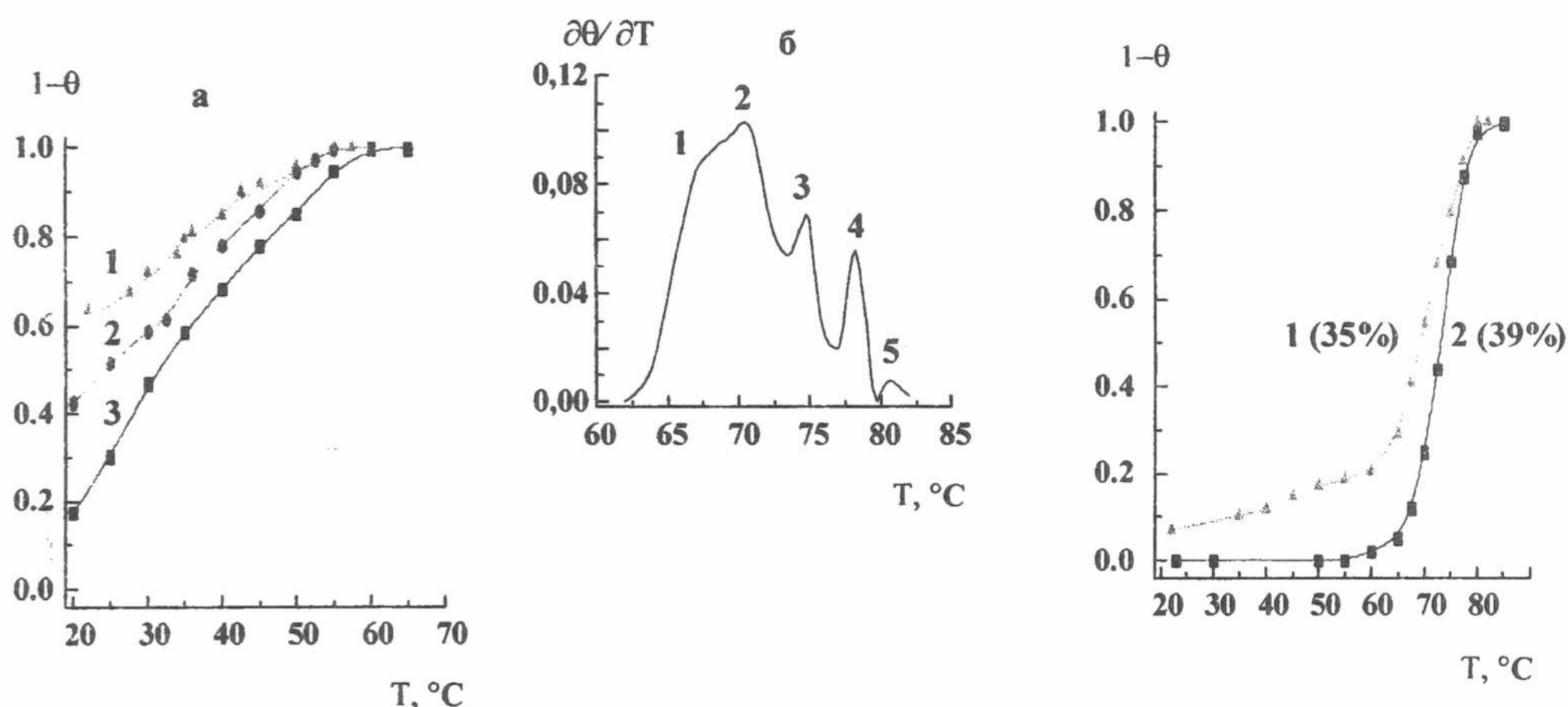


Рис.3. Кривые плавления тимусной ДНК в бессолевом водном растворе в зависимости от концентрации ДНК: $C_p^W = 2,5 \times 10^{-4}$ М (1); $C_p^W = 1,6 \times 10^{-4}$ М (2); $C_p^W = 7,5 \times 10^{-5}$ М (3) (а); дифференциальная кривая плавления, полученная для тимусной ДНК в 0,1 SSC [12] (б).

Рис.4. Кривые плавления тимусной ДНК после добавления в бессолевой водный раствор с $C_p^W = 1,2 \times 10^{-4}$ М раствора NaCl до конечной концентрации $C_{\text{NaCl}} = 6 \times 10^{-3}$ М (1); раствор ДНК той же концентрации в 6×10^{-3} М NaCl (2).

На рис.3, а приведены типичные кривые плавления тимусной ДНК в бессолевом водном растворе в зависимости от C_p^W . Видно, что в области комнатных температур максимально возможная степень расплетения $1-\theta = 0,6$. Она наблюдается для $C_p^W = 2,5 \times 10^{-4}$ М, что соответствует величине $\gamma = 24 \pm 1$ %. Учитывая блочную структуру тимусной ДНК, которая четко проявляется на дифференциальной кривой плавления [12] (рис.3, б), можно предположить, что максимальная степень расплетения, достигаемая ДНК в бессолевом водном растворе, соответствует практически полному расплетению 1 и 2 блоков ($\gamma = 28$ %), поскольку именно такой вклад относительно всего перехода (площадь под всей кривой соответствует 40%) составляют эти блоки. Дальнейший рост концентрации ДНК ($C_p^W \geq 3 \times 10^{-4}$ М) приводит к уменьшению степени расплетения, что можно объяснить увеличением концентрации ионов Na^+ в растворе за счет противоионов и примесных ионов. Труднее объяснить уменьшение степени расплетения при комнатных температурах в области низких концентраций ДНК ($C_p^W \leq 10^{-4}$ М) (рис.3,а, кривые 2, 3). В этой области концентраций разброс в определяемых величинах γ_T при комнатных температурах больше, чем в других концентрационных областях, а способ приготовления растворов существенно влияет на конечный результат. Этот факт свидетельствует о ряде необратимых процессов денатурации - ренатурации в таких системах при низких концентрациях ДНК. Не исключено, что определенный вклад в необратимость процесса денатурации-ренатурации вносит и частичная протонизация оснований нуклеиновых

кислот в области $pH \geq 5$ в условиях очень низких ионных сил в бессолевых водных растворах [11, 13]. При концентрации ДНК $C_p^W \geq (8-9) \times 10^{-4}$ М тимусная ДНК в бессолевом водном растворе находится в нативном состоянии, что подтверждается выводами ряда работ [13].

При добавлении NaCl в приготовленные при $T=20^\circ\text{C}$ бессолевые растворы ДНК, происходит их частичная ренатурация, которая сопровождается увеличением гиперхромного эффекта до (30-35) % даже в случае максимальных степеней расплетения (кривая 1, рис.4, 5, 6). Температурный переход таких образцов ДНК имеет явно выраженный двухфазный характер, причем в области более низких температур, очевидно, выплавляется большая часть изначально денатурированных участков молекул ДНК.

При добавлении исследуемых лигандов к приготовленным таким образом денатурированным-ренатурированным растворам ДНК мы фиксируем значительные изменения в кривых плавления смесей ДНК-NUC по сравнению с кривыми плавления свободных образцов ДНК (рис.5 и рис.6).

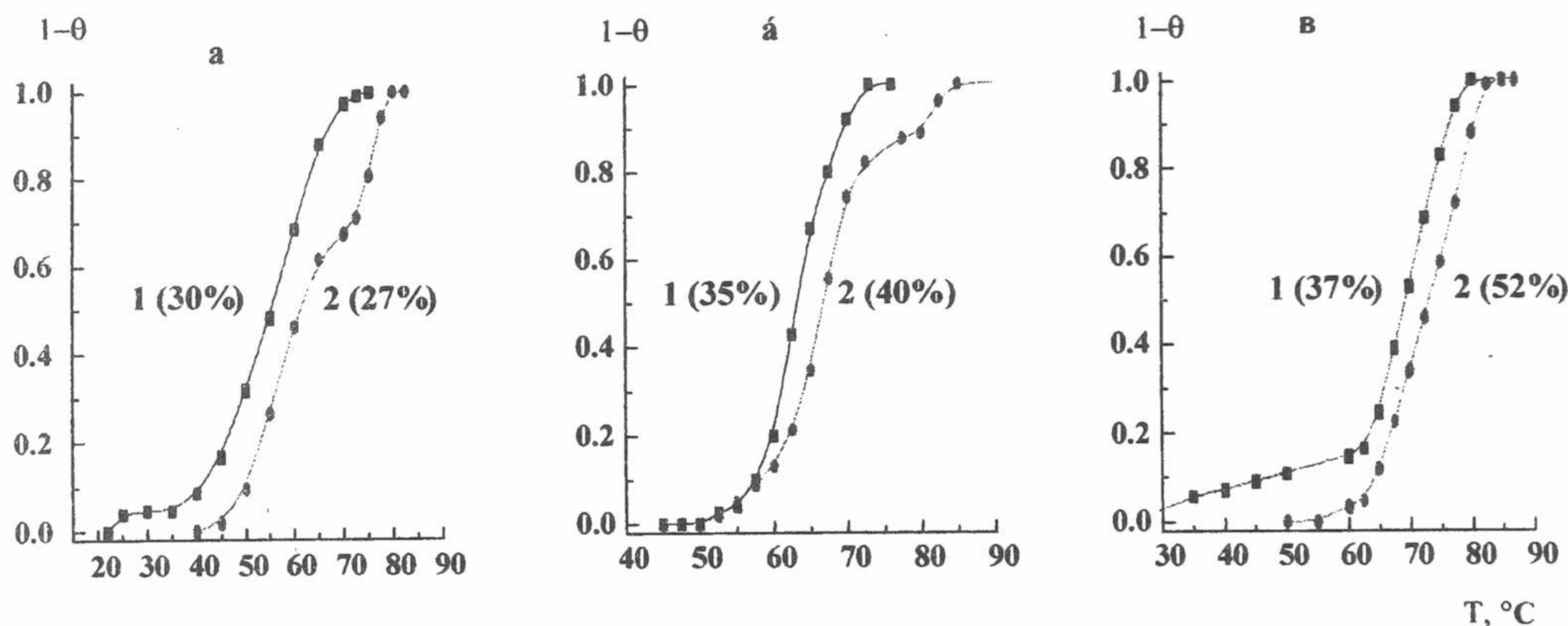


Рис.5. Кривые плавления тимусной ДНК в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ага-С для образцов ДНК, частично денатурированных в бессолевых водных растворах при: $C_p^W = 1,6 \times 10^{-4}$ М и ренатурации при 6×10^{-4} М NaCl (а); $C_p^W = 3,5 \times 10^{-4}$ М, 6×10^{-3} М NaCl (б); $C_p^W = 4,2 \times 10^{-4}$ М, 6×10^{-3} М NaCl (в) ($C_p^S = 1,2 \times 10^{-4}$ М, $C_{Ara-C} = 1 \times 10^{-4}$ М)

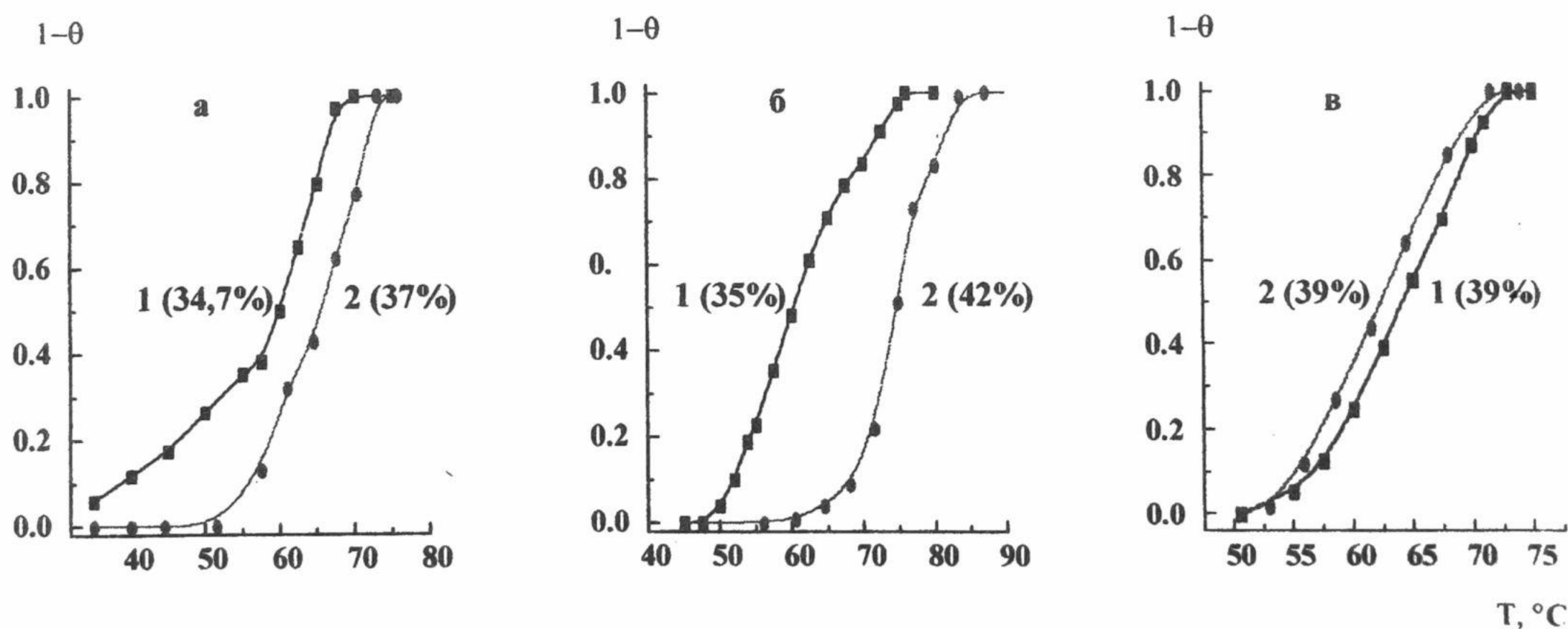


Рис.6. Кривые плавления тимусной ДНК в отсутствие (1) и в присутствии (2) 6AZC для образцов ДНК, приготовленных путем частичной денатурации ДНК в бессолевых водных растворах при $C_p^W = 7 \times 10^{-5}$ М (а); $C_p^W = 3,5 \times 10^{-4}$ М (б); $C_p^W = 7 \times 10^{-4}$ М (в) и ее дальнейшей ренатурации в 3×10^{-3} М NaCl ($C_p^S = (1,3-1,6) \times 10^{-4}$ М, $C_{6AZC} = 8,9 \times 10^{-5}$ М).

Так, из рис. 5 и 6 видно, что деградация молекул ДНК в бессолевом водном растворе приводит к связыванию рассмотренных NUC с ДНК, причем изменения в профилях кривых плавления очень похожи на такие же, фиксируемые нами для ДНК из эпидидимуса облученных животных (рис.1, в и рис.2, в). Также как и в случае

по сравнению с кривой плавления свободной ДНК, меняются величины гиперхромных эффектов. Величина смещения ΔT_m в присутствии 6AZC в большей степени, чем для Ara-C, зависит от уровня расплетения ДНК в бессолевом растворе и достигает величины порядка 15°C при максимальной степени расплетения (рис.6, б). Хорошо видно, что 6AZC в процессе связывания стабилизирует в основном те участки ДНК, которые в бессолевом водном растворе находились в денатурированном состоянии и связывание лиганда сопровождается увеличением гиперхромного эффекта. В случае очень низкой степени расплетения, наблюдающейся для бессолевых водных растворов ДНК с $C_p^w \geq 9 \times 10^{-4} \text{ M}$, при добавлении 6AZC мы не фиксировали высокотемпературных смещений кривых плавления смеси ДНК-6AZC и величина гиперхромного эффекта практически не менялась (рис.5, в).

Характер изменений кривых плавления модельных образцов ДНК в смеси с Ara-C отличен от таких же изменений для 6AZC (Рис.5). Видно, что в отличие от 6AZC, Ara-C не стабилизирует, а дополнительно расплетает те участки ДНК, которые были расплетены в бессолевых водных растворах, понижая тем самым гиперхромный эффект (рис.5, а). С другой стороны, Ara-C связывается более интенсивно с нерасплетенными участками, что сопровождается увеличением гиперхромного эффекта (рис.5, б, в). Профили кривых плавления смесей ДНК-Ara-C в случае модельных ДНК носят ярко выраженный двухфазный характер, но величины смещения ΔT_m значительно ниже, чем для 6AZC.

Таким образом, анализ кривых плавления смесей ДНК-6AZC и ДНК-Ara-C для модельных образцов ДНК позволяет заключить, что оба лиганда связываются с молекулами ДНК с модифицированной вторичной структурой. Можно предположить, что стабилизация такой ДНК происходит в результате гидрофобного связывания незаряженных нуклеозидов при их размещении в локально нестабильных (петли, шпильки, смешанные пары и пр.) областях. Этот процесс сопровождается увеличением гиперхромного эффекта.

В отличие от 6AZC, который стабилизирует деградированные в процессе денатурации-ренатурации участки, для Ara-C характерна некоторая избирательность в стабилизации ДНК. Так для Ara-C, при частичной денатурации ДНК, места связывания в спиральных GC-обогащенных областях становятся более доступными, с другой стороны, Ara-C не стабилизирует, или даже дополнительно дестабилизирует, те участки ДНК, которые были денатурированы в бессолевом водном растворе.

Сравнивая кривые плавления смесей ДНК-Ara-C и ДНК-6AZC для модельных ДНК и ДНК из эпидидимуса облученных животных, можно отметить подобие наблюдаемых эффектов. Так, в случае ДНК из эпидидимуса 4-х месячных крыс, облученных в дозе 5 сГр [1], для смесей ДНК-Ara-C на фоне небольшого смещения температуры плавления смеси в высокотемпературную область, наблюдается значительное уменьшение гиперхромного эффекта. Для ДНК из эпидидимуса 12-ти месячных крыс, облученных в дозе 50 сГр, такое же изменение T_m смеси, наоборот, сопровождается увеличением гиперхромного эффекта, как было показано выше. Это свидетельствует о разном уровне и типе повреждений этих двух образцов ДНК.

Поскольку в процессе получения модельных образцов ДНК мы не меняли молекулярного веса тимусной ДНК и не могли химически модифицировать основания нуклеиновой кислоты (за исключением возможной протонизации АТ-пар [11,13]), можно заключить, что изменения в характере взаимодействия рассмотренных лигандов с ДНК связаны с нарушением ее вторичной структуры, т.е. с увеличением концентрации нестабильных участков в ДНК. Этот вывод позволяет предположить, что в случае образцов ДНК из облученных тканей, изменения в характере связывания Ara-C и 6AZC с ДНК также связаны с модификацией вторичной структуры ДНК в местах ее точечных радиационных повреждений. Другими словами, в настоящий момент нет оснований считать, что рассмотренные нуклеозиды позволяют тестировать какие-либо специфические типы повреждений в молекулах ДНК из эпидидимуса облученных крыс. Тем не менее, можно утверждать, что терапевтическое действие рассмотренных нуклеозидов связано именно с их способностью взаимодействовать с молекулами ДНК, имеющими определенные дефекты в структуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Круглова Е.Б., Крутько Н.А., Красницкая А.А. и др. // Вісн.ХДУ №422. Біофізичний вісник. 1998. Вип.2. С.100-104.
2. Kruglova E.B., Krasnitskaya A.A., Maleev V.Ya. et. al. 2-nd International conference: Long-term health consequences of the chernobyl disaster, Kiev. 1998. P.262-263.
3. Круглова Е.Б., Довбешко Г.И., Крутько Н.А. и др. // Вісн.ХДУ № 450. Біофізичний вісник. 1999. Вип.4 (2). С. 92-95
4. Xapsos M.A., Pogożelski W.K. // Radiat. Res. 1996. 146. P.669-673.
5. Шугалий А.В., Личина М.В., Жижина Г.П., Скалацкая С.И. // ДАН. 1996. Т.350. С.828-830.
6. Ide H., Kow Y.W., Chen B.X. et. al. // Cell Biol.Toxicol. 1997. V.13. P.405-417.
7. Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B. et. al. // Cancer Res. 1998. V.58. P.222-225.
8. Ninaber A., Goodfellow J.M. // J.Biomol.Struc.Dyn. 1998. V.16. P.651-661.
9. Milligan J.R., Aguilera J.A., Wu C.C. et. al. // Radiat.Res. 1997. V.148. P.325-329.
10. Франк-Каменецкий М.Д. // Молекуляр. биология. 1968. Т.2. С. 408-419.
11. Круглова Е.Б. // Биополимеры и клетка. 1992. Т.8. С.56-62.
12. Бабаян Ю.С. Устойчивость нуклеиновых кислот при взаимодействии с биологически активными веществами. Дис. д-р. физ.-мат. наук, Ереван. 1991. 227 С.
13. Davydova O.V., Kuznetsov I.A., Florentiev V.L. // Biopolymers. 1989. V.28. P.605-615.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.391+611.783

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ И РАДИОПРОТЕКТОРА АЛЬТАНА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ**Л.В. Батюк, С.В. Гаташ**

*Харьковский НИИ медицинской радиологии, 61024, г. Харьков, ул. Пушкинская, 82,
Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4
Поступила в редакцию 11 ноября 1999 г.*

Исследовано влияние рентгеновского облучения и препарата альтан на кислотный гемолиз эритроцитов крыс и человека. Рентгеновское облучение в дозе 6 Гр приводит к уменьшению кислотной устойчивости эритроцитов как крыс, так и онкологических больных. Показано, что применение препарата альтан (перорально) до и после облучения организма существенно снижает влияние рентгеновского излучения на гемолиз эритроцитов животных и человека. В этих условиях рентгеновское облучение не приводило к изменению концентрации ионов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), как внутриклеточной в эритроцитах, так и в плазме крови. Выживаемость крыс, получавших препарат альтан, через 15-30 суток после облучения была выше в 2,5 раза. Обсуждается возможный механизм радиопротекторного действия препарата альтан.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рентгеновское облучение, эритроциты, альтан, гемолиз, кислотная устойчивость, катионы, выживаемость, радиопротекторы

При воздействии ионизирующего облучения на целостный организм отмечается угнетение эритропоэза [1], понижение концентрации гемоглобина в эритроцитах [2], появление ярко выраженного анизоцитоза с преобладанием макроцитов [3], уменьшение продолжительности циркуляции клеток в кровяном русле [4], изменение структурно-функциональных свойств эритроцитов (ингибирование активного и пассивного мембранного транспорта [5], нарушение распределения ионов между внутри- и внеклеточной средой [6,7], угнетение ферментативных процессов [8], уменьшение гемолитической устойчивости [9,10]). Реакция эритроцитов на рентгеновское облучение организма носит дозозависимый характер и недостаточно изучена. Применение рентгенотерапии при онкологических заболеваниях, требует, как исследования механизмов влияния облучения на клетки, так и поиска новых веществ радиопротекторного действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали кровь лабораторных крыс линии Вистар и кровь онкологических больных, проходящих курс лучевой терапии. Животные и больные подвергались рентгеновскому облучению в суммарной дозе 6 Гр с помощью аппарата РУМ-17 при мощности излучения 9,82 Гр/мин. Одна из групп животных и онкобольные за день до облучения и в течение 30 суток после облучения получали перорально препарат альтан (125 мг/кг живого веса ежедневно). Забор крови проводили у крыс при декапитации, а у человека пункцией вены, используя в качестве антикоагулянта гепарин. Эритромассу получали путем центрифугирования (при 3000 об/мин) и двукратного отмывания в физиологическом растворе по стандартной методике. В эксперименте использовали суспензию эритроцитов, полученную разбавлением эритромассы 0,15M NaCl в соотношении 1:100 в течение 5 часов после приготовления. Образцы крови, в каждой группе животных и человека, брали перед облучением и через 7, 14 и 30 суток после облучения.

Устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу определяли согласно [11]. Гемолиз эритроцитов регистрировали на спектрофотометре НАРЕМЕ FR SH-01 на длине волны 720 нм по методу [12]. В качестве гемолитика использовали раствор HCl в конечной концентрации 0,028N. Скорость гемолиза определяли по тангенсу угла наклона линейного участка зависимости изменения оптической плотности суспензии от времени гемолиза. Концентрацию катионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} измеряли методом пламенной фотометрии с помощью анализатора ПАЖ-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу коррелирует с возрастом клеток, циркулирующих в кровяном русле [11,13]. Принято разделять популяцию эритроцитов на три группы устойчивости - 7-5, 4,5-3,5, и 3-1,5 мин, соответствующие трем группам клеток с возрастом - до 30, от 30 до 90 и свыше 90 дней [11]. В норме количество эритроцитов в группах - 20, 60 и 20%, соответственно.

Влияние рентгеновского облучения и радиопротектора альтана...

На рис. 1А представлены результаты исследования кислотного гемолиза эритроцитов крыс, в виде рассчитанных по эмпирическим данным эритрограмм (распределения времени гемолиза эритроцитов), из которых видно, что после рентгеновского облучения устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизику уменьшается, а к 30-м суткам после облучения различия приобретают еще и качественный характер (кривая 4). По данным [11] такое изменение чувствительности эритроцитов к кислотному гемолизику свидетельствует об угасании пролиферативной функции красного ростка организма, вследствие чего уменьшается количество молодых эритроцитов, вклад которых в процесс гемолиза отражается на правой ветви эритрограммы. Вместе с этим, воздействие облучения приводит к уменьшению резистентности клеток всей популяции, и на 30-е сутки около 90% эритроцитов гемолизует уже за 2 минуты, против 30% в контроле.

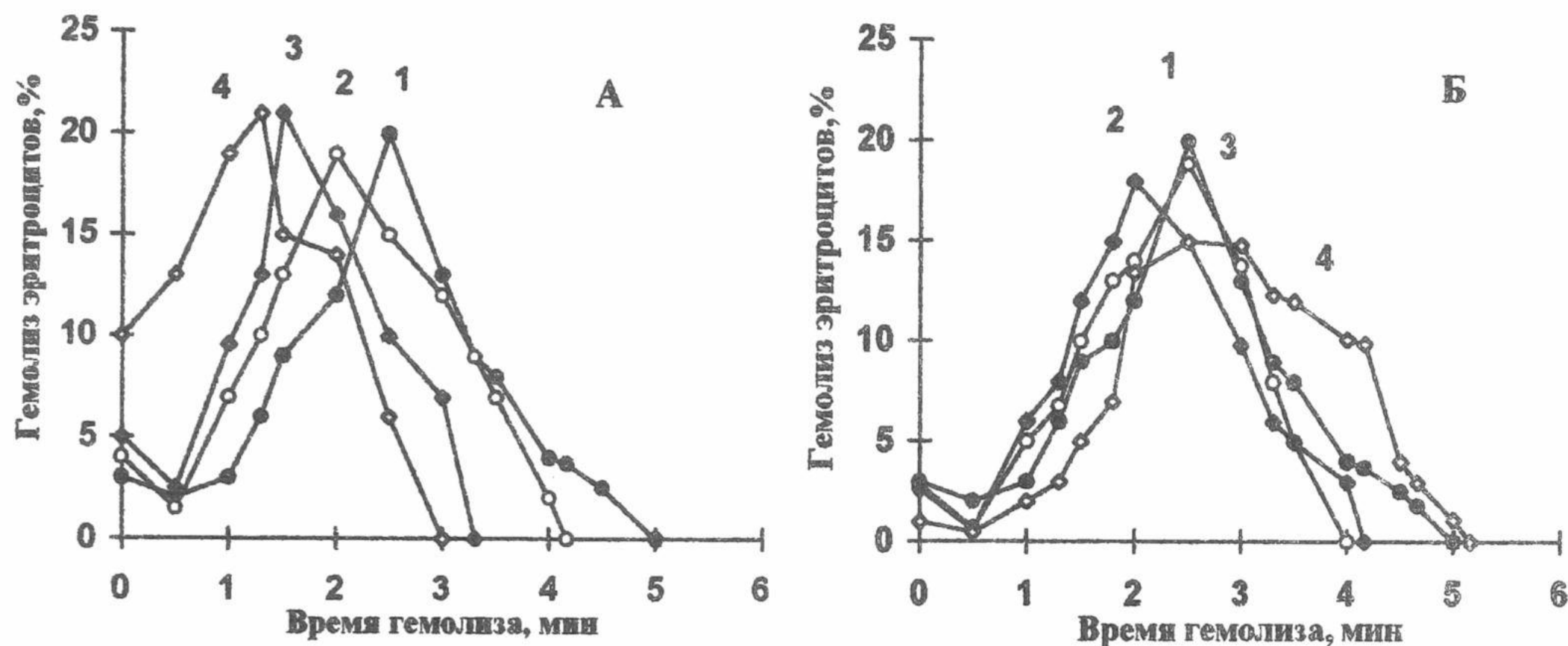


Рис.1. Эритрограммы гемолиза эритроцитов крыс, вызванного 0,028N HCl, контрольной группы (1) и после рентгеновского облучения в дозе 6Гр (2,3,4 – через 7,14 и 30 суток после облучения, соответственно), получавших препарат альтан (Б) и не получавших (А).

Понижение устойчивости эритроцитов, в ранние сроки после облучения, наблюдалось и для группы крыс, получавших препарат альтан (рис.1Б, кривая 2). Однако уже на 14-е сутки эритрограмма смещается вправо и становится по форме близкой к контрольной (кривая 3), что означает восстановление состава популяции по количеству клеток с различной продолжительностью жизни. К 30-м суткам после облучения на эритрограмме (кривая 4) справа появляется дополнительный пик. Такая форма эритрограммы свидетельствует о нарушении равновесия в системе крови и наблюдается, например, при процессах регенерации после угнетения эритропоэза, когда в кровяное русло выходит много молодых высокоустойчивых эритроцитов, чем и объясняется появление локального максимума на правой ветви эритрограммы.

Относительная скорость гемолиза эритроцитов, на линейном участке изменения оптической плотности, облученных крыс монотонно растет со временем и к 30-м суткам достигает значения в 1,7-1,8 раз больше, чем у контрольных животных (см. рис.2). В то же время у группы крыс, получавших препарат альтан после облучения, скорость гемолиза практически не изменялась в течение всего времени наблюдения и была близка по величине к скорости для контрольной группы.

Параллельно с исследованием гемолиза эритроцитов, для тех же групп крыс, определялось влияние рентгеновского облучения на выживаемость животных. На рис. 3 представлена зависимость выживаемости крыс в течении 30 суток после облучения. На графиках выделяются три этапа: до 7-х суток наблюдается 100%-я выживаемость, как для крыс, принимавших альтан, так и без него. Для более поздних сроков выживаемость резко уменьшается и к 14-16-м суткам составляет: 30% для животных не принимающих и 70% для принимающих препарат альтан. Далее уровень выживаемости стабилизируется до конца периода наблюдения. Такая зависимость выживаемости показывает, что адаптивные процессы, происходящие на уровне целостного организма после рентгеновского облучения, идут по пути накопления негативных эффектов на первом этапе, повышенной гибели животных на втором и включения адаптивных систем на третьем. Увеличение выживаемости животных на втором и третьем этапах более чем в два раза свидетельствует о выраженном радиопротекторном и адаптогенном действии, альтана.

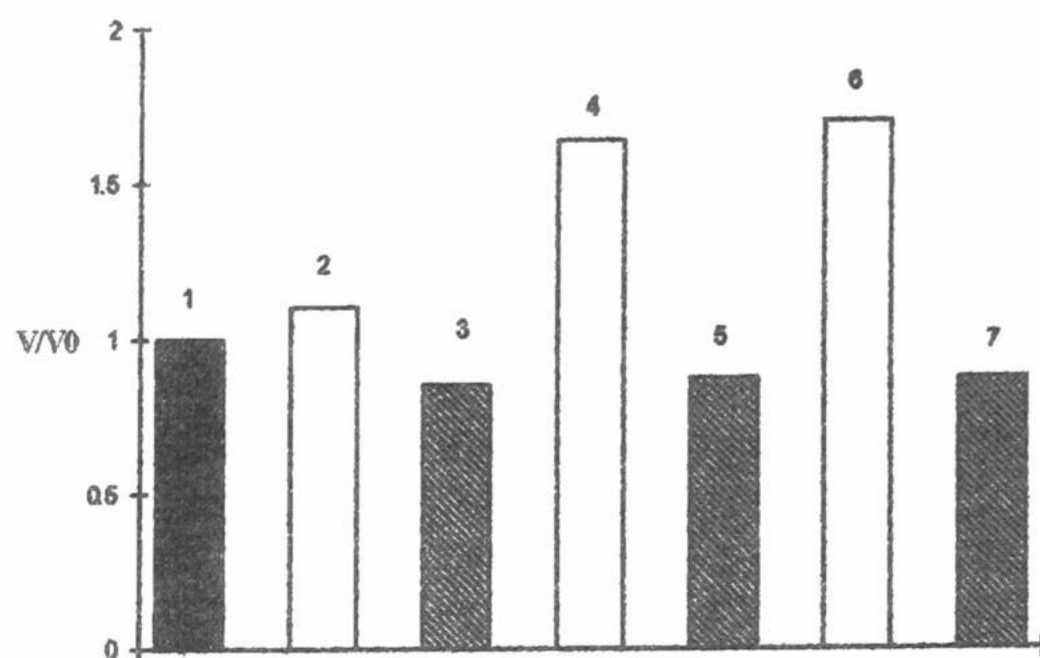


Рис.2. Относительная скорость кислотного гемолиза эритроцитов крыс контрольной группы (1) и через 7 (2,3), 14 (4,5), и 30 (6,7) суток после рентгеновского облучения в дозе 6Гр: □- с применением альтана; □- без альтана

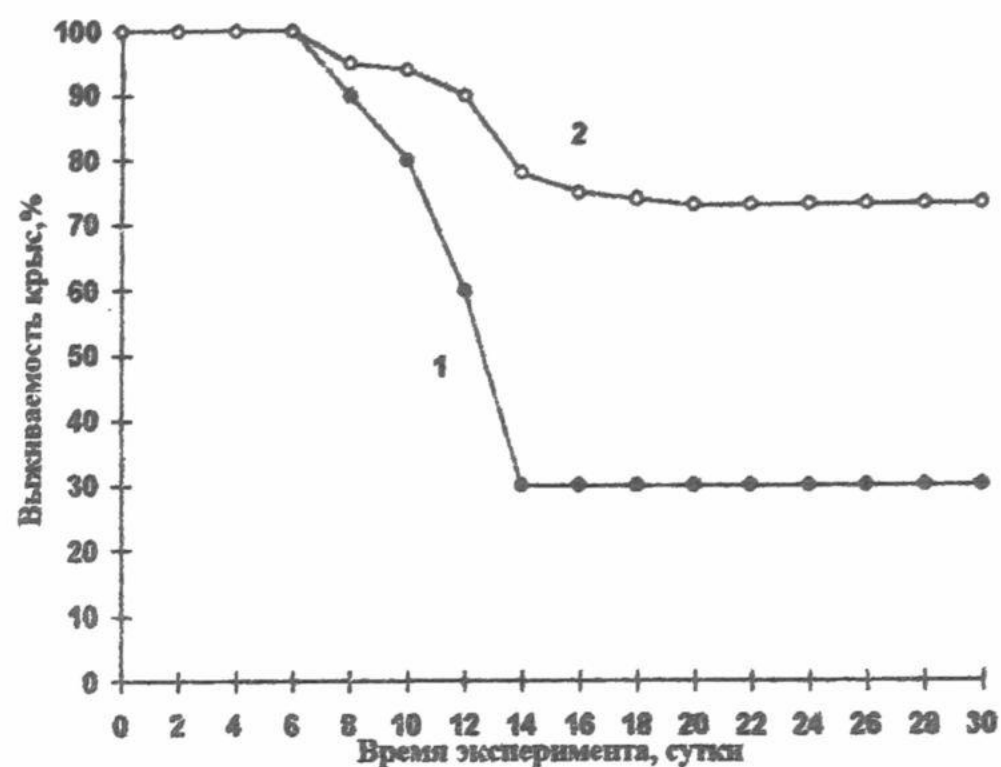


Рис.3. Выживаемость крыс в течение 30 суток после рентгеновского облучения в дозе 6Гр, принимавших препарат альтана (2) и не принимавших (1).

Эритроциты человека в целом являются более устойчивыми к кислотному гемолизу, чем крыс. Как видно из рис. 4 общее время гемолиза эритроцитов человека в 1,5-2 раза больше. Динамика изменения чувствительности эритроцитов онкобольных, подвергнутых лучевой терапии и принимавших препарат альтан, к кислотному гемолизу имеет качественно подобный характер с динамикой для эритроцитов крыс, однако, с более выраженным радиопротекторным эффектом. Значительное расширение эритрограммы до 9,6 мин и более резко выраженный локальный максимум на правой ветви на 30-е сутки после облучения (рис.4, кривая 4) указывают на большую активацию эритропоэза и продукцию макроцитов, чем у крыс. Относительная скорость гемолиза эритроцитов онкобольных близка к контролю с незначительной тенденцией к уменьшению в течение 30 суток после облучения (рис. 5).

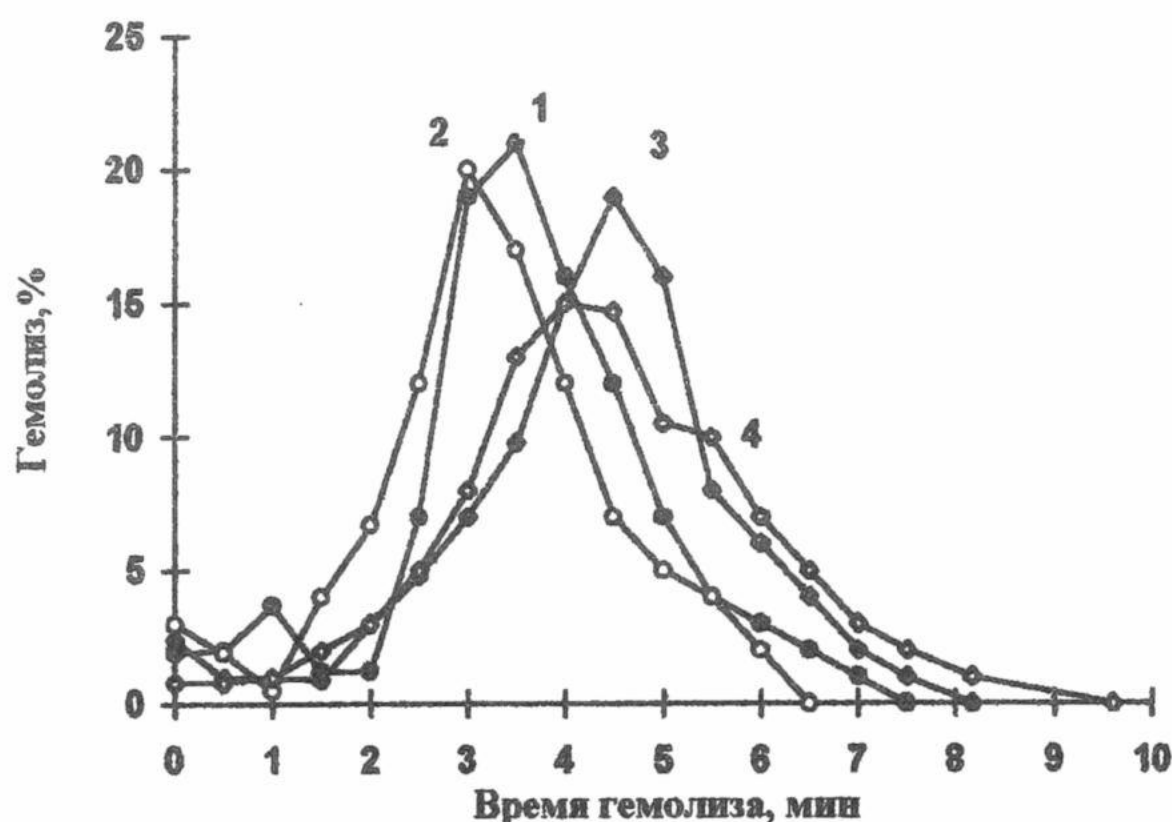


Рис.4. Эритрограммы гемолиза эритроцитов, вызванного 0,028N HCl, контрольной группы (1) и онкобольных через 7 (2), 14 (3) и 30 (4) суток после рентгеновского облучения в дозе 6 Гр на фоне приема препарата альтан.

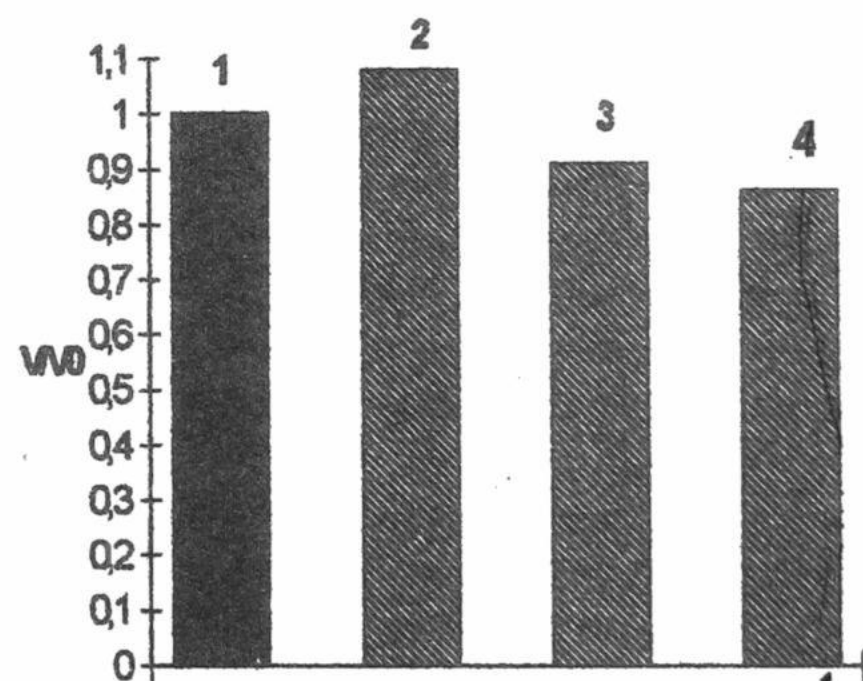


Рис.5. Относительная скорость кислотного гемолиза эритроцитов контрольной группы (1) и онкобольных через 7 (2), 14 (3) и 30 (4) суток после рентгеновского облучения в дозе 6 Гр на фоне приема препарата альтан.

Известно, что в результате действия ионизирующего излучения на клетки нарушаются ионное равновесие и мембранный транспорт, изменяется распределение ионов между внутри- и внеклеточной средами [7,14,15], что приводит к дисрегуляции клеточного гомеостаза, и отражается на радиочувствительности клеток. Для группы онкобольных, проходивших курс лучевой терапии и принимавших препарат альтан, методом пламенной фотометрии определяли ионный состав плазмы крови и внутриклеточной среды эритроцитов. В таблице 1 представлены результаты измерений

Влияние рентгеновского облучения и радиопротектора альтана...

концентрации ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} через 7, 14 и 30 суток после облучения организма. Для всех типов ионов, приведенных в таблице, величины концентрации практически не изменяются и близки к значениям для контрольной группы. Можно предположить, что радиопротекторный эффект препарата альтан заключается в стабилизации структурных компонент клеточных мембран, путем адсорбции на плазматической мембране и экранирования от повреждающего действия ионизирующего излучения.

Таблица 1. Концентрация ионов в плазме крови и в эритроцитах здоровых доноров и онкобольных после лучевой терапии в дозе 6Гр на фоне применения препарата альтан.

№ п/п	Объект исследования	Плазма крови				Эритроциты	
		Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+
1	Контрольная группа	145,01±2,73	4,05±0,11	11,20±0,51	3,14±0,16	20,62±0,52	76,03±0,96
2	Больные: 7 суток после облучения	149,15±2,67	4,28±0,12	12,17±0,32	3,11±0,09	22,49±0,54	81,95±0,75
3	Больные: 14 суток после облучения	149,20±3,06	4,18±0,12	13,52±0,43	3,45±0,09	22,02±0,42	80,02±0,71
4	Больные: 30 суток после облучения	152,80±4,41	4,20±0,12	13,18±0,39	3,17±0,11	21,31±0,52	79,31±1,14

ВЫВОДЫ

Устойчивость эритроцитов крыс к кислотному гемолизу после однократного рентгеновского облучения в дозе 6 Гр снижается, причем этот процесс пролонгирован в течение достаточно длительного периода времени. Применение препарата альтан повышает кислую резистентность эритроцитов крыс и онкологических больных, а значительное снижение скорости гемолиза указывает на то, что протектирующий эффект проявляется на этапе образования гемолитической поры в клеточной мембране. У онкологических больных, проходящих курс лучевой терапии и принимающих препарат альтан, сохраняются физиологические значения распределения ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} между внутри- и внеклеточной средами. Альтан оказывает также стимулирующее эритропоэз и общее адаптогенное действие на лабораторных животных и в клинических условиях на онкологических больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Муксинова К.Н., Мупкачева Г.С. Клеточные и молекулярные основы перестройки кроветворения при длительном радиационном воздействии. М.: Энергоатомиздат, 1990. - 156с.
2. Филенко В.А., Холодный В.С., Горбенко В.Н., Бабенко Н.А. // Біофізичний вісник, 1999 - вип.4, №2. - С.63-68.
3. Ваккер А.В., Кохан В.А., Зенькович Г.А. // Медицинская радиология, 1991. - №5. - С.47.
4. Никулин А.П., Пустовалов И.Ф. // Радиобиология, 1988. - т.28, вып.5. - С.452-454.
5. Финашин А.В., Товстяк В.В. // Біофізичний вісник, 1999 - вип.4, №2. - С.45-53.
6. Дворецкий А.И., Слепченко В.А. Влияние ионизирующей радиации на отдельные системы регуляции внутриклеточного кальция // Современные проблемы экспериментальной биологии и биотехнологии. Днепрпетровск, 1985. - С.39-44.
7. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. М.: Наука, 1986. - 228с.
8. Горбенко Г.П., Крупин В.Д. // Биофизика, 1995. - т.40, вып.2. - С.389-392.
9. Береснев В.Л., Жильцов И.В. // Медицинская радиология, 1976. - т.21, №5. - С.84-86.
10. Казаков М.Г. // Здравоохранение (Кипинев), 1972. - №4. - С.29-32.
11. Гительзон И.И., Терсков И.А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск: Изд-во Сиб.отд.Акад.наук, 1959. - 250с.
12. Rudenko S.V., Crowe J.H., Tablin F. // Biochemistry (Moscow), 1998. - v.63, №12. - P.1385-1394.
13. Кобозев Г.Н., Троицкая Н.А. // Лаб. дело, 1980. - №8. - С.30-35.
14. Chandra S., Stefani S. // Int. J. Radiat. Biol., 1981. - v.40, №3. - P. 305-311.
15. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Радиационная биофизика. М.: Изд-во МГУ, 1979. - 240с.

УДК 537.868 + 577.352.868

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЧ – ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭФФЕКТИВНУЮ ТОЛЩИНУ НЕПЕРЕМЕШИВАЕМОГО СЛОЯ ВОДЫ, ПРИМЫКАЮЩЕГО К МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТА

Б. Г. Емец

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

Поступила в редакцию 1 октября 1999 г.

С помощью ядерного магнитного резонанса определена толщина перемешиваемого слоя воды, непосредственно примыкающего к мембране эритроцита. Получено, что полчасовое облучение низкоинтенсивными микроволнами уменьшило эффективную толщину перемешиваемого слоя на 11 %. Показано, что для объяснения этого результата недостаточно рассмотрения одних только тепловых процессов в образце.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит, мембрана, диффузионный водный обмен, перемешиваемый примембранный слой жидкости, электромагнитные микроволны.

К настоящему времени широкое распространение технологических процессов, использующих электромагнитные (ЭМ) колебания, и развитие беспроводных средств связи обусловило все возрастающий уровень ЭМ загрязнения среды обитания человека. Традиционно велик интерес к проблематике биологического влияния радиоволн СВЧ-диапазона; здесь наиболее подробно исследованы процессы, происходящие при облучении биосистем высокими и средними уровнями энергии [1]. Биологические эффекты влияния низкоинтенсивных электромагнитных волн изучены гораздо меньше; нет единого мнения о механизмах взаимодействия “дотепловых” мощностей с биосредами [2, 3]. Для выработки правильного решения проблемы необходимы исследования на клеточном и мембранном уровне. В настоящей работе изучаются изменения ряда параметров эритроцитарной мембраны, вызванные низкоинтенсивными микроволнами.

При исследовании процессов пассивного транспорта вещества через биомембрану, последнюю принято рассматривать (в упрощенной модели), как трехслойную композицию – липидный бислой и непосредственно примыкающие к нему с двух противоположных сторон перемешиваемые слои водного раствора [4, 5]. Молекулы и ионы могут пройти из межклеточного пространства в клетку через перемешиваемые слои только путем диффузии: это обстоятельство в литературе принято подчеркивать, называя указанные слои перемешиваемыми диффузионными слоями Нернста.

В общем случае диффузия вещества через тонкую мембрану описывается первым законом Фика; он связывает поток вещества J с градиентом концентрации C вдоль направления переноса x : $J = -D \, dC / dx$. (Здесь D – коэффициент диффузии). В случае стационарного транспорта через тонкую мембрану производную от концентрации можно заменить конечной разностью концентраций ($C_a - C_b$), отнесенной к толщине мембраны L . Тогда

$$J = -D \, \Delta C / \Delta x = -D (C_a - C_b) / L = P (C_a - C_b) \quad (1)$$

Здесь введена проницаемость мембраны для диффузионного транспорта $P = D/L$.

Измерив разность концентраций ($C_a - C_b$) и величину потока J , можно определить проницаемость мембраны $P_{изм}$. Однако, в реальном случае, когда, на самом деле, с двух сторон липидной мембраны к ней примыкают диффузионные слои Нернста, концентрации C_a и C_b измеряются не непосредственно у противоположных поверхностей липидного бислоя, а у двух наружных поверхностей перемешиваемых слоев раствора. Поэтому истинную проницаемость $P_{ист}$ следует вычислять с соответствующей поправкой [4]:

$$P_{ист} = J / [C_a - C_b - (\Delta C)_1 - (\Delta C)_2].$$

Здесь $(\Delta C)_1 = J (D_1 / \delta_1)^{-1}$ и $(\Delta C)_2 = J (D_2 / \delta_2)^{-1}$, где δ_1 и δ_2 – толщины соответственно “переднего” и “заднего” (по направлению наблюдения) перемешиваемых примембранных слоев; D_1 и D_2 – коэффициенты диффузии молекул через указанные слои; $(\Delta C)_1$ и $(\Delta C)_2$ – разности концентраций на двух противоположных сторонах каждого из перемешиваемых слоев. С учетом сказанного

Влияние низкоинтенсивного СВЧ-излучения на эффективную толщину...

$$P_{\text{ист}} = (1/P_{\text{изм}} - \delta_1/D_1 - \delta_2/D_2)^{-1}. \quad (2)$$

Приняв приближение, что и “передний” и “задний” неперемешиваемые слои имеют одинаковую толщину ($\delta_1 = \delta_2 = \delta$) и, что коэффициенты диффузии молекул, проходящих через них, одинаковы ($D_1 = D_2 = D$), получаем выражение для удвоенной толщины неперемешиваемого слоя

$$2\delta = D(1/P_{\text{изм}} - 1/P_{\text{ист}}) \quad (3)$$

Выполнив измерения параметров, входящих в (3), для случаев суспензий клеток, экспонированных в СВЧ – поле, можно проследить зависимость 2δ от характеристик облучения.

Формула (3) может быть представлена в виде [4]:

$$2\delta = D(S\tau/V - L_m/D_m). \quad (4)$$

Здесь учтено, что проницаемость собственно мембраны $P_{\text{ист}} = D_m/L_m$, где L_m – толщина липидного бислоя, D_m – коэффициент диффузии вещества через бислой, а $P_{\text{изм}}$ может быть выражена через постоянную времени τ переноса вещества через мембрану, S – площадь поверхности клетки, V – объем клетки.

В работе рассматривается, какое значение принимает 2δ в ответ на СВЧ-облучение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Исследования выполнены на эритроцитах донорской крови человека при 25 °С. Для измерения величины водной диффузионной проницаемости мембраны $P_{\text{изм}}$ использовался ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [6], позволяющий методом “парамагнитного допинга” [7] определить постоянную времени τ процесса переноса молекул воды через эритроцитарную мембрану.

Суспензия эритроцитов (объем 0,6 см³, соотношение эритроцитарной массы и физиологического раствора 1:1) помещалась в цилиндрическую ампулу из стекла сорта “пирекс”. Облучение велось генератором типа Г 4 – 141 с использованием диэлектрического (фторопласт) волновода, погруженного непосредственно в суспензию. Рабочая частота 50 ГГц ($\lambda = 6$ мм); выходная мощность 4 мВт.

Измерения τ велись с помощью ЯМР – релаксометра, рабочая частота 15,9 МГц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ЯМР определена постоянная времени диффузионного водного обмена через мембраны необлученных эритроцитов $\tau = (11,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ с. Подставив это значение в (4), а также, следуя [8], объем эритроцита $V = 8,7 \cdot 10^{-11}$ см³, площадь его поверхности $S = 1,63 \cdot 10^{-6}$ см², параметры липидного бислоя [4, 9, 10, 11]: $L_m = 5$ нм, $D_m = 10^{-5}$ см²/с, приняв для воды при 25 °С [12] $D = 2,5 \cdot 10^{-5}$ см²/с, имеем $P_{\text{изм}} = (4,85 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ см/с; $P_{\text{ист}} = (20,0 \pm 0,4)$ см/с; $2\delta = (5,15 \pm 0,06) \cdot 10^{-3}$ см. Из полученного следует, что “проницаемость” суммарного неперемешиваемого слоя $\Pi = D/2\delta = (4,85 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ см/с в пределах указанной точности равна проницаемости мембраны $P_{\text{изм}}$. Это означает, что процесс переноса лимитируется диффузией в неперемешиваемых слоях и слабо зависит от свойств мембраны.

В таблице 1 приведена зависимость постоянной времени трансмембранного водного обмена τ , а также $P_{\text{изм}}$ и эффективной толщины неперемешиваемого слоя 2δ от продолжительности микроволнового облучения. (В ходе облучения температура образца, измеренная с точностью до 0,2 °С, не изменилась).

Таблица 1. Зависимость τ , $P_{\text{изм}}$ и $2\delta_{\text{эфф}}$ от продолжительности СВЧ – облучения

Продолжительность облучения, мин	0	5	10	15	20	30
$\tau \cdot 10^3, \text{с}$	11,0 ± 0,1	10,7 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,0 ± 0,1	9,8 ± 0,1	9,7 ± 0,1
$P_{\text{изм}} \cdot 10^3, \text{см/с}$	4,85 ± 0,05	4,99 ± 0,05	5,04 ± 0,05	5,34 ± 0,05	5,45 ± 0,05	5,50 ± 0,05
$2\delta_{\text{эфф}} \cdot 10^3, \text{см}$	5,15 ± 0,06	5,01 ± 0,06	4,96 ± 0,06	4,68 ± 0,06	4,59 ± 0,06	4,54 ± 0,06

Очевидно, что СВЧ – облучение повышает проницаемость эритроцитарных мембран $P_{изм}$, причем этот эффект проявляется тем сильнее, чем больше экспозиция.

Как отмечено выше, проницаемость эритроцитарной мембраны лимитируется не липидным бислоем, а примембранными неперемешиваемыми слоями водного раствора. Поэтому естественно предположить, что увеличение температуры поднимет проницаемость $P_{изм}$, поскольку рост температуры ослабляет межмолекулярные связи в жидкости (например, плотность воды при повышении температуры с 25 °С до 30 °С уменьшается на 0,084 %), а значит, должна уменьшиться и толщина неперемешиваемого слоя. Мы выполнили соответствующие измерения, получив при повышении температуры на 4 °С такое же увеличение проницаемости (на 13 %), которое наблюдается при 30 – минутном СВЧ-облучении. Расчет толщины неперемешиваемого слоя при этой повышенной температуре (29 °С) дает $2\delta = (5,00 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ см. (При этом учтен рост D с температурой [12]). Конечно, трудно предположить, что 5 – минутное СВЧ – облучение при практически неизменной температуре уменьшит толщину примембранного слоя на ту же величину, что и нагрев на 4 °С. Повидимому здесь следует говорить о влиянии СВЧ-облучения на изменение не абсолютной, а эффективной толщины примембранного слоя $\delta_{эфф}$.

Таким образом, для объяснения полученного результата недостаточно рассмотрения процессов диссипации в тепло микроволновой энергии в образце. Специфическое влияние СВЧ – волн может быть объяснено, если учесть наличие в реальной жидкости (в воде) растворенного воздуха и воздуха в свободном состоянии (пузырьки). Согласно [13], в воде суммарный объем пузырьков составляет стомиллионную долю общего объема растворенного воздуха. Известно, что повышение температуры уменьшает растворимость воздуха в воде. Конкретно, объем растворенного в ней воздуха при 20 °С ($18,26 \cdot 10^{-3}$ см³ в 1 мл H₂O) на 1,7 % больше, чем при температуре 21 °С ($17,95 \cdot 10^{-3}$ см³ в 1 мл H₂O) [14]. Следовательно, при повышении температуры на 1 градус, в жидкости появляются “лишние” молекулы газа, которые должны покинуть жидкость. Однако, немедленно уйдут из жидкости лишь те из них, которые оказались вблизи открытой поверхности жидкости вверху. Все остальные “лишние” молекулы, сталкиваясь друг с другом, объединяются в кластеры, а затем и в пузырьки, взвешенные в объеме жидкого образца. Суммарный объем “пузырькового” воздуха при этом может увеличиться на несколько порядков по отношению к норме. В гипотетическом случае, если представить, что все без исключения, “лишние” молекулы воздуха объединились в пузырьки, суммарный объем последних возрастет в $1,7 \cdot 10^5$ раз. Соответственно, в 170 тысяч раз увеличится (по сравнению с нормой) и количество воздушных пузырьков в объеме жидкости. Конечно, приведенная оценка является достаточно приближенной. Тем не менее, следует допустить, что при СВЧ-нагреве даже на 0,001 градуса количество пузырьков может увеличиться в несколько десятков раз против нормы. Эти “дополнительные” пузырьки, радиусом $2 \cdot 10^{-9}$ м [15], диффундируют по всему объему, проникая, в том числе, и в примембранный слой, разрыхляя последний. В результате, эффективная толщина примембранного слоя уменьшается до значений, наблюдаемых в эксперименте.

Необходимым условием для накопления “лишних” пузырьков в образце в ходе СВЧ-облучения является отсутствие конвекции в жидкости. При конвекции крупномасштабные перемещения жидких слоев выносят на свободную поверхность и “лишние” молекулы растворенного воздуха и “лишние” пузырьки. Конвекция возникает при выполнении критерия Рэлея, связывающего разность температур на границах сосуда с жидкостью, размеры сосуда и физические характеристики жидкости [16]. Конвекции можно избежать, если подводить к жидкости ЭМ колебания достаточно низкой интенсивности, что и реализовано в вышеописанных экспериментах.

ВЫВОДЫ

1. Наблюдено увеличение проницаемости эритроцитарных мембран для диффузионного водного обмена, обусловленное низкоинтенсивным микроволновым облучением. (Получасовая экспозиция при практически неизменной температуре повышает ее на 13 %. Такое же увеличение проницаемости наблюдается при нагреве эритроцитов на 4 °С).
2. Показано, что для эритроцитарных мембран проницаемость лимитируется диффузией в примембранных слоях и слабо зависит от свойств мембраны. Получено, что получасовое облучение уменьшает эффективную толщину примембранного неперемешиваемого слоя на 11 %.
3. Предложено интерпретировать наблюденное разрыхление примембранного слоя увеличением концентрации в нем воздушных микропузырьков, которое стимулировано облучением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Минин Б. А. СВЧ и безопасность человека. М. Сов. радио, 1974. 352 с.
2. Исмаилов Э. Ш. Биофизическое действие СВЧ-излучений. М. Энергоатомиздат, 1987. 144 с.
3. Девятков Н. Д. , Голант М. Б. , Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М. Радио и связь, 1991. 168 с.
4. Котык А. , Яначек К. Мембранный транспорт. М. Мир, 1980. 338 с.
5. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М. Изд-во МГУ, 1985. 190 с.
6. Абрагам А. Ядерный магнетизм. М. Изд. ин. лит., 1963. 551 с.
7. Conlon T. , Outhred R. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR – technique.// Biochem. and Biophys. Acta. 1972. V. 288. No 2. P. 354 – 361.
8. Воробьев А. И. , Бриллиант М. Л. , Андреева Н. Е. и др. Руководство по гематологии. Т. 1. М. Медицина, 1985. 448 с.
9. Кагава Я. Биомембраны. М. Высшая школа, 1985. 303 с.
10. Черницкий Е. А. , Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск. Наука и техника, 1981. 216 с.
11. Ивков В. Г. , Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М. Наука, 1981. 296 с.
12. Таблицы физических величин. Справочник. (Под ред. Кикоина И. К.) М. Атомиздат, 1976. 1008 с.
13. Бункин Н. Ф. , Бункин Ф. В. Бабстоны – стабильные газовые микропузырьки в сильно разбавленных растворах электролитов.// ЖЭТФ. 1992. Т. 101. № 2. С. 512-527.
14. Справочник по растворимости (ред. Кафаров В. В.). Том 1. Книга 1. М. –Л. Изд-во АН СССР, 1961. 960 с.
15. Бункин Н. Ф. , Виноградова О. И. , Куклин А. И. , Лобеев А. В. , Мовчан Т. Г. К вопросу о наличии воздушных субмикропузырей в воде : эксперимент по малоугловому рассеянию нейтронов. // Письма в ЖЭТФ. 1995. Т. 62. № 8. С. 659-662.
16. Гершуни Г. З. , Жуховицкий Е. М. Конвективная устойчивость несжимаемой жидкости. М. Наука, 1972. 392 с.

ЮРИЙ ПАВЛОВИЧ БЛАГОЙ

к 70-летию со дня рождения



25 июля 1999 года исполнилось семьдесят лет профессору Юрию Павловичу Благому, известному физику-экспериментатору, заведующему отделом молекулярной биофизики Физико-технического института низких температур им. Б.И.Веркина Национальной академии наук Украины.

Ю.П. Благой начал свою научную деятельность на физическом факультете Харьковского государственного университета после его окончания в 1952 году. Его научные интересы в то время были связаны с изучением физических свойств криогенных жидкостей, таких как поверхностное натяжение и фазовые равновесия в растворах. По результатам этих исследований в 1960 году он защитил кандидатскую диссертацию. Когда академик Б.И.Веркин в 1960 году организовал в

Харькове самый крупный в бывшем СССР криогенный научный центр - Физико-технический институт низких температур АН Украины, Юрий Павлович стал одним из его сподвижников. Он возглавил лабораторию физических свойств ожиженных газов. В течение 10 лет под его руководством были проведены обширные исследования термодинамических свойств криогенных жидкостей, в результате которых были определены параметры межмолекулярного взаимодействия и характер теплового движения для веществ со сферически симметричными молекулами. Существенный вклад был сделан в физику критических явлений в простых жидкостях, какими являются ожиженные инертные газы. Результаты исследований вошли в учебники и руководства по физике, в частности, в справочники по физико-техническим основам глубокого охлаждения и по свойствам жидкого водорода. В 1970 году Юрий Павлович защитил докторскую диссертацию.

С 1971 года Ю.П. Благой начинает работать в новой области науки - молекулярной биофизике, в которой он успешно трудится до сих пор. Под его научным руководством проводятся исследования структуры нуклеиновых кислот и влияния на них биологически активных соединений. Большое внимание уделяется изучению взаимодействия нуклеиновых кислот с ионами металлов ввиду их важной роли в функционировании живых организмов. По результатам этих исследований в 1991 году вышла монография "Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах".

Научные интересы Ю.П.Благого и его сотрудников охватывают обширную область молекулярной биофизики нуклеиновых кислот. При проведении исследований используются современные эффективные физические методы, такие как низкотемпературная матричная изоляция, масс-спектрометрия, дифференциальная УФ-, ИК- и флуоресцентная спектроскопия. В последние годы серьезное внимание уделяется решению научных задач экологического характера (влияние ионов тяжелых металлов, воздействие радиации). В отделе интенсивно развивается новое направление, связанное с разработкой метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот, открывающего перспективу избирательного воздействия на генетический аппарат живых организмов. Решается проблема стабилизации комплексов антисмысловых олигонуклеотидов с помощью интеркалирующих красителей.

Результаты научных достижений Ю.П.Благого и его сотрудников широко известны и признаны как на Украине, так и за рубежом. Об этом свидетельствуют около 300 публикаций в престижных научных изданиях, участие Юрия Павловича в работе конференций в качестве приглашенного лектора, международные научные гранты и звание Соросовского профессора.

Много сил и энергии Ю.П.Благой уделял развитию биофизики в бывшем СССР и на Украине. Под его руководством работала Школа по физике нуклеиновых кислот. Активное участие он принимал в проведении всесоюзных конференций по спектроскопии биополимеров.

Большая работа проделана им по созданию курса лекций по криобиофизике, физике полимеров и биополимеров в Харьковском государственном университете. Более четверти века отдано педагогической работе на кафедре молекулярной и прикладной биофизики ХГУ, которой он заведовал с 1980 по 1985 год. Свыше 500 студентов-биофизиков более чем из 20 стран мира слушали лекции Юрия Павловича.

Большое внимание Ю.П. Благой уделяет подготовке научных кадров. Среди его учеников – 2 доктора и 20 кандидатов наук.

Ю.П. Благой является заместителем председателя специализированного научного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций по биофизике – физико-математические науки, входит в состав редколлегии журнала "Біофізичний вісник".

Успех коллектива, руководимого Юрием Павловичем, всегда определялся его незаурядными организаторскими способностями, а высокая эрудиция в области физики всегда позволяли ему корректно ставить задачи и находить нестандартные решения при интерпретации результатов эксперимента. Интеллигентность, тактичность и внимание к сотрудникам характеризуют стиль его руководства. Ученики знают Юрия Павловича как эрудированного и мудрого педагога, а коллеги – как человека большой доброты и истинного благородства.

Друзья и сотрудники горячо поздравляют Юрия Павловича с юбилеем, желают ему крепкого здоровья, многих лет жизни и творческого долголетия.

ABSTRACTS

EFFECT OF Mg^{2+} ON DOUBLE AND TRIPLE HELIX FORMATIONS BETWEEN POLY(dA) AND POLY(dT)**V.N. Zozulya, A.S. Shcherbakova, Yu.P. Blagoi***Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, Kharkov, 310164, Lenin Ave. 47, Ukraine*

The Mg^{2+} ion effect on conformational transitions in double- and triple-helical structures formed by poly(dA) with poly(dT) has been studied in 10 mM cacodylate buffer, pH 7, containing 0.1 M Na^+ . The investigations were carried out by the method of thermal denaturation using UV absorbance and Rayleigh light scattering detections of melting transitions. Temperatures of helix-to-coil transition of poly(dA)-poly(dT) and triplex-to-duplex of poly(dA)-2poly(dT) increase linearly with $\log[Mg^{2+}]$ and more quickly in the last case that results in the superposition of these transitions at $[Mg^{2+}] \geq 15$ mM. At $[Mg^{2+}] \geq 20$ mM during the melting of the both structures aggregation was observed, which arises, according to Bloomfield and co-workers, due to formation of cross-links by Mg^{2+} ions bridges between partially unplaited polymer strands and disappeared after the end of melting. It is established that at the presence of 0.1 M NaCl magnesium ions do not induce the partial formation of the triplex structure in poly(dA)-poly(dT) (disproportionation) as is postulated by other authors in some papers.

KEY WORDS: polynucleotides, double and triple helices, magnesium ion, helix-to-coil transitions, Rayleigh scattering

INFLUENCE OF HYDRATION ON THE TAUTOMERISM OF NUCLEIC ACID BASES: COMPUTER SIMULATION BY MONTE CARLO METHOD**V.I. Danilov***Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 150 Zabolotny Str., 252143, Kiev, Ukraine*

An extensive computer simulation of nucleic acid bases hydration and their main tautomeric forms is performed by the Monte Carlo method. It is shown that the lactam form of guanine and amino form of cytosine in water cluster are energetically more preferable than their lactim form and imino form respectively. The greater stability of the usual tautomeric forms of these bases in water cluster as compared with their rare tautomeric forms entirely due to energetically more favourable interaction of water molecules with each other. At the same time it is detected that the imino form of adenine and lactim forms of thymine and uracil are more stable than the corresponding amino form and lactam form. This fact is determined by more favourable interaction of the base rare forms with a water.

KEYWORDS: nucleotide bases, tautomerism, hydration, Monte Carlo method, computer simulation

HYDRATION OF THE VARIOUS STRUCTURAL FORMS OF POLYRIBOCYTIDILIC ACID AND ITS COMPONENTS BY A MONTE CARLO METHOD.**2. THE INFLUENCE OF PROTONATION ON HYDRATION OF CYTOSINE ASSOCIATES.****A.V. Shestopalova, D.B. Anischenko*, V.Ya. Maleev.***Institute for Radiophysics & Electronics, NAS of Ukraine, 12 Acad. Proskura str., 61085, Kharkov, Ukraine***Kharkov National University, 4 Svobody sq., 310077, Kharkov, Ukraine*

The processes of association neutral and protonated on N3-site cytosine in water and influence of protonation on cytosine associates interaction with aqueous environment have been studied by Monte Carlo method. The structural and energetic characteristics of hydrogen-bonded pair of neutral (C) and protonated (C^+) cytosine (HB-pair) and stacked-dimers of both cytosine forms with 200 water molecules have been received. It was shown, that the formation of HB-pair in water is energetically unfavourable, but in vacuum such HB-pair is stable. The formation of stacked-dimers C-C and C^+-C^+ in water is energetically preferable. The preference of stacked-dimer C-C in water is connected with the energetic preference of the dimer-water interaction and with the favourable change in water structure around monomers during their association. The energetic preference of C^+-C^+ stacked-dimer formation in water is determined by the strong water-dimer interaction and formation of water bridges between cytosines stabilized such associate. The hydration schemes of the three associates have been determined.

KEYWORDS: cytosine associates, protonation, hydration, a Monte Carlo method

VIBRATIONAL ANALYSIS OF THE WATSON-CRICK BASE PAIR ADENINE-URACIL. AN AB-INITIO QUANTUM-CHEMICAL STUDY.**S.G. Stepanian***Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine**47 Lenin Ave., Kharkov 61164 Ukraine, e-mail: stepanian@ilt.kharkov.ua*

Vibrational spectra of the Watson-Crick base pair adenine-uracil were calculated for the first time using the DFT/B3LYP/6-31++G** level of theory with the accounting for the electron correlation. The complete analysis of the vibrational spectra of the base pair was carried out and the force fields of the monomers and dimer were determined. The spectral manifestations of the H-bonding in the base pair adenine-uracil were summarized. The interaction energies of the base pair were calculated at the MP2 and DFT levels of theory with the accounting for the basis set superposition error correction and zero-point vibration energy correction. They are -47.8 and -6.0 kJ/mol, respectively. The calculated energies are found to be in good agreement with the experimental data.

KEY WORDS: adenine-uracil, quantum-chemical ab-initio calculations, vibrational spectra, molecular parameters.

RELAXATION AND SPECTROSCOPIC MANIFESTATIONS OF HYDRATION OF POLYRIBOCYTIDYLIC ACID

V.A. Kashpur, M.A. Semenov, N.N. Sagaidakova

Institute for Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine

12, Acad. Proskura str, 310085, Kharkov, Ukraine, tel. 0038-0572-448337, fax 0038-0572-441105, e-mail: berez@ire.kharkov.ua

Hydration and structure state of polyribocytidylic acid (poly(rC)) have been studied in solutions and humid films. The role of water in forming different structures of poly(rC) was elucidated. In solutions, the hydration values of single-strand (pH 4.5), double-strand (pH 7.8) and disordered (pH 3.3) forms of poly(rC) were determined with a differential EHF-dielectrometer using the measurements of dielectric permittivity at wavelength 7.6 mm. In humid films, distribution of water molecules on the hydration sites for these structures has been found with IR spectroscopy. Hydration models of the single and double-strand structures of poly(rC) were developed using X-ray and these data.

KEY WORDS: polycytidylic acid, hydration, infrared spectra, millimeter region, structural transitions

INTERACTION OF Ni^{2+} IONS WITH HOMOPOLYNUCLEOTIDES CONTAINING ADENINE AND URACIL AND THEIR MONOMERS

V.A. Sorokin, V.A. Valeev, M.V. Degtiar, G.O. Gladchenko, Yu.P. Blagoi

B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov, 61164, Ukraine

Interactions of Ni^{2+} ions with AMP, UMP, single-chain poly A, poly U, double-chain poly A-poly U and three-chain polyA-2 poly U have been studied by the method of differential UV spectroscopy. The coil $\rightarrow$ helix transition observed in polynucleotides is due to the Ni^{2+} ion binding to oxygen atoms of phosphate groups. The nickel coordination to bases takes place only in the case of single AMPs and single-chain poly A. The formation of a chelate $\text{N7-Ni}^{2+}-(\text{PO}_4)^-$ induces melting of this polymer. Melted parts form compact particles with the effective radius ~ 100 Å.

KEY WORDS: UV spectroscopy, homopolynucleotides, metal ions

INFLUENCE OF HYDRATION ON TAUTOMERISM OF 6-THIOGUANINE.

Yu.V. Rubin

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov, 310164, Ukraine

The theoretical calculation of complexes of 6-thioguanine thiol and thion tautomers was performed by means of B3LYP and HF methods. The greater stability of complex having included the thion tautomer by 17.6 kJ/mol and 8.1 kJ/mol correspondingly was shown. It accords with experimental data that 6-thioguanine exists in water mainly in the shape of thion tautomer, although it exists in gas phase as thiol tautomer.

KEY WORDS: 6-thioguanine, tautomerism, quantum-mechanical calculations

THE FRIZZING REGIME EFFECT ON THE INTERACTION BETWEEN FIBRINOGEN AND DSM FLUORESCENCE PROBE

V.A. Gavrik, E.A. Romodanova, T.S. Dyubko, S.V. Gatash

Karazin Kharkov National University, Svobody sq. 4, Kharkov, 61077, Ukraine

**Institute of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, Pereyaslavskaya str. 23, Kharkov, 61015, Ukraine*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua, tdyubko@lincom.kharkov.ua

The interaction between fibrinogen and DSM fluorescence probe in protein solutions frizzed with different rates up to -8 °C and -196 °C has been studied by using the fluorescence spectroscopy method. Two types of probe binding centers have been detected on the fibrinogen molecule. These centers have distinct parameter values of fluorescence spectra. It has been shown, that greater conformational damages take place under slow cooling conditions than under fast ones.

KEY WORDS: fibrinogen, conformation, fluorescence spectroscopy, probe, binding, frizzling, cooling rate

PROPERTIES OF A SOLUTION OF GLYCINE IN AN INTERVAL OF TEMPERATURES 20-70 °C ON DATA OF MICROWAVE DIELECTROMETRY AND VISCOSIMETRY

G.M. Glibitskiy

Institute for Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine, 12 Acad. Proskura str., Kharkov, 310085, Ukraine

The changes of viscosity and relaxation times of 20 % of a glycine solution in the interval of temperatures 20-70 °C are studied. The technique of measurement of viscosity is described. Data on static permittivity and relaxation times calculated according to Debye model, taking into account average relaxation times in the solution, are presented. The deviations of values calculated from ones measured by alternative methods are discussed. A possible mechanism of change of dielectric parameters in the range of temperatures considered is offered.

KEY WORDS: glycine, relaxation time, permittivity, aqueous solutions.

HIGH CONDUCTANCE CALCIUM-DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IN THE MEMBRANE OF GUINEA PIG TAENIA COLI

A.V. Zima, A.V. Povstyan, M.F. Shuba

Bogomoletz Institute of Physiology, Bogomoletz str. 4, Kiev-24, 252601 GSP, Ukraine

e-mail: onmf@serv.biph.kiev.ua

High conductance calcium-dependent potassium (K(Ca)) channels in isolated membrane fragments from guinea pig taenia coli smooth muscle cells (SMCs) have been studied using "outside-out" and "inside-out" patch-clamp recording techniques. Currents carried via these channels were studied with the "whole cell" patch-clamp technique also. It was shown that charybdotoxin-sensitive K(Ca) channels are presented widely in these cells. They have a high conductance - 125 ± 24 pS at $[K^+]/[K^+]_0 = 23$. In addition to Ca^{2+} -dependence, these channels were voltage-dependent also, but have no a voltage-dependent inactivation. Fast inactivation of these K(Ca) is dependent only on sub-membrane intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$). Time course of the decay of current carried via high conductance K(Ca) channels was found to follow closely the rate of Ca^{2+} current inactivation. It was suggested that the main source of Ca^{2+} , needed for the activation of high conductance K(Ca) channels, is entrance of Ca^{2+} ions into the cell via L-type Ca^{2+} channels.

KEY WORDS: smooth muscle cells, membrane, K(Ca) channels, conductance, $[Ca^{2+}]_i$, charybdotoxin, voltage-dependence, inactivation

THE INVESTIGATION OF PERMEABILITY OF CYTOPLASMATIC MEMBRANES FOR WATER AND ENERGY OF ACTIVATION OF WATER TRANSPORT THROUGH CELL MEMBRANE

N.D. Bezugly, A.G. Trokhimenko

Kharkov Biotechnology Centre, p/o Kulinichi, Kharkov, Ukraine 312120, e-mail: cryo@animal.kharkov.ua

The method of studying of cytoplasmatic membrane permeability for water was described. The given method allows one to calculate the coefficient of mammalian ova and embryo cytoplasm membrane permeability for water on basis measurement of cell volume changes in time in solutions of different composition and temperature by using of physic and mathematical model and Kedem-Katchalsky equations. And also the energy of activation of water transport through cell membranes was determined.

KEY WORDS: osmotic reaction, cytoplasmatic membrane permeability, cell volume, energy of activation.

NUMERIC MODELLING OF THE PROCESS OF CRYOPROTECTANT REMOVAL FROM A CELLULAR SUSPENSION

M.V. Ostankov, A.A. Kostyaev

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, Kharkov

Kirovsky Scientific and Research Institute for Hematology, RAS, Vyatka, Russia

The resistance of frozen-thawed cells to posthypertonic lysis during the process of their single washing-out from a cryoprotectant has been investigated by means of the method of numeric modelling using the transmembrane mass transfer equation. It has been shown, that the dilution values of thawed cellular suspension by means of washing-out solution and the concentration of non-penetrating substances in cells in it affect the strongest effect on the result of this procedure.

KEY WORDS: numeric modelling, cryoprotectant, posthypertonic cryohemolysis.

ON POSSIBLE SCENARIO OF SPACE AND TIME EVOLUTION OF SELF-ORGANIZATION IN BIOLOGICAL MEDIA

V.P. Shestopalov

A.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine, Akad. Proskura str., 12, Kharkov, 61085, Ukraine

The results of the stationary diffraction theory, the spectral theory of open systems and the theory of Mors' critical knots of dispersion equation of boundary self-organizing biomedica permit one to determine the analytic dispersion laws and build on their basis the nonlinear evolution equation to describe local space and time processes of continuous biomolecule media. On the simplest examples of nonlinear equation solutions for flat media interfaces it has been demonstrated the variety of dynamical phenomena appearing when macromolecule self-organization occurs.

KEY WORDS: diffraction, dispersion, catastrophe, interface, self-organization, chirality

THE ROLE OF CELL MOTILITY IN THE OVERGROWTH OF METASTATIC CELLS IN A HETEROGENEOUS TUMOUR

A.V. Kolobov¹, A.A. Polezhaev¹, G.L. Solyanik²

¹*P.N. Lebedev Physical Institute of RAS, Moscow, Russia*

²*Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology, NAS of Ukraine, Kiev, 252022, e-mail: gis@onconet.kiev.ua*

The mathematical model of the growth kinetics of a heterogeneous tumour consisting of two cell subpopulations: fast-growing and non-motile subpopulation and slow-growing but motile one, - has been created to study the metastatic cell dominance phenomenon. The results obtained showed that the migrating capacity of the cells (as an inherent cellular characteristic) can result in the growth advantage of these cells in a heterogeneous tumour.

KEY WORDS: mathematical model, cell motility, heterogeneous tumour, metastatic cells

MODELING OF CELL RECEPTIVE FIELDS OF VISUAL ANALYZER

R.V. Lyakhovetsky, T.P. Palatniy, T.V. Korobko, V.R. Lyakhoetsky, V.L. Zyma

Taras Shevchenko Kyiv University, 64, Volodymyrska str., Kyiv, 01033, Ukraine

The creation of precise maps of receptive fields (RF), by the method of mathematical modeling has been investigated. We have shown that in electrical field of double sincytium (photoreceptors - horizontal cells), under the influence of dot stimulus springs up a delve, which have form of difference of gaussians. This allows presuming photoreceptor's RF and sets demands for "retina chip". Precise maps of circular and rectangular RF have been designed, which are the base for description of the properties of RF of complex cells and hypercolumn, including the possibility to normalize the dimensions of input signals.

KEY WORDS: cells of visual analyzer, models of receptive fields, elements of neurocomputer

STUDY OF RADIATION-INDUCED ALTERATIONS IN OXIDOREDUCTASE ACTIVITY IN THE PRESENCE OF MEMBRANOTROPIC AGENTS

A.V. Finashin, V.N. Tkachenko, V.V. Tovstiyak

Kharkov National University, 61077, Kharkov, Svobody sq. 4, e-mail: tovstiyak@pem.kharkov.ua

The activity of microsomal oxidoreductases has been studied under the influence of radiation in the doses 10^2 - 10^4 Gy. The activity of both enzymes has been found to decrease upon irradiation in the dose 10^4 Gy. It has been shown that radiation-induced effects do not depend on the protein's concentration range 0.2-0.23 mg/ml. Oxidoreductase radiative inactivation has been found not to correlate with the lipidperoxidation. The peculiarities of the action of compounds, modifying the membrane structural state (triton X-100, glutaraldehyde, butanol) on the oxidoreductase radioresistivity have been established.

KEY WORDS: microsomal oxidoreductases, irradiation, modification of enzyme radioresistivity.

PROLONGED CHRONIC IRRADIATION EFFECTS ON DNA STRUCTURE IN THE CHERNOBYL ZONE

S.V. Kornilova

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine.

47 Lenin Ave., 310164, Kharkov, Ukraine, e-mail: kornilova@ilt.kharkov.ua

Properties of DNA from animals exposed to prolonged irradiation in the Chernobyl APS zone were studied by methods of viscometry, thermal denaturation, IR spectroscopy and electrophoresis. In DNA preparations from liver and spleen an abnormal number of low molecular DNA was revealed, that increases in following generations of animals as well as with their ages. This effect is especially pronounced in DNA from liver. It is shown that the low molecular DNA is riched in GC-pairs and consists of four fraction, namely: 1) ~500 nucleotide pairs (n.p.), 2) ~1500-2000 (n.p.), 3) ~4000-5000 n.p. and 4) an admixture with ~20000 n.p. It was found too that DNA preparations from tissues of experimental animals contain ferrum, zinc, selenium and other elements the contents of which are by dozen times higher than those of control preparations. Cu added into food of animals living currently in the zone intensifies the radiation influence. Model experiments on the combined effect of irradiation and Cu ions on DNA from blood lymphocytes revealed synergism of their effect. Zinc has a lesser influence on DNA physico-chemical properties than copper ions have. Experimental results on properties of DNA from regenerated liver cells after hepatectomy in animals exposed to prolonged irradiation evidence the increase of latent damages of DNA under irradiation, that manifests itself as low molecular DNA fractions the number of which reaches 65%. A model of DNA damages under the action of low doses of ionizing irradiation and Mt^{2+} ions was proposed.

KEY WORDS DNA, chronic irradiation, low molecular fractions, viscometry, IR-spectroscopy, metal ions

THE MOLECULAR MECHANISMS OF CONNECTIVE TISSUE VISKO-ELASTIC PROPERTIES FORMATION UNDER THE INFLUENCE OF EXOGENOUS MECHANICAL LOAD

A.E. Kuzmis, O.B. Garbuzenko, E.E. Persky, L.A. Utevska

V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, 61077, Ukraine

The investigation of the mechanical load influence on collagen concentration and synthesis intensity and visko-elastic properties of tail tendons, skin and aorta of different ages rats in vivo and in vitro has been done. Iminoacid and radioizotop analysis were used. The values of visko-elastic properties tissue were calculated by the corresponding graphs of stain-deformation. It was shown that mechanical load which influences on the organs leads to the changes connective tissue metabolism and finally to the formation of organs visko-elastic properties that are optimal to this influence.

KEY WORDS: mechanical load, visko-elastic properties, deformation, collagen, synthesis, age

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF MELTING CURVES OF DNA-BIOLOGICALLY ACTIVE NUCLEOSIDE MIXTURES AS A METHOD FOR DETECTION OF THE DNA DAMAGES

E.B. Kruglova, N.A. Gladkovskaya

Institute for Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine, 12 Acad. Proskura str., Kharkov, 61085, Ukraine

Recently we have shown that DNA molecules extracted from epididymis of the Wistar male rats exposed to low doses of gamma radiation and the control DNA molecules interact with some of pyrimidine nucleosides (NUC) in different ways. Using UV-melting curves of the DNA-NUC mixtures for the model DNA samples we show that this differences are connected with the conformational

changes of the DNA helix. Model DNA samples were obtained by means of the partial denaturation of the calf thymus DNA in the salt-free aqueous solutions. The level of DNA damages of DNA molecules in such solutions depends on the DNA concentration. It was shown that such DNA damages lead to the changes in the melting curves of DNA-NUC mixtures which are similar to those for the DNA from irradiated tissues. It has been found also that the binding mechanisms of cytosine arabinoside (Ara-C) and 6-azacytosine (6AZC) with DNA molecules which have some modification in secondary structure are different.

KEY WORDS: salt-free DNA solutions, low radiation doses, UV melting curves, spectrophotometry, cytosine arabinoside, 6-azacytidine, the DNA damages

INFLUENCE OF X-IRRADIATION AND PROTECTOR, ALTAN, ON ERYTHROCYTE RESISTANCE

L.V. Batiuk, S.V. Gatash

Kharkov Scientific and Research Institute for Medical Radiology, 82 Pushkinskaya str., 61024, Kharkov, Ukraine

V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., 61077, Kharkov, Ukraine

The influence of x-irradiation and preparation altan on hemolysis by acid rat and human erythrocytes. The x-irradiation of 6 Gy dose causes the decrease of acid resistance of erythrocytes of both rat and oncology patients. It has been shown that altan therapy (perorally) performed before and after x-irradiation decreases the radiation effect on animal and human erythrocyte hemolysis sufficiently. Under such conditions the x-irradiation did not cause the change of ion (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) ion concentrations both inside the erythrocytes and in blood plasma. Survival of altan-recipient rats was 2.5 times greater in 15-30 days after irradiation. The possible mechanism of altan radioprotection properties.

KEY WORDS: x-irradiation, erythrocytes, altan, hemolysis, acid resistance, cations, survival, radioprotectors

LOW-INTENSE MICROWAVE RADIATION INFLUENCING THE EFFECTIVE THICKNESS OF A NON-INTERMINGLED WATER LAYER ADJACENT TO A LIPID ERYTHROCYTE MEMBRANE

B.G. Yemets

V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody sq., Kharkov 61077, Ukraine

Using an NMR technique, the thickness of a non-intermingled water layer adjacent to an erythrocyte membrane is determined. Half an hour low-intense microwave radiating is found to have decreased the effective thickness of the non-intermingled layer by 11 %. It is shown that this result cannot be account for only by thermal processes in a sample, arising under radiating.

KEY WORDS: erythrocyte, membrane, diffusion water exchange, non-intermingled liquid layer hear the membrane, electromagnetic microwaves

Підписано до друку 25.12.99. Формат 60x84 $\frac{1}{8}$. Умов. друк. арк. 7,13.
Облік.-вид. арк. 9,91. Тираж 200.

10-00

61077, Харків, пл. Свободи, 4, Харківський національний університет
ім. В.Н.Каразіна. Видавничий центр Харківського національного ун-ту.

BIOPHYSICAL BULLETIN

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Contributions written in English, Ukrainian or Russian should be sent to one of the members of the Editorial Board or to the Editorial Office in duplicate. By submitting a paper for publication in Biophysical Bulletin the authors imply that the material neither has been published previously nor has been submitted for publication elsewhere and that the authors have obtained all the necessary authority for publication.

A camera-ready manuscript (ready for photocopying) should be typed in single spacing on good quality white paper (A4 format), one side only, preferably using inkjet or laser printer. Use the MS Word with following options: 10 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, upper margin should be 3 cm, and bottom one should be 2 cm. All pages should be numbered serially on the backside in pencil.

Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means. Camera-ready figures should be computer-generated or produced in black ink with printed symbols labeling axes. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1); Table 1, Fig. 1.

Layout of the Manuscript

Leave four first lines blank on the first page. The title of the paper should appear in capital letters (12 pt., bold, centered) on the fifth line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt., bold, centered). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (9 pt., Italic, centered). Then, place the date of the paper submission: month, day, year (9 pt., centered).

After one blank line place abstract (9 pt.) of the paper, from 6 to 12 lines. The abstract should contain the brief overview of the problem, method used in the paper, and main results and conclusions. The word "Abstract" should be omitted.

On the next line type 5-8 key words (9 pt., the heading "KEY WORDS" should be typed in bold capital letters in the beginning of the line). The text of the abstract and key words should be indented 0.5 cm from the left and right margins.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper. The first line of each paragraph should be indented 0.75 cm from the left margin. It is recommended to divide the text into following sections: introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS** (headings of sections should appear in capital letters and be centered). For theoretical studies less specified text organization is envisaged, e.g. instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered. Sections may be subdivided in subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after every section or subsection. After headings of sections and subsections a point should be omitted.

Any acknowledgement regarding support, such as names of the foundations and grant numbers should be included at the end of the text after one blank line. References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers is prohibited. A full list of the references should be given at the end of the manuscript as a separate section.

On the additional separate sheet with left and right margins of 2.5 cm, upper margin of 3 cm, and bottom margin of 2 cm the abstract in English should be submitted. The word "Abstract" should be omitted. On the first line type the paper title (capital letters, bold, 10 pt.) On the next line place initials and surnames of the authors (centered, bold, 10 pt.). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (9 pt., Italic, centered). After one blank line place the text of the abstract (justified, 9 pt., no indent). On the next line after heading "KEY WORDS" (capital letters, bold, 9 pt.) type key words (justified, 9 pt.).

Please, pay attention to compact organization of the manuscript.

Manuscripts that do not correspond to the instructions above will not be considered for publication.