

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету № 434

Біофізичний Вісник

1'99

Biophysical Bulletin

1999

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направленням установи і експертним висновком. Рукописи, які подаються до редакції, повинні точно відповідати наступним вимогам.

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

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

Послідовність розміщення матеріалу:

На першій сторінці зверху пропускаються два рядка; на третьому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 9 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 9 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкуються за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число-цифрами, місяць-прописом, рік-цифрами (шрифт прямий, 9 pt., вирівнювання по центру).

Після пропуску одного рядка вміщується реферат статті, не менше 6 і не більше 12 рядків, з коротким викладом об'єкту дослідження, мети або задач, методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів і висновків. Слово "реферат" не пишеться (для тексту реферату використовується прямий шрифт розміром 9 pt.).

На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів (9 pt., заголовок "**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**" пишеться прописом на тому ж рядку, що й ключові слова і виділяється напівжирним шрифтом).

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

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

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

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

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

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

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету
№ 434, 1999БІОФІЗИЧНИЙ
ВІСНИК

Заснований у 1998 році

випуск 3(1)

Харків
1999

Від редакції:

Шановні читачі та автори !

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

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

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

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

Запрошуємо до плідного співробітництва!

Редакційна колегія

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

д.ф.-м.н., проф. **Благой Ю.П.**
д.б.н., проф. **Бондаренко В.А.**
д.б.н. **Гордієнко Є.О.**
д.б.н., доц. **Древаль В.І.**
д.ф.-м.н., проф. **Казанський В.Б.**

д.б.н., проф. **Моїсєєв В.О.**
д.ф.-м.н. **Осецький О.І.**
д.б.н., доц. **Перський Є.Є.**
д.ф.-м.н. **Семенов М.О.**
д.ф.-м.н. **Сорокін В.О.**

Відповідальні секретарі: к.б.н., доц. **Гаташ С.В.**, к.ф.-м.н., доц. **Степін Л.Д.**

Друкується за рішенням вченої ради радіофізичного факультету ХДУ
протокол № 3 від 19.03.99

Адреса редакційної колегії: 310077, м. Харків, пл. Свободи, 4,
Харківський держуніверситет, кафедра молекулярної та прикладної біофізики,
тел.: 38 0572 457576, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- V.I. Pahomov, D.V. Davies and A.N. Veselkov* Thermodynamical analysis by ^1H NMR of the complexation of ethidiumbromide to a DNA octamer, 5'-d(GpApCpApTpGpTpC), in aqueous solution 7
- Т.В. Большух, М.А. Семенов, В.А. Кашпур, В.Я. Малеев* Исследование гидратации и структурных переходов транспортных РНК 15
- S.V. Kornilova* DNA structural changes during interaction with metal ions on IR-spectroscopy data 20
- Г.И. Церетели, О.Л. Вавелюк, Т.В. Белопольская* Калориметрическое исследование стеклования денатурированной ДНК 27
- M.V. Kosevich, V.A. Pashinskaya, S.G. Stepanian, V.S. Shelkovsky, V.V. Orlov, Yu.P. Blagoy* Quantum chemical study of decamethoxinum and related dications 31
- М.И. Суховия, И.И. Шафранюш, Л.Л. Шимон* Исследование возбуждения и ионизации оснований нуклеиновых кислот электронным ударом 39
- Т.В. Белопольская, Г.И. Церетели, Н.А. Грунина* Влияние формирования гидратной оболочки на тепловые свойства глобулярных белков 42
- Т.В. Сахно, И.В. Короткова* Теоретическое исследование влияния среды на электронное строение производных кумарина и хинолина 46
- В.І. Чегель, С.О. Пілецький, О.В. Пілецька* Реєстрація біомолекул малих розмірів методом поверхневого плазмонного резонансу 51
- В.В. Пилипенко, С.А. Аксенов, А.Н. Калинин, Л.Ф. Суходуб* Изучение взаимодействия стероидных гликозидов с нуклеозидами методом плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления CF-252 56
- Ю.В. Рубин* Изучение редких таутомеров 6-тиогуанина 63

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- G.P. Gorbenko* Interaction of hemoglobin and cytochrome C with model membranes: characterization of electrostatic effects 66
- С.В. Гаташ, В.П. Берест, М.А. Воробейчик* Математическая модель динамики агрегации тромбоцитов. Определение зависимости кинетических параметров от температуры 71
- С.Х. Межидов, В.А. Моисеев* Влияние температуры на проницаемость эритроцитов человека для криопротекторов 78

- С.Х. Межидов, В.А. Моисеев* Влияние осмолярности среды на микровязкость цитоплазмы эритроцитов 84
- Л.И. Гардаш, Е.А. Гордиенко* Изменение формы эритроцитов человека при продавливании через цилиндрический микрокапилляр 88
- В.П. Берест, С.В. Гаташ, О.Т. Николов* Влияние температуры на диэлектрическую проницаемость суспензии тромбоцитов в 3-см диапазоне длин волн 92

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- Г.И. Соляник, А.А. Сериков* Стохастическая динамика развития клона дифференцирующихся клеток. Эффекты автоселекции и патологической эволюции 96
- А.О. Komendantov, A.Ch. Gozak, N.I. Kononenko* Investigation of sensitive dependence upon initial conditions and parameters of model bursting neuron 103
- А.В. Мыслик, М.К. Новоселец* Анализ текстур медицинских ультразвуковых и томографических изображений с помощью нейронных сетей 107
- Е.А. Андреев* О некоторых особенностях теплофизических свойств воды и ее поведении в живых организмах 112
- А.Т. Гиль* Мониторинг ксилемного потока винограда 118

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

- В.В. Товстяк* Флуоресцентное исследование действия радиации на структуру белков эритроцитарных мембран 122

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

- I. Zharkov, A. Tchmul, V. Safronov, V. Ermakov, G. Dovbeshko* The special multi-purpose cryostat for biological low temperature studies 125
- L.A. Kernazhitsky, V.V. Naumov, G.A. Puchkovskaya, O.I. Osadchaya* New optical method of diagnostics of the endogenous intoxication of phagocytive cells of blood plasma 127
- Я.Ю. Черняк, О.Т. Николов* Влияние различных доз ионизирующего излучения на функциональную активность *Saccharomyces cerevisiae* 130
- В.Е. Шеханин* Механические свойства кровеносных сосудов 132
- Конференція з фізики біологічних систем з міжнародною участю 134
- Памяти А.А. Серикова 135
- Abstracts 137

THERMODYNAMICAL ANALYSIS BY ^1H NMR OF THE COMPLEXATION OF ETHIDIUM BROMIDE TO A DNA OCTAMER, 5'-d(GpApCpApTpGpTpC), IN AQUEOUS SOLUTION

V. I. Pahomov, D. B. Davies* and A. N. Veselkov

Department of Physics, Sevastopol State Technical University, Crimea, Ukraine

*Department of Chemistry, Birkbeck College, University of London, WC1H 0PP, United Kingdom

Received January 5, 1999

The self-association of the self-complementary deoxyoctanucleotide, 5'-d(GpApCpApTpGpTpC), and its complexation with the phenanthridinium drug, ethidium bromide (EB), has been studied by 1D and 2D 500/600 MHz NMR spectroscopy. 2D homonuclear correlation PMR spectroscopy (TOCSY and NOESY) was used for complete assignment of the non-exchangeable protons of the molecules and for qualitative determination of the preferred binding site(s) of the ligand with the oligonucleotide chain. An NMR analysis has been developed for determining the thermodynamical parameters of self-association of the DNA octamer and its multicomponent equilibrium of complex formation with EB in solution. Quantitative determination of the equilibrium constants and thermodynamic parameters (free energy, enthalpy and entropy) of duplex formation of the octamer and its complexation with EB is based on investigation of the dependence of proton chemical shifts of the molecules on temperature and on concentration. The experimental results were interpreted in terms of complexes containing different numbers of drug molecules in the octamer duplex (1:2, 2:2, 3:2 and 4:2 complexes). It is also found that (i) the relative amount of each molecular complex depends on the ratio of the initial concentrations of the octamer and drug and on the temperature of solution and (ii) successive binding of drug molecules to the octamer duplex is anti-cooperative.

KEY WORDS: deoxyoctanucleotide, ethidium bromide, intercalation, thermodynamic parameters, NMR spectroscopy

INTRODUCTION

The thermodynamical stability of oligonucleotide duplexes depends substantially on the length of the oligomer but also on base content and nucleotide sequence in the chain [1-6]. It has been shown [3-6] that even minor changes in nucleotide sequence lead to appreciable differences in the values of thermodynamical parameters of duplex formation of oligonucleotides. It has also been found that intramolecular interactions in single strands of DNA at room temperature make a significant contribution ($\approx 40\%$) to the enthalpy (ΔH) of duplex formation [7]. At the same time, there is a substantial influence of the 'free ends' (i.e. instability of the terminal base pairs [5, 6]) on the value of ΔH of duplex formation in short oligonucleotide sequences, as well as on the thermodynamics of their binding with aromatic drug molecules [8, 9]. Thus the enthalpies of duplex formation for self-complementary deoxytetranucleotides [5, 6] are somewhat lower than those calculated for 'ideal' duplexes [10]. However, the absolute values of ΔH for complexation of the intercalating drug, ethidium bromide (EB), with tetramers [8, 9] are higher than ΔH for binding of EB with longer deoxyoligonucleotides and macromolecular DNA [11, 12, 13]. Previous work [8, 9, 14] on the complexation of EB with DNA tetramers has shown that EB binds preferentially to the pyrimidine-purine (*pyr-pur*) sites of the tetranucleotide duplexes and that EB intercalates from the minor groove of the double helix.

In this work we report an NMR (500/600 MHz) study of the self-association of a self-complementary deoxyoligonucleotide, 5'-d(GpApCpApTpGpTpC), and its complexation with the trypanocidal drug, (EB), in aqueous salt solution. The DNA octamer has two *pyr-pur* (CpA and TpG) sites in the middle of the sequence, expected to be the sites of preferential binding of EB, whereas at the ends of the octamer duplex there are *pur-pur* and *pyr-pyr* sequences with less affinity of drug complexation. It is expected that the association constant of EB binding to different sites of the DNA octamer will be substantially different and the influence of the terminal nucleotides will be considerably lower in the double-helical structure of the octamer than for the deoxytetranucleotide duplexes. An NMR analysis developed in previous work [8, 9, 14] for complexation of intercalating drugs with self-complementary tetramers included formation of only 1:2 and 2:2 complexes, i.e. one and two drug molecules intercalated into the tetranucleotide duplex according to the "excluded neighbour" model [15]. The octamer has four possible sites of intercalative binding with EB and so a new model, which takes into account the 1:2, 2:2, 3:2 and 4:2 complexes of the drug with the octamer, needs to be developed as an extension of the approach considered earlier [8, 9, 14]. Quantitative determination of the thermodynamic parameters of self-association of the octamer and its complexation with EB is based on investigation of the dependence of proton chemical shifts of the molecules on concentration and temperature [8, 9].

MATERIALS AND METHODS

The deoxyoctanucleotide 5'-d(GpApCpApTpGpTpC) was synthesized by the "Oswel DNA service" (University of Southampton). Ethidium bromide was purchased from the Sigma Chemical Company and used without further purification. The samples were lyophilized from 99.95% D₂O and redissolved in deuterated 0.1 mol·l⁻¹ phosphate buffer, pD 7.15, containing 10⁻⁴ mol·l⁻¹ EDTA. The concentration of drug stock solution was measured spectrophotometrically using the molar absorption coefficient $\epsilon=5860 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\lambda=480 \text{ nm}$) [16]. The method for the preparation of solutions and conditions of the NMR experiments were described earlier [8, 14]. 500 MHz ¹H-NMR spectra were recorded on a JEOL GSX 500 spectrometer. Measurements as a function of octamer concentration were made at three temperatures (298, 308 and 318 K) in standard 5 mm NMR tubes using a minimum volume of 0.5 ml of solution. Measurements as a function of temperature were made at constant concentration in the temperature range 278 to 358 K. Chemical shifts were measured relative to an internal reference tetramethylammonium bromide (TMA) and then recalculated, with respect to DSS (sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulphonate), i.e. $\delta_{\text{DSS}}=\delta_{\text{TMA}}+3.178 \text{ (ppm)}$. Two-dimensional homonuclear TOCSY and NOESY experiments were carried out on a 600 MHz Bruker AMX spectrometer. The sample temperature was regulated using either Bruker or JEOL variable temperature control units, as appropriate.

RESULTS AND DISCUSSION

Thermodynamics of self-association of the octamer.

Experimental observations. NMR assignment of all the non-exchangeable protons spectrum of the deoxyoligonucleotide 5'-d(GpApCpApTpGpTpC) (I) was made using homonuclear 2-D TOCSY and 2-D NOESY measurements and is in good agreement with the previous assignment for this octamer under similar experimental conditions [16]. There are only very small changes of proton chemical of I shifts with concentration

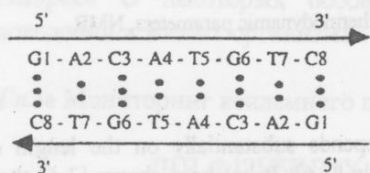
in the range of 0.06 to 4.2 mmol·l⁻¹ at two temperatures (298 and 308 K), most of them being within the limits of accuracy of the experimental measurements ($\Delta\delta=(1-2)\times 10^{-3} \text{ ppm}$). Such behaviour most likely results from a relatively high equilibrium constant for duplex formation of the octamer so that at both temperatures, 298 and 308K, practically all the oligonucleotide is in the duplex form in solution and, correspondingly, the contribution of the single-stranded form to the observed proton chemical shift δ is negligible. It should be noted that, in order to observe NMR signals of sufficient intensity for reliable quantitative analysis it is necessary to use relatively high concentrations of oligonucleotide which favour duplex formation. At the same time, in order to obtain accurate estimates for association constants, experiments should be carried out at concentrations of the molecules that are near the reciprocal of the association constants [8]. Taking all these factors into account it follows that it is very difficult to use the concentration dependence of proton NMR chemical shifts to analyse duplex formation of the self-complementary octamer 5'-d(GACATGTC) as done previously [5, 6] for the deoxytetranucleotides in solution with self-association constants in the range (10^4 – $10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$).

For molecules with relatively large self-association constants (i.e. $K > 10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$) it is feasible to use the temperature dependence of proton chemical shifts in order to determine the equilibrium constant and thermodynamical parameters of self-association. In contrast to the curves observed for deoxytetranucleotides [5, 6] the temperature dependence of a number of proton chemical shifts of the octamer shown in Fig. 1 has a pronounced sigmoidal-shape which is characteristic of melting of a duplex.

Model and analysis. The experimental results for the octamer (Fig. 1) have been analysed using the "monomer-duplex" model of molecular association, where the chemical shift of the *i*-th proton at temperature *T* can be presented in the form:

$$\delta_i(T) = f_m(T) \delta_{mi}(T) + f_d(T) \delta_{di}(T). \quad (1)$$

In equation (1) $\delta_{mi}(T)$, $\delta_{di}(T)$ and $f_m(T)$, $f_d(T)$ are the proton



I. Schematic representation of the duplex of the octamer, 5'-d(GpApCpApTpGpTpC). Dotted lines represent hydrogen bonds between bases in the double-helical structure.

account it follows that it is very difficult to use the concentration dependence of proton NMR chemical shifts to analyse duplex formation of the self-complementary octamer 5'-d(GACATGTC) as done previously [5, 6] for the

deoxytetranucleotides in solution with self-association constants in the range (10^4 – $10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$).

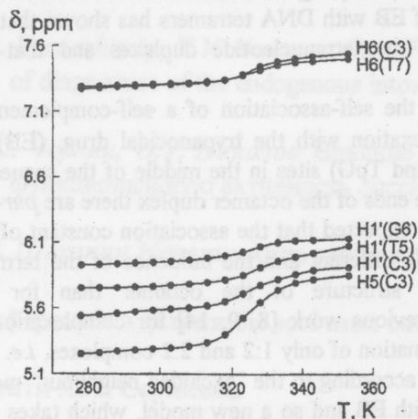


Fig. 1. Experimental temperature dependence of some of the non-exchangeable protons of the deoxyoctanucleotide, d(GACATGTC), at constant concentration ($N_0=1.89 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

chemical shifts and equilibrium mole fractions (where $f_m(T) + f_d(T)=1$) of the octamer at temperature T in the monomer and duplex forms, respectively. In the analysis of the temperature dependence of chemical shifts it was assumed that δ_{mi} and δ_{di} are monotonic functions of temperature due to changes in intramolecular base stacking in the different conformational states of the octamer in solution; linear and quadratic approximations for $\delta_m(T)$ and $\delta_d(T)$, respectively, were used in the calculations [2, 5, 6, 18]. It is expected that application of parametric regression equations would be a suitable computational method to describe the temperature dependence of mole fractions. As the experimental temperature dependence of chemical shifts has sigmoidal character (Fig. 1), the equation for the mole fraction $f_d(T)$ has the form [8, 9] used to describe the "helix-coil" transition

$$f_d(T) = f_d(T_0) [1 + S(T_0)] / [1 + S(T)], \quad (2)$$

where $S(T) = (T/\theta)^b$, θ and b are the parameters of the regression equations for mole fraction $f_d(T)$; $f_d(T_0)$ is the mole fraction at $T=298$ K. Note that the constant θ of the regression equation (2) has a definite physical meaning. The value of θ corresponds to the melting temperature T_m of the duplex, i.e. the temperature when the mole fraction of the duplex decreases to half the content compared with its value at low temperature (ca. 273 K). Equilibrium constants of duplex formation, $K(T)$, at different temperatures were determined from calculated values of mole fractions using the mass law equation and the mass conservation law for this reaction. Equilibrium constants $K(T)$, in turn, were expressed in terms of the thermodynamical parameters ΔH^0 and ΔS^0

$$K(T) = \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}\right) \quad (3)$$

assuming that values of ΔH^0 and ΔS^0 do not depend substantially on temperature in the range studied. It should be noted that use of model summarised in equation (1) assumes that the molecules are in fast exchange on the NMR time scale. The numerical procedure of minimisation was described earlier [5, 6, 19]. The calculated values of θ (i.e. T_m), $K(298$ K), ΔH and ΔS and ΔG (298 K) are listed in Table 1 for each proton studied. The mean values of these parameters for twelve protons are, respectively, $K=830 (\pm 190) \times 10^3 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ at $T=298$ K; $T_m=321 (\pm 5)$ K; $\Delta H=-410 (\pm 38) \text{ kJ}/(\text{mol duplex})$; $\Delta S=-1.26 (\pm 0.13) \text{ kJ}/(\text{mol duplex}\cdot\text{K})$. Calculations have shown that the parameters determined using all the experimental points and those at higher temperatures only ($T>308$ K) are the same within the error limits.

Table 1. Calculated values of equilibrium constant K ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$ at $T=298$ K and thermodynamic parameters ΔH^0 , ΔG^0 ($\text{kJ}/(\text{mol duplex})$) and ΔS^0 ($\text{kJ}/(\text{mol duplex}\cdot\text{K})$) of the self-association of the deoxyoligonucleotide 5'-d(GpApCpApTpGpTpC)^{a)}.

proton	$K, 10^3$	T_m, K	$-\Delta H^0$	$-\Delta S^0_{298}$	$-\Delta G^0_{298}$
H8(A2)	477	300	466	1.46	32.4
H8(A4)	679	324	410	1.26	33.3
H8(G1)	982	327	440	1.36	34.2
H8(G6)	997	324	422	1.30	34.2
H6(C8)	625	320	434	1.35	33.1
H2(A2)	997	320	284	0.84	34.2
H1'(T7)	986	319	454	1.41	34.2
H1'(G6)	972	330	398	1.22	34.1
H1'(T5)	434	326	350	1.07	32.1
H1'(C3)	976	323	432	1.33	34.2
H5(C3)	801	324	380	1.16	33.7
H5(C8)	998	319	448	1.39	34.2
mean values	830(± 190)	321(± 5)	410(± 38)	1.26(± 0.13)	33.7(± 0.6)

^{a)} In $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ phosphate buffer, pH 7.15.

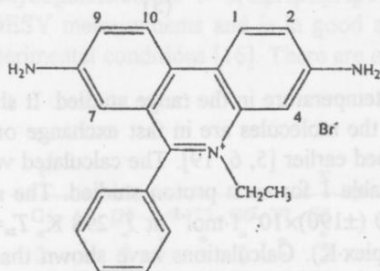
Magnitudes of the thermodynamical parameters. Each of the thermodynamical parameters (ΔH , ΔS and ΔG) of duplex formation of the octamer is summation of different kinds of physical interactions [20, 21] such as: 1) molecular interactions (hydrogen bonding, hydrophobic, van der Waals and electrostatic interactions); 2) conformational alterations in the oligonucleotide; 3) changes in hydration and release of the solvent counterion or proton in the self-association of oligonucleotide chains. The magnitudes of the contributions of each of the above

factors to the measured thermodynamical parameters are not completely understood [20], although experimental results [22] and theoretical analysis [23] confirm that hydrogen bonding and stacking interactions of the bases give comparable contributions to the stability of the double helix.

The magnitudes of the thermodynamic parameters for duplex formation of the deoxyoctanucleotide d(GpApCpApTpGpTpC) are in good agreement calculated relative to one base pair) with the corresponding ΔH and ΔS values for dimerisation reactions of self-complementary hexamers in solution [2, 17]. The enthalpy of duplex formation of the octamer is also consistent, within error limits, with the corresponding theoretical value of ΔH determined by the nearest-neighbour model [10]. The ΔH value found for the octamer in this work is more than double ($\approx 2.4 - 2.8$) the values found for analogous deoxytetranucleotide sequences measured at the same solution conditions [5, 6]; the difference probably reflects a substantially larger influence of the melting of terminal base pairs in the tetramer compared with the octamer and the greater probability of complementary strands "sliding" relative to each other in short tetranucleotide duplexes so that in equilibrium there may be different helical structures in solution [5, 6]. A similar relation for ΔH values for duplex formation is observed between deoxytetranucleotides [5, 6] and dinucleotides [24] *i. e.* double the length of the oligonucleotide sequence leads to an approximately 2.5 times increase of the absolute values of enthalpy. It is likely that some contribution to the enthalpy of duplex formation in longer oligonucleotide sequences is given by such factors as stronger stacking interactions and smaller conformational alterations in the chain due to the effect of 'free ends'.

Complexation of EB with 5'-d(GpApCpApTpGpTpC)

Experimental observations. The structural formula of ethidium bromide, EB, (II) shows the atom positions of the aromatic protons having different NMR resonance peaks used in the drug binding studies. Signal assignment



II. Structural formula of the phenanthridinium drug, ethidium bromide, (EB) with numbering of atom positions for protons used in complexation studies.

of all the non-exchangeable protons in the PMR spectrum of EB was obtained previously using both 2D homonuclear COSY and NOESY experiments [24]. Only a few intermolecular cross-peaks between EB and the octamer protons were observed in the 2-D NOESY spectra of mixed solutions obtained at different mixing times ($\tau_{m1}=90$ ms, $\tau_{m2}=200$ ms), a situation which is similar to that found previously for EB binding to self-complementary deoxytetranucleotides [8, 14].

The 2-D NOE spectrum of EB with the octamer d(GACATGTC) exhibits intermolecular cross peaks of relatively small intensities between the *ortho* protons of the EB phenyl ring and H1', deoxyribose protons of cytosine (C3) and thymine (T5) providing qualitative evidence about preferential binding of EB to the pyrimidine-purine [5'-d(T-G) and 5'-d(C-A)] sites of the octamer from the minor groove of the duplex as found [14], for example, for d(TGCA). In order to estimate quantitatively the complexation

of EB with the octamer, the chemical shift dependence of the six protons of the EB chromophore was measured as a function of both the concentration of the octamer (at three temperatures, 298, 308 and 318 K) (an example is given at 318 K in Fig. 2) and temperature (Fig. 3). The temperature dependence of EB proton chemical shifts

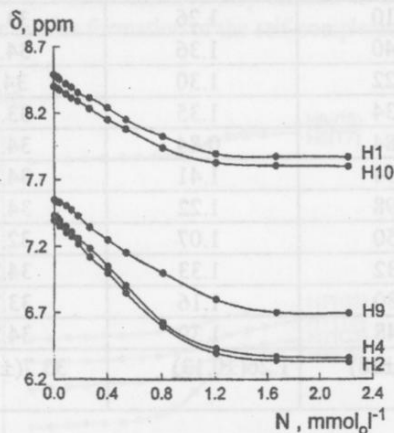


Fig. 2. Dependence of some of the EB proton chemical shifts on concentration of the octamer, d(GACATGTC), at constant drug concentration $D_0=1.15$ mmol.l⁻¹ in solution, $T=318$ K.

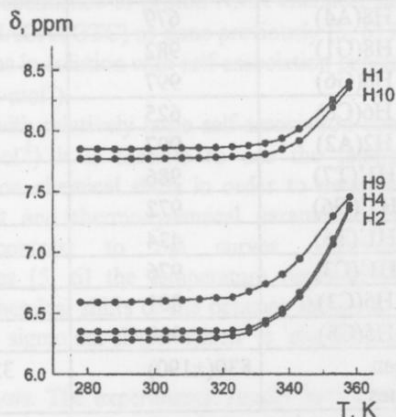
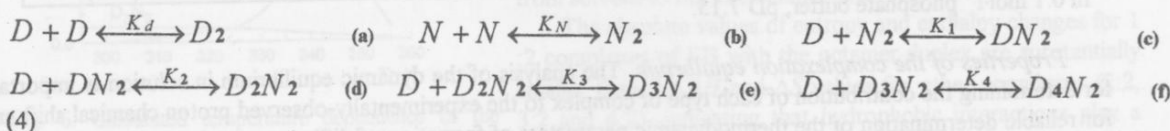


Fig. 3. Experimental temperature dependence of some of the EB proton chemical shifts in solution of the drug with the octamer ($D_0=1.15$ mmol.l⁻¹, $N_0=1.21$ mmol.l⁻¹).

at a constant ratio of drug to nucleotide in Fig. 3 has the form of those observed for "helix-coil" transition in macromolecular DNA; in the presence of EB the melting temperature T_m of the octamer duplex is increased *ca.* 23–24 K (T_m *ca.* 344–345 K).

Model of complexation and analysis. As the relative content of the duplex form of the octamer is overwhelmingly predominant in solution at moderate temperatures, it was considered that the basic scheme for molecular complexation could neglect binding of EB with the single-stranded form. Taking into consideration the "excluded neighbour" model [25] for the binding of intercalators to DNA duplexes, there are four accessible sites of intercalative binding of EB with the octamer. Hence the basic model had to take into account the 1:2, 2:2, 3:2 and 4:2 complexes of the drug with the octamer, which are characterised by the binding constants K_1 , K_2 , K_3 and K_4 , respectively. A schematic representation of examples of the different complexes of EB with the octamer are summarised in Fig. 4. Previous work [8, 14] on the complexation of EB with DNA tetramers showed that the preferred sites of drug binding are *pyr-pur* base sequences in the chain. As there are two *pyr-pur* binding sequences in the octamer, it is likely that EB preferentially forms complexes with these sites in the duplex, *i.e.* K_1 and K_2 values are expected to be higher than K_3 and K_4 binding constants, because the latter will include reactions with *pur-pur* or *pyr-pyr* sequences in the octamer duplex.

The following equilibrium reactions, including self-association of drug D (K_d) and nucleotide N (K_N), were considered for quantitative analysis of chemical shifts resulting from drug-octamer complexation:



Chemical shifts were calculated using an additive model [8, 14]:

$$\delta = \delta_m f_m + \delta_d f_d + \sum_{i=1}^4 \delta_i f_i \quad (5)$$

where δ_m , δ_d , δ_1 – δ_4 are chemical shifts of EB in the monomer, dimer, 1:2 (DN_2), 2:2 (D_2N_2), 3:2 (D_3N_2) and 4:2 (D_4N_2) complexes with the octamer duplex; f_m , f_d , f_1 – f_4 are mole fractions of EB in the monomer dimer and in the

abovementioned complexes, respectively. The validity of such a model assumes fast exchange between interacting molecules.

The equilibrium constants K_i ($i = 1 - 4$) were expressed in terms of the corresponding parameters ΔH_i^0 , ΔS_i^0 using relations equivalent to (3). The values of δ_m and δ_d , as well as ΔH_d^0 , ΔS_d^0 were

Fig. 4. Schematic representation of examples of intercalated complexes of EB (shaded rectangles) with the octanucleotide duplex at different drug: oligonucleotide ratios.

determined previously [24] from investigations of EB self-association using the dependence on concentration of drug proton chemical shifts in the same solvent system (0.1 mol·l⁻¹ phosphate buffer, pD 7.1). Taking into consideration the mass law equations for reactions (4) and the mass conservation law [8, 14], the observed chemical shift in equation (5) is a function of the following twelve parameters: δ_1 – δ_4 , ΔH_1^0 – ΔH_4^0 , ΔS_1^0 – ΔS_4^0 . The parameters of the model were determined by minimising the quadratic discrepancy function, Δ , between the experimental and calculated values of chemical shifts for the six aromatic protons of the EB chromophore; the detailed computational procedure is described in previous work [8, 19, 25, 26]. In the calculations the data on the temperature and concentration (at three different temperatures) dependence of EB proton chemical shifts in the mixed solutions have been processed jointly.

It is reasonable to solve such a multiparametric problem by the method of successive complication of the model [8, 14]. The calculated equilibrium constants and thermodynamical parameters for different complexation reactions (1:2, 2:2, 3:2 and 4:2) are summarised in Table 2. It is seen from Table 2 that $K_1 > K_2 \gg K_3 > K_4$ *i.e.* formation of the 1:2 and 2:2 complexes of EB with the duplex is preferred to the 3:2 and 4:2 complexes. The results also show that successive binding of drug molecules to the octamer duplex is anti-cooperative. The relatively high magnitudes of K_1 and K_2 are consistent with complexation of the first and the second drug

molecules being preferred to the *pyr-pur* sites [d(CA) and d(TG)] of the octamer duplex. The probability of binding for the first EB molecule (*i.e.* formation of the 1:2 complex, DN₂) when there are two preferred binding sites available should be about double that for the second drug molecule, which has access to only one such site. This is in agreement with the values of association constants K_1 and K_2 determined in the present work. The probability of complexation of EB to *pur-pur* d(GA) or *pyr-pyr* d(TC) sites (*i.e.* formation of 3:2 (D₃N₂) and 4:2 (D₄N₂) complexes) was found to be much lower than binding of drug to sites with alternating base sequence in the chain in agreement with previous work [3, 12, 27].

Table 2. Equilibrium constants K_i at $T=298$ K and thermodynamic parameters of EB complexation with the octamer 5'-d(GpApCpApTpGpTpC)^{a)}.

Complex, K_i	$K_i, 10^3$ (l·mol ⁻¹)	$-\Delta G_{298}^\circ$ (kJ/mol)	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-\Delta S_{298}^\circ$ (J/(mol·K))
DN ₂ K_1	718(±65)	33.4(±3.3)	47.8(±2.5)	48.4(±7.5)
D ₂ N ₂ K_2	315(±41)	31.4(±4.1)	75.9(±3.6)	149(±26)
D ₃ N ₂ K_3	47(±7)	26.6(±4.0)	99.8(±3.6)	245(±43)
D ₄ N ₂ K_4	18(±4)	24.3(±5.4)	86.3(±4.2)	208(±51)

^{a)} In 0.1 mol·l⁻¹ phosphate buffer, pD 7.15.

Properties of the complexation equilibrium. The analysis of the dynamic equilibrium in solution is important for determining the contribution of each type of complex to the experimentally-observed proton chemical shift and for reliable determination of the thermodynamic parameters of formation of different complexes [8, 9, 14]. Using the values of the equilibrium constants (Table 2) the relative content of each of the molecular complexes in solution has been calculated as a function of r ($=N_2/D_0$, the ratio of initial concentrations of the octamer duplex and drug) at different temperatures. An example is shown in Fig. 5 (at 298 K), where it can be seen that the contribution of different types of complexes to the general equilibrium in solution is determined not only by the values of the equilibrium reaction constants, but also by the value of r , as shown previously for drug binding with

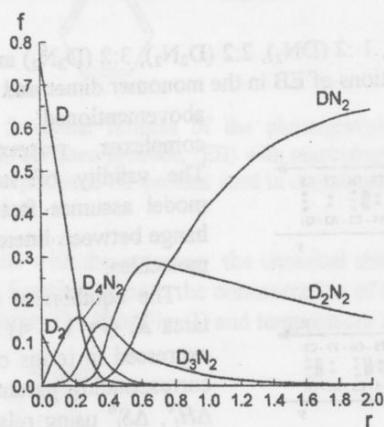


Fig. 5. Calculated relative content (f) of the drug (D) and the different complexes with the octamer 5'-d(GpApCpApTpGpTpC) in solution as a function of r ($=N_2/D_0$, the ratio of initial concentrations of octamer duplex and drug) at $T=298$ K.

for $r \approx 0.8$. It is seen that at lower temperatures (< 320 K) practically all the drug is in the complexed state but at higher temperatures the concentration of the 'free' drug (D) increases as the drug-octamer complexes disassociate. The temperature dependence of the mole fractions of the 1:2, 2:2 and 3:2 complexes of EB with the octamer duplex are typical for "melting curves" of double-helical oligonucleotides. (The mole fraction of the 4:2 complex is negligible at the conditions of the experiment ($r \approx 0.8$), as seen in Fig. 5). The value of the melting temperature T_m determined directly from the experimental curves (Fig. 3, ≈ 345 K) is significantly smaller (~ 11 K) than the calculated T_m for the 1:2 complex, which is the most stable complex in solution for the octamer studied. The calculations have also shown that successive binding of the drug to the octamer duplex decreases the melting temperatures of the complexes being formed (*i.e.* $T_m \approx 344$ K for 2:2 and $T_m \approx 338$ K for 3:2 complexes). It follows that successive intercalative binding of EB to the octamer duplex destabilises the helical structure, presumably due to unwinding of the helix by the drug in such a relatively short oligonucleotide sequence. It should be emphasized that observed melting curves for a multicomponent systems are averaged

self-complementary and non-selfcomplementary deoxytetranucleotides [8, 14, 27]. Characteristic maximums of the concentration curves for 4:2, 3:2 and 2:2 complexes are observed at r values corresponding approximately to the stoichiometric relations of octamer duplex and drug, *i.e.* $r \approx 0.25$ for D₄N₂, $r \approx 0.33$ for D₃N₂ and $r \approx 0.5$ for D₂N₂ complexes. At small r values ($r < 0.4$), when the drug concentration is higher than the concentration of the octamer in solution, the relative amount of the 2:2, 3:2 and 4:2 complexes are greater than the 1:2 complex in solution, whereas at $r \geq 1$ the fraction of the 1:2 complex of the drug with the duplex becomes predominant. It should be noted that it would be incorrect to assume that the 1:2 complex predominates for drug-octamer solutions at different concentration ratios; at $r=1$ calculations show that only about 40 % of the drug (D) is in the 1:2 complex whereas about 50 % of the drug is in the 2:2 complex. Similarly for solutions made up at 1:2 drug-octamer concentration ratios (*i.e.* $r=2$) there is still a significant amount of drug in the 2:2 complex (≈ 30 %) compared with ≈ 70 % in the 1:2 complex at 298 K.

The calculated temperature dependence of the mole fractions of different types of EB-octamer complexes are shown in Fig. 6

values and without a quantitative analysis of the complex equilibrium it is impossible to differentiate the contribution of each type of complex.

Magnitudes of the thermodynamical parameters of complexation of EB with the octamer I. The thermodynamical parameters summarised in Table 2 show that all the reactions of complex formation of EB with the octamer duplex are exothermic. Hopkins *et al* [13] suggested that enthalpy changes for binding of aromatic drugs with double-helical DNA is the sum of at least six components, including: 1) diminution of

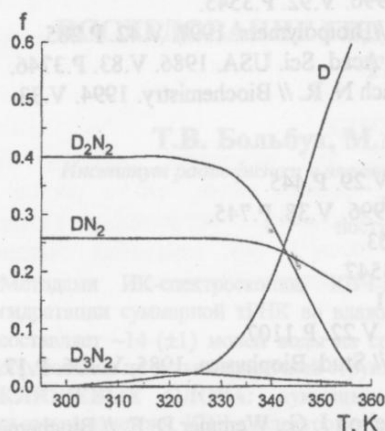


Fig. 6. Calculated temperature dependence of the relative content, $f(T)$, of different complexes of EB with the octanucleotide, d(GACATGTC), in solution at $D_0=1.15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ and $N_0=1.21 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

the stacking interactions of the bases caused by formation of the cavity for the drug molecule to occupy; 2) stacking interactions of the bases in the cavity with drug chromophore; 3) electrostatic interactions between the positively-charged drug cations and the negatively-charged phosphates of nucleotides; 4) alteration of solvation due to complex formation; 5) different arrangements of the intercalator in the complex; 6) specific hydrogen bonds which drug molecules form in the complex. Some components of enthalpy change (1), (4), (5)) may adopt positive values [13, 28]. Positive entropy contributions are determined, in the main by hydrophobic interactions due to transfer of the drug molecule from solvent to the intercalation site.

The absolute values of entropy and enthalpy changes for 1:2 complexes of EB with the octamer duplex are substantially smaller than the ΔH and ΔS values for other complexes (2:2, 3:2 and 4:2), indicating that hydrophobic interactions play a significant role in the binding of EB to the double-helical deoxyoctanucleotide in aqueous solution. It is seen from Table 2 that successive binding of EB molecules to the octamer duplex occurs with more favourable enthalpy and less

favourable entropy compared with 1:2 complex formation. These results are consistent with those found for deoxytetranucleotides [9] and may be interpreted as arising from 1) increased van der Waals interactions (a decrease of the distance between adjacent base pairs has been found in the 2:2 complex compared with the 1:2 complex of EB with d(TGCA) [14], containing the same preferred binding sites for the drug (d(T-G) and d(C-A) sites) as in the octamer studied); 2) an increase of the rigidity of the double-helical structure due to intercalation of different numbers (2-4) of drug molecules, accompanied by a decrease of entropy in view of limiting the number of accessible conformation states [29, 30]; 3) and arising from a combination of ion, and water interactions [20].

The values of the thermodynamic parameters obtained for the 1:2 and 2:2 complexes of EB with the octamer duplex, which predominate in solution at $r \geq 1$ (Fig. 5), are in good agreement with calorimetric results for EB binding to oligonucleotide duplexes of comparable length [11, 12, 31]. Previously it had been found from NMR data at the same experimental conditions [9] that the values of enthalpy changes on binding of EB to relatively short deoxytetranucleotide sequences were substantially larger (in absolute value) than those determined for macromolecular DNA [12, 13] and longer oligonucleotide duplexes [11, 12]. The observed differences [9] may be explained by the following: 1) - the contribution of hydrophobic effects would be different on binding of the drug to macromolecular DNA compared with short oligonucleotides; 2) - the conformational transitions on drug binding to short duplexes, due to the influence of "free ends" in such molecules, is quite different from DNA macromolecules where their influence can be neglected. The results obtained in this work confirm these assumptions; the influence of "free ends" is expected to be much smaller for the octamer duplex compared with deoxytetranucleotides and the thermodynamic parameters for EB complexation with the octamer (Table 2) are in good agreement with the results published previously for relatively long oligonucleotide duplexes [11, 12]. Additional support to confirm these assumptions are the much higher ΔH values for complexation of the drug with terminal sites of the octamer duplex (*i.e.* 3:2 and 4:2 complexes in Table 2) which may be explained in terms of the higher conformational freedom of the nucleotides situated at the ends of the chain.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the University of London Intercollegiate Research Service for access to the 500/600 MHz NMR facilities (at Birkbeck and Queen Mary Colleges) and the Stern Bequest for purchase of the oligonucleotide.

REFERENCES

1. Albergo D. D., Marky L. A., Breslauer K. J., Turner D. H. // *Biochemistry*. 1981. V.20. P.1409.
2. Petersheim M., Turner D. H. // *Biochemistry*. 1983. V.22. P.256.
3. Bailey S. A., Graves D. E., Rill R., Marsh G. // *Biochemistry*. 1993. V.32. P.5881.

4. Bailey S. A., Graves D. E., Rill R. // *Biochemistry*. 1994. V.33. P.11493.
5. Veselkov A. N., Davies D. B., Djimant L. N., Parkes H. G., Shipp D. // *Biopolymers and Cell* 1991. V.7. P.15. (in Russian)
6. Veselkov A. N., Djimant L. N., Kodintsev V. V., Lisyutin V. A., Parkes H. G., Davies D. B. // *Biophysics*. 1995. V.40. P.283.
7. Chen Y. K., Pettit B. M. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1992. V.58. P.225.
8. Davies D. B., Veselkov A. N. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V.92. P.3545.
9. Davies D. B., Djimant L. N., Baranovsky S. F., Veselkov A. N. // *Biopolymers*. 1997. V.42. P.285.
10. Breslauer K. J., Frank R., Blocker H., Marky L. A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V.83. P.3746.
11. Hernandez I., Zhong M., Courtney S. H., Marky L. A., Kallenbach N. R. // *Biochemistry*. 1994. V.33. P.13140.
12. Nelson J. W., Tinoco I. Jr. // *Biopolymers*. 1984. V.23. P.213.
13. Hopkins H. P., Fumero J., Wilson W. D. // *Biopolymers*. 1990. V.29. P.445.
14. Davies D. B., Karawajew L., Veselkov A. N. // *Biopolymers*. 1996. V.38. P.745.
15. McGhee J. D., von Hippel P. H. // *J. Mol. Biol.* 1974. V.86. P.463.
16. Bresloff J. L., Crothers D. M. // *Biochemistry*. 1981. V.20. P. 3547.
17. Chen H., Patel D. J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1995. V.117. P.5901.
18. Freier S. M., Albergo D. D., Turner D. H. // *Biopolymers*. 1983. V.22. P.1107.
19. Veselkov A. N., Djimant L. N., Karawajew L. S., Kulikov E. L. // *Stud. Biophysica*. 1985, V.106. P.171.
20. Chaires J. B. // *Biopolymers*. 1985. V.24. P.403.
21. Rentzeperis D., Marky L. A., Dwyer T. J., Geierstanger B. H., Pelton J. G., Wemmer D. E. // *Biochemistry*. 1995. V.34. P.2937.
22. Wada A., Yabuki S., Husimi Y. // *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1980. V.9. P.87.
23. Kollman P. A., Weiner P. K., Dearing A. // *Biopolymers*. 1981. V.20. P.2583.
24. Djimant L. N., Veselkov A. N. // *Biophysics*. 1988. V.33. P.728.
25. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V.92. P.383.
26. Davies D. B., Djimant L. N., Veselkov A. N. // *Nucleos. & Nucleot.* 1994. V.13. P.657.
27. Davies D. B., Baranovsky S. F., Veselkov A. N. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1997. V.93. P.1559.
28. Marky L. A., Blumenfeld K. S., Breslauer K. J. // *Nucleic Acids Res.* 1983. V.11. P.2857.
29. Sturtevant J. M. // *Proc. Natl. Acad. USA*. 1977. V.74. P.2236.
30. Reinert K. E. // *Nucleic Acids Res.* 1983. V.11. P.3411.
31. Rentzeperis D., Medero M., Marky L. A. // *Bioorg. Med. Chem.* 1995. V.3. P.751.

ТЕРМОДИНАМІЧНИЙ АНАЛІЗ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БРОМИСТОГО ЕТИДІО З ОКТАМЕРОМ ДНК 5'-d(GpApCpArTpGrTpC) У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ МЕТОДОМ ¹H-ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ

В. І. Пахомов, Д. Б. Девіс*, О. Н. Веселков,

Севастопольський державний технічний університет,

Севастополь, 335053, Стрелецька бухта, Студмістечко, Крим, Україна

*Департамент хімії, Беркбек коледж Лондонського університету,

Лондон, WC1H 0PP, Великобританія

Методами 1М- та 2М-ЯМР спектроскопії досліджена самоасоціація самокомплементарного дезоксиоктануклеотиду 5'-(ГрАрСрАрТрГрТрС) та його комплексоутворення з фенантридиновим барвником бромистим етидієм (ЕБ). Гомоядерна кореляційна ПМР спектроскопія 2М-TOCSY та 2М-NOESY використані для повного віднесення сигналів необмінних протонів молекул і якісного визначення міст пререважного зв'язування ліганду з олігонуклеотидною послідовністю. Розроблено методику визначення термодинамічних параметрів самоасоціації октамеру ДНК та аналізу складної рівноваги у водному розчині при його комплексоутворенні з бромистим етидієм на основі даних ЯМР. Розрахунок констант рівноваги та термодинамічних параметрів (вільної енергії, ентальпії та ентропії) утворення дуплексу октамеру та реакції комплексоутворення з ЕБ обґрунтован на дослідженні залежностей протонних хімічних зсувів молекул від температури і концентрації. Експериментальні результати оброблені за допомогою моделі, яка враховує утворення комплексів з різним числом інтеркальованих у дуплекс молекул фарбника (1:2, 2:2, 3:2 та 4:2 комплекси). Показано, що відносний склад молекулярних комплексів кожного типу залежить від співвідношення початкових концентрацій октамеру та барвника і температури розчину; послідовне вбудовування молекул барвника у октамерний дуплекс відбувається анти-кооперативно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: дезоксиоктануклеотид, бромистий етидій, інтеркаляція, термодинамічні параметри, ЯМР-спектроскопія

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРАТАЦИИ И СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕХОДОВ ТРАНСПОРТНЫХ РНК

Т.В. Больбух, М.А. Семенов, В.А. Кашпур, В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 310085

e-mail: maleev@ire.kharkov.ua.

поступила в редакцию 15 января 1999 г.

Методами ИК-спектроскопии, КВЧ-дieleктрометрии и пьезограмметрии проведено исследование гидратации суммарной тРНК во влажных пленках и растворах. Найдено, что степень гидратации тРНК составляет ~ 14 (± 1) молей воды на средний моль нуклеотида. Данное количество воды необходимо для образования не только вторичной структуры стеблей тРНК, но и формирования ее третичной структуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеиновые кислоты, гидратация, структура тРНК, ИК-спектроскопия, пьезограмметрия, КВЧ-дieleктрометрия.

Изучение транспортных РНК (тРНК) с помощью дифракции рентгеновских лучей позволило установить, что эти важные молекулы, обладая одонитчатой первичной структурой (75-90 нуклеотидов) при определенных условиях в кристаллическом состоянии формируют вторичную (в виде клеверного листа) и третичную структуры. Считается, что стабилизация этих структур достигается за счет образования водородных связей в правильных и неправильных парах азотистых оснований, а также благодаря стекнинг-взаимодействию. В большинстве случаев правильные уотсон-криковские пары формируют вторичную структуру - спиральные стебли тРНК, а третичная структура удерживается в основном неправильными парами. Известно также, что в формировании третичной структуры тРНК активное участие принимают ионы двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , и др.) [1]. Из многочисленных рентгеноструктурных данных для монокристаллов дуплексов РНК [2] известно, что устойчивость их спиральной структуры определяется как уотсон-криковскими парами и стекнинг-взаимодействием, так и сформировавшимися водными мостиками, которые в спиральной конформации скрепляют азотистые основания и противоположные полинуклеотидные цепи. Поэтому можно думать, что воде принадлежит определенная роль в образовании вторичной и, по-видимому, третичной структуры тРНК. Насколько нам известно, влияние воды на структуру тРНК не изучалось.

Целью настоящей работы было исследование влияния гидратации на структуру и структурные переходы суммарных тРНК в пленках и растворах с помощью разработанного нами комплексного подхода, основанного на использовании ИК-спектроскопии, диектрометрии и пьезограмметрии. Применение ИК-спектроскопии оказалось полезным при исследовании вторичной структуры фенилаланиновой тРНК [3]. Поэтому можно было надеяться получить информацию о влиянии гидратации не только на спиральные участки тРНК, но и на формирование третичной структуры. Предварительные результаты были сообщены в [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика ИК-спектроскопических, диектрометрических и пьезограмметрических исследований была аналогична той, которая применялась для изучения особенностей формирования двойных спиралей и гидратных оболочек полинуклеотидов типа РНК [5-9].

В качестве образцов использовали суммарную тРНК фирмы «Serva» (Германия). Количество ионов определяли с помощью пламенного фотометра ФПЛ-1 и измерений диектрических параметров (мост Р568, частота 10 кГц). Согласно этим измерениям, в исследуемом образце по отношению к сухому весу тРНК содержалось 5,7% и 0,6% ионов Na^+ и K^+ соответственно.

Пленки готовили медленным испарением воды при $4^{\circ}C$ из 1% раствора тРНК, помещенного на подложку из флюорита. Подложку располагали строго горизонтально на специальном столике. ИК-спектры записывали с помощью двухлучевого спектрофотометра UR-20, призма NaCl, разрешение 6см^{-1} при 1700см^{-1} . ИК-спектры образцов тРНК с различным содержанием воды в области $3900\text{--}1800\text{см}^{-1}$ получали с помощью ранее разработанной герметичной и термостатированной кюветы с окошками из флюорита [10]. Дейтерирование и увлажнение пленок производили в интервале 0-96% относительной влажности (ОВ) так же, как и в работе [10]. Оптическую плотность находили методом базовой линии при частотах $\nu=1800\text{см}^{-1}$ и 1350см^{-1} .

Степень гидратации тРНК в растворе (концентрация 1,3%) находили с помощью дифференциального диэлектromетра миллиметрового диапазона длин волн. Непосредственно измеряемыми величинами являлись коэффициент поглощения и фазовая постоянная, исходя из которых, как и в работе [11], рассчитывали комплексную проницаемость и количество молекул воды, связанных с молекулой РНК.

Изотермы гидратации тРНК, то есть зависимость числа сорбированных молекул воды на нуклеотид (n) от ОВ, получали методом кварцевого резонатора [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1а, б представлены спектры пленок тРНК при различных значениях ОВ в дейтерированном и недейтерированном состояниях. Из этих данных видно, что с ростом ОВ наблюдаются значительные изменения в участках спектра, отвечающих поглощению азотистых оснований ($1800-1300\text{ см}^{-1}$) и сахарофосфатной цепи ($1300-900\text{ см}^{-1}$). Эти изменения связаны с изменениями структуры тРНК и их гидратного окружения в процессе увлажнения образца.

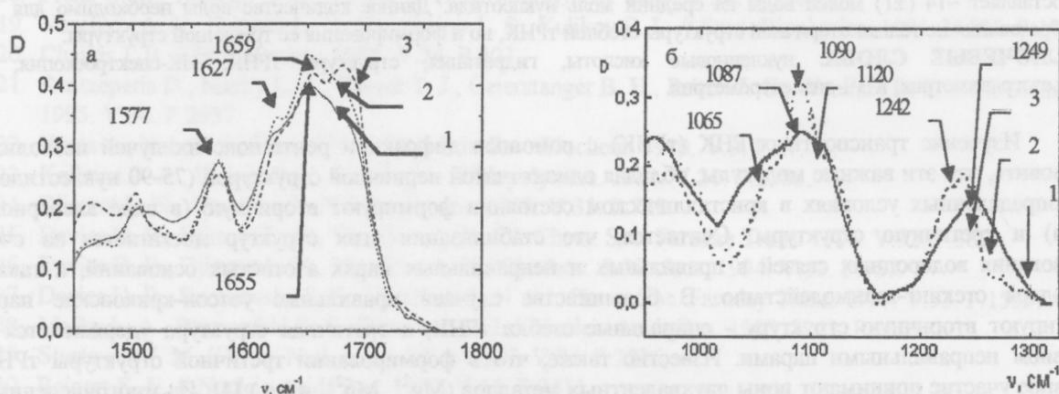


Рис. 1. ИК-спектры дейтерированной (а) и недейтерированной (б) тРНК в пленке при различных значениях ОВ: 1-0%, 2-56%, 3-92%(а); 1-0%, 2-44%, 3-86%(б)

На рис.2 приведена изотерма гидратации тРНК при 20°C . Сорбционная способность тРНК незначительно отличается от ДНК [13].

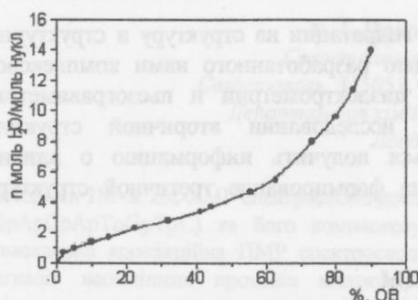


Рис. 2 Изотерма гидратации тРНК при 20°C

Для достаточно надежно интерпретированных полос поглощения азотистых оснований и сахарофосфатной цепи выполнен подробный анализ спектров. С этой целью построены зависимости значений частот ν и интенсивностей R (в относительных единицах) от величины n (числа молекул воды на нуклеотид).

Область поглощения азотистых оснований. На рис.3 для дейтерированной тРНК представлены типичные зависимости ν и R от n для полос поглощения внутрикольцевых колебаний $\text{C}=\text{N}$ гуанина $\nu=1574\text{ см}^{-1}$ (а), аденина $\nu=1624\text{ см}^{-1}$ (б), карбонильного колебания $\text{C}=\text{O}$ урацила и, возможно, $\text{C}=\text{O}$ цитозина $\nu=1655\text{ см}^{-1}$ (в) и $\text{C}=\text{O}$ гуанина $\nu=1681\text{ см}^{-1}$ (г), а на рис.3д приведены подобные зависимости для полосы поглощения 1698 см^{-1} (колебание $\text{C}=\text{O}$) недейтерированного образца тРНК.

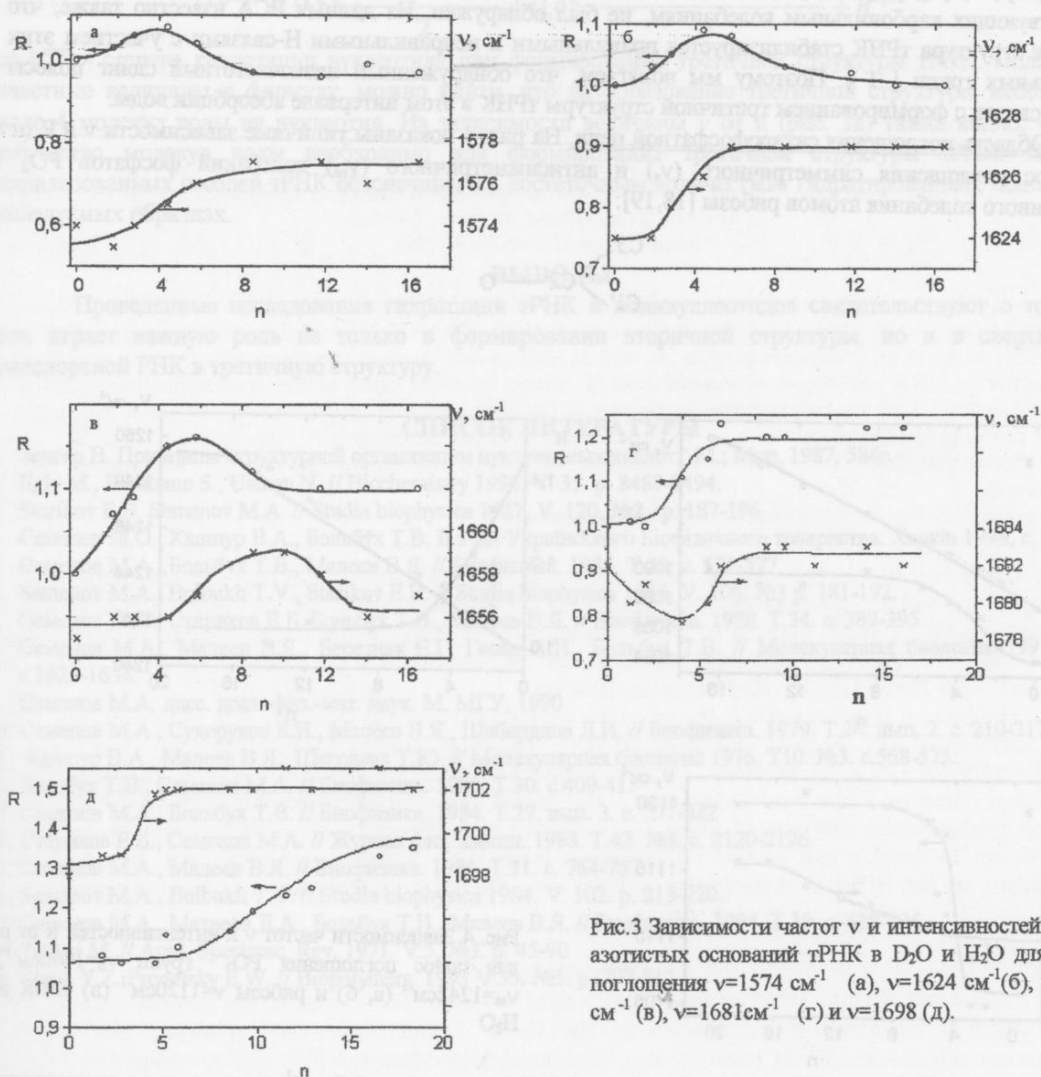


Рис.3 Зависимости частот ν и интенсивностей R от n азотистых оснований тРНК в D_2O и H_2O для полос поглощения $\nu=1574$ см $^{-1}$ (а), $\nu=1624$ см $^{-1}$ (б), $\nu=1655$ см $^{-1}$ (в), $\nu=1681$ см $^{-1}$ (г) и $\nu=1698$ (д).

На этих зависимостях в трех интервалах изменения n наблюдаются особенности. В первом интервале изменения $0 < n \leq 4$ интенсивность R возрастает на 10-20%. При этом заметного частотного сдвига большинства указанных полос не происходит. Такое увеличение интенсивности с ростом n , как показал квантовомеханический расчет для модельного соединения [14], связано с изменением электронной плотности на атомах, с которыми молекулы воды образуют Н-связи. Поскольку рассмотренные колебания относятся к связям с участием атомов азотистых оснований (N3, N7, O2, O4), то связывание молекул происходит именно по этим центрам. О связывании молекул воды с C6O6 группами свидетельствует понижение частоты $\nu=1682$ см $^{-1}$ на 2-3 см $^{-1}$ (рис.3г) и рост интенсивности на 20%.

Во втором интервале $4 < n \leq 9$ происходит резкий высокочастотный сдвиг на 3-4 см $^{-1}$ полос, соответствующих внутрикольцевым колебаниям C=N (рис.3а,б) и внекольцевым колебаниям C=O на 3 см $^{-1}$ (рис.3в,г), который сопровождается уменьшением интенсивности на 10-12% (гипохромизм). Эти эффекты в 2-3 раза меньше по сравнению с аналогичными эффектами для ДНК в двухспиральной конформации [15], что вполне объяснимо, поскольку в двухспиральной структуре тРНК находится приблизительно только $\approx 50\%$ азотистых оснований. Как показал расчет резонансных частот [16], обнаруженные высокочастотные сдвиги полос и наблюдаемый ИК-гипохромизм свидетельствуют о переходе стеблей тРНК в спиральную А-конформацию. Этот вывод соответствует работам [5-8]. При $n > 3$ полоса поглощения 1698 см $^{-1}$ недейтерированной тРНК претерпевает «голубой» сдвиг до $\nu=1702$ см $^{-1}$ (рис.3д), что также говорит о переходе тРНК в спиральную конформацию.

В третьем интервале $9 < n \leq 14$ полоса поглощения 1655 см $^{-1}$ (колебания C4O4 и C2O2) претерпевает низкочастотный сдвиг на 3-4 см $^{-1}$. Ранее при исследовании комплексов полинуклеотидов

poly(rA)-poly(rU) [5], poly(dA)-poly(dT) [17], poly(rG)-poly(rC) [8] такой эффект для полос поглощения, соответствующих карбонильным колебаниям, не был обнаружен. Из данных РСА известно также, что третичная структура тРНК стабилизируется правильными и неправильными Н-связями с участием этих карбонильных групп [1]. Поэтому мы полагаем, что обнаруженный низкочастотный сдвиг полосы 1655см^{-1} связан с формированием третичной структуры тРНК в этом интервале абсорбции воды.

Область поглощения сахарофосфатной цепи. На рис. 4 показаны типичные зависимости ν и R от n для полос поглощения симметричного (ν_s) и антисимметричного (ν_{as}) колебаний фосфатов PO_2^- и вырожденного колебания атомов рибозы [18,19]:

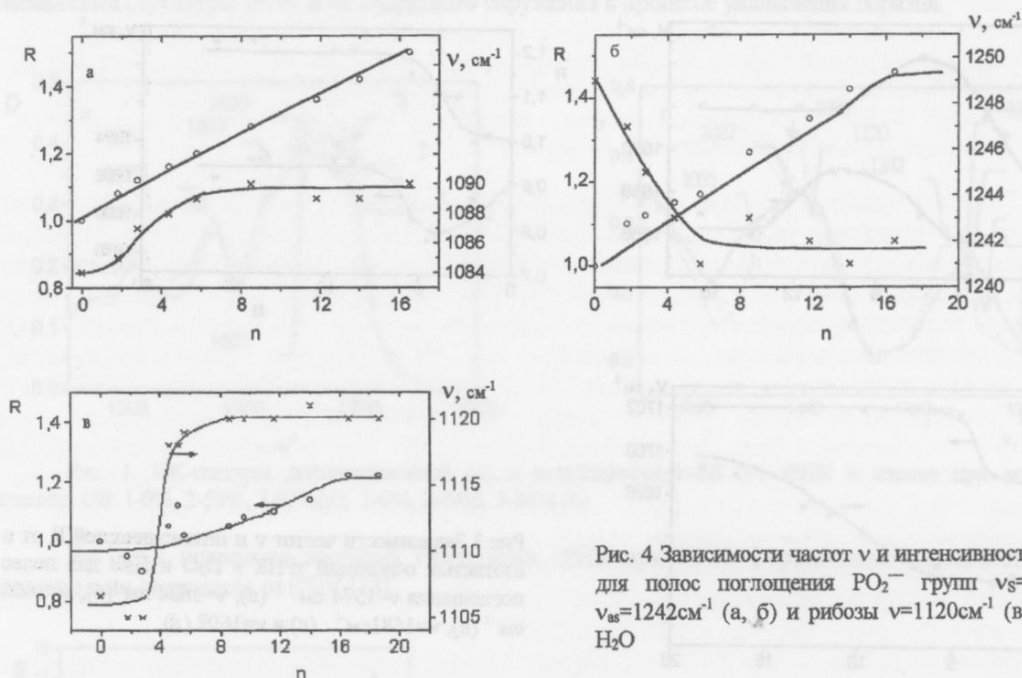
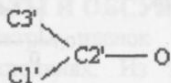


Рис. 4 Зависимости частот ν и интенсивностей R от n для полос поглощения PO_2^- групп $\nu_s=1090\text{см}^{-1}$, $\nu_{as}=1242\text{см}^{-1}$ (а, б) и рибозы $\nu=1120\text{см}^{-1}$ (в) тРНК в H_2O

Низкочастотное смещение ν_{as} и высокочастотный сдвиг ν_s на $6-7\text{см}^{-1}$ указывают на связывание молекул воды фосфатными группами. Поскольку это смещение приблизительно в 3 раза меньше, чем смещение аналогичного колебания ν_{as} ДНК [15], то следует полагать, что связывание воды с группами PO_2^- в тРНК менее прочное, чем с теми же группами ДНК. Рост интенсивности этих полос во всех трех интервалах сорбции указывает на то, что степень гидратации тРНК соответствует $n=14$ молекулам воды на один нуклеотид. Частота полосы поглощения рибозы 1105см^{-1} в первом интервале сорбции практически не изменяется, однако во втором интервале до $n=8$ она претерпевает высокочастотный сдвиг до 1120см^{-1} (рис.4в), что связано, по-видимому, с конформационными изменениями рибозы: именно в этом интервале, как было сказано выше, происходит переход стеблей тРНК в двухспиральное состояние. Рост интенсивности данной полосы вплоть до $n=14$, как и в случае с фосфатными полосами, свидетельствует о связывании молекул воды с C2'OH группами рибозы. Поскольку интенсивность этих полос возрастает и в третьем интервале сорбции, то надо полагать, что на образование третичной структуры требуется 4-5 молекул воды.

Измерения диэлектрических параметров раствора тРНК также позволили определить степень гидратации тРНК, которая оказалась близкой (~ 13 молекул воды на один нуклеотид) к соответствующей величине во влажных пленках.

Таким образом, можно считать, что степень гидратации ($\text{H}^{\text{тРНК}}$) в пересчете на один нуклеотид суммарной тРНК составляет 14 ± 1 молекул воды.

Ранее нами было установлено, что степени гидратации полинуклеотидов соответственно равны: $h^V=7(\pm 1)$, $h^A=11(\pm 1)$, $h^G=12(\pm 1)$, $h^U=9(\pm 1)$, $h^{A-U}=14(\pm 1)$, $h^{G-U}=8(\pm 1)$. Так как в среднем в двухспиральной структуре в стеблях тРНК находится $\sim 55\%$ всех нуклеотидов, то степень гидратации тРНК можно представить в виде

$$H^{\text{тРНК}} = 0,55 \frac{h^{A-Y} + h^{\Gamma-C}}{2} + 0,45 \frac{h^Y + h^A + h^{\Gamma} + h^C}{4} + h^{\text{трет}},$$

где $h^{\text{трет}}$ - степень гидратации нуклеотида при формировании третичной структуры тРНК. Подставляя известные величины в формулу, можно найти, что на образование третичной структуры необходимо около 4 молекул воды на нуклеотид. Из зависимости величины v от p (рис. 3в) также видно, что это количество молекул воды необходимо для формирования третичной структуры тРНК. Наличие спирализованных стеблей тРНК обеспечивается достаточным количеством гидратированных ионов Na^+ в исследуемых образцах.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования гидратации тРНК и полинуклеотидов свидетельствуют о том, что вода играет важную роль не только в формировании вторичной структуры, но и в свертывании транспортной РНК в третичную структуру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. -М.; Мир, 1987, 584с.
2. Egly M., Portmann S., Usman N. // Biochemistry 1996, V. 35. p. 8489-8494.
3. Starikov E.B. Semenov M.A. // Studia biophysica 1987, V. 120, №2. p. 187-196.
4. Семенов М.О., Каппур В.А., Больбух Т.В. II з'їзд Українського Біофізичного товариства. Харків 1998, с. 15
5. Семенов М.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика. 1985. Т.30. с. 571-577
6. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Starikov E.B. // Studia biophysica 1985, V. 106. №3 p. 181-192.
7. Семенов М.А., Старилов Е.Б. Больбух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика. 1988. Т.34. с. 389-395
8. Семенов М.А., Малеев В.Я., Березняк Е.Г. Гасан А.И., Больбух Т.В. // Молекулярная биология 1991. Т.25. с.1626-1634.
9. Семенов М.А. дисс. докт. физ.-мат. наук. М. МГУ, 1990
10. Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Шабардина Л.И. // Биофизика. 1979. Т.24. вып. 2. с. 210-217
11. Каппур В.А., Малеев В.Я., Щеголева Т.Ю. // Молекулярная биология 1976. Т.10. №3. с.568-575.
12. Больбух Т.В., Семенов М.А. // Биофизика. 1985. Т.30. с.409-413
13. Семенов М.А., Больбух Т.В. // Биофизика. 1984. Т.29. вып. 3. с. 377-382
14. Старилов Е.Б., Семенов М.А. // Журнал физ. химии. 1988. Т.42. №8. с. 2120-2126
15. Семенов М.А., Малеев В.Я. // Биофизика. 1986. Т.31. с. 764-767
16. Semenov M.A., Bolbukh T.V. // Studia biophysica 1984. V. 102. p. 215-220.
17. Семенов М.А., Матвеев Д.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я. // Биофизика. 1994. Т.39. с. 628-636
18. Tsuboi M. // Appl. Spectrosc. Rev. 1971. V.5, №3. p. 45-90
19. Chem Y.Z. Pronofsky E.W. // Biopolymers. 1993 V.35. №5. p. 797-812

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

DNA STRUCTURAL CHANGES DURING INTERACTION WITH METAL IONS ON IR- SPECTROSCOPY DATA

S.V. Kornilova*B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,
47 Lenin Ave., 310164, Kharkov, Ukraine*

Received on November 6, 1998.

The metal (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+}) ion effect on the DNA structure in films is studied at different relative humidities (5-98%) by the IR-spectroscopy method. The results obtained evidence the interaction of the ions with DNA phosphate groups as well as with nucleic bases. The formation of the secondary structure of DNA complexed with metal ions is shown to take place at the greater number of water molecules bound to the polymer than in the case of DNA without ions. The interaction of DNA with metal ions prevents its transition into A-form and induces essential changes in the hydrate water of the complexes. The models for the ion interaction with DNA macromolecules and its components are discussed.

Keywords: DNA structure, metal ions, vibration spectroscopy

The active biological role of divalent metal in the function of the genetic apparatus in cancerogenesis and mutagenesis has been attracting permanent interest in the interaction of these ions with nucleic acids. A great number of works has considered this problem [1-10] but at present binding sites of Me on DNA, molecular mechanisms of interactions of the hydrate water with DNA complexed with metal ions have not been clarified yet.

The present work continues the previous studies carried out using the viscosimetry, CD and differential UV-spectroscopy methods [8,9]. The work studies Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} ion interactions with DNA in films at various relative humidities by IR- spectroscopy. The method used gives information on metal ion binding sites, the metal ion effects on the macromolecule transition into the double helical conformation and on properties of the hydrate water of the complex. Such data are necessary to develop real models of the Me ion+DNA hydrate complex and to understand mechanisms of ion-hydrate environment effects on the structure and parameters of macromolecules.

EXPERIMENTAL

Native calf thymus DNA of molecular weight 1.9×10^7 Da was used, the protein content being smaller than 0.5%. DNA was extracted in the D.Yu. Lando Laboratory (Minsk, Belarus). The hypochromic effect was 36% at $\lambda = 260$ nm. The number of elements Na^+ and K^+ determined with a FPL-I flame photometer in DNA preparations (regarding their "dry" weight) was 7.0 ± 0.2 and $0.6 \pm 0.02\%$, respectively.

Methods of the DNA film preparation and IR spectrum recording with an IR-spectrophotometer UR-20 (Zeiss, Jena) are described in details elsewhere [4]. IR spectra of DNA complexes with the above ions were studied in the range of relative humidities (RH) from 5% to 98%. The temperature was 29°C. The average number of water moles per mole of DNA nucleotides (n) was determined as described in [4].

RESULTS AND DISCUSSION

To investigate Me^{2+} ion effects on the structure of DNA and its hydrate shell, IR spectra of DNA complexes with Mn^{2+} , Ca^{2+} and Cu^{2+} ions were studied in the range of relative humidities (RH) from 5% to 98% (Figs.1,2). As binding constants for the Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and Cu^{2+} ion association with DNA differ essentially, various concentrations of ions ($[Cu^{2+}]/[P]=0,4$, $[Mn^{2+}]/[P]=1$, $[Ca^{2+}]/[P]=10-20$) were studied in order to compare effects induced by Me^{2+} ions. The analysis of the spectra obtained shows that the above metal ions induced essential changes in IR-spectra of DNA in the absorption region of the sugar-phosphate bone as well as of the nucleic bases (Figs.1-3).

Thus, Ca^{2+} ions induce shifts and intensity changes of the absorption band of asymmetric ($\nu = 1230$ cm^{-1}) and symmetric ($\nu = 1087$ cm^{-1}) vibrations of PO_2 groups and 14 cm^{-1} shift of the absorption band of ribose ($\nu = 1055$ cm^{-1}) in DNA at $[Ca^{2+}]/[P]=20$ and $n=8$ (76 % RH) (Fig. 2). At

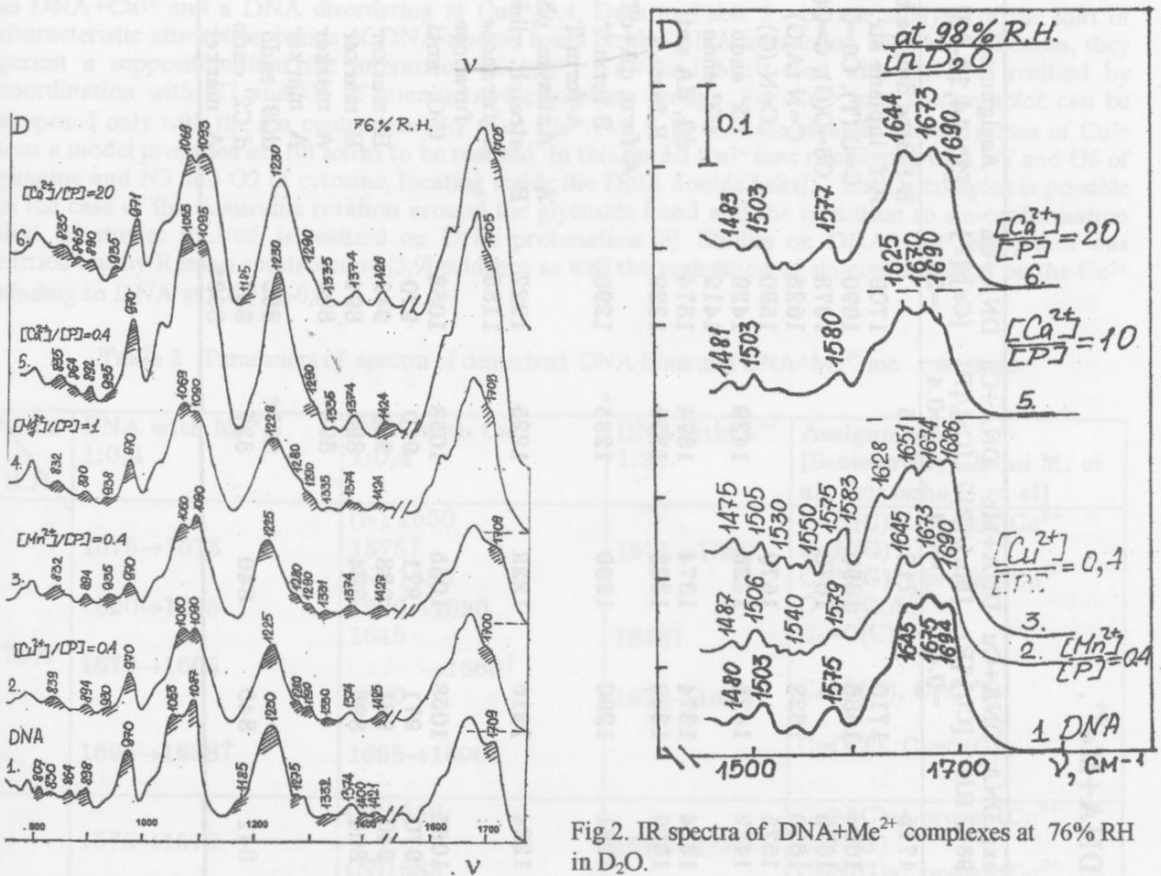


Fig 2. IR spectra of DNA+Me²⁺ complexes at 98% R.H. in D₂O.

Fig 1. IR spectra of DNA+Me²⁺ complexes at 76% R.H.

$n > 12$ (98 % R.H.) these shifts of 1221 cm⁻¹ and 1087 cm⁻¹ absorption bands decrease, being 1 - 3 cm⁻¹. Also, Mn²⁺ ions cause shifts of absorption bands of asymmetrical vibrations of PO₂ groups by 5 cm⁻¹ to the region of low frequencies ([Mn²⁺]/[P]=0.4) at 76 % R.H. (Fig. 1). With the increase of the water content in the film up to $n > 16$ the absorption band of phosphates ($\nu = 1221$ cm⁻¹) shifts up to $\nu = 1222$ cm⁻¹. Cu²⁺ ions induce shifts of phosphate absorption bands at $n = 8$. For example, the absorption band of asymmetrical vibrations of phosphates for DNA+Cu²⁺ is 1225 cm⁻¹.

Table 1 gives main characteristics of absorption bands of DNA and DNA complexed with Me²⁺ ions. These data and spectra in figs. 1-3 evidence that Mn²⁺, Ca²⁺ and Cu²⁺ interact with DNA phosphates and that DNA complexed with divalent ions seems to transit into B-form passing A-form. Changes in parameters of spectra of deuterized DNA films and DNA+Me²⁺ ion complexes are shown in Table 2. It should be noted that the absence of the band 1710 cm⁻¹ and the shift of the band 1053 cm⁻¹ characteristic of the presence of the double-helical DNA structure, in addition to the location of absorption bands of PO₂ groups, do not permit the conclusion on the formation of the native DNA structure complexed with Ca²⁺ ions (Ca/P=0,4+1), Mg (Mg²⁺/P=1) even at R.H.=98% (Fig. 1-3, Table 1). The double-helical structure is absent with the all DNA metal complexes studied at R.H.=76% (Fig. 2). Its formation completes at R.H. 98%. DNA films kept in a hermetic cuvette with H₂O or D₂O for several (2-3) days showed that metal complexes sorb the larger number of water molecules (n) than the pure DNA and that this number increases with the rise of the Me²⁺ content in DNA films [4, 5]. So, for DNA+Ca²⁺ at Ca²⁺/P=20 n were 26 while for DNA it was 20 and did not increase on the DNA keeping in a hermetic cuvette with water for 2-3 days.

Analysis of changes in spectral parameters of DNA (Figs 1) and deuterized films of DNA+Me²⁺ complexes (Fig. 3) is given in Tables 1 and 2, respectively. The comparison of frequencies of characteristic absorption bands of IR spectra of DNA and its complexes with Me²⁺ ions permits a supposition that in the presence of Me²⁺ studied DNA transits into the double-helical conformation at higher R.H.s than the pure DNA. Unlike the latter, the above DNA seems to transit to the B-form

Table 1 Main marker bands in IR spectra of complexes DNA+Me²⁺.

DNA A-form	exp.DNA 76% RH	DNA+Cu [Cu]/[P] =0.4	DNA+Mn [Mn]/[P] =0.4	DNA+Ca [Ca]/[P] =0.4	DNA+Ca [Ca]/[P] =20	DNA B-form [8]	exp.DNA 98% RH	DNA+Cu [Cu]/[P] =0.4	DNA+Mn [Mn]/[P] =0.4	DNA+Ca [Ca]/[P] =0.4	DNA+Ca [Ca]/[P] =20	Assignment [11-14,16-18]
1709	1709	1700	1709	1705	1705	1714	1715	1710	1712	1715	1709	B-f Base double bond
1695	1695	1690	1688			1694	1694	1686	1690		1690	A-f inplane str. mode
1670	1670	1660	1665			1675	1675		1673		1673	C=O (T), C6=O (G)
1620	1620	1630	1625			1620	1620	1628			1625	C6=O(G), C=O(T)
1575	1575	1575	1578		1580	1575	1575		1579		1580	C=N (A,G)
		1425	1427	1424	1426	1425	1422	1425	1426	1429	1429	C=N (G)
1421	1419										1419*	C2' endo
1374	1374	1374	1374	1374	1374	1374	1374	1374	1374	1374	1374	C3' endo
						1327	1329	1329	1328	1329	1329	dG, dA anti
1331	1332	1330	1331	1335	1335	1281	1281	1290	1280	1285*	1290	B-form T
		1280	1280*	1290	1290*							A-form dA+dT
1277	1275											B-form T
1234	1230			1230	1230							A-form T
		1225	1225			1223	1224	1216	1222	1225	1227	A Antisym. phosph.
1189	1185*					1185*					1185*	B stretch. vibration
		1060	1060	1065	1069							A furanose
1053	1055						1055	1058	1055	1058	1058	furanose
968	970	970	970	970	971	969	970	971	971	970	970	C-O, anti
		930	935	935	935	936	940	931	938	938	940	
		894	894	892	890	894	894	896	894	894	894	B marker
897	898									898*	898*	B marker
885	888											A marker
864	864			864	865					865*	865	A marker
	830*	839	832	835	835	833	841	840	840	837	837	dC3' endo
807	807										809*	d C2' endo
												A marker

* - shoulder

DNA structural changes during interaction with metal ions on IR-spectroscopy data

conformation family, passing the A-form (Table 1). Besides, we note strong conformational changes in DNA+Cu²⁺ and a DNA disordering at Cu/P≥0,4. Data in Table 2 permit analysis of the shift of characteristic absorption bands of DNA nucleic bases on the DNA interaction with Me²⁺. Besides, they permit a supposition that the interaction of Mg²⁺, Ca²⁺ and Mn²⁺ ions with DNA is realized by coordination with N7 and O6 of guanine and phosphate groups. For Cu²⁺ ions this complex can be supposed only with the ion content smaller than Cu²⁺/P<0,4. In the case of high concentrations of Cu²⁺ ions a model proposed in [10] seems to be realized. In this model Cu²⁺ ions coordinate with N7 and O6 of guanine and N3 and O2 of cytosine, locating inside the DNA double helix[5]. Such a complex is possible in the case of the guanosine rotation around the glycoside bond and the transition to sin-conformation that, as studies showed, is realized on DNA protonation [8]. Studies on DNA+Cu²⁺ complexes was carried out by Raman spectroscopy [5,9] evidence as well the realization of sin-conformation on the Cu²⁺ binding to DNA at Cu²⁺/P>0,4.

Table 2 Parameters of spectra of deuterized DNA films and DNA+Me²⁺ ion complexes

ions R.H.	DNA with Mn ²⁺ 1:0,4	DNA with Cu ²⁺ 1:0,4	DNA with Ca ²⁺ 1:20	Assignments [Semenov M; Ghomi M. et al; Fritzsche H. et al]
76%	1575→1578 1620→1625 1670→1665 1695→1688↑	(N) 1550 1575↑ (N) 1580 1620→1630 1645 →1660↑ 1670 1695→1690↓	1575→1580 1645↑ 1670→1662	C=N(C)at presentCu ²⁺ C=N(G) C=N(G)at presentCu ²⁺ C=N(C,A) C ₂ =O(C) C ₆ =O(G), C=O(T) C=O(T), C ₆ =O(G)
98%	1575→1579 1675→1673 1694→1690↓	(N)1550 (N)1583 1620→1628↓ 1694→1686↑	1575→1580 1620→1625 1675→1673 1694→1690↓	C=N(C)at presentCu ²⁺ C=N(G) C=N(G)at presentCu ²⁺ C=N(C,A) C ₆ =O(G), C=O(T) C=O(T), C ₆ =O(G)

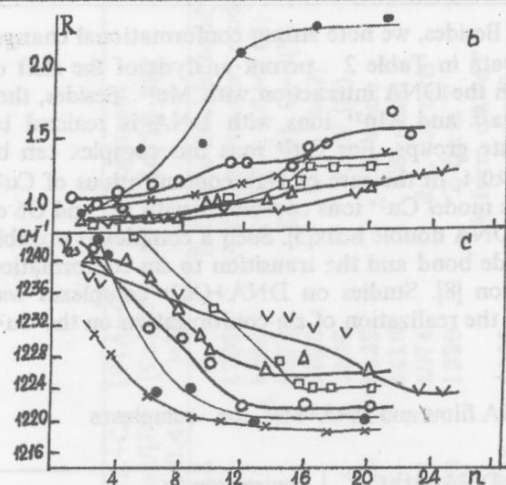
↑↓- decrease or increase of the absorption band intensity

→ - shift of absorption bands in spectra of DNA+Me²⁺ complexes are indicated in comparison with DNA spectrum;

(N)-new absorption band.

The analysis of dependencies of frequencies and intensities of absorption bands of nucleic bases and the sugar-phosphate bone on the number of absorbed water molecules per nucleotide (n) allows to study interactions with ions and structural changes of macromolecules. The absorption band intensity was characterized in relative units $R = D_i/D_0$, where D_i and D_0 are optical densities at the maximum of absorption bands at i- and minimum relative humidities, respectively. The minimum relative humidity was 5%.

Figures 3 show dependencies of frequencies and intensities of stretching vibration bands of DNA phosphate groups complexed with divalent ions. It is known that for DNA such dependences permit to observe the transition into A- and B-form at n=8 and n=12, respectively [15]. It can be seen that for DNA+Me²⁺ ion complexes essential changes in the character of the above dependences are observed. Thus, Mn²⁺ and Ca²⁺ ions decrease the intensity of these DNA absorption bands, while Cu²⁺ ions increase it. Probably, the decrease of the intensity is due to the fact that Ca²⁺ and Mn²⁺ ions interacting with phosphates prevent from their hydration, while Cu²⁺ ions are able to locate inside the DNA helix, forming interstrand complexes [5]. Besides, they do not prevent from the hydration of the bone, and the increase of the intensity could result from P=O bond polarization during the interaction. Cu²⁺ ions with DNA



Figs.3. Dependencies R and ν values for PO_2^- group vibrations on number of the sorbed water molecules (n) for DNA and $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ complexes: 1-° DNA; 2-• $\text{Cu}^{2+}/\text{P}=0.4$; 3-× $\text{Mn}^{2+}/\text{P}=0.4$; 4-Δ $\text{Mg}^{2+}/\text{P}=1$; 5-□ $\text{Ca}^{2+}/\text{P}=1$; 6-∨ $\text{Ca}^{2+}/\text{P}=20$

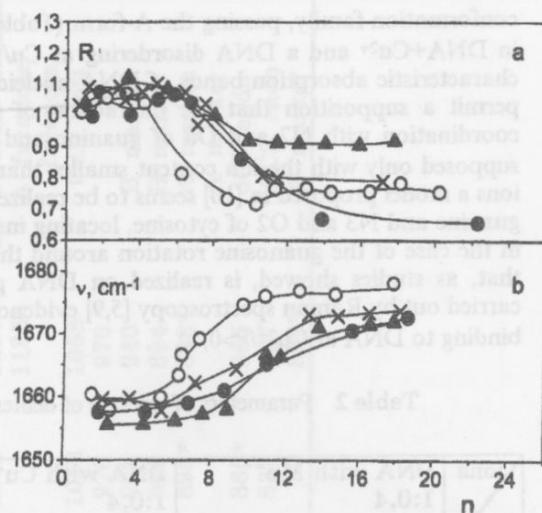


Fig.4. Dependencies of the frequency (ν) and relative intensity ($R=D_i/D_0$, where D_i and D_0 are the optical densities at the maximum of absorption band at i and minimum relative humidities, respectively) on the number of absorbed water molecules: (O) DNA, (×) $\text{DNA}+0.4[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}]$, (●) $\text{DNA}+0.4[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$, (▲) $\text{DNA}+20[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]$.

At $n < 3$ frequencies of asymmetrical vibrations of phosphate groups of $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ ion complexes, except Cu^{2+} ions, are shifted to the region of lower frequencies as regards those in the DNA spectrum. Also, it should be noted that for DNA the transition into the double helical conformation (B-form) is identified by the shifts of phosphate absorption bands to $\nu = 1224 \text{ cm}^{-1}$, 1087 cm^{-1} (it occurs at $n=12$ for DNA in the absence of Me^{2+} ions [15]), while these bands are observed at $n=18$ for $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=10$, $n=24$ for $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=20$, $n=14$ for Mn^{2+} ions and $n=12$ for Cu^{2+} ions.

Data of Table 1 and dependencies obtained for intensities and frequencies of vibrations of phosphate groups of DNA complexed with Me^{2+} ions indicate that all the above ions delay DNA transition into the B-conformation. DNA macromolecules complexed with Me^{2+} ions transit into the B-conformation at $n=14$ for Mn^{2+} ions, $n=18$ and 24 for $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=10$, 20 , respectively, and $n=12$ for Cu^{2+} ions (Fig. 3). This effect was also observed for DNA complexed with monovalent ions [7].

Also, DNA transition into the double helical conformation is identified by the appearance of absorption bands ($\nu = 1053 \text{ cm}^{-1}$) of ribose and the in-plane stretching vibration mode ($\nu = 1705 \text{ cm}^{-1}$) [14,15] in the IR spectrum of native DNA at $n > 8$ (Table 1). The observed IR band with a peak position at $\nu = 1705 \text{ cm}^{-1}$ is fairly well reproduced by calculations with the double-strand structure of Poly U (1707 cm^{-1} for $\text{C}=\text{O}(\text{U})$ absorption band of IR spectrum) [15]. Divalent metal ions induce the low frequency shift of this absorption band in IR spectra. For $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ complexes the appearance of absorption bands at the above frequencies is observed at $n=14$ ($[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}]=0.4$; 1 , $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=10$), $n=20$ ($[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=20$) and $n=12$ in the case of Cu^{2+} ions.

At $n < 12$ the absorption band of ribose is resolved at $\nu = 1065\text{--}1070 \text{ cm}^{-1}$ in the IR spectrum of DNA complexes with Ca^{2+} and Mn^{2+} ions. This band is not observed in the case of Cu^{2+} ions.

Dependencies of frequencies and intensities of absorption bands of DNA nucleic bases and $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ complexes on the number of absorbed water molecules show the delay of the $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ ion complex transition into the helical conformation and the above frequency shifts too (Fig. 4).

It should be noted that the decrease of the intensity of absorption bands of nucleic bases due to the $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ ion transition into the double helical conformation is observed at $n=10$ ($n=8$ for native DNA) (Fig. 4). The discrepancy of intervals for n values at which the structural transition of $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ ions is identified by dependencies of frequencies and intensities of absorption bands of phosphate groups and nucleic bases can be explained by the preferential binding of Ca^{2+} and Mn^{2+} ions to biopolymer phosphates and by hydration of these centres. Such a discrepancy is not observed in the case of Cu^{2+} ions, which is due to higher values of binding constants for these ions bound to DNA bases than those for phosphates [5,14]. All the divalent ions, except Cu^{2+} ones, induce the shift of the frequency of the absorption band of stretching vibrations of the absorbed water from 3420 to 3400

DNA structural changes during interaction with metal ions on IR-spectroscopy data

cm^{-1} , perhaps, due to the Ca^{2+} and Mn^{2+} ion interaction with H_2O in outer layers of the DNA hydrate shell (Fig. 5).

It is also known that the frequency shift of this absorption band is proportional to the excess enthalpy of water molecule evaporation from the complex [13,15]. This leads to a conclusion that the binding of water molecules to the $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ complex is stronger than that to DNA macromolecules without ions.

Also, it should be noted that on the complex formation the maximum number of absorbed water molecules in the DNA hydrate shell increases (Fig.3). It follows from the fact that on the long-term (for about 5 days) keeping of $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ films at $\text{R.H.}=100\%$ maximum numbers of absorbed water molecules for Ca^{2+} ions are 23 at $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=10$ and 26 at $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=20$. For Mn^{2+} and Cu^{2+} ions this value is 22.

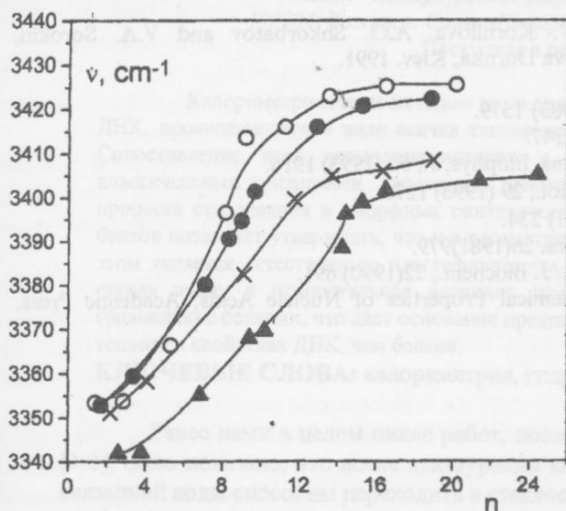


Fig.5. Dependencies of the frequency of the absorption band of absorbed water molecules on DNA: (O)DNA, (●)DNA+0.4 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]$, (×)DNA+0.4 $[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}]$, (▲)DNA+20 $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]$.

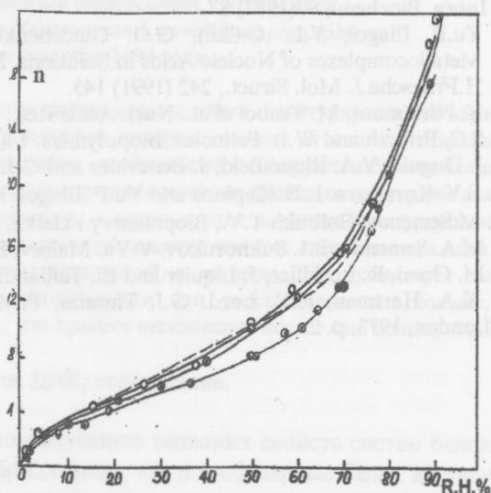


Fig 6. Dependence of sorbed water molecules (n) on relative humidity (RH) for DNA (1-○) and complexes with Cu^{2+} (2-●) and Mn^{2+} (3-⊙)

The dependence of n on relative humidity of DNA + Cu^{2+} and DNA+ Mn^{2+} by data of IR-spectroscopy and picrogravimetry methods are shown on fig. 6.

Binding DNA with Cu^{2+} decrease of the DNA sorption degree and $\text{RH} \approx 30-70\%$. In the range of $\text{RH}=50-70\%$ where DNA transition into double helix conformation is observed, the decrease of the DNA sorption degree is two water molecules per nucleotide ($n=2$). For Mn^{2+} ions this values $[\text{Mn}^{2+}]/[\text{P}] = 0.4$ is about $n=1$ and coincide with curve for DNA molecules without ions (Fig. 6). This effect can be explained by the fact that Me^{2+} bind with N_7 of the guanine and N_3 of the cytosine, which involved in hydration bonds formation. The DNA double helix structure formation is occurs at interaction water molecules with this centres on DNA molecules and dehydration N_7 of the guanine and N_3 of the cytosine during binding with the Cu^{2+} ions and in this case the number of the water molecules need for transition DNA + Cu^{2+} are increase.

Conclusion

The results obtained show that in the presence of metal ions DNA transits into the B form by passing the A form. All the investigated ions delay the DNA transition into the B conformation. The transition occurs at $n = 14$ for Mn^{2+} ions, $n = 18$ and 24 for $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] = 10$ and 20 , respectively, and $n = 12$ for Cu^{2+} ions. Cu^{2+} and Mn^{2+} ions decrease the DNA hydration while Ca^{2+} ions increase it. From the fact that shifts of frequencies of stretching vibrations of the water sorbed on the $\text{DNA}+\text{Me}^{2+}$ complex are observed, it may be concluded that the binding of water molecules to a DNA + Me^{2+} complex is stronger than that to DNA macromolecules without ions.

The results obtained evidence the modification of the secondary DNA structure, specifically, the B-A structural changes in some part of the DNA molecule complexed with Ca^{2+} at high concentrations of calcium ions ($[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}] = 20$). Studies of DNA + Cu^{2+} complexes ($[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] = 0.4-0.6$) show that the DNA structure cannot be assigned to any of the known conformations (A,B,Z). The purine nucleotide transition from anti to syn conformation was observed in DNA complexes with Cu^{2+} ions and at the high ($[\text{Ca}^{2+}]/[\text{P}]=20$) concentration of Ca^{2+} ions. These data can support the model of the DNA + Cu^{2+} complex proposed in Refs. [9,10].

References

1. N. Cho and S.A. Asher, J. Am. Chem. Soc., 115 (1993) 6349.
2. M.J. Bloemink and J. Reedijk. in A. Sigel and H. Sigel (Eds.) Metal Ions in Biological Systems, Cisplatin and derived anticancer drugs: mechanism and current status of DNA binding, New York, 1996, pp. 641-685.
3. P. Miskovsky, A. Laigle, L. Chinsky and P. Turpin. J. Biomol. Struct. Dynam., 10(1992) 169.
4. S. Kornilova, L. Kapinos and Yu.P. Blagoi. Mol. Biol., 27 (1993) 791.
5. S.V. Kornilova, L.E. Kapinos, A. Tornkova. P. Miskovsky, Yu.P. Blagoi and T.V. Bolbukh, Biofizika 39 (1994) 407.
6. M. Ghomi, R. Leteller, J. Liquier and E. Taillander. Int. Biochem., 22 (1990) 691.
7. W.I. Peticolas. G.A. Thomas and Z. Dai. J. Mol. Struct., 242 (1991) 135.
8. V.A. Sorokin. Yu.P. Blagoi. V.A. Valeev, S.V. Kornilova. G.O. Gladchenko, I.D. Reva and V.I. Sokhan, J. Inorg. Biochem., 80(1987) 87.
9. Yu.P. Blagoi, V.L. Galkin. G.O. Gladchenko. S.V. Kornilova, A.G. Shkorbatov and V.A. Sorokin, Metallocomplexes of Nucleic Acids in Solutions, Naukova Durnka, Kiev. 1991.
10. H. Fritzsch. J. Mol. Struct., 242 (1991) 145.
11. Y. Nishimura, M. Tsuboi et al.. Nucl. Acids Res., 11 (1983) 1579.
12. S.C. Erfurth and W.L. Peticolas. Biopolymers. 14(1975) 247.
13. J. Duguid, V.A. Bloomfield, J. Benevides and G.J. Thomas, Biophys. J., 65 (1993) 1916.
14. S.V. Kornilova. L.E. Kapinos and Yu.P. Blagoi, Mol. Biol., 29 (1993) 1276.
15. M. Semenov, Bolbukh T.V., Biopolimery i kletka, 6 (1987) 234.
16. M.A. Semenov, B.I. Sukhorukov, V.Ya. Maleev, Biofizika. 26(1981)979.
17. M. Gomi, R. Lebellier, J. Liquier and El. Taillandier, Int. J. Biochem., 22(1990) 691.
18. K.A. Hartman, R.C. Lord. G.J. Thomas, Physico-chemical Properties of Nucleic Acids, Academic Press, London, 1973, p. 2.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 573.323

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕКЛОВАНИЯ
ДЕНАТУРИРОВАННОЙ ДНК

Г.И. Церетели, О.Л. Вавелюк, Т.В. Белополюская

*Санкт - Петербургский государственный университет, НИИ Физики,
198904, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ульяновская 1, vavol@geo.phys.spbu.ru
Поступила в редакцию 9 ноября 1998 года.*

Калориметрическим методом установлена аномалия тепловых свойств денатурированной влажной ДНК, проявляющаяся в виде скачка теплоемкости, температура которого зависит от степени гидратации. Сопоставление всех термодинамических и кинетических особенностей обнаруженной аномалии с классическими признаками проявления одного из основных релаксационных процессов в твердом теле - процесса стеклования в аморфных синтетических полимерах, а также в ряде влажных денатурированных белков позволяет утверждать, что и в рассматриваемом случае наблюдается процесс стеклования, а вода при этом является естественным пластификатором. Интервал влажностей, в котором ДНК существует в виде стекла шире, а относительная величина изменения теплоемкости при расстекловывании больше, по сравнению с белками, что дает основание предполагать, что процесс стеклования играет еще большую роль в тепловых свойствах ДНК, чем белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: калориметрия, гидратация, ДНК, стеклование.

Ранее нами в целом цикле работ, посвященном изучению тепловых свойств систем белок - вода [1-3], было показано, что после денатурации как фибриллярные, так и глобулярные белки в присутствии связанной воды способны переходить в стеклообразное состояние.

В настоящей работе в продолжение этого цикла исследований выполнено детальное калориметрическое изучение тепловых свойств системы ДНК - вода с переменным содержанием воды. Проблеме гидратации ДНК посвящено достаточно большое количество работ, однако, как правило, внимание исследователей при этом сосредоточено на проблеме взаимодействия с водой ДНК в ее нативном состоянии [4]. В настоящей работе основное внимание уделено изучению тепловых свойств денатурированной ДНК. Отметим, что данные, полученные нами для нативной ДНК, находятся в хорошем согласии с результатами тепловых исследований, анализируемых в работе [4]. В результате проделанной работы было установлено, что денатурированная ДНК, содержащая воду в связанном состоянии, как и влажные белки, при охлаждении переходит в стеклообразное состояние, при этом вода в процессе стеклования играет роль естественного пластификатора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все измерения выполнены на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДСК-111 фирмы «Setaram» с согласованным с ним вычислительным комплексом Intertechnic-50 (Франция). Чувствительность микрокалориметра $3 \cdot 10^{-5}$ Дж/с. Ошибка в определении величин тепловых эффектов индуцированных теплом структурных превращений биополимера с использованием предложенного нами ранее экспериментального способа проведения базовой линии в температурном интервале перехода для процесса денатурации составляла $\pm 5\%$. Погрешность в определении абсолютных значений измеряемых температур составляла ± 0.1 °C. В качестве объекта исследования в работе использовался препарат ДНК тимуса телят фирмы «Serva».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в результате продолжительного теплового воздействия ДНК теряет способность к ренатурации. На рис.1 (кривые 2-8) приведены температурные зависимости такого денатурированного образца при различном содержании воды. Как следует из рисунка, для всех кривых температурной зависимости теплоемкости денатурированной ДНК при содержании воды более 40% характерно наличие максимума вблизи 0°C, обусловленного плавлением льда, образующегося при замораживании объемной свободной воды.

Полученные нами данные для максимального количества связываемой с ДНК воды, а также для всего хода кривой зависимости $\Delta Q_{пл}$ (СН₂О %) (рис.26) находятся в хорошем согласии с литературными данными [4,5].

Из приведенных на рис.1 результатов наиболее важным, на наш взгляд, является установленный экспериментально факт существования аномалии температурного хода теплоемкости в виде скачка ΔC_p для образцов денатурированной ДНК, содержащих только связанную воду. Получено, что наблюдаемый скачок теплоемкости имеет величину примерно $0.42 \text{ Дж/г}\cdot\text{K}$ в пересчете на сухой вес в предположении, что теплоемкость воды равна $4.18 \text{ Дж/г}\cdot\text{K}$ и практически не зависит от влажности, в то время как его температура $T_{ст}$ (рис.2, кривая 1а), как и в денатурированных белках (рис.2, кривая 2а) очень сильно изменяется со степенью гидратации ДНК.

Рассматриваемая аномалия теплоемкости ранее была обнаружена нами в денатурированной ДНК с 14% воды и интерпретирована (по аналогии с исследованиями тепловых свойств белков) как калориметрическое проявление процесса стеклования [1]. В настоящей работе получены экспериментальные факты, полностью подтверждающие предложенную интерпретацию. К ним относятся, помимо зависимости температуры скачка $T_{ст}$ от содержания воды и сохранения в первом приближении величины скачка теплоемкости ΔC_p при различных степенях гидратации, полученный характер изменения температуры скачка при изменении режимов нагревания/охлаждения.

Кроме того, появление дополнительного максимума на кривой температурной зависимости теплоемкости после проведения отжига исследуемой системы и характер его изменения в зависимости от времени тепловой обработки также очень типичны для калориметрического проявления процессов стеклования.

Сопоставление всех перечисленных особенностей калориметрического проявления тепловых свойств денатурированной ДНК с типичными признаками одного из основных релаксационных процессов в твердом теле - процесса стеклования в аморфных синтетических полимерах [6], а также в ряде гидратированных денатурированных белков [1-3] безусловно доказывает, что и в данном случае имеет место процесс стеклования, а вода при этом является естественным пластификатором.

Известно, что при переходе из стекла в высокоэластическое состояние появляется новый тип теплового движения, не связанный с колебательным спектром исследуемой системы и обусловленный появлением трансляционного движения молекул [6]. В случае аморфных синтетических и денатурированных биологических полимеров это означает появление трансляционного движения отдельных сегментов молекул [6], которое, в свою очередь, и приводит к появлению инкрементов теплоемкости, сопровождающих эти процессы. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что во влажной денатурированной ДНК, как и в белках, наличие скачка ΔC_p на кривых температурной зависимости теплоемкости непосредственно связано с изменением конформационной подвижности при расстекловывании.

Далее при исследовании влияния отжига на тепловые свойства ДНК нами были получены новые интересные особенности поведения системы денатурированная ДНК - вода, указывающие на релаксационный характер исследуемого процесса. Оказалось, что наибольший по величине дополнительный максимум в области стеклования, превышающий величину самого скачка, наблюдается в тех случаях, когда стеклообразное состояние исследуемой системы получено непосредственно из ее гелеобразного состояния с содержанием воды не менее 50%. При этом было установлено, что величина наблюдаемого дополнительного максимума зависит от используемых условий проведения калориметрического опыта, уменьшаясь с понижением скорости нагревания, т.е. имеет релаксационное, а не структурное происхождение, в отличие от максимумов на кривых теплоемкости, определяемых фазовыми переходами, для которых теплота перехода не зависит от условий проведения эксперимента [6].

Этот эксперимент, на наш взгляд, демонстрирует новые неизвестные ранее особенности процесса стеклования, обусловленные специфическим взаимодействием воды с биомакромолекулой.

Необходимо отметить, что появление в исследуемой системе свободной воды препятствует описанному выше классическому калориметрическому проявлению процесса стеклования. Замерзшая свободная вода образует ледяную матрицу, которая препятствует скачкообразному изменению молекулярной подвижности собственно молекул ДНК. Наложение температурных интервалов плавления ледяной матрицы и процесса стеклования определяет сложное поведение температурной зависимости теплоемкости исследуемой системы вблизи 0°C и требует дальнейшего изучения в связи с необходимостью разделения вкладов фазовых и релаксационных переходов.

Сопоставление полученных данных с результатами исследования процесса стеклования влажных белков показывает: интервал влажностей, в котором ДНК существует в виде стекла, шире, а относительная величина изменения теплоемкости при расстекловывании больше, по сравнению с белками, что дает основание предполагать, что процесс стеклования играет еще большую роль в тепловых свойствах ДНК, чем белков.

Калориметрическое исследование стеклования денатурированной ДНК

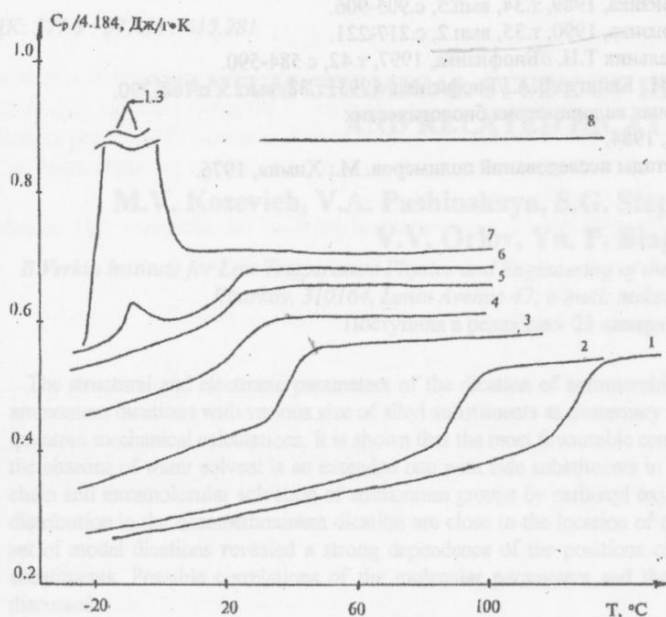


Рис. 1. Температурные зависимости теплоемкости системы денатурированная ДНК - вода при различном содержании воды:
 1 - 12.8% H_2O , 2 - 17.3% H_2O , 3 - 25.0% H_2O , 4 - 32.2% H_2O , 5 - 40.7% H_2O , 6 - 44.3% H_2O , 7 - 52.3% H_2O , 8 - 79.9% H_2O .

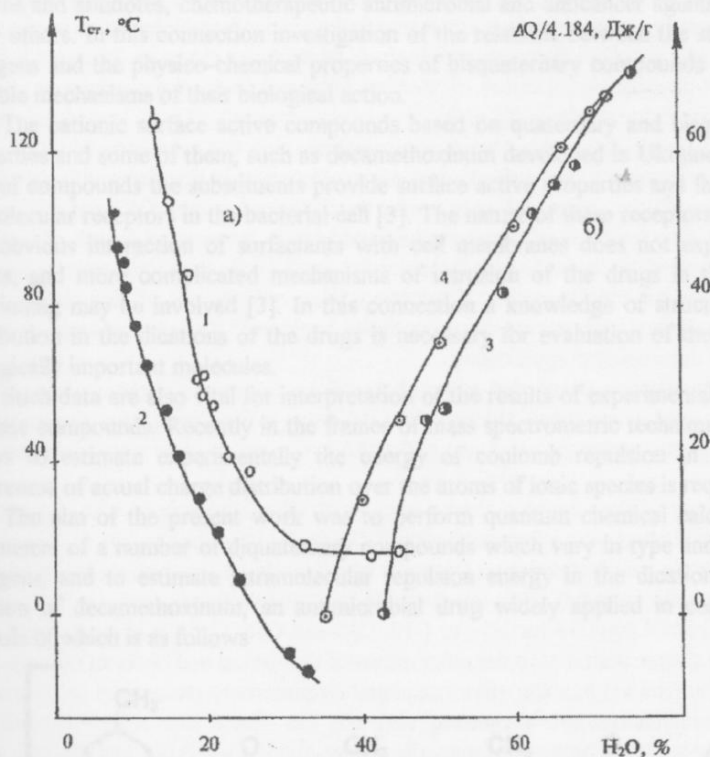


Рис. 2. Зависимость тепловых свойств системы ДНК - вода от содержания воды:
 а) температуры стеклования $T_{ст}$: 1 - ДНК, 2 - аморфной желатины [2];
 б) теплоты плавления свободной воды $\Delta Q_{пл}$: 3 - денатурированной ДНК, 4 - нативной ДНК [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Церетели Г.И., Смирнова О.И. //Биофизика, 1989, т.34, вып.5, с.905-906.
2. Церетели Г.И., Смирнова О.И. //Биофизика, 1990, т.35, вып.2, с.217-221.
3. Церетели Г.И., Белопольская Т.В., Мельник Т.Н. //Биофизика, 1997, т.42, с.584-590.
4. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. //Биофизика, 1993, т.38, вып.5, с.768-790.
5. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул. Тбилиси, Мецниереба, 1984.
6. Годовский Ю.К. Теплофизические методы исследований полимеров. М.: Химия, 1976.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК: 577.3 : 577.33 : 615.281

QUANTUM CHEMICAL STUDY OF DECAMETHOXINUM
AND RELATED DICATIONSM.V. Kosevich, V.A. Pashinskaya, S.G. Stepanian, V.S. Shelkovsky,
V.V. Orlov, Yu. P. Blagoy*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kharkov, 310164, Lenin Avenue 47; e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua*

Поступила в редакцію 25 января 1999 г.

The structural and electronic parameters of the dication of antimicrobial drug decamethoxinum and a set of model ammonium dications with various size of alkyl substituents at quaternary nitrogens were determined by means of AM1 quantum mechanical calculations. It is shown that the most favourable conformation of the decamethoxinum dication in the absence of water solvent is an extended one with side substituents in the *trans*-position with respect to the central chain and intramolecular solvation of ammonium groups by carboxyl oxygens. The positions of two centers of charge distribution in the decamethoxinum dication are close to the location of quaternary nitrogens while the analysis of the set of model dications revealed a strong dependence of the positions of such centers on type and size of the alkyl substituents. Possible correlations of the molecular parameters and the biological activity of ammonium salts are discussed.

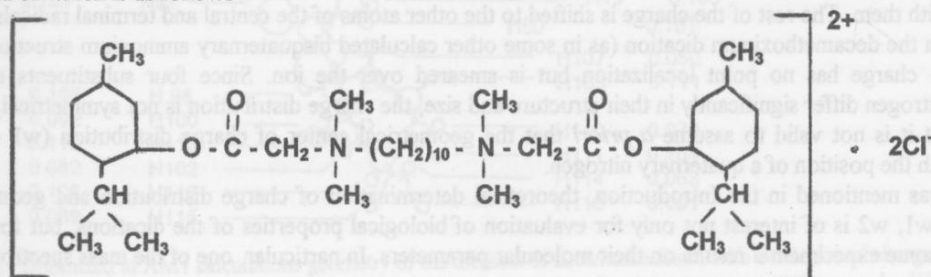
KEY WORDS: diquaternary ammonium antimicrobial agents, decamethoxinum, quantum chemical calculations

A class of salts of diquaternary ammonium compounds embraces the substances the distinctive feature of which is the presence of two quaternary nitrogens in the structure of their dications. At the same time the possibility of practically unlimited variation and combination of types of the substituents at quaternary nitrogens offers a variety of compounds with a wide spectrum of chemical properties and biological action, including poisons and antidotes, chemotherapeutic antimicrobial and anticancer agents, miorelaxants, herbicides, dyes, and many others. In this connection investigation of the relations between the structure of substituents at quaternary nitrogens and the physico-chemical properties of bisquaternary compounds is of great interest for elucidation of possible mechanisms of their biological action.

The cationic surface active compounds based on quaternary and bisquaternary salts possess antimicrobial properties and some of them, such as decamethoxinum developed in Ukraine, are used as medicines [1-3]. In this type of compounds the substituents provide surface active properties and facilitate the adjustment of the drug to its molecular receptors in the bacterial cell [3]. The nature of these receptors, however, is not yet entirely known. The obvious interaction of surfactants with cell membranes does not explain all the effects of bisquaternary agents, and more complicated mechanisms of intrusion of the drugs in the cell metabolism and biopolymers functioning may be involved [3]. In this connection a knowledge of structure, conformational mobility, charge distribution in the dications of the drugs is necessary for evaluation of the possibility of their interactions with biologically important molecules.

Such data are also vital for interpretation of the results of experimental, in particular, spectroscopic, studies of these compounds. Recently in the frames of mass spectrometric technique an approach was developed, which allows to estimate experimentally the energy of coulomb repulsion in multiply charged molecules [4, 5]. Awareness of actual charge distribution over the atoms of ionic species is required in these experiments.

The aim of the present work was to perform quantum chemical calculations of structural and electronic parameters of a number of diquaternary compounds which vary in type and length of substituents at quaternary nitrogens, and to estimate intramolecular repulsion energy in the dications. The objects of the study were a dication of decamethoxinum, an antimicrobial drug widely applied in composition of relevant medicines the formula of which is as follows



and a set of model dications with variable length of central inter-nitrogen and side alkyl substituents.

THEORETICAL METHODS

Calculations of structural and electronic parameters of the above listed quaternary ammonium dications were performed in the frames of semiempirical AM1 procedure using the MOPAC 6 program package [6]. A good agreement between the dipole moment values determined using charges on atoms, obtained by the AM1 technique and measured experimentally for a large row of organic compounds proved the validity of application of the present method for evaluation of charge distributions [6].

Intramolecular coulombic repulsion energy U between two charged parts of the dications was calculated using formula (1)

$$U = \sum_i \sum_j U_{i,j} = \sum_i \sum_j c \frac{q_i \cdot q_j}{r_{i,j}}, \quad (1)$$

which accounts the interactions between each pair of charges q_i and q_j located on atoms i and j , taken from two symmetrical halves of the dication, and the interatomic distances r_{ij} between the corresponding pairs of atoms (c is a constant being 1.439 nm/eV in CI units [5]). Knowledge of the total coulomb energy allowed to estimate the distance r_{w1-w2} between two geometrical centers of weight ($w1, w2$) of the charge distribution in the ion:

$$r_{w1-w2} = \frac{c q_1 q_2}{U} \quad (2)$$

RESULTS AND DISCUSSION

The geometry fully optimized in the AM1 calculations geometry and the charges on atoms of the dication of decamethoxinum are presented in Fig. 1 a, b. The optimal conformation of the central polymethylene chain $-(CH_2)_{10}-$ (with no influence of a solvent) of the dication is completely extended. The length of the organic dication in this extended conformation is 2.75 nm, the distance between two quaternary nitrogens r_{N-N} is 1.39 nm.

The methyl substituents at quaternary nitrogens (N31, N44, here and further the atom labeling is as in Fig. 1) occur in opposite directions in relation to the chain axis and the methyl rings in decamethoxinum are in *trans*-position in relation to the chain as well. It should be mentioned that, along with the structure featured in Fig. 1, there is a number of close energy minima for the positions of methyl rings and their own conformers. Heat of formation of such conformers differs from that of the most favourable structure (71.96 kcal/mole) by 1-3 kcal/mole. The ionization potential of doubly charged species is comparatively high and comprises 14.09 eV.

Another interesting feature of the structure of the dication of decamethoxinum is that the positively charged quaternary groups are «solvated» by carboxyl oxygens. For example, the distance between O57 and C33 or C34 of the methyl groups at N31 is 0.27 nm, the value of which is comparable with the average length of hydrogen bonds. The analogous effect was reported in the literature, for example, for a cyclic antibiotic gramicidin S, in which structure neutral [7] or charged due to protonation [8] amino groups on the ends of side chains of two ornithine residues were solvated by carboxyl oxygens of the polypeptide backbone. An intramolecular solvation may contribute to the stabilization of decamethoxinum dication.

Analysis of the atomic charge distribution shows that a partial charge on quaternary nitrogens themselves is rather small, being 0.044 of electron unit. The positive charge of the dications is distributed over the hydrogens, mainly those at four carbons adjacent to a quaternary nitrogen and some hydrogens in the central polymethylene chain (Fig. 1).

An assessment of the distributions of the positive charge over four radicals connected with a quaternary nitrogen in one of the two symmetrical halves of the decamethoxinum dication is presented in Fig. 2. One can see that about 83% of one-electron charge is concentrated on a fragment which could be conventionally called as the first coordination sphere of a quaternary nitrogen. This involves the nearest-to-nitrogen two methyl and two methylene groups, including C1, C32 and C33, C34 for N31 or C10, C45 and C46, C47 for N44, and hydrogens connected with them. The rest of the charge is shifted to the other atoms of the central and terminal radicals.

Thus, in the decamethoxinum dication (as in some other calculated bisquaternary ammonium structures [9]) the «excess» charge has no point localization but is smeared over the ion. Since four substituents at each quaternary nitrogen differ significantly in their structure and size, the charge distribution is not symmetrical, which is to say that it is not valid to assume *a priori* that the geometrical center of charge distribution ($w1$ or $w2$) coincides with the position of a quaternary nitrogen.

As it was mentioned in the Introduction, theoretical determination of charge distribution and geometrical positions of $w1, w2$ is of interest not only for evaluation of biological properties of the dications, but for interpretation of some experimental results on their molecular parameters. In particular, one of the mass spectrometric

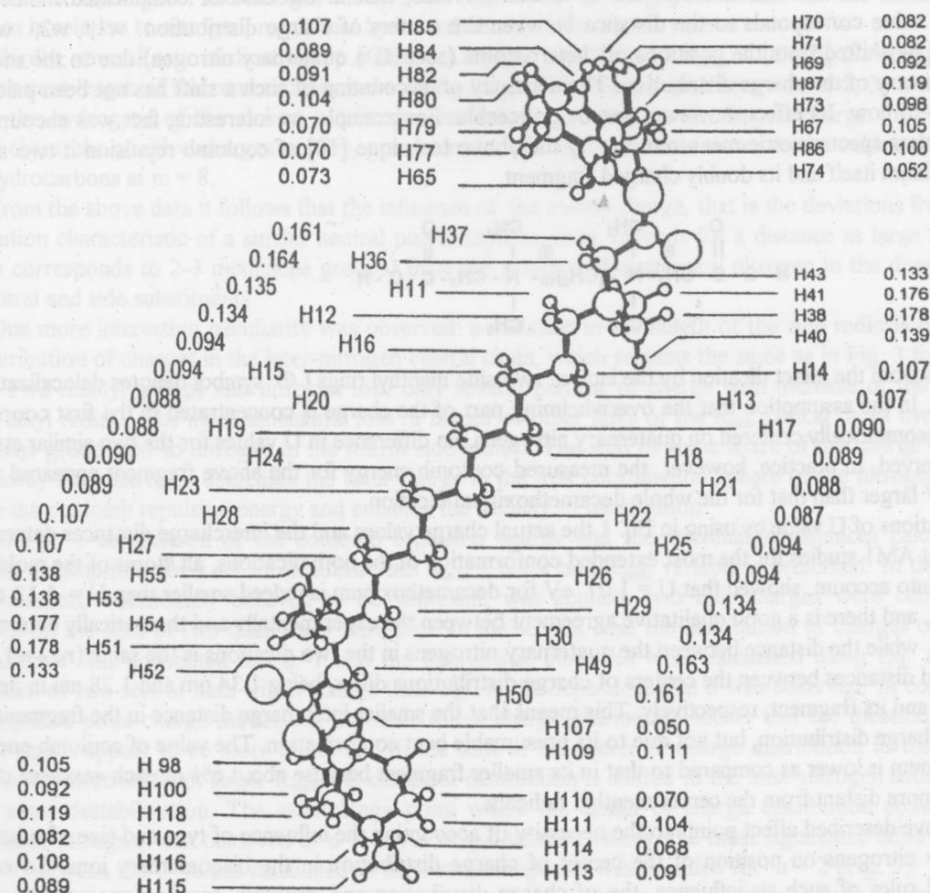
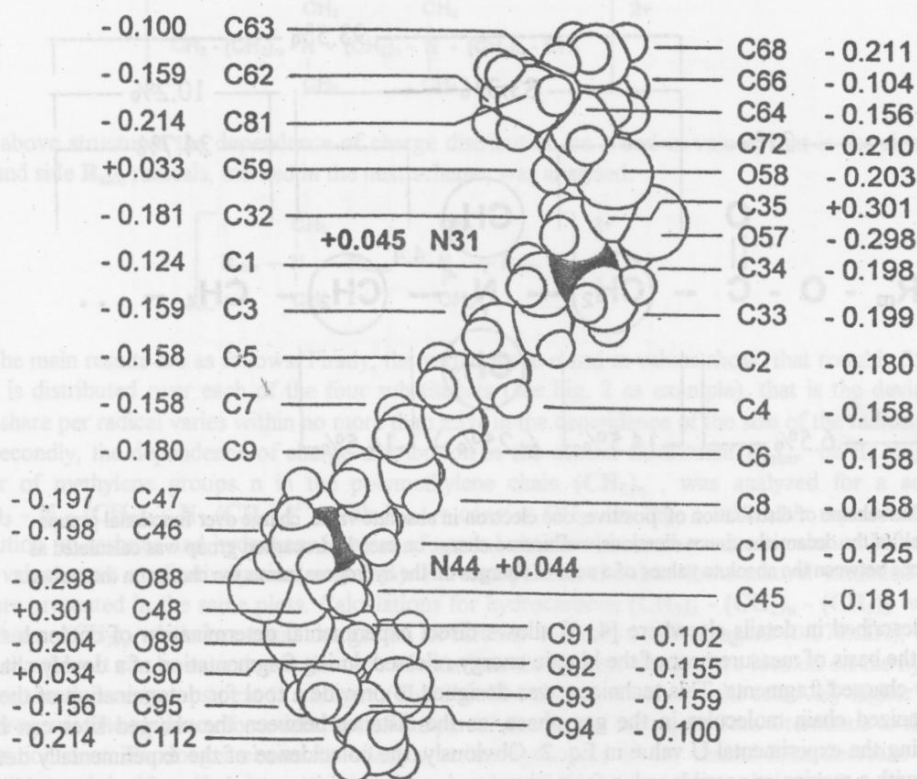


Fig. 1. Optimized in AM1 calculations geometry of the dication of decamethoxinum with indication of charges on atoms of C, O, N (a) and H (b). (Radii of spheres in (a) are conventional and do not correspond to van-der-Waals radii).

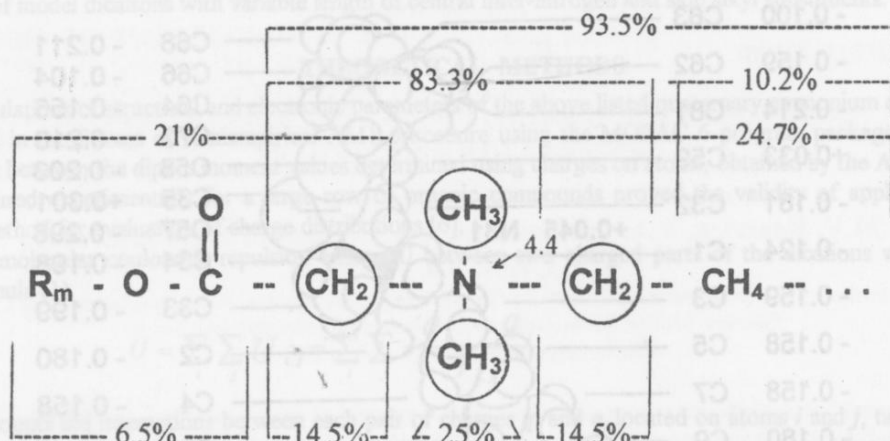
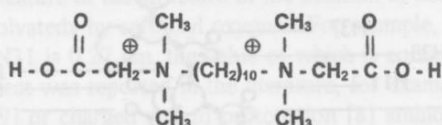


Fig. 2. The scheme of distribution of positive, one electron in absolute value, charge over functional groups of one-half of the decamethoxinum dication. «Excess» charge on each hydrocarbon group was calculated as a difference between the absolute values of a sum of charges on the hydrogens minus the charge on the carbon.

techniques, described in details elsewhere [4, 5] allows direct experimental determination of coulomb repulsion energy U on the basis of measurement of the kinetic energy released during fragmentation of a doubly charged ion to two singly charged fragments. This technique was designed to provide a tool for determination of the conformation of ionized chain molecules in the gas phase, as the distance between the charged sites can be easily calculated using the experimental U value in Eq. 2. Obviously, the coincidence of the experimentally determined r_{w1-w2} value with a maximum possible value for a given molecule means its extended conformation, while smaller r_{w1-w2} values evidence the bend structure. It is also obvious, that in the case of complicated molecules the measured r value corresponds to the distance between the centers of charge distribution $w1$, $w2$, which, in general, can be shifted from the positions of heteroatoms (such as a quaternary nitrogen) due to the mentioned above asymmetry of the charge distribution. The necessity of accounting of such a shift has not been paid proper attention up to now. Its effect, however, can be noticeable. For example, an interesting fact was encountered in our recent mass spectrometric measurements by the above technique [10] of coulomb repulsion of two species - decamethoxinum itself and its doubly charged fragment

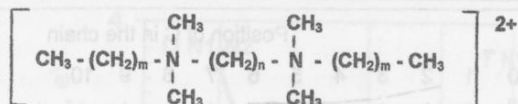


which differs from the intact dication by the lack of two side menthyl rings (⊕ symbol denotes delocalization of a unit charge). In the assumption that the overwhelming part of the charge is concentrated in the first coordination sphere and geometrically centered on quaternary nitrogens, no difference in U values for the two similar structures must be observed. In practice, however, the measured coulomb energy for the above fragment appeared to be by about 0.2 eV larger than that for the whole decamethoxinum dication.

Calculations of U value by using in Eq. 1 the actual charge values and the intercharge distances determined in the present AM1 studies for the most extended conformation of the both dication, all atoms of the molecules being taken into account, showed that $U = 1.07$ eV for decamethoxinum is indeed smaller than $U = 1.12$ eV for the fragment, and there is a good qualitative agreement between the experimentally and theoretically determined values. Thus, while the distance between the quaternary nitrogens in the two dication is the same ($r_{N-N} = 1.39$ nm), the calculated distances between the centers of charge distributions differ, being 1.34 nm and 1.28 nm in decamethoxinum and its fragment, respectively. This means that the smaller intercharge distance in the fragment is due to different charge distribution, but not due to its presumable bent conformation. The value of coulomb energy in decamethoxinum is lower as compared to that in its smaller fragment because about 6% of each «excess» charge is shifted to more distant from the center menthyl radicals.

The above described effect points to the necessity of accounting the influence of type and size of substituents at quaternary nitrogens on position of the center of charge distribution in the bisquaternary ions. To establish some general rules of such an influence, the of charge distribution and coulomb energy were calculated for a number of model dication of the following type

Quantum chemical study of decamethoxinum and related dications



In the above structures the dependence of charge distribution on n and m values, that is the size of the central R_{centr} and side R_{side} radicals, marked in the next scheme, was analysed:



The main results are as follows. Firstly, the variations in n and m values show, that roughly $25 \pm 5\%$ of a unit charge is distributed over each of the four substituents (see Fig. 2 as example), that is the deviation from one fourth share per radical varies within no more than $\pm 5\%$ in the dependence of the size of the radicals.

Secondly, the dependence of charge distribution in the central substituent R_{centr} on its length, that is the number of methylene groups n in the polymethylene chain $(\text{CH}_2)_n$, was analyzed for a set of dications $[(\text{CH}_3)_3 - \text{N} - (\text{CH}_2)_n - \text{N} - (\text{CH}_3)_3]^{2+}$ with $R_{\text{side}} = \text{const} = \text{CH}_3$. In Fig. 3 schematic representation of charge distribution on carbons and hydrogens in a set of central chains with even n values is shown (the structures with odd n values gave qualitatively similar results). For comparison the data for a neutral extended polymethylene chain are presented in the same plots. Calculations for hydrocarbons $(\text{CH}_3)_3 - (\text{CH}_2)_n - (\text{CH}_3)_3$ with n up to 12 show that a $-(\text{CH}_2)_n$ - chain has equal charges on all carbons (-0.158) and hydrogens ($0.079 \times 2H$), which compensate each other. It can be seen that in the case of dications the highest charges are located on the hydrogens of the first three methylene groups next to nitrogen (Fig. 3b). The shorter the chain, the relatively higher charges are on the hydrogens. The tendency for a decrease of the partial charge per hydrogen from a terminus to the center of the chain is nonlinear. For longer chains the charges on the hydrogens of the central links decrease noticeably, but they do not reach the value characteristic of pure polymethylene even for a chain as long as of 16 groups. In contrast to hydrogens, the charges on carbons (Fig. 3 a), showing peculiarities for the atoms in α and β positions in relation to nitrogen, reach neat hydrocarbon values for chains with $n > 4$.

Thirdly, several sets of dications $[(\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_m - \text{N} - (\text{CH}_3)_2 - R_{\text{centr}} - (\text{CH}_3)_2 - \text{N} - (\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3]^{2+}$ with constant length of the central chain and varying length of the side radicals ($m = 0, 1, 2, 3$) were considered. Again, the hydrogens of the closest to nitrogen methylene groups have the largest charge. In contrast to the central chain, the positive charges on CH_2 groups in the side chain decrease down to the values characteristic of pure hydrocarbons at $m = 8$.

From the above data it follows that the influence of the excess charge, that is the deviations from the charge distribution characteristic of a similar neutral polymethylene chain, extends for a distance as large as 0.5-0.6 nm (which corresponds to 2-3 methylene groups) from the position of quaternary nitrogen in the directions both of the central and side substituents.

One more interesting peculiarity was observed: a variation in the length of the side radicals does not affect the distribution of charges in the inter-nitrogen central chain, which remains the same as in Fig. 3 for corresponding n . Two methyl groups and nitrogen lose only several percent of charge with increase of the length of the fourth alkyl radical. The most substantial loss in favour of other links of the R_{side} radical bares hydrogens of the methylene group next to nitrogen in the fourth side radical. The shift of some share of the charge along the side chain away from nitrogen decreases the total charge in the first coordination sphere of the nitrogen, which must reduce the coulomb repulsion energy and enhance the stability of the dication.

In Fig. 4 comparison of the coulomb repulsion energy and the intercharge distances calculated in two different assumptions for a set of dications with $R_{\text{side}} = \text{const}$ and R_{centr} variable is presented. In the first case an approximation, traditionally believed to be sufficient, was applied: two unit charges were considered to be centered on the sites of two quaternary nitrogens. In the second case the distribution of charges on all atoms of the molecule was accounted in Eq. 1 and the intercharge distances were calculated using Eq. 2. Noticeable deviations of two sets of data which change their sign in the dependence on n was observed. In comparison with the simplified point-charge model, the account of real charge distribution shows that the dications with smaller central chains appear to be more stable due to the shift of the center of charge distribution to the side radicals, while in the dications with larger R_{centr} the center of distribution is shifted to the inter-nitrogen substituent, which cause some destabilization. The «switching» point where the center of charge distribution coincides with the position of nitrogen, was observed at $n = 6$. As to quantitative values, the most significant difference by about 0.85 eV between the U values calculated in the two assumptions was revealed for $n = 2$ (Fig. 5). The same data demonstrated that an error in estimation of intercharge distances due to the use of too rough approximations may reach 10-15%.

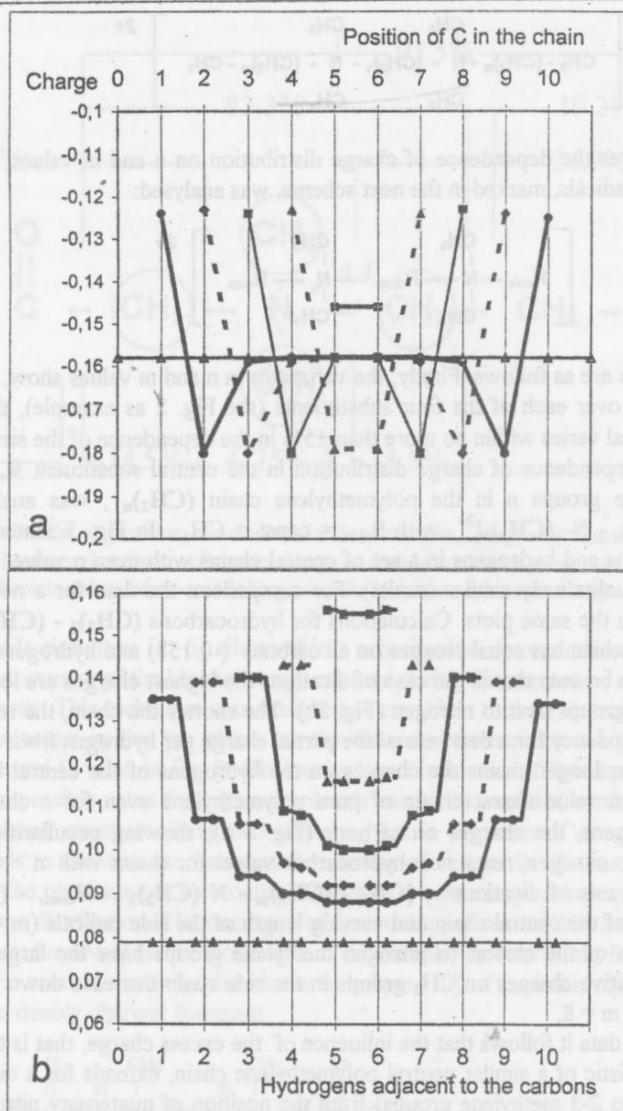


Fig. 3. Schematic representation of the distributions of the charges on atoms of carbon (a) and hydrogen (b) in the dependence of the number of atoms n in the central polymethylene chain $-(CH_2)_n-$ of dications $[(CH_3)_3-N-(CH_2)_n-N-(CH_3)_3]^{2+}$ ($n = 2, 4, 6, 8, 10, 12$). Straight base lines represent the equal charges on C and H atoms in the «infinite» linear polymethylene chain.

Although the alkyl part of the side chain of decamethoxinum is presented not by a linear chain, but by a cyclic menthyl ring, the effect of this type of substituent is similar to that of the chain of the same number of carbons. As it was shown above, the side menthyl radicals which «pump» some share of charge from the first coordination sphere increase the stability of the decamethoxinum dication by $\sim 5\%$ as compared with its analog with only one CH_2 group in the side radicals.

It should be marked that some of the above model dications are miorelaxants, that is they have the mechanism of action different from that of decamethoxinum. In contrast to these compounds a chain of heteroatoms COO is included to the side chains of decamethoxinum and related drugs, such as ethonium. This atomic group, obviously, has its effects on intermolecular interactions and metabolism of the antimicrobial drugs.

The previous discussion concerned the charge distribution in the most extended conformation of the dications, which appeared to be the most favourable in the gas phase. To analyse possible reasons of this favourability, several conformers of decamethoxinum were calculated using fixing of at least one «kink» in the polymethylene chain. The change of conformation did not affect the general pattern of charge distribution determined above for the linear dication, except of some changes in charges on hydrogens at the carbons directly participating in the «kink». The coulomb energy calculated for the structure with one kink in the middle of the central chain appeared to be 1.18 eV, which is greater as compared to the extended conformation due to shortening of distances between all charged atoms. The distance $r_{w1-w2} = 1.22$ nm calculated with account of all atoms was close to $r_{N-N} = 1.24$ nm for this conformation.

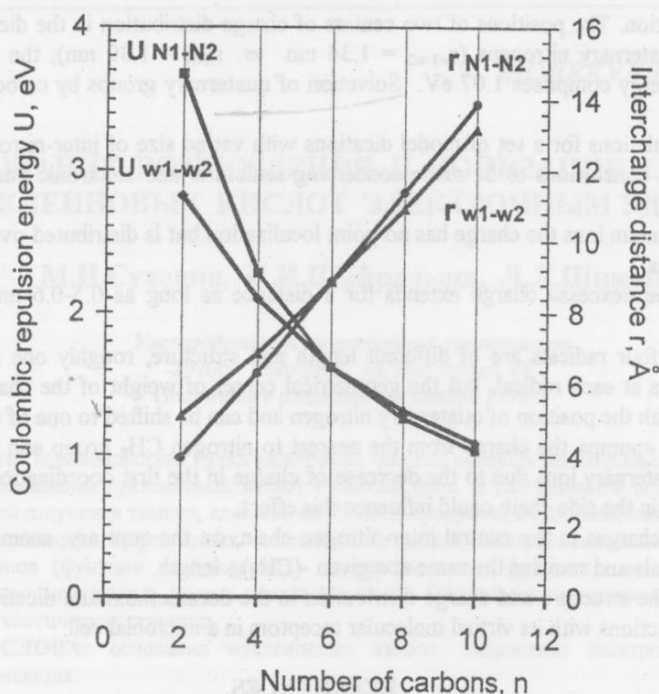


Fig. 4. The coulomb energy and the interchange distances for a set of dications in the extended conformation with $R_{\text{side}} = \text{const} = \text{CH}_3$ and the number of $-(\text{CH}_2)-$ groups in R_{centr} varied from 2 to 10, calculated in two assumptions: 1) point unit charges are centered on quaternary nitrogens ($r_{\text{N1-N2}}$, $U_{\text{N1-N2}}$); 2) charge distribution over all atoms of the dication is accounted ($r_{\text{w1-w2}}$, $U_{\text{w1-w2}}$).

From the above at least three reasons for stabilization of extended conformation of the central polymethylene chain of decamethoxinum follow. Firstly, any bend of the chain provokes repulsion between partially positive hydrogens; secondly, kinks distort the symmetry of charge distribution in the chain (that is deviations from the symmetrical plots in Fig. 2); thirdly, the coulomb repulsion increases upon shortening of the distance between the centers of charge distribution. It should be noted that all the considerations presented are valid for the isolated molecules (ions) in the gas phase, and the interactions with the solvent may have relevant effects on this type of amphylic compounds. However, some biologically important processes such as interaction of the surfactants with cell membranes, proceed in a deficit of water molecules, in which case the data on molecular parameters in the absence of the polar solvent may be appropriate.

It has been earlier determined that the spectrum of antimicrobial action of bisquaternary cationic surfactants depends on size of side substituents R_{side} and inter-nitrogen distance $r_{\text{N-N}}$ which is connected with the size and conformational mobility of R_{centr} [11, 12]. The data reported here show that the differences in charge distribution and charge density over the dication may be responsible for the binding of a particular drug to a specific receptor. It is established that two unit charges have no point localization but are smeared over the organic ion. The first coordination sphere of each quaternary nitrogen has a mean radius of 0.214 nm, and only 83% of a unit charge is distributed over its surface. This may suggest that not a point negative charge, but an extended zone of negative electrostatic potential is necessary for a more firm coordination of the quaternary group with the surface of its virtual receptor; spatial distribution of charge and a particular the value of charge density may provide specific recognition of a definite receptor [13]. The energy of interaction of the species with delocalized charges with other molecules must be smaller in comparison with the ions with localized «point» charges as well. Delocalization of charge increases the area of the positively charged surface of the dication, in particular, on account of the hydrocarbon substituents, which decreases their lipofility as compared with the pure hydrocarbon species of the same size.

CONCLUSIONS

The structural and electronic parameters of the dication of antimicrobial drug decamethoxinum were determined by the AM1 quantum chemical method. It was shown that the most favourable conformation of the decamethoxinum dication in the isolated state is extended (which was confirmed by mass spectrometric data [10]). Two positive charges of the ion are distributed over the hydrogens of alkyl substituents at quaternary nitrogens, which reduces the intramolecular coulombic repulsion in comparison with the virtual point-charge species and

thus stabilize the dication. The positions of two centers of charge distribution in the dication, however, are close to the location of quaternary nitrogens ($r_{w1-w2} = 1.34$ nm vs $r_{N-N} = 1.39$ nm); the calculated intramolecular coulomb repulsion energy comprises 1.07 eV. Solvation of quaternary groups by carboxyl oxygens stabilize the structure as well.

Theoretical calculations for a set of model dications with varied size of inter-nitrogen and side substituents allowed some general conclusions to be made concerning structural and electronic parameters of bisquaternary compounds:

- in quaternary ammonium ions the charge has no point localization but is distributed over the substituent radicals at quaternary nitrogens;
- the influence of the «excess» charge extends for a distance as long as 0.5-0.6 nm from the position of a quaternary nitrogen;
- in the case where four radicals are of different length and structure, roughly one fourth ($\pm 5\%$) of the one electron charge occurs at each radical, but the geometrical center of weight of the charge distribution does not obligatory coincide with the position of quaternary nitrogen and can be shifted to one of the substituents;
- larger side radicals «pump» the charge from the nearest to nitrogen CH_2 group and thus reduce the coulomb repulsion in the bisquaternary ions due to the decrease of charge in the first coordination sphere; the presence of heteroatoms (groups) in the side chain could influence this effect;
- the distribution of charges in the central inter-nitrogen chain, on the contrary, seems to be insensitive to the changes in other radicals and remains the same at a given $-(CH_2)_n$ - length.

Information on the structure and charge distribution in the decamethoxinum dication can be used in further evaluation of its interactions with its virtual molecular receptors in a microbial cell.

REFERENCES

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М. Медицина. 1978. Ч. II. С. 311.
2. Волянский Ю.Л. Противомикробная активность новых азот- и фосфорсодержащих органических соединений, фенолов и ферроценов: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. - Москва, 1981.
3. Виевский А.Н. Механизмы биологического влияния катионных поверхностно-активных веществ. Москва. Б.И. 1990. 249 с.
4. Cooks R.G., Beynon J.H., Caprioli R.M., Lester R.G. Metastable Ions. Elsevier. Amsterdam, 1973.
5. Szilagyi Z., Vekey K. // Eur. Mass Spectrom. 1995. V.1. P.507-518.
6. Dewar M.J.S., Zebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. // J.Amer.Chem.Soc. 1985. V. 107. P.3902-3909.
7. Hull S.E., Karlsson R., Main P., Woolfson M.M. Dodson E.J. // Nature. 1978. V.275. P.206-207.
8. Gross D.S., Williams E.R. // J Am. Chem. Soc. 1995. V.117. P.883-890
9. Szilagyi Z., Drahos L., Vekey K. // J. Mass Spectrom. 1997. V.32. P.689-696.
10. Pashinskaya V.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Czira G., Szilagyu Z., Vekey K. Abstr. of the 15th Inform. Meeting on Mass Spectrom., 4-6 May 1998, Budapest, Hungary, P. 86.
11. Денисенко В.П., Рудь В.П. В сб.: Физиологическая роль поверхностно-активных веществ. Черновцы. 1975. С. 40-41.
12. Гудзь О.В., Овчинников В.Г., Писько Г.Т., Смирнова Н.А., Тарасенко В.С. // Микробиол. журн. 1987. 49. С. 82-85.
13. Zakrzewska K., Lavery R., Pullman B. // Nucl. Acid Res. 1983. V.11. P. 8825-8839.

КВАНТОВОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДІКАТІОНУ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ПОДІБНИХ ДІКАТІОНІВ

М.В.Косевич, В.А.Пашинська, С.Г.Степанян, В.С.Шелковський, В.В.Орлов, Ю.П.Благой

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І.Веркіна НАН України,

Харків, 310164, пр. Леніна, 47, e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua

Структурні та електронні параметри дікатіону протимікробного препарату декаметоксину та ряду модельних амонієвих дікатіонів з різним розміром алкільних радикалів при четвертинному азоті були встановлені за допомогою квантово-хімічного методу AM1. Показано, що найбільш вигідна конформація дікатіону декаметоксину у відсутності розчинника-води є витягнутою, а заступники розташовані у транс-положенні відносно центрального ланцюга, та має місце сольватація амонієвих груп карбоксильними ксидами. Положення двох центрів розподілу заряду у декаметоксині близькі до центрів четвертинних азотів, у той час як аналіз серії модельних дікатіонів дозволив виявити сильну залежність позицій таких центрів від типу та розміру алкільних заступників. Обговорюються можливі кореляції молекулярних параметрів та біологічної активності амонієвих солей.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бісчвертинні амонієві сполуки, протимікробні агенти, декаметоксин, квантово-хімічні розрахунки

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ И ИОНИЗАЦИИ ОСНОВАНИЙ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭЛЕКТРОННЫМ УДАРОМ

М.И.Суховия, И.И.Шафраньш, Л.Л.Шимон

Ужгородский государственный университет

294000 Ужгород, ул. Подгорная, 46

Поступила в редакцию 30 ноября 1998 г.

Изучены неупругие взаимодействия пучка электронов, энергия которых регулировалась в пределах от 0 до 300 эВ, с основаниями нуклеиновых кислот в газовой фазе. В спектральной области 200 - 600 нм получены спектры излучения тимина, аденина, цитозина и продуктов их диссоциативного возбуждения. Исследованы зависимости эффективных сечений возбуждения спектральных полос в максимуме от энергии электронов (функции возбуждения). Измерены также функции ионизации оснований. Полученные экспериментальные данные используются для моделирования условий внутриклеточного бета-облучения генетических структур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: основания нуклеиновых кислот, медленные электроны, возбуждение, ионизация, диссоциация.

Изучение механизмов взаимодействия низкоэнергетических электронов с молекулами является важным не только для физики, но и для биофизики и радиобиологии, особенно, если иметь в виду такие объекты, как нуклеиновые кислоты и их компоненты. Процессы возбуждения, ионизации и диссоциации биомолекул под влиянием вторичных электронов лежат в основе радиационной деградации клеточных структур. Формирование триплетных метастабильных состояний молекул и проблема абиогенного синтеза нуклеотидов также связаны с такими неупругими взаимодействиями [1]. Однако процессы возбуждения и ионизации биомолекул электронным ударом практически мало изучены вследствие экспериментальных трудностей. Исследования взаимодействия медленных (0-100 эВ) электронов с молекулами цитозина и аденина выполнены нами ранее [2,3]. В данном сообщении приводятся результаты для молекул тимина. Экспериментальные данные, полученные для различных оснований, используются для физического моделирования условий внутриклеточного бета-облучения генетических структур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались препараты азотистых оснований нуклеиновых кислот фирм "Calbiochem" и "Reanal".

Исследования проводились на специально сконструированной экспериментальной установке, основными блоками которой являются источники молекулярного и электронного пучков, камера столкновений, вакуумная система, системы детектирования ионов и фотонов. Методика и техника экспериментов описаны в наших предыдущих публикациях [2,3]. Источником электронного пучка служила пятиэлектродная электронная пушка с оксидным катодом. Энергия электронного пучка регулировалась в пределах от 0 до 300 эВ. Плотность тока пучка 4 мА/см² при энергетической неоднородности 0,7 эВ. Эксперименты проводились при вакууме в камере столкновений 10⁻⁷ Тор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов были получены спектры излучения тимина и продуктов его диссоциативного возбуждения в области 200-600 нм для различных энергий электронного пучка. Также изучены зависимости эффективных сечений возбуждения десяти спектральных полос в максимуме от энергии электронов - "функции возбуждения". Спектральные характеристики тимина и его фрагментов, а именно - длины волн λ_{max} , соответствующие максимумам спектральных полос, и относительные интенсивности полос I для энергии электронов 100 эВ, приведены в таблице 1. Там же указаны аналогичные данные для изученных нами ранее оснований цитозина и аденина.

Таблица 1. Характеристики спектров излучения молекул нуклеотидных оснований, возбуждаемых электронами энергией 100 эВ

ТИМИН		ЦИТОЗИН		АДЕНИН	
$\lambda_{\max}$, нм	I, отн. ед.	$\lambda_{\max}$, нм	I, отн. ед.	$\lambda_{\max}$, нм	I, отн. ед.
286,5	1,00	290,6	1,00	308,1	1,00
333,2	0,52	316,8	0,38	327,0	0,74
369,6	0,88	328,3	0,69	338,2	0,28
408,1	0,59	340,5	0,67	354,5	0,52
432,0	0,48	356,7	0,42	388,0	0,43
482,2	0,72	381,2	0,85	435,3	0,24
525,0	0,40	429,3	0,35		

Сопоставление оптических и масс-спектров пиримидиновых оснований [2], а также анализ пороговых значений энергии и формы соответствующих функций возбуждения дают возможность определить природу молекулярных фрагментов. Наиболее вероятно образование следующих фрагментов: $C_4H_4N_2$, $C_4H_2N_2$, C_2N_2 , H_2CN_2 , HC_3N , NCO , $HNCN$, NCN , CNC , OH . Как правило, в наших экспериментах функции возбуждения спектральных полос характеризуются подъемом вблизи пороговых значений энергии и имеют один или два максимума. В частности, функция возбуждения тимина для полосы с максимумом 487 нм имеет порог около 4 эВ и достигает экстремальных значений при 16 и 87 эВ. Не исключено, что ее поведение отражает суперпозицию нескольких процессов, в том числе и возбуждение оптически запрещенных интеркомбинационных переходов. Функция ионизации молекул тимина имеет максимум при 60 эВ. Пороговое значение этой функции 9,5 эВ соответствует первому потенциалу ионизации молекулы.

Анализ физической стадии взаимодействия медленных электронов с биомолекулами позволяет оценить вклад первичных физических процессов в радиационную деградацию живой клетки. Таким образом можно построить физическую модель, характеризующую последствия бета-облучения нуклеиновых кислот. При этом медленные электроны могут быть вторичными как при внешнем облучении различными видами радиации, так и при внутриклеточном воздействии.

В общем случае, взаимодействие электронов с мишенью количественно описывается следующим соотношением [4]:

$$\Delta Z = N_m \cdot P_e \cdot Q_p \cdot L,$$

где ΔZ - количество актов взаимодействия, вызывающих реакцию, N_m - концентрация мишеней, P_e - поток электронов, Q_p - эффективное сечение реакции, L - путь электронов в среде мишени (ширина молекулярного пучка).

Для наших экспериментальных условий: $P_e = 2 \cdot 10^{16} \text{ с}^{-1}$; $N_e = 5 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-3}$; $Q_p = 1,5 \cdot 10^{-15} \text{ см}^2$; $L = 7 \cdot 10^{-1} \text{ см}$; $\Delta Z = 7 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$. Отметим, что из сравнения P_e и ΔZ следует, что только одна из 10^5 частиц вступит во взаимодействие с мишенью.

Для расчета дозы, образованной в ядре живой клетки потоком электронов, можно использовать следующий подход. Допустим, что клетка имеет форму шара, в центре которого находится ядро также сферической формы. Источники потоков медленных электронов в клетке (β - потоков) представим точечными излучателями: $Q_1, Q_2, \dots, Q_b, \dots, Q_n$.

Доза D_{oi} в точке Q_i [5]:

$$D_{oi} = N \int_V D_p dV,$$

где N - относительное количество частиц, провзаимодействующих с молекулами клетки; D_p - доза, создаваемая одним излучателем; V - объем клетки.

Средняя доза, поглощенная всей клеткой:

$$D = 1/V \int_0^a D_{oi} 4\pi b^2 db,$$

где a - радиус клетки, b - расстояние от точечного источника до ядра клетки.

Таким путем можно оценить общее количество поглощенной энергии на клетку, ядро, молекулу, то есть поглощенную дозу, не раскрывая, на какие конкретно физические, физико-химические процессы используется данная энергия. Наша модель позволяет более корректно решить этот вопрос, поскольку она дает возможность экспериментально измерить вероятности различных физических процессов. В

частности, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что абсолютные сечения ионизации и возбуждения тимина электронным ударом составляют соответственно $1,5 \cdot 10^{-15} \text{ см}^2$ (при энергии электронов 60 эВ) и $3 \cdot 10^{-15} \text{ см}^2$ (при энергии электронов 20 эВ). При низких энергиях вероятности возбуждения триплетных и синглетных состояний близки. Кроме того, необходимо учитывать одновременное прохождение нескольких процессов. Например, диссоциативное возбуждение и диссоциативную ионизацию, возбуждение образовавшихся ионов и фрагментов. Результаты спектральных и масс-спектрометрических исследований взаимодействия оснований с медленными электронами свидетельствуют о достаточно высоких вероятностях этих процессов. Измерение их абсолютных сечений чрезвычайно трудная задача, однако одним из реальных экспериментальных подходов ее решения может быть прецизионный учет припороговых эффектов, например, при измерениях функций возбуждения и ионизации.

ВЫВОДЫ

При взаимодействии медленных электронов с нуклеотидными основаниями в газовой фазе эффективно проходят процессы возбуждения и ионизации молекул как целого, а также диссоциативное возбуждение и диссоциативная ионизация оснований. При моделировании условий внутриклеточных радиационных эффектов, вызванных вторичными (медленными) электронами, необходимо оценивать не только общую поглощенную энергию (дозу), а и вероятности протекания каждого из этих физических процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fielden E.M., Lillicrap S.C. // Curr.Top. Radiat. Res. 1974. V.7. P. 138-180.
2. Суховия М.И., Славик В.Н., Шафраньш И.И., Шимон Л.Л. // Биополимеры и клетка. 1991. Т.7, №6. С.77-82.
3. Суховия М.И., Вошечинец Е.И., Шафраньш И.И., Шимон Л.Л. // Биополимеры и клетка. 1996. Т.12, №3. С.97-100.
4. Месси Г., Бархон Е. Электронные и ионные столкновения. М. Наука, 1959. 604 с.
5. Robertson J.S., Bond V.P. // Internat. J. Appl. Radiat. Isotop. 1959. V.7, №1. P.35-37.

УДК 577.3

Влияние формирования гидратной оболочки на тепловые свойства глобулярных белков.

Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Грунина Н.А.

Научно-исследовательский институт физики Санкт-Петербургского государственного университета,

Санкт-Петербург, 198904

Поступила в редакцию 25 ноября 1998 года

Методом ДСК определены абсолютные значения теплоемкости системы глобулярный белок-вода в широком интервале температур и концентраций как для нативного, так и для денатурированного состояний, так называемых, малых глобулярных белков: миоглобина, лизоцима и рибонуклеазы. Получено, что для всех изученных белков на термограммах нагревания денатурированных образцов, содержащих лишь связанную воду, наблюдается скачок теплоемкости, обусловленный, очевидно, процессом стеклования белка. Вычислены значения теплоемкости собственно белка в нативном и денатурированном состояниях при изменении концентрации воды от 0 до 90 %, т.е. от сухого образца до белка с полностью сформированной гидратной оболочкой. Обнаружено, что для всех глобулярных белков кривые, характеризующие зависимость суммарной теплоемкости, а также теплоемкости собственно белка от содержания воды однотипны и имеют S-образный вид, что, повидимому, является отражением процесса расстекловывания белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сканирующая калориметрия, глобулярные белки, теплоемкость, стеклование, гидратация, влажность.

Проблема гидратации белков, несмотря на уже имеющийся большой экспериментальный материал, продолжает оставаться актуальной до настоящего времени [1-5]. Недавно, нами был выполнен цикл исследований по определению теплоемкости системы фибриллярный белок коллаген – вода в широком интервале концентраций и большом диапазоне температур [6,7]. В результате было высказано мнение, что рассмотрение теплоемкости системы белок-вода при вариации содержания компонентов в широком интервале концентраций невозможно без учета того факта, что белки при обезвоживании способны, как и синтетические полимеры, переходить в стеклообразное состояние.

Целью настоящей работы является аналогичное исследование тепловых свойств водных систем малых глобулярных белков во всем возможном диапазоне изменения концентраций компонентов – от концентрированного раствора до белка, имеющего лишь связанную воду, а также изучение изменений теплоемкости собственно белка в процессе формирования его гидратной оболочки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование тепловых свойств систем белок-вода выполнено на дифференциальном сканирующем калориметре ДСК-111 фирмы Сетарам в интервале температур $-30 \div 150^\circ\text{C}$. Детали эксперимента подробно описаны в статье [8], посвященной изучению фазовых переходов в нативном и денатурированном миоглобине. В настоящей работе основное внимание уделено изучению изменения молекулярной подвижности исследуемой системы белок-вода вне областей фазовых переходов на основе анализа абсолютных значений теплоемкости. Ошибка в определении абсолютных значений теплоемкости не превышала 1% при уменьшении концентрации белка вплоть до 10%. В качестве объектов исследования использовались: миоглобин (*Mb*), лизоцим (*Lys*) и рибонуклеаза (*RNC*-аза). Скорость нагрева $5^\circ\text{C}/\text{мин}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

На рис. 1 приведены температурные зависимости абсолютных значений теплоемкости (C_p) системы *Mb*-вода при первом и втором нагреваниях в широком интервале концентраций. Отметим, что денатурация, образование и плавление упорядоченных структур, возникающих в денатурированном *Mb*, были подробно рассмотрены нами в работе [8]. В связи с этим у представленных на рис. 1 кривых не приведена высокотемпературная часть. Кроме того, для настоящей работы, посвященной, в основном, абсолютным значениям теплоемкости исследуемой системы в интервале температур $20-90^\circ\text{C}$, существенно, что кривые, относящиеся ко второму нагреванию образца, отражают температурную

зависимость теплоемкости денатурированного *Mb* во всех случаях [8]. При этом последний находится либо в полностью разупорядоченном состоянии, либо в нем присутствуют гель-структуры.

Рис. 2 демонстрирует, каким образом при фиксированной температуре изменяется суммарная удельная теплоемкость системы *Mb*-вода в нативном и денатурированном состояниях (кривые 1-3) при переходе от полностью обезвоженных образцов к образцам со значительным (90%) содержанием воды. Из рис. 2 видно, что все построенные кривые, как для нативного, так и для денатурированного состояния белка однотипны и состоят из двух участков: нелинейного *S*-образного и практически линейного, соответствующего концентрациям воды более 50%. Таким образом, из приведенных данных следует, что теплоемкость системы *Mb*-вода ни в нативном, ни в денатурированном состояниях не может быть рассмотрена по простой аддитивной схеме в широком интервале концентраций в предположении, что теплоемкости *Mb* и воды остаются постоянными. Наши данные наглядно демонстрируют, что такой подход к вычислению теплоемкости белка некорректен в области концентраций, где происходит формирование гидратной оболочки. На наш взгляд, его применение правомерно только в ограниченной области концентраций: либо для полностью обезвоженных белков, либо для разбавленных растворов, как это и было сделано, например, в работе [9].

Теплоемкость собственно *Mb* (рис. 2, кривые 1'-3') вычислена в предположении, что теплоемкость всей воды, как свободной, так и, в первом приближении, связанной в интервале температур 20-90°C остается постоянной и равной 4,18 Дж/г·град.

Установленный *S*-образный характер всех приведенных кривых обусловлен, по-видимому, постепенным переходом влажных белков в стеклообразное состояние. Наличие инкремента теплоемкости (рис. 1,3) и приведенные на рис. 4 зависимости его температуры от присутствия пластификатора, роль которого в данном случае играет вода, являются калориметрическим проявлением процесса стеклования и наглядно подтверждают нашу точку зрения. Следует подчеркнуть, что резкий скачок теплоемкости при расстекловывании может быть обнаружен лишь в случае строго контролируемых режимов нагревания и предварительного охлаждения. В противном случае во всем интервале стеклования будет наблюдаться лишь постепенное увеличение теплоемкости.

Выполненные нами исследования для *Lys* и *RNC*-азы при изменении их водного окружения (рис. 3,4) показали, что рассмотренные выше тепловые свойства системы *Mb*-вода носят достаточно общий характер. Следует, однако, отметить, что наблюдаемая величина скачка теплоемкости в *Mb* существенно меньше, чем в *Lys*, *RNC*-азе, а также в коллагене [6,7]. Кроме того, сам рассматриваемый переход в *Mb* происходит в гораздо более широкой области температур, чем при соответствующих значениях влажности в случае других белков. Указанные отличия в поведении скачка теплоемкости в *Mb*, значительно маскирующие проявление процесса стеклования, обусловлены, на наш взгляд, тем, что в данном случае стеклующейся системой является денатурированный белок, содержащий ненативные упорядоченные структуры [8], в отличие от других исследованных нами денатурированных белков, не образующих таких структур при аналогичных условиях проведения калориметрического эксперимента [12,13]. Интересно отметить, что в случае некоторых синтетических полимеров (а денатурированный белок мы рассматриваем как полимер) присутствие даже небольшого процента кристаллической фазы, т.е. аналогично упорядоченной структуре в денатурированном белке, может привести к размыванию скачка стеклования, ярко проявляющегося в полностью аморфном полимере [10].

Далее, полученные данные позволяют проследить, как происходит переход дегидратированного белка в раствор при увлажнении, а также какие состояния при этом проходит белок. Как нативный, так и денатурированный *Mb*, например, при комнатной температуре при содержании воды от 0 до 10% находится в состоянии стекла, и его теплоемкость при этом не зависит от влажности и равна 1,30 Дж/г·град. Эта величина находится в хорошем согласии с имеющимися литературными данными для обезвоженного состояния белков вне зависимости от их первичной структуры [2-5,9]. Обнаруженный факт, свидетельствующий о нечувствительности теплоемкости *Mb* к присутствию первых 10% воды, является довольно неожиданным, поскольку свидетельствует о том, что начало формирования гидратной оболочки не приводит к изменению тепловых свойств белка. Установлено, что при дальнейшем увлажнении до 20% теплоемкость начинает расти и белок при комнатной температуре оказывается в интервале стеклования. Такое состояние является самым неравновесным из всех возможных для стекла и, как показали наши исследования, теплоемкость белка при этом зависит не только от тепловой предыстории и способа задания влажности тестируемого образца, не только от величины скорости нагревания при определении теплоемкости, но и от времени нахождения при этой температуре, в данном случае комнатной. При этом состояние белка продолжает оставаться неравновесным и при появлении в исследуемой системе первых процентов свободной воды.

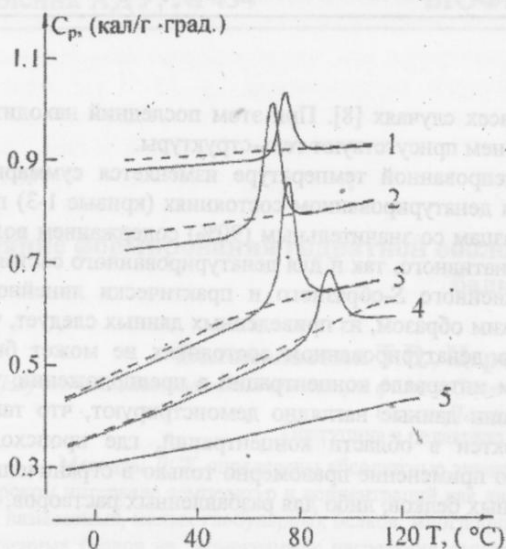


Рис.1

Рис. 1. Температурные зависимости абсолютных значений теплоемкости системы Mb-вода при концентрациях воды 80% (1); 50% (2); 21% (3); 11% (4) и 0% (5). Сплошная линия – первое нагревание. Пунктирная линия – второе нагревание. Скорость нагревания 5°C/мин.

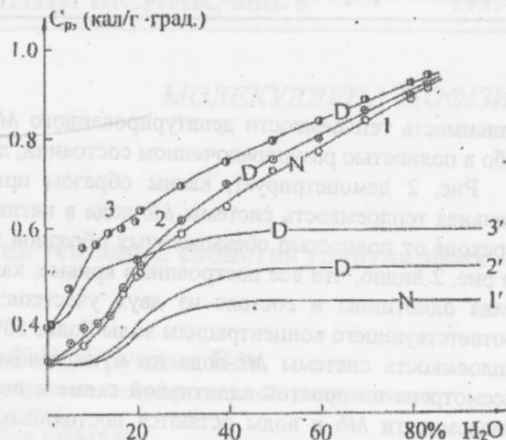


Рис.2

Рис. 2. Зависимость суммарной теплоемкости системы Mb-вода (1-3) и теплоемкости собственно белка (1'-3') для нативного и денатурированного состояний при различных температурах. 1, 2 – 20°C; 3 – 90°C.

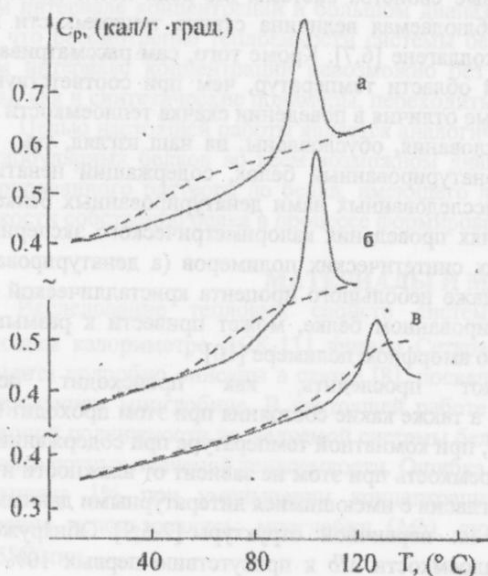


Рис.3

Рис. 3. Температурные зависимости абсолютных значений теплоемкости влажных глобулярных белков: RNC-азы (а), Lys(б), Mb(в). Сплошная линия – первое нагревание. Пунктирная линия – второе нагревание. Скорость нагревания 5°C/мин.

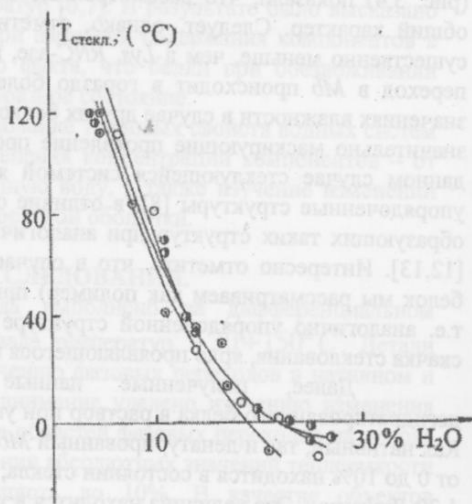


Рис.4

Рис. 4. Зависимость температуры стеклования денатурированных глобулярных белков от влажности. О—RNC-аза, О—Lys, О—Mb.

Когда количества свободной и связанной воды становятся сопоставимыми, теплоемкость белка вновь перестает зависеть от влажности. Показано, что последний результат относится не только к комнатной температуре, но также и ко всем другим в интервале до 90°C. Получено также, что при повышении температуры область интенсивного изменения теплоемкости постепенно смещается в сторону меньших влажностей, в то время как линейный участок лежит при концентрациях воды выше 50%. Отсюда можно сделать вывод, что хотя граница между связанной и свободной водой с повышением температуры смещается в сторону меньших значений влажности, завершение формирования гидратной оболочки, чему соответствует независимость теплоемкости белка от влажности, во всех случаях происходит при концентрациях воды около 50%.

ВЫВОДЫ.

Установленный нами S-образный рост теплоемкости глобулярных белков при увлажнении, как и в коллагене [6,7,11], является отражением процесса расстекловывания при нагревании влажных белков. Наблюдаемый инкремент теплоемкости представляет собой скачок C_p при стекловании. Как следствие, ниже этого скачка денатурированный белок находится в состоянии стекла, выше – в так называемом высокоэластическом состоянии [10]. Основное термодинамическое различие этих состояний, как известно [10], обусловлено проявлением при расстекловывании трансляционной сегментальной подвижности.

Переход от стеклообразного состояния к высокоэластическому при повышении температуры, так же как и переход от стеклообразного состояния к раствору при увлажнении, связан, на наш взгляд, с появлением в белке трансляционной сегментальной подвижности, запрещенной в стеклообразном состоянии [10].

В денатурированном состоянии белка проявление трансляционной подвижности находит свое отражение в виде скачка теплоемкости. Как следствие, теплоемкость денатурированного глобулярного белка в растворе должна превышать теплоемкость сухого белка, находящегося в стеклообразном состоянии, по крайней мере, на величину скачка теплоемкости при расстекловывании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ :

1. Privalov P.L., Gill S.J. // *Advances in Protein Chemistry* 1988, Vol. 39, P. 191-234.
2. Мревлишвили Г.М. Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул, Тбилиси, 1984, С.188.
3. Гасан А.И., Кашпур В.А., Малеев В.Я. // *Биофизика*, 1994, Т. 39, С. 588-593.
4. Рапли Д., Янг П., Толлин Г. Вода в полимерах / Пер. с англ.: под редакцией Г.Е.Зайкова М. 1984. С.114-136.
5. Хёве Ч. Вода в полимерах / Пер. Пер. с англ.: под редакцией Г. Е. Зайкова М., 1984. С. 137-149.
6. Церетели Г.И., Белопольская Т.В., Мельник Т.Н. // *Биофизика*, 1997, Т. 42, С. 68-74.
7. Церетели Г.И., Белопольская Т.В., Мельник Т.Н. // *Биофизика*, 1997, Т. 42, С. 584-590.
8. Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Грунина Н.А. // *Вестник С.-Петербург. ун-та. Сер.4*, 1997, вып.4, С.66-73.
9. Suurkuusk J. // *Acta Chemica Scandinavica*, 1974, Vol. B28, P. 409-417.
10. Годовский Ю.К. Теплофизические методы исследований полимеров. М. 1976, С. 216.
11. Церетели Г.И., Смирнова О.И. // *Биофизика*, 1989, Т. 34, Вып. 5, С. 905-906.
12. Белопольская Т.В., Сочава И.В., Казицина С. Ю. // *Биофизика*, 1990, Т. 35, С. 751-755.
13. Belopolskaya T.V., Sochava I.V. // *Biophys Chem.*, 1992, V. 43, P. 1-8.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 535.37

Теоретическое исследование влияния среды на электронное строение производных кумарина и хинолина.

Т.В.Сахно, И.В.Короткова.

Полтавское отделение Академии наук технологической кибернетики Украины
Украина, 314003, Полтава, ул.Сковороды, 1/3, Sakhno@ugsep.Poltava.ua

Поступила в редакцию 11 сентября 1998г.

В данной работе представлены результаты квантово-химического исследования взаимосвязи спектрально-люминесцентных свойств гетероароматических молекул плоского строения и геометрии хромоформных фрагментов, изменение которой может быть вызвано влиянием температуры, полярности растворителя. Показана возможность применения разработанной модельной системы для теоретического изучения различных сольватационных процессов, определяющих спектрально-люминесцентные характеристики молекул.

Ключевые слова: производные кумарина, хинолина, акридон, ксантон, фенатридон, электронное строение, квантово-химические расчеты, методы AM1, PM3.

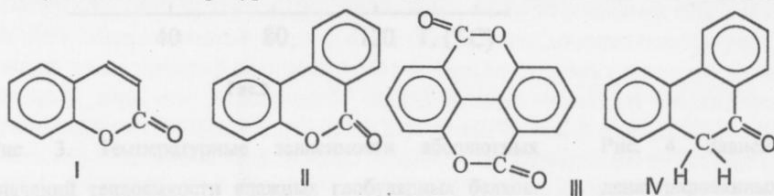
Флуоресцирующие молекулы с гетероатомами азота и кислорода находят широкое применение в медицине в качестве флуоресцентных меток [1]. Для исследования биологических мембран могут быть использованы только те люминесцирующие молекулярные системы, которые обладают стабильными фотофизическими характеристиками и потому, при подборе таких молекул, важное значение имеет изучение влияния внешних факторов (температуры, полярности среды) на интенсивность свечения.

Систематическое исследование электронной структуры, спектрально-люминесцентных свойств органических соединений позволило установить основную закономерность их взаимосвязи, сущность которой заключается в том, что спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства молекул определяются относительным положением и близостью уровней энергии низших электронно-возбужденных состояний различной орбитальной и спиновой природы [2]. Многоатомные молекулы сложных органических соединений можно рассматривать как системы, построенные из взаимодействующих атомных и молекулярных фрагментов, а также определенных функциональных или хромоформных групп, содержащих гетероатомы N, O, S и др. Электронная структура таких фрагментов, а также их геометрия, количество и пространственное расположение также определяют свойства таких систем, в том числе и относительное положение электронно-возбужденных состояний различной орбитальной и спиновой природы [3].

Поэтому, представляет интерес изучение влияния изменения геометрии хромоформных фрагментов, содержащих гетероатомы азота и кислорода, на спектрально-люминесцентные свойства молекул, так как указанные изменения могут быть вызваны воздействием внешних факторов, таких как температура, природа растворителя, агрегатное состояние, что имеет непосредственное практическое значение.

Методы.

Результаты настоящего исследования основаны на расчетах и анализе энергии электронных состояний молекул по методу ЧПДП/С-КВ в полном валентном базисе в приближении однократно возбужденных конфигураций и исследовании взаимосвязи относительного положения уровней энергии

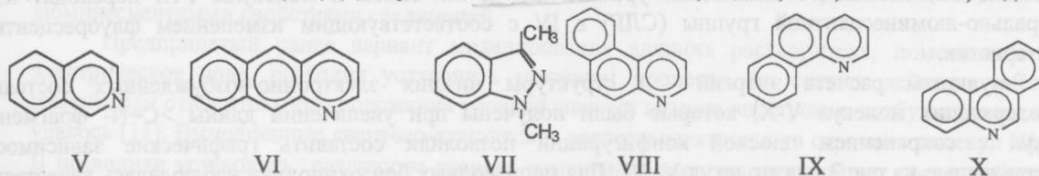


низших электронно-возбужденных состояний сложных многоатомных молекул и плоской деформации $>C=O$ и $>C=N$ -фрагментов. В качестве модельных соединений

использовали производные ряда кумарина, широко применяющиеся благодаря устойчивым фотофизическим характеристикам: кумарин (I), 3,4-бензокумарин (II), 4,9-диоксапирен-5,10-дион (III). Для сравнения выполнен расчет молекулы сходного электронного строения, но без гетероатома в цикле - фенантренона (IV).

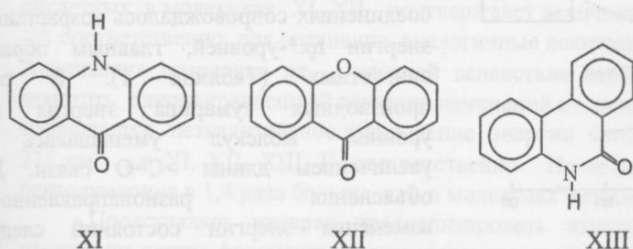
Влияние среды на электронное строение производных кумарина и хинолина

Исследуемый ряд азотсодержащих молекул составили производные хинолина: изохинолин (V), бензохинолин (VI) и его производные (5,6-бензохинолин (VIII), 7,8-бензохинолин (IX), 3,4-бензохинолин (X)), 1,3-диметилиндазол (VII). Длину $>C=O$ связи изменяли от 1,16 до 1,45 Å, $>C=N$ - от 1,28 до 1,55 Å.



Для исследуемых соединений I, II, III экспериментально установлена зависимость квантового выхода флуоресценции от температуры [4]. Квантовый выход флуоресценции изохинолина изменяется от 0,6 до 0,02 в температурном интервале 120-250K, бензохинолина от 0,9 до 0,4 в интервале 180-300K, 1,3-диметилиндазола - от 0,4 до 0,24 [5,6].

Для проверки общности предлагаемой модельной системы, позволяющей учитывать влияние внешнего окружения на структуру молекулы и прогнозирования возможности возникновения подобных эффектов при изучении аналогичных гетероароматических систем, был составлен ряд соединений,



содержащих одинаковые хромофорные группы, но различным образом расположенные в цикле и, как определено экспериментально, по-разному проявляющие чувствительность к полярности растворителя: акридон (XI)-ксантон (XII), фенантридон (XIII), 3,4-бензокумарин (II) [7]. Расчет электронной

структуры молекулы акридона выполнен в рамках методов AM1 и PM3, входящих в пакет программы Nurg Chem [8]. Обоснованность применения этих методов проверена посредством сопоставления экспериментально определенных величин энергии электронных состояний и рассчитанных данными методами. Поскольку молекула акридона имеет два фрагмента с гетероатомами было выполнено исследование зависимости энергии уровней от длин $>C-N$ и $>C=O$ связей.

Результаты и обсуждение.

В ряде работ показано, что изменение геометрии молекулы (уменьшение длины связей, валентных углов) при сохранении в целом плоской конформации, существенно изменяет положение уровней энергии $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -типа [9,10]. При $n-\pi^*$ электронных переходах молекул карбонильных соединений наибольшие изменения в их строении относятся к карбонильным фрагментам: характерной особенностью

является увеличение межъядерных расстояний $>C=O$ на 0,1-0,2 Å (с 1,2 до 1,3-1,4 Å) для молекул с одной карбонильной группой и на 0,03-0,1 Å для дикарбонильных соединений. Возможно увеличение межъядерного расстояния $C=C$ -связи на 0,1 Å, находящейся в сопряжении с группой $>C=O$ и уменьшение $C=C$ расстояний для центральных атомов углерода на 0,07-0,1 Å [9]. На рисунке 1 представлена графическая зависимость энергии уровней низших электронно-возбужденных состояний 3,4-бензокумарина от длины $>C=O$ связи (для всех остальных соединений

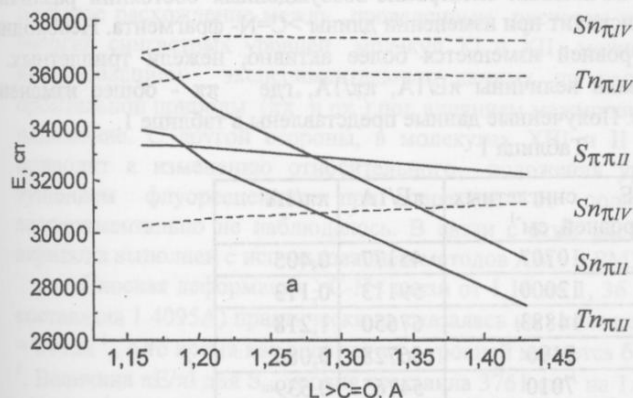


Рис. 1. Зависимость энергии уровней $S_{\pi\pi^*}$, $T_{\pi\pi^*}$, $S_{\pi\pi^*}$ типов от длины $>C=O$ связи (—-соединениеII, ---соединениеIV)

наблюдалась аналогичная зависимость).

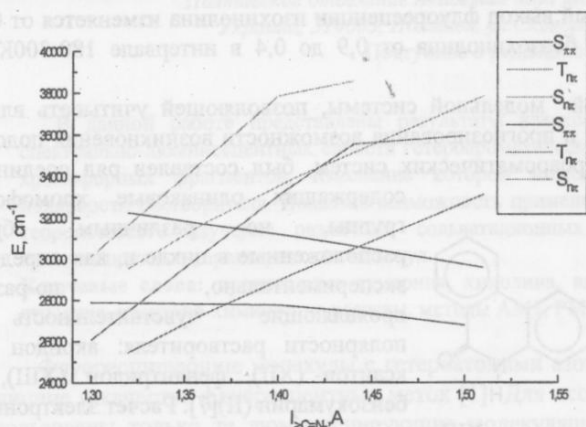
Относительное положение уровней энергии при исходной длине связи 1,16 Å для всех молекул следующее: $T_{\pi\pi^*}$, $S_{\pi\pi^*}$,

$T_{\pi\pi^*}$, $S_{\pi\pi^*}$ (VCLП). С увеличением длины карбонильного фрагмента отмечается значительное изменение энергии $S_{\pi\pi^*}$ и $T_{\pi\pi^*}$ уровней, в то время как энергия $S_{\pi\pi^*}$ -уровней изменяется слабо; наблюдается изменение их относительного положения $T_{\pi\pi^*}$, $T_{\pi\pi^*}$, $S_{\pi\pi^*}$, $S_{\pi\pi^*}$ (IVCLП). Энергия уровней молекулы IV

остается практически неизменной во всем исследуемом диапазоне.

Таким образом, увеличение длины связи с гетероатомом в хромофорном фрагменте приводит к изменению относительного положения уровней $\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$ -типов и молекулы I-III переходят из V спектрально-люминесцентной группы (СЛГ) в IV с соответствующим изменением флуоресцентных характеристик.

Результаты расчета энергий и структуры низших электронно-возбужденных состояний азотсодержащих молекул V-X, которые были получены при увеличении длины $>C=N-$ фрагментов молекул с сохранением плоской конфигурации позволили составить графические зависимости, представленные на рис.2 для молекул V, VI. Для производных бензохинолина наблюдалась качественно



орбиталей (МО). Как показывает анализ, установленные

Рис.2. Зависимость энергии уровней низших электронно-возбужденных состояний соединений V и VI от длины $>C=N-$ связи

длины $>C=N-$ связи происходит последовательное уменьшение коэффициентов d_π на гетероатоме: в изохинолине $\pi d_N(p_x + p_y) = -0,18$; в бензохинолине $\pi d_N(p_x + p_y) = -0,098$; в 1,3-диметилиндазоле $\pi d_N(p_x + p_y) = -0,266$. В ряду производных бензохинолина данные изменения составили: $\pi d_N(p_x + p_y) = -0,121, -0,130, -0,179$ в молекулах VIII, IX, X, соответственно. Представленные на рис.2 зависимости хорошо согласуются с экспериментальными данными о влиянии температуры на относительный квантовый выход соединений V, VI, VII [5,6]. Данные факты, по-видимому, можно связать с изменением относительного положения уровней энергии низших электронно-возбужденных состояний различной орбитальной и спиновой природы, что происходит при изменении длины $>C=N-$ фрагмента. Необходимо отметить, что энергия синглетных $\pi\pi^*$ -уровней изменяется более активно, нежели триплетных. В качестве параметров сравнения использовали величины $\pi E/1A, \pi\pi/1A$, где $\pi\pi$ - общее изменение заселенности АО гетероатома ($\pi_i = \pi[d_\pi(p_i)]^2$). Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Соединение	πE триплетных уровней, см^{-1}	πE синглетных уровней, см^{-1}	$\pi E/1A$	$\pi\pi/1A$
Изохинолин	10000	10707	45177	0,405
Бензохинолин	11600	12000	59113	0,113
1,3-диметилиндазол	12398	14883	67650	1,218
5,6-бензохинолин	8294	9190	56728	0,080
7,8-бензохинолин	6626	7010	54765	0,539
3,4-бензохинолин	10670	11506	60878	0,386

Как следует из представленных данных, общее изменение заселенности атомных орбиталей гетероатома на единицу длины связи ($\pi\pi/1A$) хорошо коррелирует с изменением энергетических характеристик состояний, а именно $\pi E/1A$.

При замене атома N на $>C=O$ группу в молекуле IX с последующим изменением длины связи от 1,16 до 1,40 А положение уровней энергии низших электронно-возбужденных состояний изменялось незначительно. Так πE синглетных уровней $\pi\pi^*$ -типа составило 916 см^{-1} , в то время как $\pi\pi^*$ -типа - 1403 см^{-1} . Более значительно повышалась энергия S-T-расщепления для $\pi\pi^*$ -уровней, но инверсии уровней не

подобная картина. Как и в случае карбонилсодержащих соединений ряда кумарина, при увеличении длины $>C=N-$ связи энергия $\pi\pi^*$ -уровней молекул изменялась более активно, чем $\pi\pi^*$, отличие лишь в том, что увеличение длины указанной связи в азотсодержащих соединениях сопровождалось возрастанием энергии $\pi\pi^*$ -уровней, главным образом синглетных (Таблица 1). В ряду производных кумарина энергия $\pi\pi^*$ уровней молекул уменьшалась с увеличением длины $>C=O$ связи. Для объяснения разнонаправленности изменения энергии состояний следует рассмотреть структуру $\pi\pi^*$ -молекулярных отличия следует связывать с различной степенью изменения коэффициентов $d_\pi(p_i)$, которые представляют собой коэффициенты разложения МО по атомным орбиталям (АО). С увеличением

Влияние среды на электронное строение производных кумарина и хинолина

наблюдалось, как и в случае молекулы IV.

Выполненные расчеты позволили в самом общем виде установить связь между изменением вклада гетероатома в формирование природы и энергии $\pi\pi^*$ -молекулярных орбиталей (МО) и спектрально-люминесцентными свойствами соединений.

Предпринятый ранее вариант моделирования влияния растворителя, помещением молекул в электрическое поле, позволил установить механизм процесса, но связать действие растворителя с изменением относительного положения уровней энергии низших электронно-возбужденных состояний не удалось [11]. Выполненные квантово-химические расчеты электронного строения молекул XI, XII, XIII и II позволили установить различную степень изменения энергии электронных состояний $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -типа. Для молекул акридона и ксанта, величины синглет-триплетного $S_{\pi\pi} - T_{\pi\pi}$ расщепления ($8000 - 10000 \text{ см}^{-1}$) значительно меньше, чем для $S_{\pi\pi} - T_{\pi\pi}$ - состояний ($10000 - 12000 \text{ см}^{-1}$) молекул фенантридона и 3,4-бензокумарина. Эти различия связаны с изменением орбитальной природы состояний и локальным распределением заряда на атомах (N,O), расположенных на сравнительно большом расстоянии. С увеличением длины $>C=O$ связи $E_{S-T_{\pi\pi}}$ уровней в молекулах акридона и ксанта увеличивается на 2562 см^{-1} и 5236 см^{-1} , в то время как в молекулах фенантридона и 3,4-бензокумарина происходит уменьшение энергии $S-T$ - расщепления $\pi\pi^*$ - уровней. Большую подвижность $\pi\pi^*$ - уровней, главным образом синглетных, в молекулах XI, XII подтверждает величина $\pi E/\pi I$, которая составляет $5562 \text{ см}^{-1}/\text{\AA}$ и $5647 \text{ см}^{-1}/\text{\AA}$ соответственно, для сравнения, аналогичные величины в молекулах XIII, II всего 1177 и $3517 \text{ см}^{-1}/\text{\AA}$. Анализируя поведение $\pi\pi^*$ - уровней вследствие варьирования геометрии $>C=O$ фрагмента следует отметить однонаправленный характер изменений их характеристик. Для всех молекул наблюдается незначительное уменьшение энергии синглет-триплетного расщепления: на $329,403$, 330 , 271 см^{-1} , в XI, XII, XIII, II, соответственно. Но величины $\pi E/\pi I$ в молекулах фенантридона и 3,4-бензокумарина в 1,4 раза больше, чем в молекулах акридона и ксанта.

Представляет интерес проанализировать изменение энергетических характеристик при изменении длины фрагмента с гетероатомом в цикле ($>N-R$ и $C-O-C$), учитывая, что $>N-R$ является более сильным электронно-донорным заместителем, чем кислородный мостик. Если в молекулах фенантридона и 3,4-бензокумарина энергия $\pi\pi^*$ - уровней при этом меняется менее, чем на $800 \text{ см}^{-1}/\text{\AA}$, то в молекулах акридона и ксанта указанные величины составляют $13821 \text{ см}^{-1}/\text{\AA}$ и $5375 \text{ см}^{-1}/\text{\AA}$. Изменение энергии $\pi\pi^*$ - уровней, в формировании которых принимает участие гетероатом, носит обратный характер в ряду молекул: XI, XII, XIII, II наблюдается последовательное увеличение величины $\pi E/\pi I$ от 324 см^{-1} до 12668 см^{-1} , т.е. наиболее чувствительны $\pi\pi^*$ - уровни молекул фенантридона и 3,4-бензокумарина.

Расчет электронного строения молекул акридона, ксанта, фенантридона и 3,4-бензокумарина в рамках метода ЧПДП/С-КВ не позволил адекватно интерпретировать установленную экспериментально зависимость спектрально-люминесцентных характеристик молекул от полярности растворителя. Согласно полученными данными значительная чувствительность к полярности растворителя молекул XI, XII объясняется подвижностью $\pi\pi^*$ - уровней молекул, т.е. уровней с большим вкладом l -электронов. Большое расхождение между проведенным расчетом и полученными экспериментально значениями энергий синглетных уровней молекул XI и XII можно объяснить недостатком метода ЧПДП/С и использованием экспериментальных данных по растворам, в которых уровни энергий разной орбитальной природы ($\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$) под влиянием межмолекулярных взаимодействий могут изменять свое положение. С другой стороны, в молекулах XIII и II увеличение длины карбонильного фрагмента приводит к изменению относительного положения уровней энергии, что должно сопровождаться тушением флуоресценции при переходе от полярного растворителя к неполярному, что экспериментально не наблюдалось. В связи с этим расчет энергии электронных состояний молекулы акридона выполнен с использованием методов AM1 и PM3.

Плоская деформация $>C-N<$ связи от $1,16$ до $1,36 \text{ \AA}$ (длина $>C=O$ связи оставалась постоянной и составляла $1.4095 \text{ \AA}$) практически не сказалась на положении $\pi\pi^*$ -уровней молекулы: $\pi E_{S_{\pi\pi}} = 677 \text{ см}^{-1}$, $\pi E_{T_{\pi\pi}} = 844 \text{ см}^{-1}$, в то время как энергия $\pi\pi^*$ - уровней меняется более активно: $\pi E_{S_{\pi\pi}} = 3426 \text{ см}^{-1}$, $\pi E_{T_{\pi\pi}} = 608 \text{ см}^{-1}$. Величина $\pi E/\pi I$ для $S_{\pi\pi}$ уровня составила 3761 см^{-1} на $1 \text{ \AA}$, $T_{\pi\pi}$ - уровня 4689 см^{-1} на $1 \text{ \AA}$; для $S_{\pi\pi}$ уровня - 19033 см^{-1} на $1 \text{ \AA}$; для $T_{\pi\pi}$ - 3378 см^{-1} на $1 \text{ \AA}$. На основании полученных данных сделан вывод о большей чувствительности к деформации $>C-N<$ связи $\pi\pi^*$ - уровней молекулы акридона, о чем свидетельствует величина наклона кривых к оси абсцисс. На рис.3 представлена зависимость энергии электронных состояний молекулы акридона от длины $>C=O$ связи, полученная методами PM3 и AM1. Анализируя кривые, полученные на основании данных метода PM3, следует выделить три области, в соответствии с точками инверсии:

I: $1,35 - 1,41 \text{ \AA}$ (положение уровней соответствует состоянию молекулы в газовой фазе).

II: $1,31 - 1,35 \text{ \AA}$ (молекула акридона в н-углеводородах).

III : 1,18 - 1,31 Å (положение уровней соответствует растворителю) [11].

Методы AM1 и PM3 адекватно отражают экспериментальные данные об изменении относительного положения уровней энергии молекулы акридона в различных средах, но инверсия уровней происходит при различных длинах $>C=O$ связи.

Как следует из рисунка 3 с увеличением длины $>C=O$ фрагмента наблюдается снижение энергии уровней. В исследуемом геометрическом интервале $\pi E_{S_{\pi\pi}} = 8887 \text{ см}^{-1}$, $\pi E_{S_{\pi\pi}} = 766 \text{ см}^{-1}$, $\pi E_{T_{\pi\pi}} = 9000 \text{ см}^{-1}$, $\pi E_{T_{\pi\pi}} = 1432 \text{ см}^{-1}$. Величина $\pi E/\pi l$ составила: для $S_{\pi\pi}$ уровня 39852 см^{-1} на 1Å, для $T_{\pi\pi}$ уровня 40359 см^{-1} на 1Å, для $S_{\pi\pi}$ уровня 3435 см^{-1} на 1Å, для $T_{\pi\pi}$ уровня 6421 см^{-1} на 1Å. Величины $\pi E/\pi l$ полученные методом

AM1 составили: для $S_{\pi\pi}$ - 2067 см^{-1} на 1Å, $T_{\pi\pi}$ - 8349 см^{-1} , $S_{\pi\pi}$ - 33403 см^{-1} , $T_{\pi\pi}$ - 34098 см^{-1} на 1Å. Расчеты, выполненные обоими методами, позволили сделать вывод о взаимосвязи геометрии $>C=O$ фрагмента и энергии π -уровней молекулы акридона. С увеличением длины $>C=O$ связи происходит закономерное снижение энергии π -уровней молекулы. Следовательно, в зависимости от структурных факторов наблюдается последовательное снижение частоты запрещенных и незначительное увеличение частоты разрешенных переходов с $\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$ - уровней, т.е. в области $l_{C=O}$ 1,292Å и 1,334Å (метод PM3) и $l_{C=O}$ 1,17 и 1,244 Å (метод AM1) происходит инверсия уровней различной орбитальной природы и мультиплетности. Это находится в полном соответствии с положениями спектрально-люминесцентной систематики молекул.

Выводы.

Квантово-химически установлена взаимосвязь энергии $\pi\pi^*$ - уровней кислород- и азотсодержащих молекул с длиной $>C=O$ и $>C=N$ -связей в хромофорных фрагментах, которая

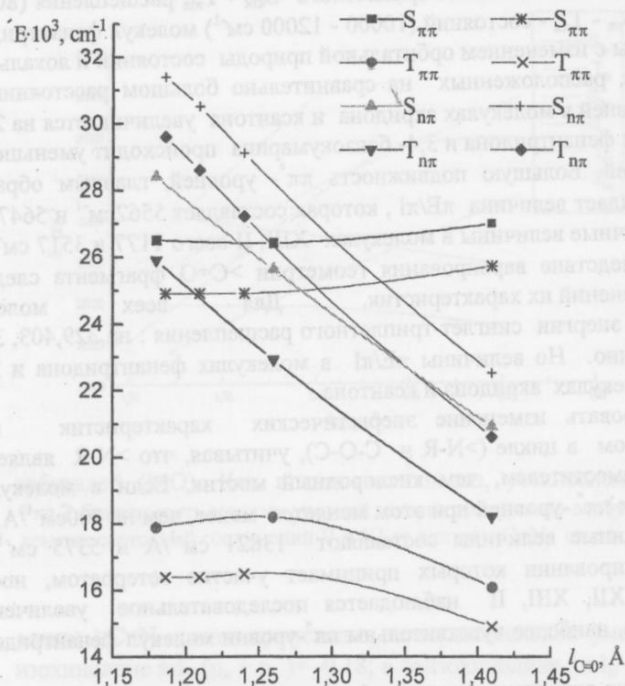


Рис. 3. Зависимость энергии уровней низших электронно-возбужденных состояний молекулы акридона от длины $>C=O$ связи - метод PM3 (1), AM1 (2)

может меняться под влиянием различных внешних факторов.

Таким образом, разработан теоретический метод изучения зависимости спектрально-люминесцентных свойств молекул от изменения геометрии хромофорных фрагментов молекулы, определяющей относительное положение уровней энергии различной орбитальной и спиновой природы.

Список литературы:

1. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. М. Наука, 1989. 227 С.
2. Шигорин Д.Н.// Журн. физ. химии. 1980. Т.54. №8. С.1920-1936
3. Шигорин Д.Н., Валькова Г.А., Гасилов Е.А., Годик В.А., Коноплев Г.Г., Пак М.А., Родионов А.Н., Строкач Н.С. Электронно-возбужденные состояния многоатомных молекул и процессы их дезактивации. М. Наука, 1993. 496 С.
4. Сахно Т.В., Короткова И.В., Хახель О.А.// Теорет. и эксперим. химия. 1996. Т.32. №4. С.247-250
5. Robert Huber J., Mahaney M., Morris J.V.// Chem. Phys. 1976. V.16. P.329-335
6. Bendig J., Kreysig D.// Z. Chem. 1980. V.20. P.378-379
7. Валькова Г.А., Сахно Т.В., Шигорин Д.Н. и др.// Журн. физ. химии. 1981. Т.55. №3. С.803-805
8. Dewar M.I.S., Zebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P.// J. Am. Chem. Soc. 1985. V.107. №13. P. 3902-3905
9. Годунов И.А., Яковлев Н.Н.// Журн. структ. химии. 1995. Т.36. №2. С.269-283
10. Гасилов Е.А., Королькова Н.В., Валькова Г.А., Коноплев Г.Г., Ни Б.В.// Журн. физ. химии. 1992. Т.66. №8. С.2105-2111
11. Короткова И.В., Сахно Т.В., Соловьев В.В.// Укр. хим. журн. 1998. Т.64. №2. С.9-13

УДК 621.3.682.5

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

РЕЕСТРАЦІЯ БІОМОЛЕКУЛ МАЛИХ РОЗМІРІВ МЕТОДОМ
ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУВ.І.Чегель¹, С.О.Пілецький², О.В.Пілецька²

1) Інститут фізики напівпровідників Національної Академії Наук, 252650 Київ-28, пр.Науки, 45

2) Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук, 252143, Київ, пр.Заболотного, 150.

Надійшла до редакції: 24 грудня 1998 року

Показана можливість використання поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для реєстрації органічних молекул з малою молекулярною масою (≈ 200 дальтон) на прикладі гербіцидів атразину та метрибузину. ППР-реєстрація вказаних гербіцидів базується на використанні рослинного білку D1, який є природним рецептором для гербіцидів, що інгібують процес біосинтезу. Чутливість, що досягнута для двох запропонованих вимірювальних схем, сягає 100 нг/мл та 0.1 нг/мл, відповідно. Описуються особливості методики та технології, що пов'язані з реєстрацією органічних молекул з малою молекулярною масою та використанням ППР.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гербіциди, поверхневий плазмонний резонанс, біосенсор.

В останні роки метод ППР затвердився як один з основних методів при дослідженні біомолекулярних взаємодій [1]. Серед переваг цього методу є висока чутливість, можливість спостереження за кінетикою біологічних реакцій в реальному вимірі часу та в природному для молекул середовищі, можливість обійтися без попередньої молекулярної мітки. В той же час існують деякі обмеження для методу, пов'язані з розмірами досліджуваних об'єктів. Так, спостереження молекул з масою меншою ніж 200 дальтон є практично неможливим з використанням звичайної схеми реєстрації.

Для вирішення цієї проблеми ми пропонуємо два підходи, які базуються на наявній можливості специфічного зв'язку між молекулою з малою молекулярною масою, що реєструється, та великою молекулою. Ці підходи ілюструються на прикладі реєстрації гербіцидів за допомогою рослинного білку D1, який ще називають гербіцид-зв'язуючим білком, одержаним з хлоропластових мембран. Механізм дії гербіциду базується на заміщенні ним пластохінону, який є вторинним акцептором електронів в реакційному центрі фотосистеми II, що призводить до зупинки переміщення електронів між фотосистемами з послідовним припиненням життєдіяльності рослини [2]. Молекулярна маса більшості гербіцидів коливається в межах 190-250 дальтон, що робить їх реєстрацію з використанням ППР проблематичною. В першій методиці молекула гербіциду, атразин, проникає в шар білку D1, адсорбованого на поверхні золота і заміщує пластохінон, молекулярна маса якого 750 дальтон. Реакція заміщення змінює діелектричні характеристики молекулярного комплексу, що реєструється приладом. Зміщення кута плазмонного резонансу (ППР-сигнал) при цьому пропорціональне концентрації гербіциду в розчині. Другу методику можна назвати конкурентною, тут молекула гербіциду з малою молекулярною масою (в нашому випадку це метрибузин) закріплюється на чутливій поверхні сенсора і конкурує з вільною молекулою метрибузину за зв'язування з білком D1 в розчині. Для поліпшення умов взаємодії з білком, гербіцид закріплювався на поверхні з використанням молекулярного ланцюжка, який складався із сімнадцяти атомів вуглецю. З метою прискорення реакції зв'язування, пластохінон з білку D1 був екстрагований. Під час реєстрації розчин білку D1 інкубувався з різними концентраціями метрибузину. ППР-сигнал при цій методиці є зворотнім до концентрації вільного гербіциду в розчині.

ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ

Поверхневий плазмон (ПП) являє собою хвилю густини заряду, хвильовий вектор якої направлений вздовж границі розподілу між металом чи напівпровідником та середовищем, а амплітуда напруженості поля експоненційно згасає при віддаленні від границі розділу. Подібна хвиля може бути збуджена зокрема, на зовнішній поверхні тонкої плівки металу з достатньо великою негативною та невеликою уявною частинами комплексної діелектричної функції [3]. Для збудження ПП звичайно використовуються тонкі плівки золота та срібла. Рівняння дисперсії для поверхневого плазмону, що розповсюджується вздовж тонкої плівки металу з комплексною діелектричною функцією $\varepsilon(\omega)$ та середовищем з діелектричною функцією ε_c має вигляд [3]:

$$k_{\text{m}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon(\omega)\varepsilon_c}{\varepsilon_c + \varepsilon(\omega)}} \quad (1)$$

де $k_{\text{пл}}$ - хвильовий вектор плазмону, c - швидкість, ω - частота світла. Поверхневий плазмон не може бути збуджений прямим падаючим світлом з середовища з меншою густиною, в силу того, що величина хвильового вектора для фотона $k_c = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_c}$ є недостатня. Для збільшення величини хвильового вектора падаючого світла (виконання закону збереження компоненти хвильового вектора, паралельної границі розподілу) використовують метод ППВВ (порушене повне внутрішнє відбиття). Найчастіше використовується схема експерименту в геометрії Кретчмана [4] (Рис.1), при якій плівка металу розміщена безпосередньо на призмі з високим коефіцієнтом заломлення $\sqrt{\epsilon_n} > \sqrt{\epsilon_c}$ або на скляній пластинці, що має оптичний контакт з призмою завдяки рідині. В методі ППВВ світло падає на границю розподілу між середовищами при кутах, що більше критичного θ_k . При цьому спостерігається повне внутрішнє відбиття світла $R \rightarrow 1$. Однак, частина світла все-таки проникає на зовнішню сторону призми (затухаюча хвиля) і збуджує в металі плазмон. При цьому плівки використовують такі, щоб потік енергії досягав границі розподілу метал-середовище. Відповідно до теорії, ППР виникає в випадку, коли $k_x = k_{\text{пл}}$, що досягається зміною кутів падіння в інтервалі між $\theta_k < \theta < 90^\circ$ і реєструється, як мінімум в графіку інтенсивності відбитого р-поляризованого світла $R(\theta)$ (далі-крива ППР, Рис. 2, крива 1). Мінімуму інтенсивності відповідає резонансний кут $\theta_{\text{пл}}$, який може бути визначений з рівняння:

$$\sqrt{\epsilon_c} \sin \theta_{\text{пл}} \approx \sqrt{\frac{\epsilon'(\omega)\epsilon_c}{\epsilon_c + \epsilon'(\omega)}} \quad (2)$$

в якому ми використовуємо тільки реальну частину комплексної діелектричної функції $\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) + i\epsilon''(\omega)$. Звичайно, поверхневий плазмон не може існувати без затухання в плівці металу і $\epsilon''(\omega) \neq 0$, але в більшості випадків $|\epsilon'(\omega)| \gg |\epsilon''(\omega)|$. Розміщення на поверхні металу діелектричного покриття, наприклад, у вигляді адсорбованих біомолекул, викликає зростання величини вектора поверхневого плазмону:

$$k_{\text{пл}}^1 = k_{\text{пл}}^0 + \Delta k_{\text{пл}}$$

Відповідно до рівняння (2) це викличе зміщення положення мінімуму кривої ППР (Рис.2, крива 2). Розраховуючи зміщення $d\theta$ з використанням формул Френеля, стає можливим оцінити оптичну товщину шару біомолекул. Для розрахунку ефективного коефіцієнта заломлення n_{ef} молекулярного шару необхідно зробити підсумовування поляризуємостей складаючих його частин згідно рівняння Лорентц-Лоренса [3].

$$\frac{n_{\text{ef}}^2 - 1}{n_{\text{ef}}^2 + 2} = \frac{n_{\text{мол}}^2 - 1}{n_{\text{мол}}^2 + 2} V + \frac{n_c^2 - 1}{n_c^2 + 2} (1 - V) \quad (3)$$

де $n_{\text{мол}}$ - коефіцієнт заломлення молекул, n_c - коефіцієнт заломлення середовища, в якому молекули знаходяться, V - фактор заповнення, що визначається формою молекул.

Мінімальна величина зміщення положення мінімуму ППР-кривої обмежується можливостями реєструючого обладнання і в більшості випадків знаходиться близько 0.005° . Відповідно до рівняння (3), ефективний коефіцієнт заломлення щільно запакованого моношару біомолекул сферичної форми в водному середовищі $n_{\text{ef}} = 1.36$, і є можливим розрахувати оптичну товщину шару, що викликає таке зміщення. Її величина не перевищує 0.05 нм і залежить від щільності пакування. Знаючи молекулярну вагу відповідної молекули і вважаючи її форму сферичною, легко розрахувати товщину моношару біомолекул, що реєструються. Так, для гербіцидів вона буде в межах 0.8 - 1 нм. Розрахунки показують, що сорбція такого моношару викличе зміщення положення мінімуму ППР-кривої менше ніж 0.05° , що знаходиться близько нижньої межі чутливості ППР-методу. Проте, при реєстрації малих концентрацій щільність пакування біомолекул в сорбційному шарі, і, відповідно, величина зміщення положення

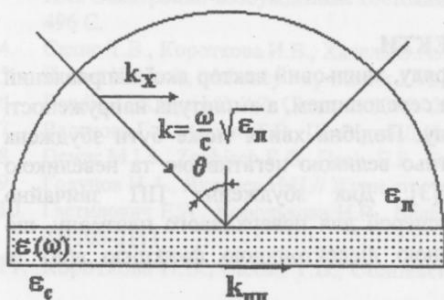


Рис.1. Схема збудження поверхневого плазмону за допомогою призми в геометрії Кретчмана (Кретчман-конфігурація).

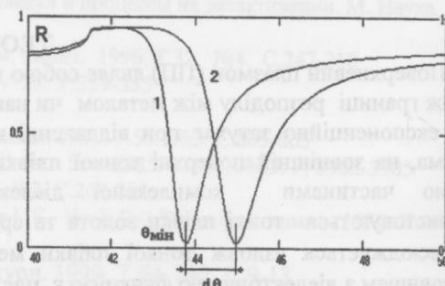


Рис.2. Відбиття плівки золота (1) і тієї ж плівки після нанесення на неї шару діелектрика (2) в геометрії ППВО Кретчмана.

Реєстрація біомолекул малих розмірів методом поверхневого плазмонного резонансу

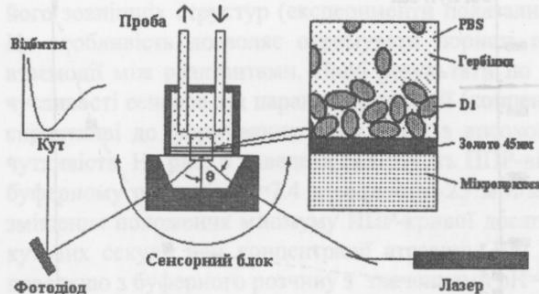


Рис.3. Схема ППР-пристрою та модель шарової структури.

біомолекулами з малою та великою молекулярними масами. ППР-моніторинг таких взаємодій в реальному режимі часу дає можливість для спостереження кінетики зміни оптичної товщини біомолекулярного комплексу і, як результат, реєструвати присутність молекул малих розмірів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Виділення білку D1 проводилось в відповідності з методом [5] з гороху (*Pisum sativum* L.).

ППР-виміри

Виміри проводились на комп'ютеризованому ППР-пристрої з Кретчман-конфігурацією сенсорного оптичного блоку (Рис.3). Використовувались гелій - неоновий лазер з потужністю 2 мВт з р-поляризацією випромінювання, скляна мікропризма ($n=1.51$), проточна кювета (оргскло, кільце з силіконової гуми діаметром 8 мм і 1 мм висотою) та реєструючий фотодіод. Змінна мікропризма та реєструючий фотодіод розміщені на столику, що обертається (0.01° роздільна здатність по куту). Мікропризма являє собою скомплектовану сенсорну структуру (скло, шар золота, шар тіолів), що дозволило проводити вимірювання з більш високою точністю в порівнянні з вимірами на змінних скляних пластинках, де необхідно використовувати імєрсійну рідину для отримання оптичного контакту з призмою. Шар золота товщиною 45 нм був напильний (термічне напильня, 10^{-3} Па) на поверхню мікропризми з одночасним напильням підшару хрому товщиною ≈ 3 нм для поліпшення адгезії. Під час вимірювань положення мінімуму ППР-кривої реєструвалось в вигляді сенсограми. Всі виміри проводились при кімнатній температурі.

Реєстрація гербіцидів з використанням реакції заміщення пластохінону

Білок D1 був розчинений в фосфатному буферному розчині (PBS) ($pH=7.4$, 25 мМ KH_2PO_4 , 25 мМ NaCl) і розбавлений до концентрації 5 мГ/мл. Проба розчину білку (100 мкл) вводилась в вимірювальну кювету на 30 хвилин. Після промивки кювети буферним розчином на протязі приблизно 30 хвилин реєструвався реальний дрейф підготовленої до основного етапу вимірювань системи. Після стабілізації в кювету вводилась проба розчину атразину визначеної концентрації і реєструвалась кінетика реакції заміщення пластохінону гербіцидом. Щоб визначитися, чи дійсно процес заміщення відбувся, аналогічний експеримент був проведений з білком D1, з якого попередньо за допомогою гексану був екстрагований пластохінон. І хоч білок зберігав при цьому здатність до зв'язування з гербіцидом, реакція заміщення в даному випадку не спостерігалась (Рис.4). По цій схемі був проведений ряд експериментів для визначення та оптимізації чутливості сенсора.

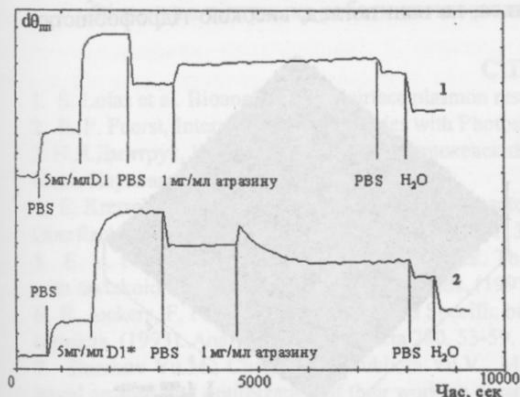


Рис.4. Сенсограми реакції зв'язування атразину з очищеним від пластохінону білком D1(1) та заміщення пластохінону в неочищеному білку D1*(2).

Реєстрація гербіцидів з використанням "конкурентного" методу

Хлоропластовий білок D1 був очищений від пластохінону за допомогою гексану. Екстрагований таким чином білок був розчинений в 25 мМ буферному розчині (25 мМ NaCl, pH 7.4) і розбавлений до концентрації 5 мГ/мл. Далі на поверхню золота сорбувався цистеїн (з розчину 1мГ/мл на протязі 2-х годин). Як відомо, місце зв'язування залягає глибоко всередині білку D1 на відстані від поверхні молекули, що дорівнює 10 атомам вуглецю[6]. З метою зменшити просторові обмеження та підвищити ефективність взаємодії, метрибузин був закріплений на поверхні металу не безпосередньо, а з використанням проміжної

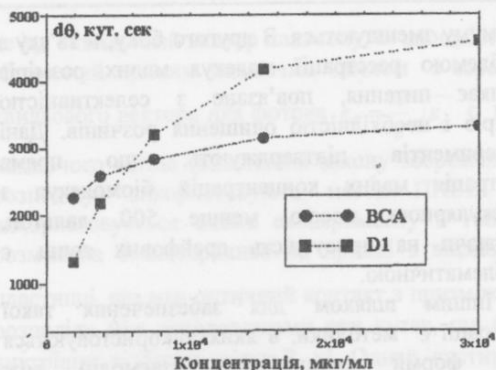


Рис.5. Зміщення кута плазмонного резонансу при адсорбції на поверхню золота BCA і D1 з розчинів різних концентрацій.

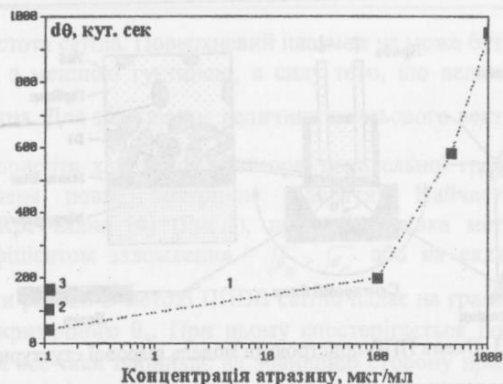


Рис.6. Зміщення кута плазмонного резонансу в залежності від концентрації атразину. 1-реакція заміщення в буферному розчині з рН=7.4, 2- рН=5.2, 3- рН=2.2.

молекули гексаметилендіаміду, яка є зв'язуючим ланцюжком. Спочатку мікропризма з шаром золота, покритого цистеїном, на протязі 2-х годин оброблялась в 0.1% розчині глутаральдегіду, після цього відмивалась в буферному розчині і занурювалась в 1% розчин гексаметилендіаміду на 2 години. Потім мікропризма знову відмивалась в буферному розчині і занурювалась в розчин метрибузину концентрацією 1мг/мл на 2 години. Після цього проба, що містить суміш екстрагованого білку D1 концентрацією 1мг/мл з метрибузином в різних концентраціях вводилась в кювету і проводився запис сенсограми.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Реакція заміщення

Внаслідок гранично малих для методу ППР значень молекулярної маси атразину реакція специфічного зв'язування між екстрагованим білком D1 і гербіцидом, як і очікувалось, практично не спостерігалась (рис 4.1.), тому в подальшому ми будемо обговорювати тільки реакцію заміщення. На цьому же малюнку наведена сенсограма (рис. 4.2), що показує кінетику реакції заміщення між атразином та неекстрагованим білком D1, де явно помітний відклик на введення проби з гербіцидом. Наведені сенсограми показують кінетику реакцій для шару білку, що утворився при сорбції з розчину D1 концентрацією 5 мГ/мл, яка була визначена після ряду експериментів. При даній концентрації товщина сорбційного шару, що утворювався, була оцінена нами в 8.5-9.5 нм [7](виходячи з коефіцієнту заломлення білку $N_{ef}=1.36$), що значно перевищує товщину моношару. Справді, порівняльні експерименти, проведені для двох типів білків-гідрофобного рослинного D1 та амфіфільного волового сироваткового альбуміну (BCA) демонструють значну відмінність в товщині сорбційного покриття, отриманого з розчинів високої концентрації (до 30 мГ/мл) (рис. 5). Враховуючи співвідношення молекулярних мас двох білків- 69 кДа для BCA і 39 кДа для D1, а також відомий факт відсутності для BCA сорбції на моношар [8], можна стверджувати, що для рослинного білку відзначається неупорядкована полімолекулярна сорбція, яка приводить до утворення на поверхні золота пористої структури товщиною в декілька моношарів. Це підтверджують дані, отримані за допомогою силового атомного мікроскопу (САМ) (Рис.7-8). Спроможність утворювати при сорбції мультишари є принциповою особливістю рослинного білку D1 і пояснюється, на наш погляд, високою гідрофобністю

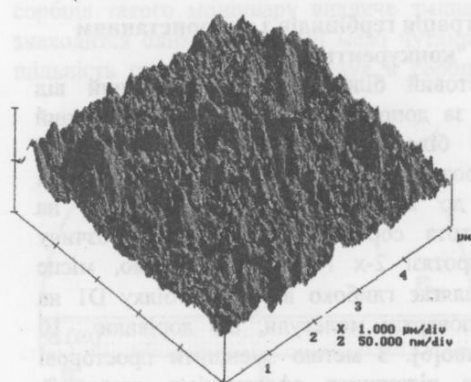


Рис.7. САМ зображення сорбованого на поверхні золота білку D1. Сорбція з розчину 10 мг/мл.

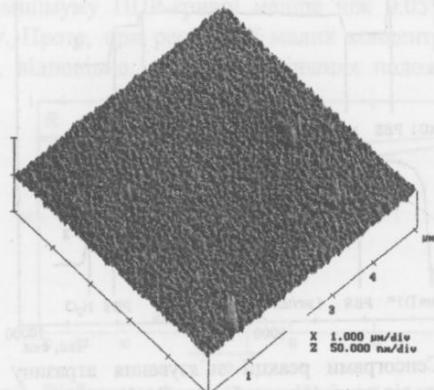


Рис.8. САМ зображення сорбованого на поверхні золота BCA. Сорбція з розчину 10 мг/мл.

його зовнішніх структур (експерименти показали значно ослаблену сорбцію D1 на гідрофільне золото). Ця особливість дозволяє отримувати пористі шари типу псевдоматриксів, котрі розширюють зону взаємодії між реагентами. Наші результати по формуванню шару білку показують пряму залежність чутливості сенсора від параметрів сорбції (концентрації білку, pH та іонної сили розчину). Тільки умови, сприятливі до формування шару білку з високою пористістю дозволяють отримати достатньо високу чутливість. На рис. 6 наведена залежність ППР-відгуку сенсора від концентрації атразину у фосфатному буферному розчині pH=7.4 молярністю 25 мМ/мл. В діапазоні концентрацій атразину $10^2 - 10^3$ мГ/мл зміщення положення мінімуму ППР-кривої досягало 200-1000 кутових секунд, яке зменшувалось до 40 кутових секунд при концентрації атразину 100 нГ/мл. Чутливість підвищується при сорбції білку на поверхню з буферного розчину з значеннями pH=5.2-2.2 (при цьому зміщення положення мінімуму ППР-сигналу збільшується до 110-170 кутових секунд для концентрації атразину 100 нГ/мл). Можна припустити, що часткова денатурація молекул білку поліпшує доступ молекул атразину до місць зв'язування в результаті конформаційних змін в молекулах білку.

Конкурентний метод

Сенсограми, наведені на рис.10, показують кінетику ППР-сигналу при взаємодії поверхневих шарів

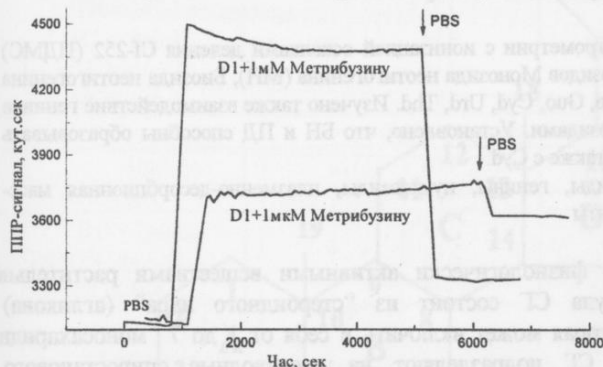


Рис. 10. Сенсограми, що отримані при "конкурентному" методі реєстрації молекул з малою молекулярною масою.

0.1 мГ/мл, але програє йому в зручності та необхідності попередньої підготовки поверхні сенсора.

ВИСНОВКИ

Отримані результати показують широкі можливості методу ППР в дослідженні міжмолекулярних взаємодій між біомолекулами, розмір яких варіюється від 200 до 32000 Дальтон. Межа реєстрації для молекул малого розміру визначена в 100 мГ/мл для прямих вимірів та 0.1 мГ/мл для конкурентного методу. Використання нових технологій з попередньою концентрацією гербіцидів дозволяє підвищити чутливість в 1000 разів і робить можливим використання ППР-методу для реєстрації гербіцидів в питній воді. Приведена технологія може бути використана для реєстрації біологічних реакцій за участю молекул малих розмірів як в фундаментальних так і в прикладних дослідженнях в медицині, екології та біотехнології.

Фінансова підтримка роботи частково забезпечувалась за рахунок гранту INTAS UA 95-0161

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. Lofas et al. Bioanalysis with surface plasmon resonance. (1991). Sens. & Act. B, B5, 113-121.
2. E. P. Fuerst, Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron Transport. (1991). Weed Science, 39, 458-464.
3. Н.Л.Дмитрук, В.Г.Литовченко, В.Л.Стрижевский. Поверхностные поляритоны в полупроводниках и диэлектриках. Киев, Наукова думка, 1989.
4. E. Kretschmann, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmawingungen. (1971). Phys., 241, 313-314.
5. E. V. Piletskaya, S. A. Piletsky, N. F. Lavrik. The estimation of the photosynthesis-inhibiting herbicides concentration with thylakoid membranes and their compounds. (1997). Biochemistry and physiology of cultivated plants, 29, 234-240.
6. R. Jockers, F. F. Bier and R. D. Schmid Specific binding of photosynthetic reaction centers to herbicide -modified grating couplers. (1993). Analytica Chimica Acta 280, 53-59.
7. Shirshov Yu.M., Chegel V.I., Subbota Yu.V., Matsas E.P., Kostioukevich E.V, Rachcov A.E. R.Merker. Biosensors, based on SPR and optimization of their working parameters. SPIE Proceeding of 5th Int. Workshop on Electronic Properties of Metal/Nonmetal Microsystems (EPMS'95), Poland, Polanica Zdroj, 11-14 Sept., 1995, vol. 2780, pp.257-260.
8. M. Malmsten. Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophobic surfaces. (1994). J. Coll. Int. Sci., 166, 333-342.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ С
НУКЛЕОЗИДАМИ МЕТОДОМ ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННОЙ МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ С ИОНИЗАЦИЕЙ ОСКОЛКАМИ ДЕЛЕНИЯ CF-252****В.В. Пилипенко, С.А. Аксенов, А.Н. Калинин, Л.Ф. Суходуб***Институт Прикладной Физики, Национальной Академии Наук Украины,**244030, Сумы, ул. Петропавловская 58**Поступила в редакцию 3 ноября 1998 г.*

Методом плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления CF-252 (ПДМС) исследовано взаимодействия стероидных гликозидов Монозида неотигогенина (МН), Биозида неотигогенина (БН) и Петуниозида Д (ПД) с нуклеозидами Ado, Guo, Cyt, Urd, Thd. Изучено также взаимодействие генинов неотигогенина и гитогенина с теми же нуклеозидами. Установлено, что БН и ПД способны образовывать нековалентносвязанные ассоциаты с Urd, а БН также с Cyt.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стероидные гликозиды, генины, нуклеозиды, плазменно-десорбционная масс-спектрометрия, нековалентносвязанные ассоциаты

Стероидные гликозиды (СГ) являются физиологически активными веществами растительного происхождения. В общем случае молекула СГ состоит из "стероидного ядра" (агликона) и присоединенной к нему углеводной цепи, которая может включать в себя от 1 до 7 моносахаридных мономеров. Согласно структуре агликона СГ подразделяют на производные спироанового и фуранового рядов [1]. Известно, что СГ могут проявлять мембранотропную [1], фунгицидную [2,3], противовоспалительную [4], антиоксидантную [1] и другие виды активности. Для СГ характерен также выраженный гипохолестеринемический эффект, что позволило создать на базе СГ, выделенных из *Dioscorea caucasica* Lipsky и *Dioscorea nipronica* Makino, а также из *Tribulus terrestris* L., лекарственные препараты, применяемые для профилактики и лечения ранних стадий атеросклероза [5-7]. Кроме этого лекарственные препараты, включающие в свой состав СГ, широко используются при лечении кардиологических заболеваний [7,8]. Не последнюю роль в интересе, проявляемом исследователями к данным соединениям, играет возможность применять СГ в качестве исходных или промежуточных реагентов для синтеза гормональных препаратов или их производных, а также проявление гормональной активности нативными СГ [1,9-11]. В частности, получены данные по применению препарата трибестана, основой которого являются СГ из *Tribulus terrestris* L., в качестве афродизийного средства для мужчин [12]. В последние годы особое внимание привлекает также противоопухолевая активность СГ. Рядом авторов отмечается высокая ингибирующая способность СГ в отношении пролиферирующих клеточных систем [1,9,13,14], отмечается также, что данную активность проявляют только СГ, содержащие в олигосахаридной цепи более 2 звеньев [13]. Исходя из вышесказанного видно, что информация о реакционной способности СГ по отношению к биологически важным молекулам представляет интерес для создателей новых фармацевтических препаратов, в частности, для объяснения или предвидения нежелательных побочных эффектов.

Масс-спектрометрия, особенно мягкоионизационные методы, давно и весьма эффективно используется для определения, подтверждения или уточнения химической структуры СГ и исследований взаимодействия СГ с различными биомолекулами [15-20]. Результаты, полученные из масс-спектров СГ позволяют существенно расширить объем информации о данной группе веществ, об их реакционной способности в смесях с различными биомолекулами. В литературных источниках высказывается предположение о способности СГ проникать в клетку [2]. В качестве объекта исследования мы взяли функционально наиболее значимые элементы информационных, транспортных и рибосомальных нуклеиновых кислот - нуклеозиды. Данная работа является продолжением исследований по изучению методами мягкоионизационной масс-спектрометрии процессов взаимодействия фармакологических препаратов с различными биомолекулами, проводимых в лаборатории биофизики ИПФ НАНУ под руководством Л.Ф. Суходуба [21].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения взаимодействия СГ с нуклеозидами нами были использованы представители СГ: очищенный препарат Монозида неотигогенина (МН), Биозида неотигогенина (БН), выделенные из семян томатов, а также их агликон неотигогенин, полученный из того же источника, и очищенный препарат Петуниозида Д (ПД), экстрагированный из семян петунии и его агликон гитогенин, также выделенный из семян петунии; и нуклеозиды: Ado, Cyd, Guo, Thd, Urd марки х/ч производства Serva.

Молекула МН и БН включает в себя стероидную (агликоновую) часть, представленную генином ряда спиростана неотигогенином (25S-5a-spirostan-3b-ol), и углеводную часть, состоящую из галактозы у МН и галактозы и глюкозы у БН.

Углеводный компонент присоединяется к агликону по месту 3-ОН связи [1,10]. Структура БН изображена на рис. 1.

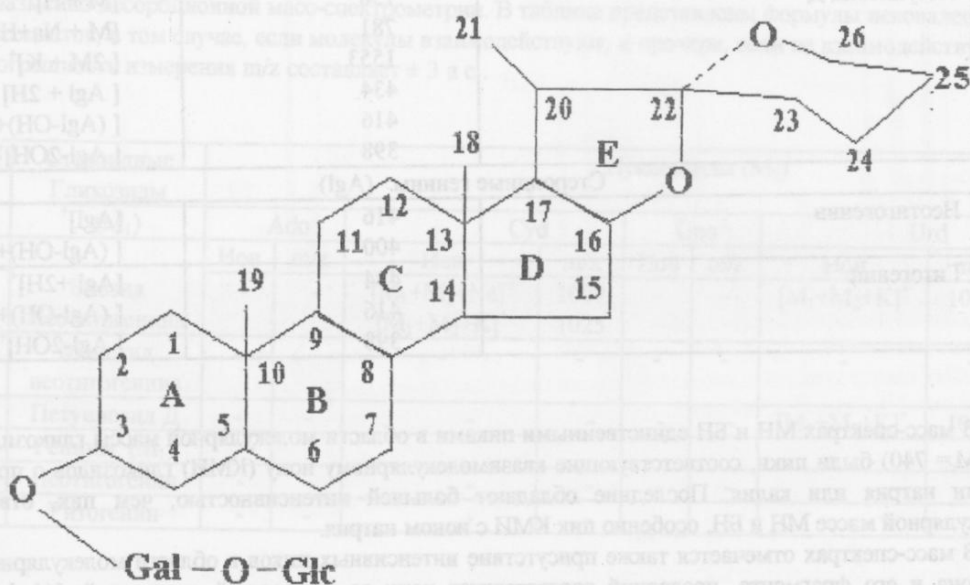


Рис. 1. Химическая структура молекулы Биозида неотигогенина.

ПД также состоит из стероидной составляющей, представленной агликоном гитогенином, химическая структура которого идентична неотигогенину за исключением дополнительной гидроксигруппы в положении 2, и углеводного фрагмента, состоящего из галактозы и глюкозы. Таким образом, ПД также является биозидом спиростанового ряда как и БН [1,10].

Исследование проводили путём приготовления модельных смесей гликозида или агликона с определённым нуклеозидом, в молярном соотношении 1:1. Данную смесь затем растворяли в дистиллированной воде с концентрацией 1мг/мл в случае смеси гликозида с нуклеозидом или в водно-бутанольном растворе (1:1 по объёму) с той же концентрацией, если это смесь агликона с нуклеозидом.

Далее приготовленный раствор наносили на позолоченный пробонесущий диск в количестве 10-20 мкл. и просушивали в струе тёплого воздуха таким образом, чтобы на диске образовался сухой осадок. Анализ проводили с помощью времяпролётного масс-спектрометра с ионизацией осколками деления Cf-252 МСБХ, разработанного для биохимических исследований и изготовлённого АО SELMI, Сумы, Украина, при ускоряющем напряжении +15kV и -15kV. Разрешение по массам составляло около 250 на уровне 0,1 высоты пика [22,23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально были получены масс-спектры МН, БН и ПД, а также неотигогенина и гитогенина, с целью изучения путей фрагментации молекул гликозидов и их агликонов, а также для проверки чистоты препаратов. Основные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Основные пики плазменно-десорбционных масс-спектров стероидных гликозидов и генинов. Погрешность измерения m/z составляет ± 1 а. е.

Стероидные гликозиды (М)			
№		m/z. пика	Соответствующий ион
1.	Монозид неотигогенина	577	[M + H] ⁺
		599	[M + Na] ⁺
		601	[M + Na + 2H] ⁺
		400	[(Agl-OH) + H] ⁺
		416	[Agl] ⁺
2.	Биозид неотигогенина	742	[M + H] ⁺
		765	[M + Na + 2H] ⁺
		781	[M + K + 2H] ⁺
		1505	[2 M + Na + 2H] ⁺
		400	[(Agl-OH) + H] ⁺
3.	Петуниозид Д	758	[M + H] ⁺
		781	[M + Na + H] ⁺
		1553	[2M + K] ⁺
		434	[Agl + 2H] ⁺
		416	[(Agl-OH) + H] ⁺
		398	[Agl-2OH] ⁺
Стероидные генины (Agl)			
1.	Неотигогенин	416	[Agl] ⁺
		400	[(Agl-OH) + H] ⁺
2.	Гитогенин	434	[Agl + 2H] ⁺
		416	[(Agl-OH) + H] ⁺
		398	[Agl-2OH] ⁺

В масс-спектрах МН и БН единственными пиками в области молекулярной массы гликозидов ($M_r = 576$, $M_r = 740$) были пики, соответствующие квазимолекулярному иону (КМИ) гликозидов с протоном и ионами натрия или калия. Последние обладают большей интенсивностью, чем пик, отвечающий молекулярной массе МН и БН, особенно пик КМИ с ионом натрия.

В масс-спектрах отмечается также присутствие интенсивных пиков в области молекулярной массы агликона и его фрагмента, последний соответствует иону со следующей структурой: $[(AgI-OH) + H]^+$. Другими словами, в процессе фрагментации молекулы СГ происходит разрыв по месту присоединения углеводной части к стероидному ядру с отрывом от агликона гидроксогруппы и последующим протонированием образованного иона. Подобный механизм фрагментации молекулы СГ является типичным и описан ранее в литературе [19-20,24]. В данном случае масс-спектры МН и БН подтверждают ранее полученные данные для подобных по структуре СГ растительного происхождения. В спектре БН также присутствует слабый по интенсивности пик в области масс, отвечающих образованию ассоциата из двух молекул гликозида ($m/z=1505$). Масс-спектр неотиогенина продемонстрировал наличие интенсивных пиков в области молекулярной массы неотиогенина ($M_r = 416$) и в области его фрагмента $[(AgI-OH) + H]^+$. При анализе масс-спектров ПД ($M_r = 757$) и гитогенина ($M_r = 432$) мы пришли к выводу, что для них характерен такой же путь фрагментации молекулы гликозида и агликона и следовательно образования пиков в той же области масс, что и для МН и БН, однако в данных масс-спектрах присутствует дополнительный пик в области масс фрагментов агликона, соответствующий иону с двумя отщепленными гидроксигруппами $[(AgI-2OH)]^+$, что связано по-видимому с наличием в молекуле гитогенина двух гидроксигрупп. ПД также склонен образовывать КМИ с ионами натрия и калия и пики в области масс данных КМИ также являются более интенсивными чем пик, соответствующий молекулярной массе ПД. В масс-спектре ПД также есть достаточно интенсивный пик в области масс, отвечающих образованию димера из двух молекул данного гликозида ($m/z = 1553$), который более интенсивен чем в масс-спектре БН.

В целом масс-спектры гликозидов и генинов характеризуются небольшим количеством уверенно идентифицируемых пиков и низким уровнем химического шума.

В масс-спектрах нуклеозидов присутствовали интенсивные пики в области молекулярной массы соответствующего нуклеозида, а также очень интенсивные пики в области молекулярной массы азотистого основания. Прослеживалось также наличие не менее интенсивных пиков КМИ нуклеозидов и азотистых оснований с ионами натрия или калия.

Изучение взаимодействия стероидных гликозидов с нуклеозидами...

Следует также отметить, что для масс-спектра чистого Cyd характерно наличие пика, отвечающего образованию иона димерного гомоассоциата. Подобное явление не проявлялось ни в одном из масс-спектров остальных нуклеозидов.

В масс-спектрах смесей МН с рибонуклеозидами мы обнаружили наличие интенсивных пиков характерных для индивидуальных компонентов смесей.

Анализ данных масс-спектров смесей БН и нуклеозидов позволил также обнаружить в них присутствие интенсивных пиков тех же типов, что и в масс-спектрах индивидуальных компонентов смесей. Кроме этого в ряде масс-спектров были обнаружены пики, отвечающие гетерокластерным ассоциатам БН с определенным нуклеозидом по типу [БН+нуклеозид]. При этом в состав данного гетерокластерного ассоциата, наряду с молекулой гликозида и нуклеозида входил также ион натрия или калия. Результаты анализа масс-спектров модельных смесей СГ с рибонуклеозидами представлены в таблице 2.

Таблица 2. Взаимодействие стероидных гликозидов и генинов с рибонуклеозидами по данным плазменно-десорбционной масс-спектрометрии. В таблице представлены формулы нековалентных ассоциатов, в том случае, если молекулы взаимодействуют, и прочерк, если не взаимодействуют. Погрешность измерения m/z составляет ± 3 а.е.

№	Стероидные Гликозиды	Нуклеозиды (M ₂)							
	(M ₁)	Ado		Cyd		Guo		Urd	
		Ион	m/z	Ион	m/z	Ион	m/z	Ион	m/z
1.	Биозид Неотигогенина	-	-	[M ₁ +M ₂ +Na] ⁺ [M ₁ +M ₂ +K] ⁺	1009 1025	-	-	[M ₁ +M ₂ +K] ⁺	1026
2.	Монозид неотигогенина	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	Петуниозид Д	-	-	-	-	-	-	[M ₁ +M ₂ +K] ⁺	1042
№	Генины (M ₁)								
1.	Неотигогенин	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	Гитогенин	-	-	-	-	-	-	-	-

Наибольшей интенсивностью такие пики гетероассоциатов обладают в масс-спектре БН с Urd и Cyd, что не оставляет сомнений во взаимодействии гликозида с данными нуклеозидами. Масс-спектр модельной смеси БН с Cyd представлен на рис. 2. Масс-спектр модельной смеси БН с Urd представлен на рис. 3. Пик гетероассоциата присутствует также в масс-спектре БН с Ado, но его интенсивность очень низка. В масс-спектрах Thd с БН и Guo с БН отсутствуют пики гетероассоциатов, во всяком случае, их невозможно обнаружить при визуальном анализе масс-спектра. Последнее позволяет предположить, что сайтом присоединения СГ к нуклеозиду является не рибоза, а именно азотистое основание.

При анализе масс-спектров модельных смесей ПД с теми же нуклеозидами мы обнаружили также наличие интенсивных пиков тех же типов, что и в масс-спектрах индивидуальных компонентов смесей. Относительно пиков, соответствующих образованию гетерокластерного ассоциата ПД с определенным нуклеозидом по типу [ПД + нуклеозид], можно сказать, что в данном случае мы обнаружили такие пики только в масс-спектре смеси ПД с Urd.

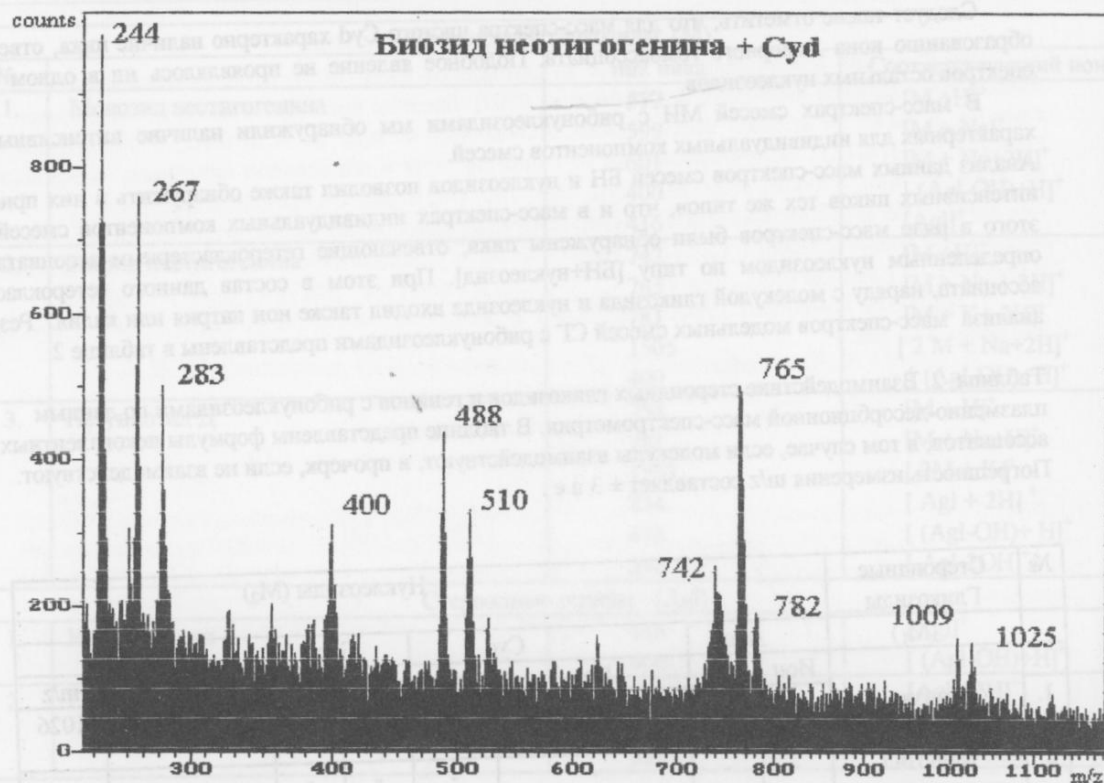


Рис. 2. Масс-спектр модельной смеси стероидного гликозида Биозид неотигогенина и Cud. Распифровка пиков представлена в Таблице 1 и Таблице 2.

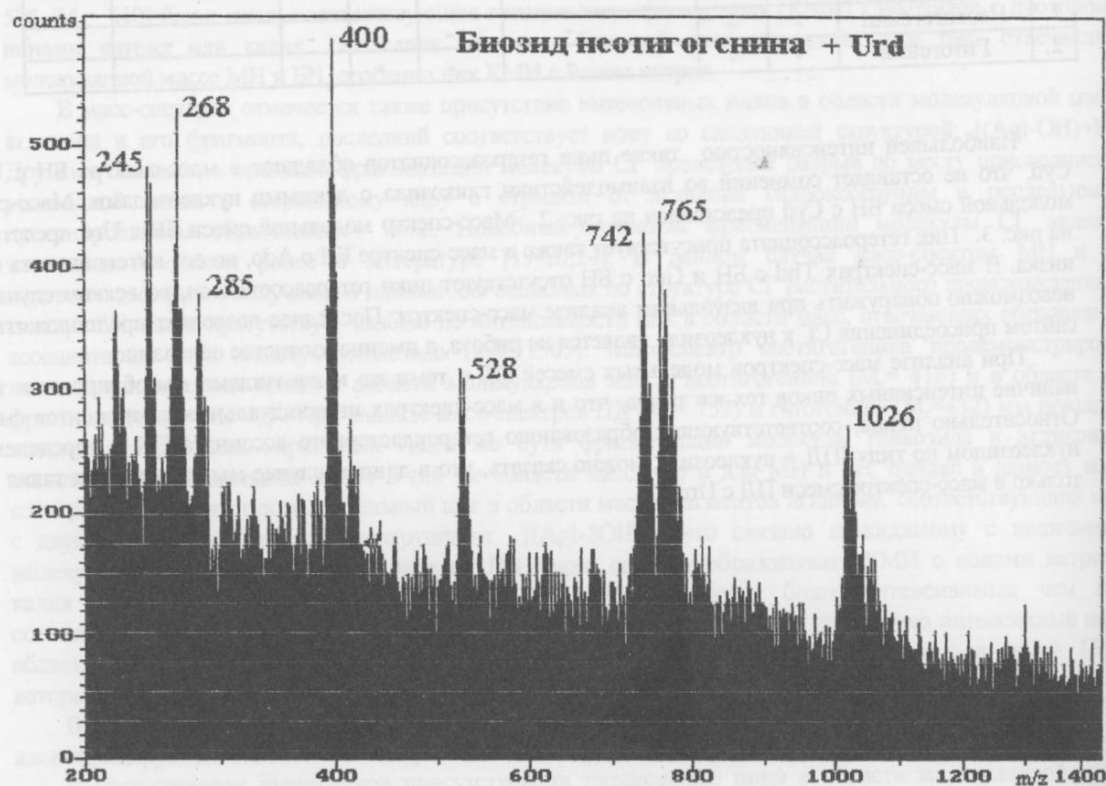


Рис. 3. Масс-спектр модельной смеси стероидного гликозида Биозид неотигогенина и Urd. Распифровка пиков представлена в Таблице 1 и Таблице 2.

При этом в данном масс-спектре пик в области гетерокластерного ассоциата гликозида и нуклеозида был выражен более интенсивно, чем в масс-спектре БН с тем же нуклеозидом. В состав гетерокластерного ассоциата ПД и Urd входил также ион калия. Масс-спектр модельной смеси ПД с Urd представлен на рис. 4.

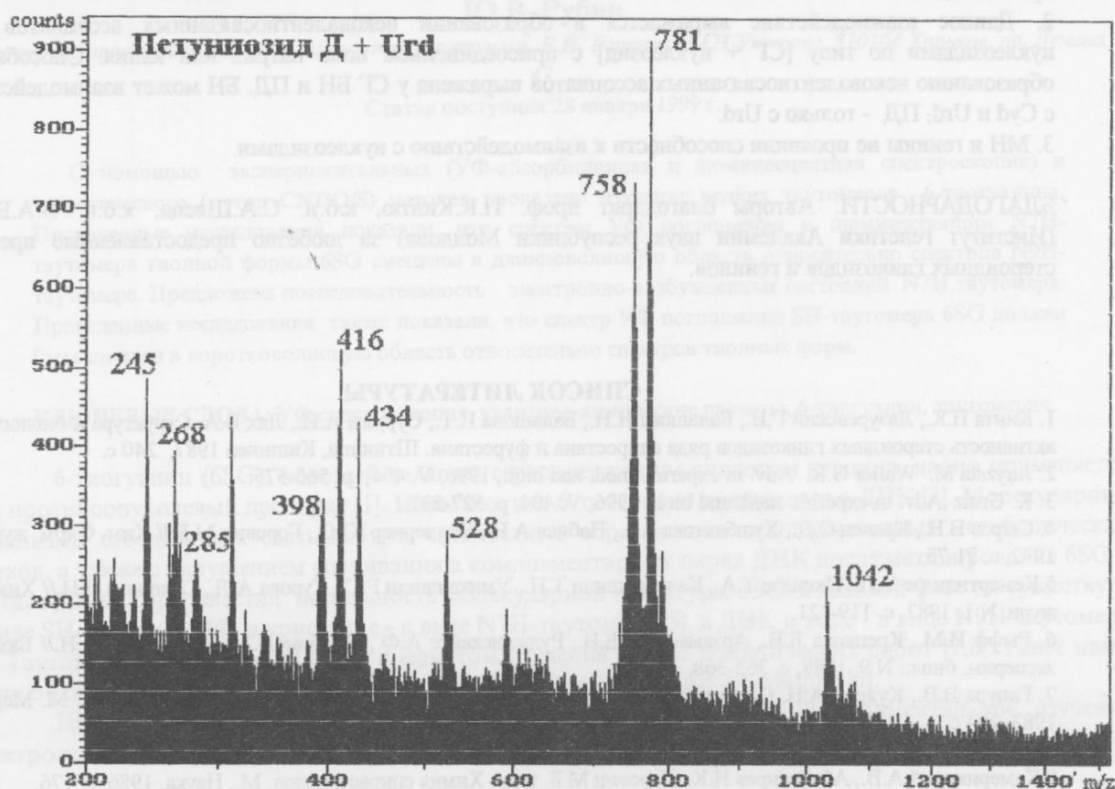


Рис. 4. Масс-спектр модельной смеси стероидного гликозида Петуниозида Д и Urd. Распифровка пиков представлена в Таблице 1 и Таблице 2.

В масс-спектрах модельных смесей данного гликозида с Ado, Cyd, Guo, Thd пики в области масс образования гетерокластерных ассоциатов не были обнаружены или же имели очень низкую интенсивность.

Таким образом, исследование модельных смесей СГ с нуклеозидами указывает на возможность взаимодействия гликозидов с нуклеозидами путём образования нековалентносвязанного гетероассоциата. Как показал анализ полученных масс-спектров МН не вступает во взаимодействие с нуклеозидами, когда как БН и ПД способны на образование нековалентносвязанных гетероассоциатов, при этом наиболее предпочтительным нуклеозидом для взаимодействия является Urd, а для БН также и Cyd. Другими словами, данные гликозиды проявляют большее сродство к нуклеозидам пиримидинового ряда.

Поскольку молекула гликозида состоит, как уже указывалось, из стероидной и углеводной частей, то вполне целесообразным является также исследование модельных смесей агликонов гликозидов с теми же нуклеозидами на предмет проверки возможности образования гетерокластерных ассоциатов с определенными нуклеозидами. С этой целью мы исследовали модельные смеси неотигогенина и гитогенина с теми же нуклеозидами соответственно.

В полученных масс-спектрах мы обнаружили наличие интенсивных пиков, относящихся к индивидуальным компонентам смеси, но пиков, даже очень низкой интенсивности, которые бы соответствовали образованию гетерокластерных ассоциатов агликонов с нуклеозидами, эти спектры не продемонстрировали. Очевидно, что генины, как и МН, не вступали во взаимодействие с нуклеозидами в данных модельных смесях. Полученный результат хорошо коррелирует с литературными данными о более низкой химической активности генинов и монозидов по сравнению с гликозидами с разветвленной олигозидной цепью [9-11,13].

ВЫВОДЫ

1. Исследование модельных смесей СГ МН, БН и ПД и генинов неотигогенина и гитогенина с нуклеозидами Ado, Cyd, Guo, Thd, Urd показало возможность вступления во взаимодействие СГ с нуклеозидами.
2. Данное взаимодействие выражается в образовании нековалентно связанных ассоциатов СГ с нуклеозидами по типу [СГ + нуклеозид] с присоединением иона натрия или калия. Способность к образованию нековалентно связанных ассоциатов выражена у СГ БН и ПД. БН может взаимодействовать с Cyd и Urd, ПД - только с Urd.
3. МН и генины не проявили способности к взаимодействию с нуклеозидами.

БЛАГОДАРНОСТИ: Авторы благодарят проф. П.К.Кинтя, к.б.н. С.А.Швеца, к.б.н. В.А.Бобейко (Институт генетики Академии наук республики Молдова) за любезно предоставленные препараты стероидных гликозидов и генинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кинтя П.К., Лазуревский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружи А.И., Лях В.А. Структура и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана. Штиинца, Кишинев 1987, 240 с.
2. Jurysta M., Waller G.R. Adv. in experim. med. and biol., 1996, V. 404, p. 565-575.
3. K. Gruiz Adv. in experim. med. and biol., 1996, V. 404, p. 527-537.
4. Сыров В.Н., Кравец С.Д., Хушбакова З.А., Набиев А.Н., Воллернер Ю.С., Горовиц М.Б.// Хим- Фарм. журн. N 5, 1992, с. 71-75.
5. Кемертидзэ Э.П., Пхеидзе Т.А., Качухашвили Т.Н., Умикашвили Р.С., Турова А.Д., Соколова Л.Н.// Хим-Фарм. журн. N 1, 1982, с. 119-121.
6. Рыфф И.М., Крепкова Л.В., Арзамасцева Е.В., Руджянскайте А.Ф., Пучкова В.А., Петрусенко А.Н.// Бюллетень эксперим. биол. N 9, 1988, с. 365-368.
7. Гацура В.В., Кудрин А.Н. Сердечные гликозиды в комплексной терапии недостаточности сердца. М. Медицина, 1983, 204 с.
8. H. Achenbach, H. Hubner, M. Reiter Adv. in experim. med. and biol. 1996, V. 404, p.357-371.
9. Камерницкий А.В., Абубакиров Н.К., Горовиц М.Б. и др. Химия спирастенолов. М., Наука, 1986, с. 176.
10. Физер Л., Физер М. Стероиды. М. Мир, 1964, 982 с.
11. Neftman E. Biochemistry of steroidal saponins and glycoalkaloids. Lloydia, 30,209,1967.
12. Gjumetowa R., Tomowa M., Simowa M. Pharmazie 1982, N 4, p. 296.
13. Ахов Л.С., Головкин Э.А. Физиология и биохимия культ. растений 1998, т. 30, N 2 с.112-123.
14. Takao Konoshima Adv. in experim. medicine and biol., 1996, V. 404, p. 87-101.
15. Maillard M.P., Hastetmann K. J. Chem. 647 N 1, 1993, p. 137-146.
16. Maillard M.P., Hastetmann K. A 673, Planta Medica, N 7, 1992, V. 58.
17. Catherine E. Costello Adv. in experim. med. and biol. , 1996, V. 405, p. 317-331.
18. Waller G.R., Chou C.H., Cheng C.S., West Paul R., Kuei J.C.H., Lai N.N. Proc. Int. Symposium in 1992 on the Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress (1993) p. 419-426.
19. Lee M.K., Ling Y.C., Jurysta M., Waller G.R. Adv. of experim. med. and biol. , 1996, V. 405, p. 353-365.
20. West P.R., Waller G.R., Geno P.W., Oleszek W., Jurysta M. Adv. of experim. med. and biol. , 1996, V. 405, p. 339-353.
21. Sukhodub L.F. Mass Spectrom. Rev., 1995, V. 14, p. 235-254.
22. Калиниченко Т.Г., Аксенов С.А., Чиванов В.Д., Суходуб Л.Ф. Науч.-техническая конф. "Техника и физика электронных систем и устройств", тезисы докладов, Сумы, 1995.
23. Пилипенко В.В., Аксенов С.А., Калинкевич А.Н., Суходуб Л.Ф. II съезд УБФТ, тезисы докладов, Харьков, 1998.
24. Waller G.R., West P.R., Cheng C.S., Ling Y.C., Chou C.H. Bot. Bull. Acad.Sin. (1993) 34: 323-334.

ИЗУЧЕНИЕ РЕДКИХ ТАУТОМЕРОВ 6-ТИОГУАНИНА

Ю.В. Рубин

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, 310164 Харьков, пр. Ленина, 47.

Статья поступила 28 января 1999 г.

С помощью экспериментальных (УФ-абсорбционная и люминесцентная спектроскопия) и теоретического (метод CNDO/S) методов проведено изучение редких таутомеров 6-тиогуанина. Проведенные исследования показали, что спектры УФ поглощения и люминесценции N7H-таутомера тионной формы 6SG смещены в длинноволновую область относительно спектров N9H-таутомера. Предложена последовательность электронно-возбужденных состояний N7H таутомера. Проведенные исследования также показали, что спектр УФ поглощения SH-таутомера 6SG должен быть смещен в коротковолновую область относительно спектров тионных форм.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: УФ спектроскопия, квантово-химические расчеты, 6-тиогуанин, таутомерия.

6-тиогуанин (6SG), который является серосодержащим аналогом гуанина, давно применяется как противоопухолевый препарат [1]. Известно, что 6-тиогуанин включается в ДНК [2]. Молекулярные механизмы его действия связывают, в частности, с образованием многочисленных метаболических блоков, а также с нарушением спаривания в комплементарных парах ДНК после метилирования 6SG в составе ДНК [2,3]. Известна лабильность молекулярной структуры 6SG: в газовой фазе он существует в виде SH-таутомера [4], в кристалле - в виде N7H-таутомера [5], в ДНК и воде - в виде N9H-таутомера [6]. Таутомерия 6-тиогуанина была предметом изучения в ряде теоретических работ [7,8]. Ранее нами было показано существование двух таутомеров 6SG в этанольных растворах [6].

Целью данной работы является подробное теоретическое и экспериментальное изучение спектроскопических свойств редких таутомеров 6-тиогуанина - N7H и SH - таутомеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучали препараты 6-тиогуанина (6SG), 6-тиогуанозина (6SGR) и 10-метил-6-тиогуанозина (10Me6SGR), синтезированные в Институте органического синтеза Латвии. 6SGR моделировал N9H тионный таутомер 6SG, а 10Me6SGR моделировал SH- таутомер 6SG. Исследовали этанольные растворы 6-тиогуанина и 6-тиогуанозина с pH 6. Исследование 10Me6SGR проводили в водных растворах в диапазоне pH 1 - 7. Концентрация исследуемых веществ была 10^{-4} М. В диапазоне pH 1-7 было проведено спектрофотометрическое титрование 10Me6SGR, методика которого описана в работе [9]. Спектры УФ поглощения снимали, а спектрофотометрическое титрование проводили на спектрофотометре Specord. Спектр УФ поглощения N7H-таутомера был получен вычитанием спектра 6SGR, моделировавшего N9H-таутомер, из спектра 6-тиогуанина с учетом сдвига спектра 6-тиогуанозина в длинноволновую область на 2 нм, как это имеет место для гуанина и 4-тиоурацила при присоединении рибозы [9,10]. Спектры люминесценции 6SG снимали на установке, описанной ранее [10], при температуре 77°K и при возбуждении $\lambda=365$ нм, т.е. в области длинноволнового плеча в спектре поглощения 6SG. Более подробно зависимость спектров люминесценции 6SG от длины волны возбуждающего света показана в работе [6]. С помощью полумпирического метода CNDO/S был проведен расчет сил осцилляторов и энергий электронно-возбужденных состояний трех таутомеров 6-тиогуанина и 10Me6SGR, а также зарядов на атомах и порядков связей в основном и возбужденных состояниях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные ранее нами исследования спектров УФ поглощения и люминесценции 6SG и 6SGR показали [6,12], что, хотя в водных растворах спектры поглощения 6SG и 6SGR подобны друг другу, спектры поглощения и люминесценции их этанольных растворов имеют некоторые различия. В частности, в спектре поглощения 6SG имеется длинноволновое плечо, отсутствующее у 6SGR. Наблюдаются также различия асимметрии и полуширин первых полос УФ поглощения 6SG и 6SGR (спектр 6SG уширен по сравнению со спектром 6SGR). Спектры люминесценции 6SG и 6SGR также отличаются по форме спектров и количеству максимумов. Теоретический анализ этих различий

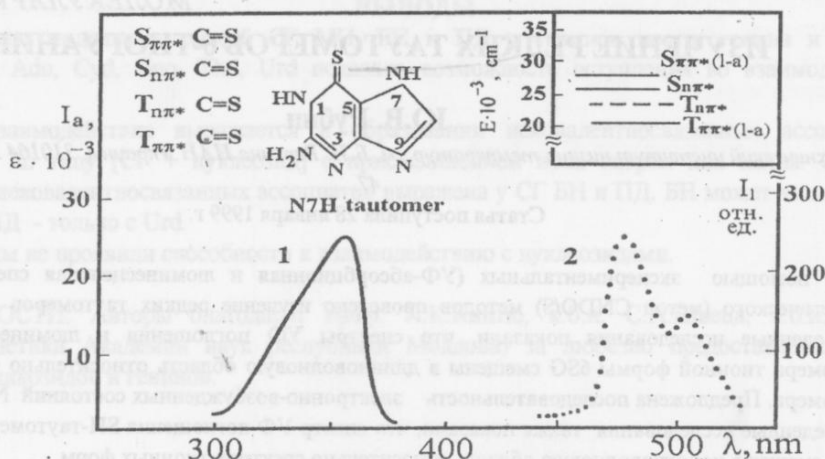


Рисунок 1. Спектры УФ поглощения (1) и флуоресценции (2) N7H-таутомера. Вверху слева- локализация возбуждения, справа- диаграмма возбужденных состояний N7H-таутомера

показал [6], что наблюдаемые различия в спектрах 6SG и 6SGR в этаноле обусловлены присутствием в этанольных растворах 6SG двух таутомеров: N7H и N9H-таутомеров. Нами также было показано, что в полярных растворителях 6SG и 6SGR существуют в тионных формах [6].

Представляет интерес более подробное исследование электронных спектров таутомеров 6SG. На рис.1 показаны спектры УФ поглощения и флуоресценции N7H таутомера. В табл. 1 представлены результаты расчета электронно-возбужденных состояний различных таутомеров 6SG в сопоставлении с экспериментальными данными и данными для N9H-таутомера [6].

Как следует из теоретических расчетов и результатов эксперимента (табл.1), спектр УФ поглощения N7H-таутомера смещен в длинноволновую область относительно спектра N9H-таутомера. Спектр флуоресценции N7H-таутомера (флуоресценция в его спектрах люминесценции отсутствует) также смещен в длинноволновую область относительно спектра флуоресценции N9H таутомера [6], что согласуется с расчетом энергий $T\pi\pi^*$ состояний этих таутомеров (табл. 1). Анализ электронной структуры N7H-таутомера в основном и нижних возбужденных состояниях (порядков связей, зарядов на атомах) позволяет заключить, что возбуждение в синглетных и триплетных состояниях $\pi\pi^*$ типа, а также в состояниях $\pi\pi^*$ типа локализовано на фрагменте $C=S$. Анализ элементов электронной структуры также позволяет сделать заключение, что интенсивная полоса УФ поглощения в области 354 нм является полосой внутримолекулярного переноса заряда (полосой 1-а типа по классификации Каша [13]).

Расчет энергий электронно-возбужденных состояний N7H-таутомера показывает (табл. 1), что нижним по энергии синглетным состоянием должно быть состояние $\pi\pi^*$ типа, как и для N9H-таутомера, для которого существование $\pi\pi^*$ состояния было показано теоретически и обнаружено экспериментально [12]. О наличии нижнего по энергии синглетного состояния $\pi\pi^*$ типа свидетельствует также отсутствие флуоресценции в спектре люминесценции N7H-таутомера, что

Таблица 1. Рассчитанные (Рассч.) и экспериментальные (Эксп.) энергии электронно-возбужденных состояний (Е) и силы осцилляторов (f) различных таутомерных форм 6SG.

Форма	Е (S $\pi\pi^*$)		f	Е $\pi\pi^*$ Рассч.(эв)	Е (T $\pi\pi^*$)	
	Рассч. (эв)	Эксп.(эв,нм)			Рассч. (эв)	Эксп.(эв,нм)
N9H	3.81	3.65 (341)	0.49	3.15	2.87	2.71 (457)
N7H	3.76	3.51 (354)	0.49	3.25	2.80	2.59 (478)
10Me6SGR	4.04	3.98 (311)	0.23	4.96	3.53	-----
SH	4.76	-----	0.28	4.83	3.67	-----

Изучение редких таутомеров 6-тиогуанина

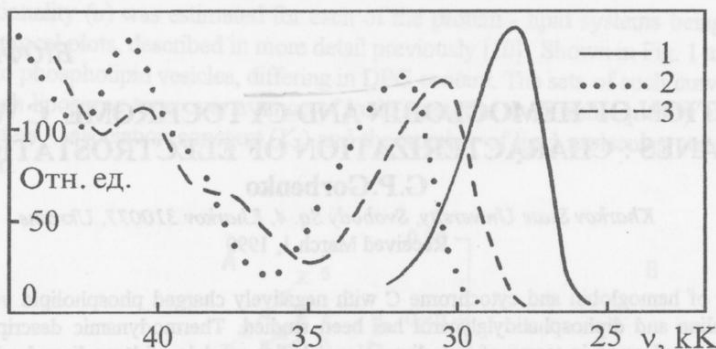


Рисунок 2. Спектры УФ поглощения: N7H-таутомера 6SG (1); нейтральной формы (2) и катиона (3) 10Me6SGR.

согласуется с правилом Каша [13]. Изложенный выше анализ типов электронных переходов в молекуле N7H-таутомера позволяет предложить последовательность возбужденных состояний этой молекулы: S^0 , T_{11}^* (1-a), T_{11}^* , S_{11}^* , S_{11}^* (1-a) (рис 1).

Как было сказано выше, 10Me6SGR является моделью SH-таутомера 6SG. Экспериментально этот таутомер в полярных растворителях не обнаруживается. Изучение электронно-возбужденных состояний 10Me6SGR представляет интерес, т.к. он образуется в ДНК при метилировании 6-тиогуанина [3].

На рис. 2 представлены спектры УФ поглощения нейтральной и катионной форм 10Me6SGR. 10 Me6SGR не способен образовывать анион в интервале pH 1 - 12. Как видно на рисунке, при переходе от нейтральной формы к катионной спектр УФ поглощения 10Me6SGR смещается в длинноволновую область, что характерно для катионов 6-тиогуанина и гуанина [9,12].

Сравнение положения максимумов спектров (рис.2) показывает, что спектр УФ поглощения 10Me6SGR смещен в коротковолновую область спектра относительно спектра УФ поглощения тионных форм 6-тиогуанина (N7H и N9H-таутомеров), что согласуется с результатами теоретических расчетов, приведенных в табл. 1. Сила осциллятора УФ поглощения 10Me6SGR ниже, чем у тионных таутомеров. Из табл. 1 следует, что $\pi\pi^*$ состояние 10Me6SGR расположено выше, чем синглетное состояние $\pi\pi^*$ типа. Таким образом расчет и экспериментальные исследования показывают, что спектральные характеристики SH-таутомера должны быть смещены в коротковолновую область относительно тионных форм.

ВЫВОДЫ

Теоретические и экспериментальные исследования показали, что спектры УФ поглощения и люминесценции N7H-таутомера тионной формы 6SG смещены в длинноволновую область относительно спектров N9H-таутомера. Последовательность электронно-возбужденных состояний N7H таутомера имеет вид: S^0 , T_{11}^* (1-a), T_{11}^* , S_{11}^* , S_{11}^* (1-a)

Проведенные исследования показали, что спектр УФ поглощения SH-таутомера 6SG должен быть смещен в коротковолновую область относительно спектров тионных форм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Химиотерапия злокачественных опухолей - Ред. Н.Н. Блохин - М.: Медицина - 1977.
2. Преображенская М.Н., Мельник С.Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот - ингибиторы нуклеинового обмена // Итоги науки и техники: Сер. Биорг. химия - М.: ВИНТИ - 1984 - Т. 1.
3. Waters T.R., Swann P.F. // Biochem. - 1997 - 36 - P. 2501-2506.
4. Szczepaniak K., Person W.B., Leszczynski J., Kwiatkowski J.S. // Adv. Biochem. - 1995 - 41 - P. 300-312.
5. Bugg C.E., Thewalt U.J. // J. Am. Chem. Soc. - 1970 - 92 - P. 3520-3526.
6. Stewart M., Leszczynski J., Rubin Yu. V., Blagoi Yu.P. // J. Phys. Chem. 1997, 101, P. 4753-4760
7. Leszczynski J. // J. Phys. Chem. - 1993 - 97 - P. 3520-3524.
8. Leszczynski J. // J. Mol. Struct. (Theochem) - 1994 - 311 - P. 37-45.
9. Морозов Ю.В. Бажулина Н.П. Электронное строение и реакционная способность молекул. 1989-М; Наука-288 с.
10. Rubin Yu.V., Savin F.A., Blagoi Yu.P. // Stud. Biophys. - 1988-123, 3-p. 205-215
11. Рубин Ю. В. // В кн Люмин. анализ в мед.-биол. исслед. - Рига РМИ 1983 - С. 246-250
12. Rubin Yu.V., Bokovoy V.A., Blagoi Yu.P. // J. Fluorescence, 1995 - V. 5 - N3 - P. 263-272
13. Нурмухаметов Р.Н. Поглощение и люминесценция ароматических соединений. 1971-М; Химия-216с.

УДК 577.37

БЮФІЗИКА КЛІТИНИ

INTERACTION OF HEMOGLOBIN AND CYTOCHROME C WITH MODEL MEMBRANES : CHARACTERIZATION OF ELECTROSTATIC EFFECTS

G.P.Gorbenko

Kharkov State University, Svobody Sq. 4, Kharkov 310077, Ukraine

Received March 1, 1999

The interaction of hemoglobin and cytochrome C with negatively charged phospholipid vesicles composed of phosphatidylcholine and diphosphatidylglycerol has been studied. Thermodynamic description of the binding process has been performed in terms of two-dimensional lattice models of large ligand adsorption to surface, being modified to distinguish the electrostatic contribution to the binding energy. The electrostatic and nonelectrostatic components of the association constant have been found to exhibit nonmonotonous dependence on the surface charge of lipid bilayer, with the minimum being observed at ca. 20-40 mol % of diphosphatidylglycerol. The results obtained provide arguments in favour of decreasing the contribution of electrostatic effects to the total binding energy upon the increase of the degree of surface occupancy by the protein.

KEY WORDS: hemoglobin, cytochrome C, liposomes, protein - lipid complexes, adsorption models

Model systems containing water soluble proteins and phospholipid vesicles are presently extensively used in elucidating general principles and specific mechanisms underlying association of peripheral membrane proteins with the lipid bilayer [1,2]. Initial step of the protein binding to lipids is thought to be a formation of electrostatic contacts between positively charged amino acid residues and deprotonated phosphate or carboxyl groups of lipid molecules [3]. Despite the apparent simplicity of electrostatic protein - lipid interactions, the factors, governing this process and its possible consequences are not yet fully understood. In considering electrostatic binding of the protein to lipid bilayer one should take into account peculiar properties of the protein - lipid systems, stemming, particularly, from the large size of ligand, effect of area exclusion, nonlocalized character of the adsorption [4-6]. One of the attempts to develop theoretical background for estimation of electrostatic contribution to the binding isotherm has been made by Heimburg & Marsch [7], using the formalism of double layer theory in combination with the two-dimensional Van der Waals gas equation. However, such approach, ignoring specific features of protein - lipid systems, was demonstrated to appreciably underestimate the effect of area exclusion [6]. In this respect it seems reasonable to employ the statements of double layer theory in obtaining the expression for binding isotherm within the framework of formalism, being more appropriate for thermodynamic description of protein - lipid interactions. Such formalism is provided, in particular, by two-dimensional lattice models of large ligand adsorption to surface, proposed by Stankowski [4,5].

In the present study an attempt has been made to employ these models for characterization of electrostatic component of hemoglobin (Hb) and cytochrome C (cyt c) binding to negatively charged liposomes, composed of phosphatidylcholine (PC) and diphosphatidylglycerol (DPG).

MATERIALS AND METHODS

Egg yolk PC and beef heart DPG were purchased from Bakpreparat (Kharkov, Ukraine). Both phospholipids gave single spots by thin layer chromatography in the solvent system chloroform:methanol:acetic acid:water, 25:15:4:2, v/v). Horse hemoglobin was obtained from "Reanal" (Hungary). Beef heart cytochrome C was purchased from Reachim (Russia). Unilamellar phospholipid vesicles were prepared by the method of ethanol injection. 1 ml of the ethanol lipid solution containing appropriate amounts of PC and DPG was injected into 13 ml of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 under continuous stirring. Ethanol was then removed by dialysis. Phospholipid concentration was determined according to the procedure of Bartlett [8]. Protein concentrations were found using extinction coefficients $E_{407}=5.66 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Hb and $E_{407}=1.05 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for cyt C.

RESULTS AND DISCUSSION

The first step of the study was aimed at obtaining binding isotherms, characterizing the formation of protein-lipid complexes. Association of the proteins with liposomes was examined by monitoring the changes of Hb and cyt c absorbance in Soret band maximum (at 407 nm). According to approach, developed in the previous works [9,10], it was assumed that lipid - induced absorbance decrease (ΔA_{407}) is proportional to the concentration of bound protein (B^* , mol/l):

$$\Delta A_{407} = aB^* \quad (1)$$

Interaction of hemoglobin and cytochrome C with model membranes...

Coefficient of proportionality (a) was estimated for each of the protein - lipid systems being studied using the method of double reciprocal plots, described in more detail previously [10]. Shown in Fig. 1 are typical curves of Hb and cyt c binding to phospholipid vesicles, differing in DPG content. The sets of such curves, obtained for 5 - 8 concentrations of each liposome type over a range of ionic strengths, were subsequently analyzed in order to derive binding parameters - association constant (K_a) and the number of lipid molecules per molecule of bound protein (n) at saturation.

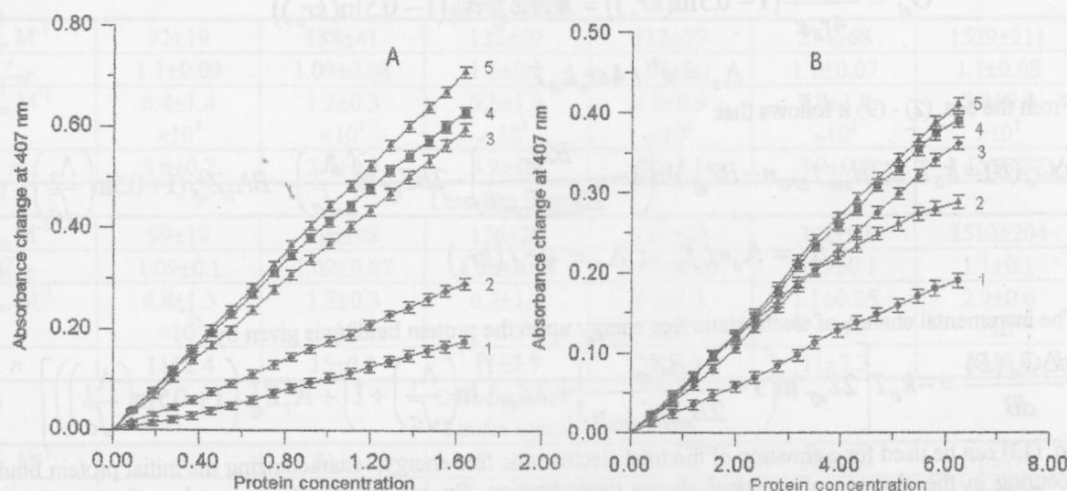


Fig. 1. The isotherms of hemoglobin (A) and cytochrome C (B) binding to liposomes, composed of PC and DPG. DPG content, mol %: A: 1 - 5, 2 - 11, 3 - 25, 4 - 43, 5 - 67; B: 1 - 11, 2 - 25, 3 - 43, 4 - 67, 5 - 100. Lipid concentration, mM: A: 1 - 1.7, 2 - 1.5, 3 - 1.2, 4 - 0.6, 5 - 0.5; B: 1 - 1.5, 2 - 1.2, 3 - 0.6, 4 - 0.5, 5 - 0.2. Temperature - 16° C. Protein concentration is given in μM .

To characterize the contribution of electrostatic effects in the formation of protein - lipid complexes the following approach has been used. The total change of electrostatic free energy upon binding of B protein molecules to the surface can be represented as [7]:

$$\Delta G_{el}(B) = G_{el}^s(B) - G_{el}^s(0) - BG_{el}^P \quad (2)$$

where $G_{el}^s(B)$ and $G_{el}^s(0)$ are the electrostatic free energies of a surface with B protein molecules bound and without any ligands bound, respectively, G_{el}^P is the electrostatic free energy of a protein in solution. Given the neutralization of the surface charge upon the protein adsorption and taking into account that the charge of DPG is $-2e$, the surface charge density is given by:

$$\sigma = - \frac{2ef_{DPG} - eZ_{eff}B^*/L}{f_o} \quad (3)$$

where e is the elementary charge, Z_{eff} is the protein effective charge, L is lipid concentration (in mol/l), f_o is the mean area per lipid molecule, defined as:

$$f_o = f_{PC}S_{PC} + f_{DPG}S_{DPG} \quad (4)$$

where f_{PC} , f_{DPG} are the mole fractions of PC and DPG in the lipid bilayer, S_{PC} , S_{DPG} are the mean areas of PC (0.65 nm^2) and DPG (1.2 nm^2). Within the framework of double-layer theory the electrostatic free energy of the surface is given by:

$$G_{el}^s(B) = 2(2B_{max}f_{DPG}n - BZ_{eff})k_B T \ln \left(- \frac{\Lambda_o \sigma}{\sqrt{c}} \right) \quad (5)$$

$$\Lambda_o = \sqrt{(8000\epsilon_o\epsilon_r N_A k_B T)^{-1}} \quad (6)$$

where B_{max} is the number of bound protein molecules at saturation, k_B is Boltzmann constant, T - temperature, N_A - Avogadro's number, ϵ_o is dielectric permittivity of free space, ϵ_r is dielectric constant of aqueous phase. The electrostatic free energy of the protein in solution can be written as [11]:

$$G_{el}^P = \frac{Z_{eff}^2 e^2}{2(1 + kr_o)r_o \epsilon} \quad (7)$$

$$k = \sqrt{\frac{8000\pi e^2 N_A}{k_B \varepsilon}} \sqrt{\frac{c}{T}} \quad (8)$$

where $\varepsilon = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r$, k is the reciprocal Debye length, r_o is the protein radius, c is the monovalent ion concentration in mol/l. Approximating eq. (7) by logarithmic expression one obtains:

$$G_{el}^P = \frac{Z_{eff}^2 e^2}{4r_o \varepsilon} (1 - 0.5 \ln(kr_o)) = k_B T Z_{eff}^2 \Lambda_2 (1 - 0.5 \ln(kr_o)) \quad (9)$$

$$\Lambda_2 = e^2 / 4\varepsilon r_o k_B T \quad (10)$$

From the eqs. (2) - (9) it follows that:

$$\Delta G_{el}(B) = k_B T \left[2(2B_{max} f_{DPG} n - BZ_{eff}) \ln \left(1 - \frac{BZ_{eff}}{2B_{max} f_{DPG} n} \right) - 2BZ_{eff} \ln \left(\frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}} \right) - B\Lambda_2 Z_{eff}^2 (1 + 0.5 \ln \left(\frac{\Lambda_3}{\sqrt{c}} \right)) \right] \quad (11)$$

$$\Lambda_1 = \Lambda_o e / f_o ; \Lambda_3 = \sqrt{c} / (kr_o) \quad (12)$$

The incremental change of electrostatic free energy upon the protein binding is given by:

$$\frac{d\Delta G_{el}(B)}{dB} = -k_B T \left[2Z_{eff} \ln \left(1 - \frac{BZ_{eff}}{2B_{max} f_{DPG} n} \right) + 2Z_{eff} \left(\ln \left(\frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}} \right) + 1 \right) + \Lambda_2 Z_{eff}^2 \left(1 + 0.5 \ln \left(\frac{\Lambda_3}{\sqrt{c}} \right) \right) \right] \quad (13)$$

Eq. (13) can be used for estimation of the total electrostatic free energy, characterizing the initial protein binding, occurring in the absence of marked charge neutralization. By considering the case when degree of surface coverage $\theta = B / B_{max} = nB / L = nr$; ($B_{max} = L / n$) tends to zero, one obtains the following expression for 'initial' binding constant (K_o):

$$K_o = K_i \exp \left(\frac{\Delta G_{el}(\theta \rightarrow 0)}{k_B T} \right) = K_i \left(\frac{\Lambda_1}{\sqrt{c}} \right)^{2Z_{eff}} \left(\frac{\Lambda_3}{\sqrt{c}} \right)^{0.5\Lambda_2 Z_{eff}^2} \exp(2Z_{eff} + \Lambda_2 Z_{eff}^2) \quad (14)$$

where K_i is the intrinsic binding constant, being independent of electrostatic effects. Ultimately, the expression for binding constant is given by [7]:

$$K_a = K_o \left(1 - \frac{Z_{eff} \theta}{2f_{DPG} n} \right)^{2Z_{eff}} = K_o \left(1 - \frac{Z_{eff} r}{2f_{DPG}} \right)^{2Z_{eff}} \quad (15)$$

By introducing K_a into the binding isotherms of Stankowski [4,5], for linear ligand one obtains:

$$F = K_o^{-1} \left(1 - \frac{Z_{eff} r}{2f_{DPG}} \right)^{-2Z_{eff}} \left(\frac{r}{1 - nr} \right) \left(\frac{1 - (1 - \lambda)nr}{1 - nr} \right)^{n-1} \quad (16)$$

and for disc-like ligand

$$F = K_o^{-1} \left(1 - \frac{Z_{eff} r}{2f_{DPG}} \right)^{-2Z_{eff}} \left(\frac{r}{1 - nr} \right) \exp \left(\frac{\alpha nr}{1 - \omega r} \right) \quad (17)$$

where F is the concentration of free protein, α is the parameter of excluded area ($\alpha = 3$), $\omega = 2\sqrt{3}n / \pi$. The aforementioned approach has been employed to derive effective protein charge, nonelectrostatic (K_i), initial electrostatic (K_o) terms of the binding constant and binding stoichiometry (n). Given that $B = \Delta A_{407} / a$ and using eqs (16), (17) for determination of F , one can calculate the value of the total protein concentration ($P_o = B + F$) for a certain set of parameters n , K_b , K_o , Z_{eff} . The values of these parameters, providing the best fit of experimental data were found by minimizing a function:

$$f = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (P_o^e - P_o^c)^2 \quad (18)$$

where P_o^c and P_o^e are calculated and determined experimentally concentrations of the protein, m is the number of experimental points. The radius of cyt c molecule was taken to be 1.5 nm [12]. Taking into account that Hb is dissociated into dimers in the concentration range being used, the r_o value was assumed to be 2.2 nm [13]. Presented in Table 1 are the binding parameters characterizing Hb and cyt c association with liposomes of various composition. The results obtained for Hb are indicative of nonmonotonous dependence of initial

Interaction of hemoglobin and cytochrome C with model membranes...

Table 1. Binding parameters characterizing the complexes of hemoglobin and cytochrome C with liposomes

DPG content, mol %	5	11	25	43	67	100
Λ_1	2.02	1.93	1.74	1.55	1.35	1.14
Hemoglobin						
Linear ligand						
K_b, M^{-1}	92±19	188±41	122±29	112±27	274±68	1529±211
Z_{eff}	1.1±0.09	1.09±0.08	1.1±0.1	1.08±0.1	1.1±0.07	1.1±0.08
K_o, M^{-1}	6.4±1.4 ×10 ²	1.2±0.3 ×10 ³	6.1±1.3 ×10 ²	4.2±0.9 ×10 ²	7.8±1.8 ×10 ²	3.0±0.8 ×10 ³
n	3.6±0.7	2.4±0.5	5.9±1.3	22±4.1	3.9±0.9	15±3.8
Disc-like ligand						
K_b, M^{-1}	99±19	196±48	126±29	111±23	392±92	1510±204
Z_{eff}	1.09±0.1	1.09±0.07	1.09±0.08	1.08±0.09	1.09±0.1	1.1±0.1
K_o, M^{-1}	6.8±1.5 ×10 ²	1.2±0.3 ×10 ³	6.2±1.3 ×10 ²	4.2±1.1 ×10 ²	1.1±0.25 ×10 ³	2.9±0.6 ×10 ³
n	11±2.4	15±3.1	11±2.7	78±18	11±2.3	34±8.4
Cytochrome C						
Linear ligand						
K_b, M^{-1}		51±11	11±2.4	2±0.5	104±24	315±76
Z_{eff}		3.24±0.7	3.44±0.8	3.49±0.8	3.31±0.7	3.34±0.9
K_o, M^{-1}		9.9±2.2 ×10 ³	1.4±0.3 ×10 ³	1.2±0.2 ×10 ²	2.1±0.4 ×10 ³	2.1±0.5 ×10 ³
n		2.2±0.4	2.5±0.5	2.2±0.5	3.4±0.8	11.6±2.6
Disc-like ligand						
K_b, M^{-1}		53±12	14±3.2	2.4±0.6	148±34	311±73
Z_{eff}		3.39±0.9	3.37±0.7	3.48±0.7	3.35±0.7	3.35±0.8
K_o, M^{-1}		1.3±0.3 ×10 ⁴	1.7±0.4 ×10 ³	1.5±0.3 ×10 ³	3.1±0.7 ×10 ³	2.1±0.5 ×10 ³
n		20±5.2	15±3.3	11±2.7	13±3.2	21±4

'electrostatic' binding constant (K_o) on the surface charge of model membranes - K_o increases with increasing DPG content from 5 to 11 mol %, and from 43 to 100 mol %, while at *ca.* 20 - 40 mol % of DPG minimum K_o values are observed. The intrinsic binding constant exhibits similar behaviour - some decrease of K_i value occurs in the range of DPG contents 11 - 43 mol %. The character of K_o and K_i changes in the case of cyt *c* resembles that observed for Hb - at 43 mol % of DPG these parameters attain minimum values, whereas increasing DPG content to 67 - 100 mol % leads to a drastic increase of nonelectrostatic contribution to binding constant, the effect being especially pronounced for cyt *c* (Table 1). The enhancement of hydrophobic protein - lipid interactions may be mediated by a number of factors including, in particular, the unfolding of protein molecule, that is known to be induced by negatively charged phospholipids [14,15] and structural reorganization of the lipid phase, accompanied by the formation of nonbilayer structures and the protein penetration into aqueous cylinders spanning the bilayer. The data available in the literature suggest high probability of the appearance of nonbilayer structures in the systems, containing DPG and cyt *c* [16], while for Hb such information is still lacking. Another question noteworthy concerns the observation that effective charge of cyt *c* (*ca.* + 3.2 - + 3.4) is appreciably lower than its net charge, being *ca.* + 9. This finding is consistent with that, reported by other authors [3,7] and is explained by several possible reasons: i) repulsion between the molecules of bound protein, ii) finite size of the protein as compared to Debye length and iii) ion condensation at the charged lipid - water interface [7]. It seems of importance to emphasize that association constant (eq. (15)) does not remain unchanged, but decreases with increasing the amount of bound protein because of neutralization of the surface charge. As illustrated in Fig. 2, showing the dependencies of the actual association constant on the degree of protein binding to liposomes, the alterations in the binding conditions in a course of the protein adsorption are especially pronounced for lipid bilayers, possessing relatively low surface charge.

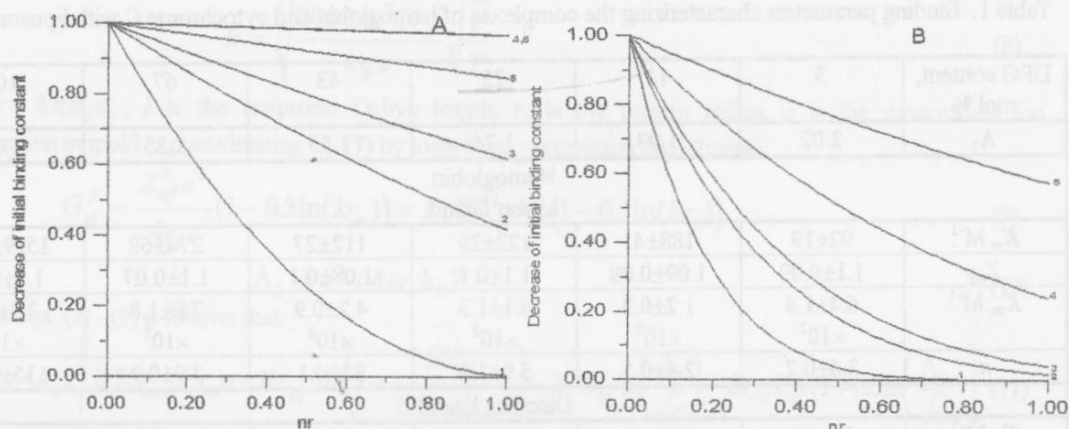


Fig. 2. The plots of actual binding constant (K_a) to initial binding constant (K_c) ratio vs. degree of the protein binding to the lipid bilayer. The curves were calculated from eq. (15) using Z_{eff} and n values presented in Table 1. DPG content, mol %: A: 1 - 5, 2 - 11, 3 - 25, 4 - 43, 5 - 67, 6 - 100; B: 1 - 11, 2 - 25, 3 - 43, 4 - 67, 5 - 100.

CONCLUSIONS

The present study suggests that in analyzing thermodynamic aspects of the protein association with lipid bilayer it is important not only to take into account peculiar statistical properties of lipid - protein systems, but also to consider electrostatic and nonelectrostatic components of the total binding energy. The results obtained for model systems, containing Hb or cyt c and negatively charged liposomes indicate that both electrostatic and nonelectrostatic terms of association constant exhibit strong nonmonotonous dependence on the surface charge of lipid bilayer. The contribution of electrostatic effects into the total binding energy decreases with increasing the fraction of bound protein, thus providing additional possibilities for modulating the character of protein - lipid interactions.

REFERENCES

1. Sankaram M., Marsh D. In Protein - Lipid Interactions. A. Watts, editor. Elsevier, Amsterdam. 1993. P. 127-162.
2. Salamon Z., Tollin G. // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 848-857.
3. Heymann J., Zakharov S., Zhang Y., Cramer W. // Biochemistry. 1996. V.35. P.2717-2725.
4. Stankowski S. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V.735. P.341-360.
5. Stankowski S. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V.777. P.167-182.
6. Chatelier R., Minton A. // Biophys. J. 1996. V.71. P.2367-2374.
7. Heimburg T., Marsh D. // Biophys. J. 1995. V.68. P. 536-546.
8. Bartlett G. // J.Biol.Chem. 1959. V.234 P. 466-472.
9. Горбенко Г.П. // Вісник Харківського університету N 422. 1998. Біофізичний вісник. N 2. С. 69-73.
10. Gorbenko G.P. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1409. P. 12-24.
11. Tanford C. // J.Phys. Chem. 1955. V. 59. P.788-793.
12. Dickerson R., Takano T., Eisenberg D., Kallai O., Samson L., Cooper A., Margoliash E. // J.Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 1511-1535.
13. Вайнштейн Б.К., Борисов В.В. // Успехи биол. химии. 1975. Т. 14. С. 91-145.
14. Marva E., Hubbel R. // Blood. 1994. V.83. P. 242-249.
15. Muga A., Mantsch H., Surewicz W. // Biochemistry. 1991. V.30. P. 7219-7224.
16. de Kruijff B., Cullis P., Verkleij A. et al. in Progress in Protein-Lipid Interactions 1985. Elsevier Science Publisher. P. 89-142.

ВЗАЄМОДІЯ ГЕМОГЛОБІНУ І ЦИТОХРОМУ С З МОДЕЛЬНИМИ МЕМБРАНАМИ: ВКЛАД ЕЛЕКТРОСТАТИЧНИХ ЕФЕКТІВ

Горбенко Г.П.

Харківський державний університет, пл. Свободи 4, Харків, 310077

Досліджували взаємодію гемоглобіну та цитохрому С з негативно зарядженими фосфоліпідними везикулами, сформованими із фосфатидилхоліну і діфосфатидилгліцерину. Аналіз експериментальних даних проведено в рамках двомірних репіткових моделей адсорбції великих лігандів на поверхні, модифікованих з метою оцінки електростатичного вкладу в енергію зв'язування. Виявлена немонотонна залежність електростатичної та неелектростатичної компонент константи зв'язування від поверхневого заряду ліпідного бішару. Отримані результати свідчать про зменшення вкладу електростатичних ефектів в енергію зв'язування при зростанні концентрації сорбованого білка.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемоглобін, цитохром С, ліпосоми, білково-ліпідні комплекси, моделі адсорбції

УДК 577.31.001.57

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

С.В. Гаташ, В.П. Берест, М.А. Воробейчик

Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077

Поступила в редакцию 28 октября 1998 года

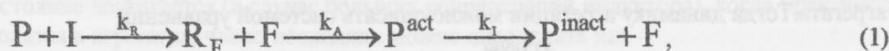
Представлена математическая модель, описывающая динамику агрегации тромбоцитов *in vitro* в условиях действия сдвиговых сил в потоке. Получено аналитическое выражение, связывающее величину изменения оптической плотности клеточной суспензии с размерами образующихся агрегатов. Рассчитаны величины кинетических констант скоростей связывания клеток с агрегатом и отсоединения от него для различных температур и значения энергии активации этих процессов. Обсуждается механизм зависимости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от температуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, агрегация, механизмы, сдвиговые потоки, математические модели, кинетические константы, светопропускание, температура, энергия активации

Несмотря на обилие экспериментальных результатов многие стороны механизма агрегации тромбоцитов остаются не выясненными [1]. Наиболее распространенными методами изучения функции тромбоцитов являются оптические [2]. Предприняты попытки количественного описания экспериментальных кинетических кривых агрегации тромбоцитов, полученных оптическими [3, 4], и кондуктометрическими [5, 6] методами. Достаточно детально рассмотрены математические модели спонтанной обратимой и необратимой агрегации тромбоцитов в сдвиговом потоке различной интенсивности [7-9], определены оптимальные условия образования агрегатов [10]. Однако в литературе практически отсутствуют модели, описывающие динамику образования и распада агрегатов тромбоцитов, вызываемых физиологическими индукторами, и не введены физически обоснованные кинетические параметры этих процессов. Отсутствуют также и математические выражения количественного соотношения между изменением оптической плотности суспензии клеток в процессе агрегации и размерами образующихся агрегатов [11]. В данной работе предложены математическая модель агрегации тромбоцитов, рассматривающая образование агрегата как результат эффективных упругих столкновений частиц шарообразной формы и аналитическая формула, связывающая изменение оптической плотности с размерами агрегатов. Модель применена для определения зависимости кинетических параметров агрегации тромбоцитов от температуры.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Рассмотрим динамику индуцированного процесса образования агрегатов тромбоцитов *in vitro*. Будем считать, что нативные тромбоциты неактивны и не способны объединяться в агрегаты. После взаимодействия с веществом-индуктором клетки переходят в активированное состояние, на поверхности мембран тромбоцитов экспонируются рецепторы для фибриногена, и они становятся способными соединяться друг с другом при сближении, посредством фибриногеновых мостиков между клеточными мембранами [1]. Скорость активации и количество активированных тромбоцитов определяется концентрацией и видом индуктора. В общем виде процесс активации тромбоцитов можно представить следующей схемой:

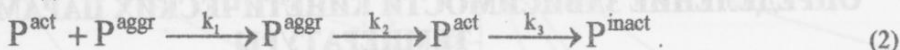


где P , P^{act} , P^{inact} – концентрации (количество) нативных, активированных и инактивированных тромбоцитов, соответственно; I , F , R_F – концентрации молекул индуктора, фибриногена и мембранных рецепторов для фибриногена; k_I – константы скоростей рассматриваемых реакций (взаимодействий).

Здесь мы предполагаем, что скорости обратных реакций много меньше прямых. Если концентрации индуктора и фибриногена – велики, а $k_I \ll k_A$ и $k_I \ll k_R$, что соответствует обычным условиям наблюдения агрегации тромбоцитов *in vitro* и соотношению между величинами характерных времен рассматриваемых реакций, то, при достижении быстрыми динамическими переменными P, I, R_F, F стационарных состояний, можно считать $P^{act} \approx P$ и $P^{inact} \approx 0$. Тогда, рассматривая процесс образования агрегатов тромбоцитов на клеточном уровне, можно принять, что в начальный момент времени практически все тромбоциты (после взаимодействия с индуктором) будут активированными ($P^{act} = P_0$), а количество инактивированных клеток $P^{inact} = 0$.

В начале процесса отдельные тромбоциты будут соединяться между собой. Однако по мере роста агрегатов, в условиях принудительного перемешивания в эксперименте *in vitro*, вероятность объединения

относительно крупных агрегатов между собой становится намного меньше, чем вероятность присоединения отдельного тромбоцита к агрегату, вследствие действия больших сдвиговых сил в потоке. В таком случае, за исключением начальной стадии процесса, рост агрегатов может рассматриваться как результат последовательного присоединения к ним отдельных тромбоцитов. Тогда схема процесса агрегации будет иметь вид



Динамика агрегации тромбоцитов, соответственно схеме (2), будет описываться следующей системой уравнений:

$$\frac{dP^{aggr}}{dt} = k_1 P^{act} P^{aggr} - k_2 P^{aggr}, \quad (3)$$

$$\frac{dP^{act}}{dt} = -k_1 P^{act} P^{aggr} + k_2 P^{aggr} - k_3 P^{act}, \quad (4)$$

$$\frac{dP^{inact}}{dt} = k_3 P^{act}, \quad (5)$$

где k_1 и k_2 - константы скоростей образования и распада агрегатов, соответственно, k_3 - константа скорости инактивации тромбоцитов.

Концентрации (количества) тромбоцитов, находящихся в различных состояниях, связаны между собой очевидным алгебраическим выражением

$$P^{act} = P_0 - P^{aggr} - P^{inact} \quad (6)$$

Однако система уравнений (3) - (5) может описывать только обратимую агрегацию, т. к. при $t \rightarrow \infty$ P^{inact} будет стремиться к P_0 . В случае необратимой агрегации, вызываемой высокими концентрациями индуктора, когда молекул последнего много больше, чем соответствующих рецепторов на мембранах тромбоцитов, будем считать возможной многократную активацию клеток. Учитывая, что скорость активации значительно больше, чем скорость образования клеточных агрегатов, можно ожидать, что инактивированных тромбоцитов будет мало и принять $P^{inact} = 0$. Тогда в системе уравнений (3) - (5) останутся только два первых уравнения.

Поскольку активация тромбоцитов зависит от характера перемешивания и диффузии молекул индуктора, добавляемого в среду, то в начале возникают некие "центры агрегации", которые затем становятся ядрами образующихся агрегатов. На начальной стадии процесса распределение агрегатов по размерам будет достаточно широким. По мере укрупнения агрегатов, учитывая обратную зависимость вероятности объединения частиц от их размеров в сдвиговом потоке, очевидно, будет все больше преобладать процесс присоединения мелких частиц к крупным. С другой стороны небольшие агрегаты будут легче распадаться на отдельные клетки, которые преимущественно будут присоединяться к уже имеющимся крупным агрегатам. Следовательно, со временем распределение агрегатов по размерам будет сужаться и при достижении стационарного состояния можно ожидать, что в суспензии станут преобладать крупные агрегаты близких размеров. Поэтому в дальнейшем будем рассматривать систему состоящую из отдельных активных тромбоцитов и агрегатов.

Предполагая процесс установления связей между клетками обратимым, будем считать теперь, что от агрегата могут отсоединяться только те тромбоциты, которые находятся на его поверхности. В таком случае скорость дезагрегации будет прямо пропорциональна количеству тромбоцитов в поверхностном слое агрегата. Тогда динамику агрегации можно описать системой уравнений

$$\frac{dP^{aggr}}{dt} = k_1 P^{act} A - k_2 P_{surf}^{aggr}, \quad (7)$$

$$\frac{dP^{act}}{dt} = -k_1 P^{act} A + k_2 P_{surf}^{aggr}, \quad (8)$$

где A - количество агрегатов, а P_{surf}^{aggr} - количество тромбоцитов в поверхностном слое агрегатов.

Без учета инактивированных клеток соотношение между числом тромбоцитов (6) принимает вид:

$$P^{act} = P_0 - P^{aggr}. \quad (9)$$

Известно, что мембранные рецепторы для фибриногена расположены равномерно по всей поверхности тромбоцита, а форма активированных клеток близка к шару [12, 13]. Поэтому, при условии

равновероятного соединения тромбоцитов любыми участками поверхности и действия сдвиговых сил в вязкой среде, очевидно, что и форма образующихся агрегатов будет шарообразной. У активированных тромбоцитов после установления связей между клетками в агрегате происходит расслабление цитоскелета, сближение поверхностей и уплотнение клеток в агрегате [14, 15]. Тогда можно считать объем агрегата приблизительно равным сумме объемов, входящих в него тромбоцитов и выразить его размер через известный средний радиус тромбоцита, предполагая, что объем тромбоцита практически не меняется при изменении его формы [16], т.е.

$$R_{\text{aggr}} \approx R_{\text{pl}} N^{1/3}, \quad (10)$$

где R_{aggr} и R_{pl} - радиусы агрегата и тромбоцита, соответственно, N - количество клеток в агрегате.

Для агрегатов, размеры которых существенно больше, чем отдельных тромбоцитов, количество клеток в поверхностном слое можно определить из примерного соотношения

$$4\pi R_{\text{aggr}}^2 \approx \pi R_{\text{pl}}^2 P_{\text{surf}}^{\text{aggr}}, \quad (11)$$

откуда, с учетом (10), для одного агрегата получим

$$P_{\text{surf}}^{\text{aggr}} \approx 4N^{2/3}. \quad (12)$$

Будем считать, что в процессе агрегации количество агрегатов остается постоянным, а изменяются только их размеры и соотношение числа отдельных тромбоцитов и клеток в агрегатах, т.е. $A = \text{const}$, а

$$P^{\text{aggr}}(t) = AN(t). \quad (13)$$

Тогда уравнение для скорости изменения количества тромбоцитов находящихся в агрегатах, подставляя в (7) выражения (12) и (13), можно записать в виде

$$\frac{d(AN)}{dt} = k_1 P^{\text{act}} A - k_2 4N^{2/3} A. \quad (14)$$

Входящие в уравнения (14) константы скоростей k_1 и k_2 будут зависеть от длины свободного пробега частиц между встречами, которая, в свою очередь будет определяться концентрацией частиц и их размерами. В процессе агрегации оба эти параметра будут изменяться, а значит k_1 - будут функциями времени.

Рассмотрим процесс агрегации как результат эффективных упругих столкновений частиц шарообразной формы. Тогда скорость образования агрегатов будет пропорциональна частоте упругих столкновений, которая зависит от эффективного сечения рассеяния. В случае столкновений отдельных тромбоцитов с агрегатами его величина будет функцией времени

$$\sigma_{\text{PA}}(t) = \pi \left(\frac{R_{\text{pl}} + R_{\text{aggr}}(t)}{2} \right)^2. \quad (15)$$

Пренебрегая возможностью объединения агрегатов при столкновениях друг с другом, будем, однако, учитывать возможность их частичного разрушения или отрыва отдельных тромбоцитов с поверхности [7]. Тогда скорость процесса дезагрегации, вызванной упругими столкновениями агрегатов, будет пропорциональна их эффективному сечению рассеяния. Для агрегатов равных размеров

$$\sigma_{\text{AA}}(t) = \pi R_{\text{aggr}}^2(t). \quad (16)$$

Примем, что количество агрегатов в процессе агрегации не изменяется со временем. Тогда, считая, что стационарное состояние достигается (в случае больших концентраций индуктора), когда практически все тромбоциты находятся в агрегатах, число последних можно определить как

$$A = P_0 / N_{\text{max}} = \text{const}, \quad (17)$$

где N_{max} - максимально возможное количество тромбоцитов в одном среднестатистическом агрегате.

Тогда, считая, что в каждый момент времени в системе все агрегаты имеют одинаковые размеры, уравнение (14) преобразуется к виду

$$A \frac{dN}{dt} = k_1 \sigma_{\text{PA}}(t) P^{\text{act}}(t) A - 4k_2 AN^{2/3} - k_3 \sigma_{\text{AA}}(t) A^2. \quad (18)$$

Пусть константа скорости разрушения агрегатов в результате столкновений k_3 будет равна по величине константе k_2 . Тогда, подставляя в уравнение (18) соответствующие выражения из (9) и (15) - (17) с учетом (10), после простых преобразований окончательно получим:

$$\frac{dN}{dt} = k_1 \frac{\pi R_{pl}^2}{4} P_0 (1 + N^{1/3})^2 \left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right) - k_2 N^{2/3} \left(4 + \pi R_{pl}^2 \frac{P_0}{N_{max}}\right). \quad (19)$$

Уравнение (19) описывает динамику изменения количества тромбоцитов в среднестатистическом агрегате, которая будет зависеть от двух кинетических констант k_1 и k_2 , определяющих скорости присоединения тромбоцитов к агрегату и отсоединения от него.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Агрегацию тромбоцитов *in vitro* обычно регистрируют оптическими методами [17]. Однако интерпретация таких результатов неоднозначна из-за отсутствия строгих аналитических зависимостей между измеряемыми оптическими параметрами и составом исследуемой дисперсной системы.

Известно, что для разбавленных клеточных взвесей зависимости оптической плотности и светопропускания от концентрации клеток подчиняются законам Бэра и Бугера-Ламберта-Бэра [18]. Применимость этих законов для суспензии тромбоцитов в плазме подтверждается экспериментальными линейными зависимостями оптической плотности от концентрации тромбоцитов в области $8 \cdot 10^4 - 9 \cdot 10^5$ клеток/мм³ [19]. Однако в случае клеточных взвесей изменение светопропускания будет в основном определяться большой рассеивающей способностью поверхностей клеток, т.е. мутностью среды. Поэтому используемая обычно в биологическом эксперименте величина "оптической плотности", определяемая по изменению светопропускания клеточной суспензии, есть только некий эквивалент оптической плотности среды, лишь постольку, поскольку соответствует зависимости, выражаемой законом Бэра

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = kCl, \quad (20)$$

где I_0 и I - интенсивности падающего и прошедшего света, соответственно, D - оптическая плотность, C - концентрация однородных частиц в среде, l - длина оптического пути (толщина образца), k - коэффициент пропорциональности, зависящий от характера рассеивания света взвешенными частицами (клетками) и оптических свойств среды.

При агрегации тромбоцитов количество клеток в образце остается постоянным, но изменяются со временем размеры и число взвешенных в среде частиц. Распространяя аддитивность закона Бугера-Ламберта-Бэра на присутствующие в суспензии тромбоцитов в плазме при агрегации частицы, оптическую плотность такой системы можно определить выражением

$$D(t) = D_{dm} + v_{pl} S_{pl} P^{act}(t) + v_{aggr} S_{aggr}(t) A l, \quad (21)$$

где D_{dm} - оптическая плотность диспергирующей среды (плазмы крови), S_{pl} и S_{aggr} - эффективные сечения рассеивания тромбоцитов и агрегатов; v_{pl} и v_{aggr} - коэффициенты, характеризующие оптические свойства рассеивающих частиц (клеток и агрегатов) в суспензии.

В начальный момент времени оптическая плотность суспензии тромбоцитов будет определяться выражением

$$D_0 = D_{dm} + v_{pl} S_{pl} P_0 l. \quad (22)$$

Тогда изменение оптической плотности суспензии в процессе агрегации будет описываться уравнением

$$\Delta D = D_0 - D(t) = v_{pl} S_{pl} l (P_0 - P^{act}) - v_{aggr} S_{aggr} l A. \quad (23)$$

Используя для эффективных сечений рассеяния света S_l выражения вида (16) и принимая, что $v_{pl} = v_{aggr} = v$, с учетом выражений (9), (10), (13) и (17) окончательно получим:

$$\Delta D = v \pi R_{pl}^2 l P_0 \left(\frac{N - N^{2/3}}{N_{max}} \right). \quad (24)$$

В стационарном состоянии (при необратимой агрегации) все тромбоциты находятся в агрегатах и если последние будут равных размеров, то стационарное значение оптической плотности суспензии будет определяться выражением

$$\bar{D} = D_{dm} + v \pi R_{pl}^2 l N_{max}^{2/3} A. \quad (25)$$

Тогда максимальное изменение оптической плотности данного образца с учетом (17) будет

$$\Delta D_{max} = D_0 - \bar{D} = v \pi R_{pl}^2 l P_0 (1 - N_{max}^{-1/3}). \quad (26)$$

Из уравнения (26), можно получить выражение для максимального количества тромбоцитов в одном агрегате

$$N_{\max} = \left(1 - \frac{\Delta D_{\max}}{\nu l R_{pl}^2 l P_0} \right)^{-3} \quad (27)$$

Коэффициент пропорциональности ν , характеризующий оптические свойства системы, может быть легко определен по экспериментальной линейной зависимости оптической плотности суспензии тромбоцитов от их концентрации [19]. Тогда, зная начальную концентрацию тромбоцитов P_0 и экспериментально определив $\Delta D_{\max}$, можно по выражению (27) вычислить количество тромбоцитов в среднестатистическом агрегате в стационарном состоянии.

Экспериментальные кривые изменения оптической плотности суспензии тромбоцитов от времени агрегации могут быть описаны системой уравнений (19), (24). При известных величинах параметров ν , l , R_{pl} , P_0 и $N_{\max}$ можно найти оптимальные значения кинетических констант k_1 и k_2 для конкретной экспериментально полученной зависимости.

В данной работе система уравнений (19), (24) решалась с использованием численного метода Рунге-Кутты. Оптимизация величин кинетических констант k_1 , k_2 по экспериментальным данным, приведенным на рис.1, проводилась методом прямого поиска. Выбирались две области оптимального ответа ($\pm 0,01$ отн. ед. ΔD относительно экспериментальных значений) на начальном участке кривой агрегации для константы k_1 и на конечном участке – для k_2 . Путем применения алгоритма ускоренного спуска, поочередно для одной и второй областей оптимизации, находили оптимальные значения кинетических констант при попадании одновременно в обе области ответа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представленная выше математическая модель была использована для изучения характера зависимости агрегации тромбоцитов *in vitro* от температуры образца. Изменение оптической плотности суспензии тромбоцитов человека в плазме определяли по методике и с помощью аппаратуры описанной в [20]. Измерения проводили в области температур 4 – 40°C, с точностью регистрации $\pm 0,1^\circ\text{C}$. В качестве индуктора агрегации использовали раствор АДФ ("Reanal", Венгрия) высокой концентрации (20 мг/мл), вызывающей максимальную устойчивую необратимую агрегацию [21].

Используя экспериментально полученные величины $\Delta D_{\max}$ и $\nu=0,165$, по формуле (27) рассчитаны значения среднего максимального количества тромбоцитов в агрегате $N_{\max}$ для различных температур (рис.2). Были приняты следующие значения параметров: $l=3,0$ мм, $R_{pl}=1,2 \cdot 10^{-3}$ мм, $P_0=2,5 \cdot 10^5$ мм⁻³. Как видно из рис.2 зависимость $N_{\max}$ от температуры имеет экстремальный характер с максимумом около 18°C. Малые величины $N_{\max}$ при низких температурах (до 12°C), вероятно, связаны с тем, что образующиеся в начале процесса агрегации крупные агрегаты – рыхлые и легко разрушаются [16]. Снижение $N_{\max}$ при повышении температуры выше 24°C, вероятно, связано с активированием дезагрегации при этих температурах, а также с отмеченным в [20, 22] фактом преобладания в этой области температур небольших агрегатов, успевших образоваться при больших скоростях активации.

По экспериментальным кривым АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека, полученным оптическим методом (рис.1), оптимизированы величины кинетических параметров образования и распада агрегатов по уравнению (19). Как видно из рис.3,4 теоретические кривые достаточно хорошо согласуются с экспериментальными. Зависимости констант скоростей k_1 и k_2 от температуры носят экстремальный характер. Максимальное значение k_1 соответствует примерно 20°C, k_2 – 18°C (см. рис. 5,6). Наличие максимумов на температурных зависимостях констант скоростей, свидетельствует о существовании как минимум двух факторов, определяющих характер процесса. При повышении температуры до 13-15°C отношение констант k_1/k_2 значительно уменьшается и практически не изменяется при дальнейшем увеличении температуры. По-видимому, при температурах выше комнатных процесс обмена тромбоцитов, находящихся в свободном состоянии и в агрегатах, становится стационарным. В работе [23] получено значение константы скорости необратимой агрегации тромбоцитов $0,012 \text{ с}^{-1}$. Однако, автор рассматривал кинетику формирования агрегата как реакцию второго порядка и основывался на модели образования агрегата Смолюховского.

Зависимости величин констант k_1 и k_2 от температуры в аррениусовых координатах имеют изломы при температуре около 20°C (рис. 5,6). Значения энергии активации (E) процессов образования и распада агрегатов, рассчитанные для этих данных приведены в нижеследующей таблице.

Температура	Энергия активации, кДж/моль	
	образование	распад
4-20°C	187,99	434,72
20-40°C	-118,88	-348,18 (18-24°C)

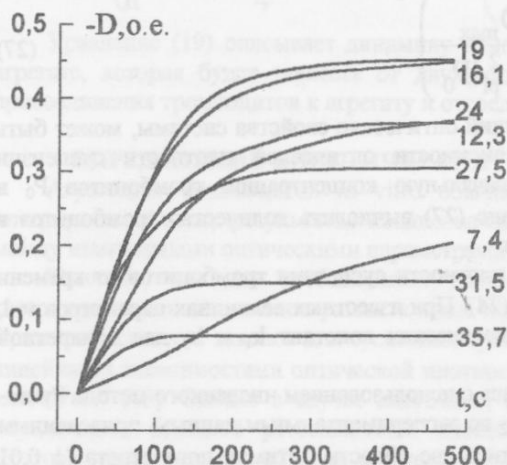


Рис. 1. Кинетические кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека, полученные при разных температурах (значения указаны на графике)

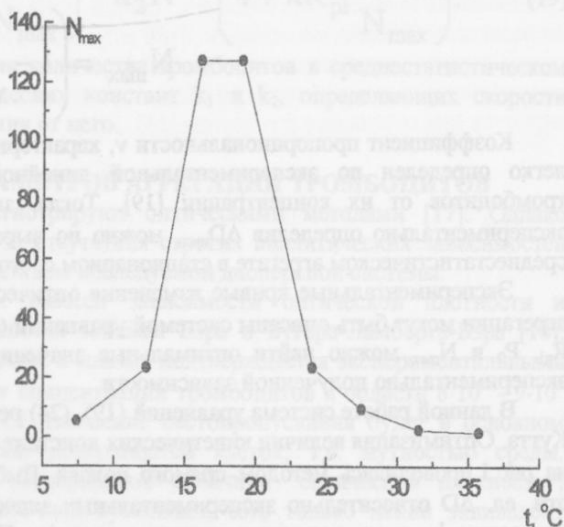


Рис. 2. Зависимость максимального количества тромбоцитов в агрегате от температуры

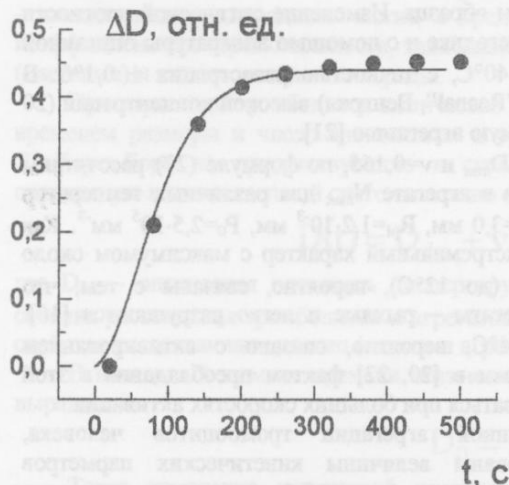


Рис. 3. Теоретическая кривая агрегации тромбоцитов, (рассчитанная по уравнению 19) и экспериментальные точки и для температуры 19 °C.

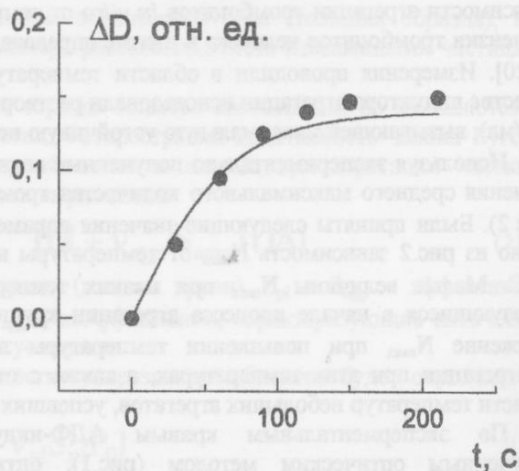


Рис. 4. Теоретическая кривая агрегации тромбоцитов и экспериментальные точки для температуры 31,5 °C.

Авторы [10] показали, что для образования устойчивого агрегата из двух тромбоцитов, находящихся в сдвиговом потоке 10 c^{-1} , достаточно одной связи между клетками посредством молекулы фибриногена. Если учесть, что свободная энергия связывания фибриногена с тромбоцитарным рецептором $33,6 \text{ кДж/моль}$ [24], то можно считать, что образование устойчивой связи тромбоцита с агрегатом есть результат нескольких столкновений. Так авторы [9] показали что лишь одно из тысячи столкновений тромбоцитов в сдвиговом потоке большой интенсивности заканчивается объединением клеток. Можно предположить, что в исследованных условиях, для образования прочной связи между тромбоцитом и агрегатом необходима определенная взаимная пространственная ориентация участков мембран клеток при их соприкосновении. Возможно, играет роль количество занятых фибриногеном рецепторов в области контакта тромбоцит-агрегат, или угол, образуемый молекулой фибриногена с мембранами соприкасающихся клеток. Таким образом возрастает вклад энтропийного компонента в величину энергии активации.

Полученные нами значения E являются некими "эффективными" величинами, определяемыми многими различными стадиями процессов объединения клеток в агрегаты и распада агрегатов. Отрицательные значения E при температурах выше 20°C свидетельствуют только об изменении

направленности результирующих процессов. Возможно, что конформационный переход в молекуле фибриногена при 20°C и структурные изменения мембран тромбоцитов в этой же области температур, отмеченные нами ранее [25, 26], играют определяющую роль в изменении знака и величины E . Авторы [14, 16] высказывают предположение о том, что в основной агрегатов является сеть из белков цитоскелета, мембранных рецепторов Пб-IIIa и внеклеточного фибриногена. По-видимому, структурные изменения в этой сети при 20°C и приводят к изменению энергии активации процесса агрегации тромбоцитов.

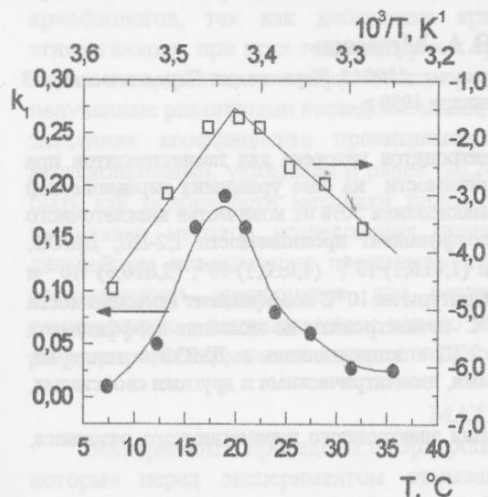


Рис. 5. Зависимость константы скорости образования агрегата (k_1) от температуры и соответствующая аррениусова зависимость.

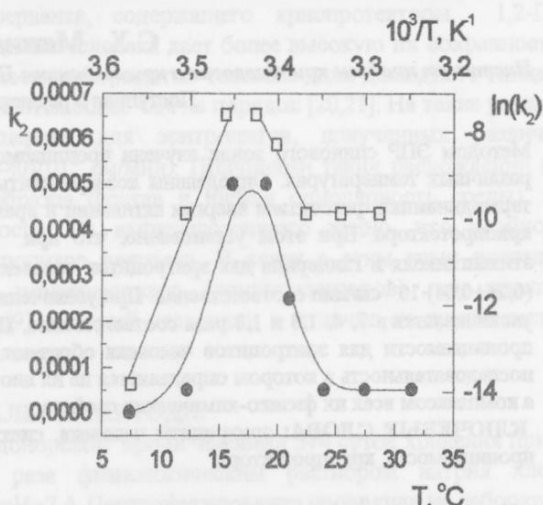


Рис. 6. Зависимость константы скорости распада агрегата (k_2) от температуры и соответствующая аррениусова зависимость.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что экстремальный характер зависимости параметров агрегации тромбоцитов человека от температуры определяется структурными перестройками мембран тромбоцитов и конформационным переходом в молекуле фибриногена при 18-20°C. В результате изменяется энергия активации процессов образования и распада агрегатов. По-видимому, при температурах выше комнатной равновесие в системе образование-распад агрегата сдвигается в сторону распада, что отражается в уменьшении величины отношения констант скоростей соответствующих процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siess W. // *Physiological Reviews*. V. 69, № 1. P. 58-178.
2. Born G.V.R. // *Nature*. 1962. V. 194, № 4832. P. 927-929.
3. Маркосян Р.А., Габбасов З.А., Радин А.Ю., Попов Е.Г. // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1981. Т. 91, № 4. С. 508-510.
4. Neelamegham S., Munn L.L., Zygorakis K. // *Biophysical Journal*. 1997. V. 72, № 1. P. 51-64.
5. Martin I., Dozin B., Quarto R., et al. // *Cytometry*. 1997. V.28, № 2. P. 141-146.
6. Hause L.L., Retzinger G.S., Megan P.A. // *Thromb. Res*. 1989. V. 56, № 2. P. 133-146.
7. Huang P.Y., Hellums J.D. // *Biophysical Journal*. 1993. V.65, № 1. P. 334-343.
8. Huang P.Y., Hellums J.D. // *Biophysical Journal*. 1993. V.65, № 1. P. 344-353.
9. Belval T.K., Hellums J.D. // *Biophysical Journal*. 1986. V.50, № 3. P. 479-487.
10. Вржеш П.В., Верхуша В.В., Варфоломеев С.Д. // *Биофизика*. 1990. Т. 35, вып. 4. С. 637-641.
11. Гаташ С.В., Лакин К.М., Крылов Ю.Ф. и др. // *Фармакол. и токсикол.* 1981. Т. 44, № 5. С. 611-620.
12. Белицер Н.В., Анищук М.Г., Позднякова Т.М., Горкун О.В. // *Цитология и генетика*. 1989. Т.23, № 3. С. 3-7.
13. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // *Биофизика*. 1989. Т.34, вып.2. С. 267-271.
14. Ермолаева Т.А. // *Гематол. и трансфузиол.* 1989. Т. 34, № 2. С. 43-49.
15. Born G.V.R., Hume M. // *Nature*. 1967. V. 215. P. 1027-1029.
16. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. *Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы*. Минск: Университетское, 1990. 104 с.
17. Nicholson N.S., Panzer-Knodle S.G., Haas N.F. et al. // *Am. Heart J.* 1998. V. 135. P. 170-178.
18. Лопатин В.Н., Сидько Ф.Я. *Введение в оптику взвесей клеток*. Новосибирск: Наука. 1988. 240 с.
19. Born G.V.R. // *J. Physiol.* 1970. V. 209. P. 487-494.
20. Берест В.П., Гаташ С.В. // *Фізіологічний журнал*. 1998. Т.44, № 5-6. С. 89-94.
21. Jancinova V., Nosal R., Petrikova M. // *Thromb. Res*. 1992. V. 65, № 1. P.1-11.
22. Trenchard P.M., Jeffery D.M. // *Clin. Phys. Physiol. Meas.* 1989. V. 10, № 1. P. 65-74.
23. Hantgan R.R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. V. 846, № 1. P. 64-75.
24. Marguerie G.A., Thomas-Maison N., Larrieu M.-J., Plow E.F. *Blood*. 1982. V. 59, № 1. P.91-95.
25. Берест В.П., Морозова Т.Ф., Гаташ С.В. // *Вісник ХДУ*. 1998. № 422. Біофіз. вісн. Вип. 2. С. 45-48.
26. Gatash S.V., Berest V.P. // *Eur. Biophys. J.* 1997. V. 26, № 1. P.21

УДК 612.111:577.352.464

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ

С.Х. Межидов, В.А. Монсеев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 310015, Харьков, ул. Перелазская, 23
Поступила в редакцию 5 января 1999 г.

Методом ЭПР спинного зонда изучена проницаемость эритроцитов человека для неэлектролитов при различных температурах. Определены коэффициенты проницаемости на базе уравнения неравновесной термодинамики, рассчитана энергия активации и время проникновения 50% от количества внеклеточного криопротектора. При этом установлено, что при 0 °С коэффициент проницаемости 1,2-ПД, ДМСО, этиленгликоля и глицерина для эритроцитов человека равен $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$, $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$, $(2,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$ и $(0,26 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$ см/мин соответственно. При увеличении температуры на 10 °С коэффициент проницаемости увеличивается в 7, 4, 1,8 и 1,8 раза соответственно. При 10 °С неэлектролиты по величине коэффициента проницаемости для эритроцитов человека образуют ряд 1,2ПД > этиленгликоль > ДМСО > глицерин, последовательность в котором определяется не их лиотропными, диэлектрическими и другими свойствами, а комплексом всех их физико-химических свойств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты человека, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса, проницаемость, криопротекторы

Изучению проницаемости клеток для неэлектролитов и электролитов посвящено достаточно большое число экспериментальных [12,17,20,21,22,23] и теоретических работ [1,5,6,16,18,24], так как выяснение механизмов, лежащих в основе регуляции клеточной проницаемости, имеет большое значение не только для определения оптимальных условий криоконсервирования биологических объектов при низких температурах, но и для биологии в целом. Однако до сих пор остаются неясными многие стороны клеточной проницаемости.

Исследование проницаемости эритроцитов человека для неэлектролитов ведутся давно [16,17,21]. Однако до сих пор нет данных по систематическому исследованию проницаемости эритроцитов для различных криопротекторов при различных температурах. Так Джекобс [16,17] провел исследование проницаемости эритроцитов человека и различных млекопитающих для глицерина, этиленгликоля гемолитическим методом. При этом было определено время гемолиза эритроцитов при различных температурах. Орсков [21] исследовал проницаемость эритроцитов для глицерина оптическим методом в диапазоне температур 0-37 °С и установил, что при изменении температуры на 10 °С константа скорости изменяется в 1,8-2 раза. Коэффициент проницаемости для глицерина при 0 °С $\sim 0,23 \cdot 10^{-5}$ см/мин и $\sim 0,87 \cdot 10^{-5}$ см/мин при 20 °С (рассчитаны из графических данных). Стейн [22,23] оптическим методом определил время, в течение которого проникает 50% от количества внеклеточного вещества ($t_{1/2}$) в эритроциты человека при 10-30 °С. Значения $t_{1/2}$ для 1,2-пропандиола (1,2-ПД) 20% - 101 с, глицерина - 30% - 90 с (20 °С), этиленгликоля 20% - 65 с (определены из графических данных путем экстраполяции). Высокая скорость проникновения глицерина при больших его концентрациях объяснена образованием димеров глицерина с переносчиком глицерина [22,23,24]. Мазур и Миллер [20] исследовали проницаемость эритроцитов человека для глицерина гемолитическим методом и определили, что коэффициент проницаемости (Р) при 20 °С составляет $2,5 \cdot 10^{-4}$ см/мин, а при 0 °С - $1,0 \cdot 10^{-4}$ см/мин. При использовании оптического метода Левит и Млекодей [19] получили значение коэффициента проницаемости этиленгликоля для эритроцитов человека $3,9 \cdot 10^{-4}$ см/с ($2,3 \cdot 10^{-2}$ см/мин) (23 °С). Используя эти данные, а также данные по влиянию блокаторов проницаемости на трансмембранные потоки, они пришли к выводу о существовании независимых транспортных систем для растворителя и растворенных веществ. Однако Тун и Соломон [26] на основании собственных исследований пришли к выводу, что проницаемость мембран эритроцитов для воды все же коррелирует с проницаемостью этиленгликоля и мочевины, на основании чего сделали вывод о прохождении этих веществ через одни и те же поры в мембране. Свенсон и соавт. [25] исследовали проницаемость мембран лизосом из клеток печени крыс для 43 органических веществ (неэлектролитов) с молекулярной массой 62-1000. Было показано, что имеет место отрицательная корреляция между скоростью проникновения этих вещества в лизосомы и с их способностью к образованию водородных связей с водой (для ОН-группы способность образовывать водородные связи считали равной 2).

Зинченко [2] считает, что ряд связывающей способности, построенный Свенсоном и соавт. [25], соответствует достаточно слабым водородным связям исследованных веществ с водой.

Приведенные выше данные показывают, что основное внимание в большинстве работ уделялось изучению механизмов транспорта веществ через мембраны, измерению трансмембранных потоков и определению коэффициента проницаемости. Следует отметить, что данные по исследованию проницаемости эритроцитов человека при 0-10 °C единичны [22,23]. Этот диапазон важен для криобиологов, так как добавление криоконсерванта, содержащего криопротекторы 1,2-ПД и этиленгликоль, при этих температурах к эритроцитам человека дает более высокую их сохранность [4]. Кроме того, данные по коэффициенту проницаемости эритроцитов человека даже для одного глицерина, полученные различными исследователями, отличаются более чем на порядок [20,21]. На такие различия в значениях коэффициента проницаемости глицерина для эритроцитов, полученных различными исследователями, указывали и ранее [20,24] ($(3 \pm 4) \cdot 10^{-5}$ см/мин). Причинами таких расхождений могут быть как особенности методики подготовки образца (состав и низкая осмолярность среды), так и недостатки методов исследования проницаемости. Из вышеизложенного видно, что необходимы дальнейшие исследования проницаемости эритроцитов человека. В связи с этим нами исследована проницаемость эритроцитов для различных неэлектролитов (криопротекторов) при различных температурах с использованием нового метода [9], который позволяет, в отличие от других методов, регистрировать изменение внутриклеточного объема.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на эритроцитах донорской крови человека 3-4 суток хранения при 4 °C, которые перед экспериментом отмывали 3 раза физиологическим раствором натрия хлорида, приготовленным на натрий-фосфатном буфере с pH=7,4. Центрифугирование проводили на лабораторной центрифуге ОПН-3 при 3000 в течение 15 мин.

Эритромассу объемом 5 мкл помещали в кварцевый капилляр диаметром 1,5-2 мм. Над эритромассой на расстоянии 10-15 мм помещали раствор, содержащий криопротектор - 20%, зонд 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксид (ТЕМПОН) - $10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, ферроцианид калия - 0,10 моль/л (раствор держится за счет капиллярных сил). Капилляр помещали в резонатор спектрометра электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) "Bruker" ER-100 D (ФРГ). Температуру в резонаторе поддерживали температурной приставкой с точностью ± 1 °C. После выдержки в течение 5 мин раствор смешивали с эритромассой и перемешивали 10-15 с при помощи немагнитной проволоки, которую опускали в капилляр до уровня раствора с самого начала. После удаления проволоки настраивали прибор (20-30 с) и записывали центральную компоненту (h_0) первой производной спектра поглощения (ППСП) ЭПР зонда ТЕМПОН. Подробное описание методики дано в нашей работе [9].

Все реактивы, которые использованы в работе были марки ХЧ или ЧДА. Препараты не соответствующие этим требованиям очищали перекристаллизацией или перегонкой. Растворы готовили весовым методом.

Для расчета коэффициента проницаемости использовали уравнение, которое получил Гордиенко [1] на базе уравнений неравновесной термодинамики Кадем и Катчальского [18]

$$P = -(1 - g_0 h_\infty) \cdot \ln((h_\infty - h_t) / h_\infty) / (g_0 + (1 - g_0) / (1 - \alpha)) t \gamma \quad (1),$$

где $g_0 = 0,5$, $\alpha = 0,35$, $h_\infty = h_t$ при $t = \infty$, $\gamma = S/V$, h_∞ , h_t - интенсивности центральной компоненты ППСП ЭПР зонда ТЕМПОН при $t = \infty$ и при текущем времени соответственно; площадь поверхности эритроцита $S = 109$ мкм², а объем $V = 63$ мкм³ [15]. Результаты исследований обрабатывались статистически с учетом коэффициентов Стьюдента при доверительной вероятности 95% ($P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении экспериментов выяснилось, что процесс проникновения 1,2-ПД и ДМСО при 20 °C завершается в течение 30-40 сек, что не позволило определить скорость их проникновения при этой температуре. Кинетика проникновения различных криопротекторов при 10 °C в эритроциты человека представлена на рис. 1 (по одной кривой). Видно, что кинетика проникновения криопротекторов в эритроциты человека регистрируется достаточно хорошо.

Результаты расчетов представлены в табл. 1, из которой видно, что увеличение температуры от 0 до 10 °C приводит к увеличению коэффициента проницаемости для 1,2-ПД, ДМСО, этиленгликоля и глицерина в 7, 4, 1,8 и 1,8 раза соответственно. Следует отметить, что P для глицерина и этиленгликоля увеличивается в обоих случаях почти в 2 раза при увеличении температуры от 0 до 10 °C. Для ДМСО и

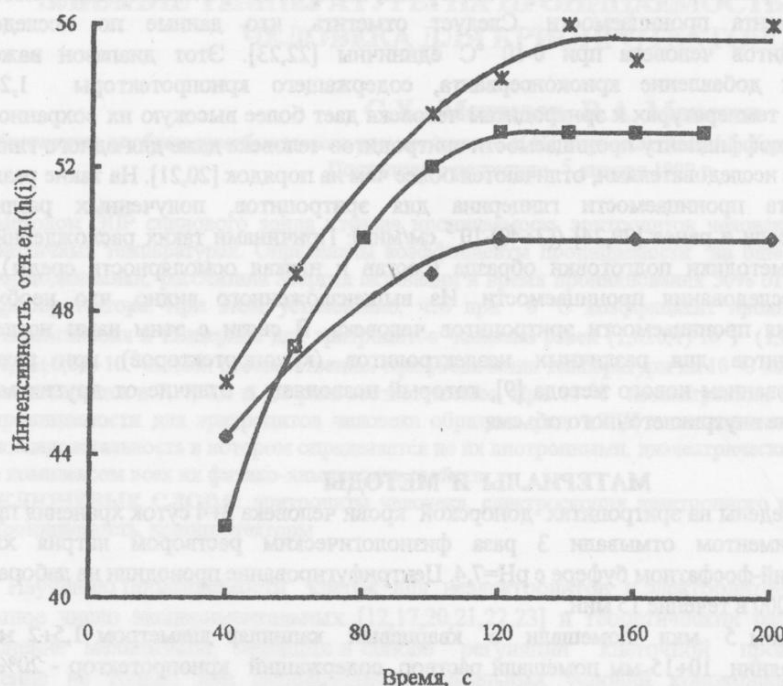


Рис. 1. Кинетика проникновения криопротекторов (20%) в эритроциты человека при 10 °C: этиленгликоль (♦), диметилсульфоксид (✱), 1,2-пропандиол (■).

Таблица 1. Зависимость коэффициента проницаемости эритроцитов от температуры и вида криопротектора (20%). Глицерин* - 30%.

	0 °C	5 °C	10 °C	20 °C
	$P \cdot 10^{-5}$ см/мин			
1,2-пропандиол	1,0±0,1	3,1±1,8	7,3±1,9	-
ДМСО	1,0±0,1	1,6±0,1	3,9±1,3	-
Этиленгликоль	2,8±0,6	3,2±1,0	4,9±0,4	-
Глицерин*	0,29±0,03	-	0,52±0,07	1,6±0,2
Глицерин	0,26±0,04	-	-	-

1,2-ПД отмечается значительное увеличение коэффициента проницаемости в том же диапазоне температур по сравнению с данными для глицерина и этиленгликоля. Такое увеличение P , по-видимому, связано с особенностями строения этих криопротекторов (наличие в их структуре метильных групп). Возможно, что здесь играет роль и растворимость криопротекторов в липидах. Так нами был приготовлен 10% раствор лецитина в 1,2-ПД, чтобы изучить его влияние на сохранность клеток при криоконсервировании.

Данные по константам скоростей проникновения криопротекторов в эритроциты (их среднее арифметическое значение) при различных температурах были использованы для расчета энергии активации (E) процесса проникновения. Результаты таких расчетов представлены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что изменение энергии активации в диапазоне температур 0 ÷ 10 °C больше выражено для 1,2-ПД затем для ДМСО. Такие различия в энергии активации, по-видимому, обусловлены теми же причинами, которые нами указаны выше, для объяснения различий в коэффициентах проницаемости.

Данные по коэффициенту проницаемости глицерина при 0 °C близки к данным, которые получил

Таблица 2. Зависимость энергии активации транспорта различных криопротекторов (20%) в эритроциты от температуры. Глицерин* - 30%.

	Энергия активации, ккал/моль	
	0 - 10 °С	0 - 20 °С
1,2-пропандиол	26,8	-
ДМСО	18,5	-
Этиленгликоль	6,2	-
Глицерин*	5,7	9,3

Орсков [21] ($\sim 0,23 \cdot 10^{-5}$ см/мин, определен из графических данных зависимости k от температуры, при $V = 63 \text{ мкм}^3$, $S = 109 \text{ мкм}^2$). Значения $P = 1,6 \cdot 10^{-5}$ см/мин при 20 °С больше, чем данные работы [21] при той же температуре ($\sim 0,87 \cdot 10^{-5}$ см/мин), но меньше диапазона значений P , который приведен в работе [24] ($(3+40) \cdot 10^{-5}$ см/мин). Значение энергии активации 9,3 ккал/моль в диапазоне температур 0+20 °С для глицерина близки к данным литературы 7,2 ккал/моль [20]. Имеющееся различие в коэффициенте проницаемости по сравнению с данными, которые приведены в работе [24], связано с различиями в методе его расчета, что станет очевидно при его расчете на основе уравнения Фика. Значение P для 20% растворов при 0 °С было: глицерин - $0,67 \cdot 10^{-5}$, 1,2-ПД - $2,6 \cdot 10^{-5}$, ДМСО - $2,5 \cdot 10^{-5}$, этиленгликоль - $6,9 \cdot 10^{-5}$ см/мин, что больше данных, приведенных выше, в $\sim 2,5$ раза. Этот результат становится очевидным, если мы сравним уравнения, которые получены на основе неравновесной термодинамики [1] и закона Фика [9]

$$P = -(1 - g_o h_o) \cdot \ln(h_o - h_i) / h_o / (g_o + (1 - g_o) / (1 - \alpha)) t \gamma \quad (1)$$

$$P = -\ln((h_o - h_i) / h_o) / t \gamma \quad (2),$$

В уравнении (2) сделаны преобразования с учетом того, что $k = P A/V$ и $\gamma = S/V$. Видно, что эти два уравнения отличаются на константу равную $(1 - g_o h_o) / (g_o + (1 - g_o) / (1 - \alpha)) = (1 - 0,5 \cdot 1) / (0,5 + (1 - 0,5) / (1 - 0,35)) = 0,394$, т.е. коэффициенты проницаемости, полученные на основе уравнений неравновесной термодинамики, меньше в 2,5 раза чем те, которые получены на основе закона диффузии Фика.

Для глицерина при 20 °С $P = 4,0 \cdot 10^{-5}$ см/мин совпадает с данными литературы $(3+40) \cdot 10^{-5}$ см/мин [20,24], а значение энергии активации 9,3 ккал/моль близко к значению 7,2 ккал/моль, полученному ранее [20]. Более выраженное изменение константы скорости и энергии активации в диапазоне температур 10+20 °С (12,3 ккал/моль), чем в диапазоне температур 0+10 °С, по-видимому, связано с тем, что при температуре выше 10 °С завершается процесс плавления основной массы липидов эритроцитарной мембраны [3]. Кроме того, отмечено, что при повышении температуры с 10 до 20 °С происходит более выраженное уменьшение времени корреляции вращательной диффузии спинного зонда как в мембране эритроцитов, так и в их цитоплазме, чем в диапазоне температур 0+10 °С [8,13,14]. Это указывает на уменьшение микровязкости липидной матрицы и цитоплазмы эритроцитов, что могло привести к соответствующим изменениям скорости проникновения криопротекторов. Таким образом, по нашим данным коэффициент проницаемости глицерина в диапазоне температур 10-20 °С претерпевает более выраженное увеличение (более чем в 3 раза) по сравнению с данными литературы (около 2 раз) [21], в то время как данные в диапазоне температур 0-10 °С совпадают.

Расчет времени проникновения в эритроциты 50% криопротектора от его количества, которое находится во внеклеточной среде ($t_{1/2}$), проводился по формуле

$$t_{1/2} = -0,394 \cdot \ln((h_o - h_i) / h_o) P \gamma = -0,394 \cdot \ln(1/2) / P \gamma \quad (3),$$

где $h_i = h_o/2$.

Результаты расчетов представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что за достаточно малое время происходит проникновение 50% от количества внеклеточного криопротектора. Вполне понятно, что $t_{1/2}$ отражает константу скорости проникновения криопротекторов в эритроциты человека. Данные, полученные нами по $t_{1/2}$ для глицерина при 20 °С несколько меньше, чем данные Стейна (~ 90 с) [22,23]. Данные по $t_{1/2}$ для 1,2-ПД (~ 101 с) близки к данным, полученным при 0 °С, а данные для этиленгликоля отличаются почти в 2 раза. Следует отметить, что в работе [22,23] изучалась проницаемость эритроцитов при температурах 10 °С и выше. Кроме того, данные для 1,2-ПД больше, чем данные для

Таблица 3. Зависимость времени проникновения 50% от количества внеклеточного криопротектора ($t_{1/2}$) в эритроциты от температуры и вида криопротектора (20%). Глицерин* - 30%.

	$T_{1/2}, \text{с}$			
	0 °C	5 °C	10 °C	20 °C
1,2-пропандиол	95,0±9,5	32,0±16,6	12,9±3,8	-
ДМСО	98,3±15,0	60,7±3,9	24,8±8,6	-
Этиленгликоль	34,4±7,4	30,3±10,3	19,2±1,5	-
Глицерин*	328,0±146,0	-	182,0±26,0	59,3±6,0
Глицерин	361,0±50,0	-	-	-

глицерина. Полученные результаты не дают оснований для вывода, что транспорт не электролитов, и в частности глицерина, внутрь эритроцитов осуществляется переносчиками, а указывают на возможность простой диффузии. Этот вывод не согласуется с объяснением Стейна [22,23] высокой скорости проникновения глицерина в эритроциты наличием переносчиков. Возможно, причиной такого расхождения является то, что при высокой концентрации криопротектора глицерина имеет место простая диффузия, на что указывали исследователи и ранее [6].

Увеличение коэффициента проницаемости глицерина и этиленгликоля на одинаковую величину ~2 раза при увеличении температуры на 10 °C указывает на возможность их транспорта через один и тот же канал. Этот вывод находит свое подтверждение и в том, что проницаемость обоих криопротекторов блокируется Cu^{2+} [20]. Транспорт глицерина и этиленгликоля блокировал также Ni^{2+} , в то время как транспорт ДМСО и 1,2-ПД, в этих условиях не блокировался, что указывает на возможность транспорта последних двух криопротекторов через другие каналы.

Таким образом, по величине коэффициента проницаемости при температуре 10 °C криопротекторы образуют ряд: 1,2-ПД > этиленгликоль > ДМСО > глицерин, последовательность в котором не согласуется с рядом последовательности, который они образуют по величине коэффициента распределения в системах хлороформ/вода и оливковое масло/вода (лиотропный ряд) и имеет вид ДМСО > 1,2-ПД > этиленгликоль > глицерин [6,10]. Не согласуется этот ряд последовательности также и с рядом последовательности, который они образуют по величине диэлектрической проницаемости их растворов, имеющего вид, этиленгликоль > 1,2-ПД > глицерин > ДМСО [7,11]. Кроме того, этот ряд последовательности не согласуется и с рядом их последовательности, который они образуют по количеству связанной с криопротектором воды, так как тогда скорость проникновения ДМСО должна быть выше, чем у 1,2-ПД и этиленгликоля, а у них она наоборот больше. При этом считали число молекул воды, связанных с криопротектором, исходя из того, что одна ОН-группа связывает 2 молекулы воды, как и в работе [26], так как химический сдвиг второй молекулы воды, связанной с криопротектором, все таки отличается от химического сдвига молекулы воды находящегося в этом растворе, но не связанного с криопротектором [2]. В связи с вышеизложенным следует полагать, что скорость проникновения криопротектора определяется комплексом его физико-химических свойств. К ним следует отнести, кроме перечисленных выше, еще размеры молекул, энергию связи криопротектора с молекулами воды, влияние криопротекторов на вязкость примембранного не перемешиваемого слоя и т.д.

ВЫВОДЫ

Криопротекторы по скорости проникновения в эритроциты человека при 10 °C образуют ряд 1,2ПД > этиленгликоль > ДМСО > глицерин, последовательность в котором определяется комплексом всех их физико-химических свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. - Киев: Наукова думка, 1994. - 144 с.
- Зинченко В.Д. Процессы метаболизма макроэргических соединений и трансмембранного переноса неэлектролитов и ионов водорода в условиях криоконсервирования: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.22. - Харьков, 1994. - 36 с.
- Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. - М.: Наука, 1981. - 296 с.
- Кирошка В.В. Значение факторов среды в обеспечении устойчивости эритроцитов к действию витрифицирующих концентраций проникающих криопротекторов: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. - Харьков. - 1997. - 132 с.
- Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. - Москва: Наука, 1986. - 256 с.
- Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. - Москва: Мир, 1980. - 341 с.

7. Марковский А.Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. - Харьков, 1984. - 200 с.
8. Межидов С.Х., Моисеев В.А. // Криобиология. - 1987. - №4. - С. 49-50.
9. Межидов С.Х., Нардид О.А., Моисеев В.А. // Биофизика. - 1996. - №6. - С. 1278-1283.
10. Пичугин Ю.И., Новиков А.Н., Олейник С.Т. // Криобиология и криомедицина. - 1984. - №14. - С. 12-13.
11. Пичугин Ю.И. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. - Харьков, 1988. - 120 с.
12. Трошина А.С. Распределение веществ между клеткой и средой. - Л.: Наука, 1985. - 191 с.
13. Цымбал Л.В., Гаврилова И.И., Моисеев В.А. // Криобиология. - 1988. - №1. - С. 7-10.
14. Цымбал Л.В., Моисеев В.А. // Проблемы криобиологии. - 1992. - №2. - С. 13-20.
15. Чижевский А.Л. Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. - Новосибирск: Наука, 1980. - 177 с.
16. Jacobs M.N. // J. Cell. and Comp. Physiol. - 1934. - 4. - P. 161-183.
17. Jacobs M.N. // J. Cell. Comp. Physiol. - 1935. - 5. - P. 197-225.
18. Kadem O., Katchalsky A. // BBA. - 1958. - 27. - P. 229-246.
19. Levitt D.G., Mlekodoy H.Y. // J. Gen. Physiol. - 1983. - 81. - №2. - P. 239-253.
20. Mazur P., Miller R.M. // Cryobiology. - 1976. - 13. - №5. - P. 507-522.
21. Orskov S.L. // Biochem ztschr. - 1935. - Bd 279. - S. 241-249.
22. Stein W.D. // Biochem. Biophys. Acta. - 1962. - 59. - №1. - P. 35-46.
23. Stein W.D. // Biochem Biophys. Acta. - 1962. - 59. - №1. - P. 47-65.
24. Stein W.D. The movement of molecules across cell membranes. - New York-London: Academic Press, 1967. - 369 p.
25. Svenson G.P., Bird S.Y., Lloyd J.B. // Biochem. J. - 1989. - №2. - P. 451-456.
26. Toon M.R., Solomon A.K. // Biochem. et Biophys. Acta. - 1990. - 1020. - P. 239-253.

УДК 612.111:576.311.32

ВЛИЯНИЕ ОСМОЛЯРНОСТИ СРЕДЫ НА МИКРОВЯЗКОСТЬ ЦИТОПЛАЗМЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Межидов С.Х., Моисеев В.А.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 310015, Харьков, ул. Перелазовская, 23
Поступила в редакцию 5 января 1999 г.

Методом ЭПР спинного зонда изучена зависимость времени корреляции вращательной диффузии (ВКВД= τ_c) спинного зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от осмолярности внеклеточной среды и концентрации 1,2-пропандиола (1,2-ПД). При этом обнаружено, что при концентрации натрия хлорида, калия хлорида, сахарозы и глюкозы выше 0,8 моль/л отмечается отклонение от линейной зависимости, что связано с выходом из эритроцитов основной массы свободной воды. Установлено наличие различий в τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов в зависимости от концентрации 1,2-ПД при концентрациях натрия хлорида до 0,8 моль/л, которые обусловлены зависимостью вязкости внутриклеточного водного раствора от концентрации криопротектора в силу наличия в эритроцитах достаточного количества свободной воды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты человека, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса, микровязкость цитоплазмы, осмолярность внеклеточной среды.

Влияние температуры и криопротекторов на состояние цитоплазмы эритроцитов исследовали и ранее [9,11]. Однако эритроциты перед замораживанием находились в физиологических условиях, а исследовать процессы, протекающие в диапазоне отрицательных температур (0÷-10 °С), не удается из-за переохлаждения системы. Данные, полученные на этапе отогрева, не в полной мере отражают процессы, протекающие в этом диапазоне температур, из-за явлений гистерезиса.

Проведенные ранее исследования [3] охватывали диапазон концентраций натрия хлорида 0,15~1,2 моль/л (конечная концентрация в надосадке). Но известно, что на этапах замораживания концентрация натрия хлорида может достигать 4 моль/л и более [1]. В связи с этим нами исследовано влияние концентраций различных веществ на τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на эритроцитах донорской крови человека 3+5 суток хранения при 4 °С. Перед экспериментом эритроциты отмывали 3 раза физиологическим раствором натрия хлорида, приготовленным на 5 ммоль/л натрий-фосфатном буфере с pH 7,2. Центрифугировали на лабораторной центрифуге Опп-3 при 3000 об/мин в течение 15 мин. Для получения необходимой концентрации исследуемого вещества во внеклеточной среде его растворы с соответствующей концентрацией добавляли к эритромассе 1:10. Все растворы содержали 5 ммоль/л натрий-фосфатный буфер pH 7,2. При изучении влияния 1,2-ПД предварительно добавляли его растворы с соответствующей концентрацией к эритромассе, выдерживали 30 мин (до установления диффузионного равновесия между клетками и окружающей их средой) [5] и центрифугировали. После удаления надосадки добавляли растворы с различными концентрациями натрия хлорида, содержащие 1,2-ПД с концентрацией, равной его концентрации в надосадке, зонд ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксид) 10^{-3} моль/л и ферроцианид калия с концентрацией 0,1-0,267 моль/л [6]. Затем образец в кварцевом капилляре помещали в резонатор спектрометра ЭПР «Bruker» ER-100 D (ФРГ) и записывали первую производную спектра поглощения зонда ТЕМПОН, находящегося внутри клеток.

Расчет τ_c зонда ТЕМПОН проводили по известной методике [2]

$$\tau_{c(-1)} = 1/\nu_{(-1)} = ((h_0/h_{-1})^{1/2} - 1)\Delta H_0/3.6 \cdot 10^{-9}, c^{-1} \quad (1),$$

где $\tau_{c(-1)}$, $\nu_{(-1)}$ - время корреляции и частота вращательной диффузии спинного зонда соответственно, рассчитанные с использованием центральной (h_0) и высокопольной компонент (h_{-1}) спектра ЭПР зонда в отн. ед.; ΔH_0 - полуширина центральной компоненты в Гс.

Между ВКВД спинного зонда и микровязкостью существует прямая пропорциональная зависимость, которая выражается уравнением [2]

$$\tau_c = 4\pi a^3 \eta / 3kT \quad (2),$$

где a - эффективный гидродинамический радиус спинного зонда;
 η - микровязкость среды.

Все использованные препараты были марки ХЧ и ЧДА. Результаты исследований обрабатывались статистически при доверительной вероятности 95% с учетом коэффициентов Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные по зависимости τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентрации хлорида калия. Так как τ_c прямо пропорционально микровязкости то по его изменению можно судить о характере ее изменения. Из рис. 1 видно, что характер изменения ВКВД зонда ТЕМПОН носит линейный характер до 0,80 моль/л, а далее отмечается отклонение от линейной зависимости. Причиной отклонения от линейной зависимости, по-видимому, является почти полная дегидратация клетки. Так ранее радиоизотопным методом [10], а позднее и нами методом ЭПР спинного зонда [7] было показано, что при осмолярности внеклеточной среды выше 1600 мосм эритроциты почти полностью дегидратированы, в то время как минимальный объем достигается при 1150 мосм [10]. Как видно из рис. 1, аналогичный характер носит зависимость τ_c зонда ТЕМПОН от концентрации глюкозы до 0,80 моль/л, а при более высоких ее концентрациях происходит отклонение от линейной зависимости, хотя и далее она носит линейный характер, но с другим углом наклона. Причиной отклонения от линейной зависимости, по-видимому, та же, что и для калия хлорида - почти полная дегидратация эритроцитов при концентрации глюкозы выше 0,8 моль/л.

Следует отметить более низкие значения τ_c ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов при наличии во взвешивающей среде глюкозы, что связано с проникновением глюкозы в эритроциты. О проникновении глюкозы в эритроциты свидетельствовало разрушение эритроцитов при переводе их в физиологический раствор натрия хлорида после эквilibрации с физиологическим раствором, содержащими 5% глюкозы. Различия в зависимости τ_c ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентрации калия хлорида и глюкозы становились недостоверными при их концентрации 2,0 моль/л. Это, по-видимому, связано с тем, что при высоких концентрациях глюкозы блокируется проницаемость для нее, как и для криопротектора глицерина при повышении концентрации натрия хлорида [4].

Исследование зависимости τ_c ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентрации натрия хлорида и сахарозы показало, что она также носит линейный характер до их концентрации 0,8 моль/л и значения τ_c достоверно не отличались от данных для калия хлорида. Так как на этапах криоконсервирования клетки оказываются в гипертоническом растворе электролита в присутствии криопротектора, то нами исследована зависимость τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентрации натрия хлорида в присутствии различных концентраций 1,2-ПД.

В табл. 1 представлены данные по зависимости τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентрации натрия хлорида в присутствии различных концентраций 1,2-ПД. Из табл. 1 видно, что при концентрации натрия хлорида 0,40 моль/л (заменен на ферроцианид калия 0,267 моль/л) значения τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов для концентраций 1,2-ПД 25 и 35% достоверно отличаются от данных для 5 и 15%. Имеются также достоверные различия между τ_c ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов при концентрациях 1,2-ПД 25 и 35%. Причиной таких отличий, по-видимому, является увеличение микровязкости внутриклеточного раствора при высоких концентрациях 1,2-ПД в силу влияния криопротектора на его вязкость. Этот вывод

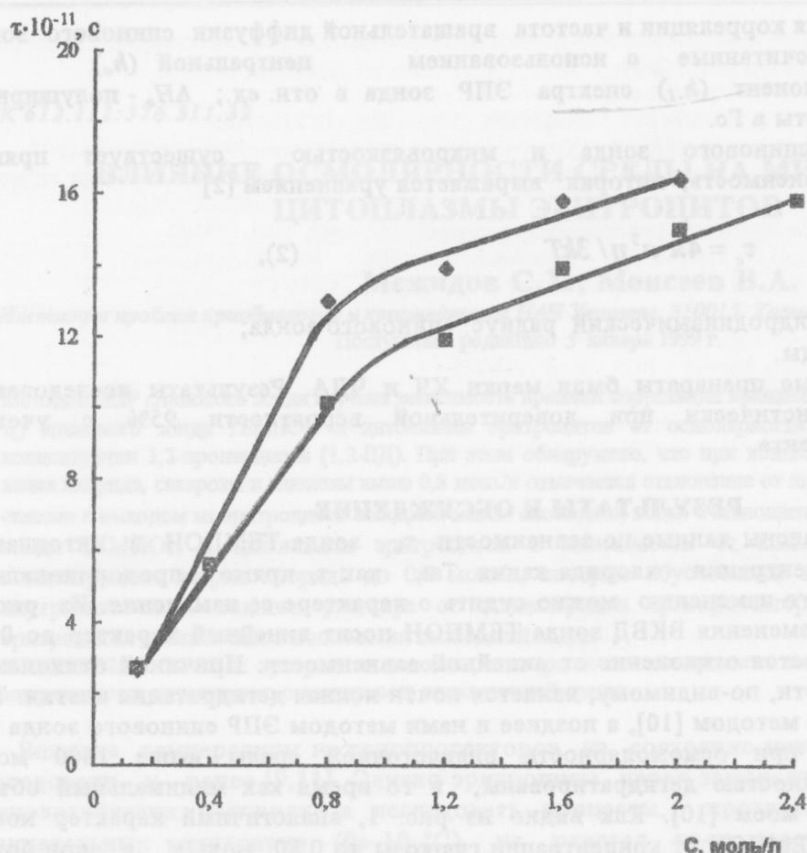


Рис. 1. Зависимость времени корреляции вращательной диффузии (τ_c) и полуширины центральной компоненты (ΔH_c) спинового зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентрации:

- ◆ - калия хлорида;
- - глюкозы.

Таблица 4.1.2. Зависимость τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов от концентраций натрия хлорида и 1,2-ПД. Концентрация ферроцианида калия 0,267 моль/л, а зонда ТЕМПОН 10^{-3} моль/л.

NaCl моль/л	1,2-ПД, % (моль/л)			
	5(0,66)	15(1,97)	25(3,29)	35(4,6)
	$\tau \cdot 10^{-11}, \text{с}^{-1}$			
0,40	5,8±0,4	5,5±0,5	6,7±0,4	9,0±0,7
0,80	11,6±0,3	15,1±0,5	13,7±0,3	-
1,20	12,4±0,8	13,0±0,9	13,3±0,7	-
2,4	16,7±1,3	17,5±0,6	15,3±1,2	-

согласуется с данными литературы [8] о влиянии высоких концентраций криопротекторов на свойства воды.

При концентрации натрия хлорида 1,20 моль/л и выше отсутствуют различия между значениями τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов при всех концентрациях 1,2-ПД. Такой характер изменений τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов можно объяснить тем, что при концентрациях натрия хлорида 1,20 моль/л и выше из эритроцитов вышла основная масса свободной воды и вязкость цитоплазмы в основном зависит от концентрации гемоглобина. Эти результаты согласуются с данными

зависимости дегидратации эритроцитов от осмолярности растворов натрия хлорида. Так при концентрации натрия хлорида выше 0,8 моль/л (1600 мосм) эритроциты почти полностью дегидратированы [7,10].

ВЫВОДЫ

1. Отклонение от линейного характера зависимости τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов при концентрации различных веществ выше 0,8 моль/л связано с выходом из эритроцитов основной массы свободной воды.
2. Различия в τ_c зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов в зависимости от концентрации 1,2-ПД при концентрациях натрия хлорида до 0,8 моль/л обусловлены зависимостью вязкости внутриклеточного водного раствора от концентрации криопротектора в силу наличия в эритроцитах достаточного количества свободной воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.22. - Харьков, 1988. - 450 с.
2. Лихтенштейн Г.И. Метод спинового зонда в молекулярной биологии. - М.: Наука, 1974. - 255 с.
3. Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О.А. // Криобиология. - 1989. - №2. - С. 13-16.
4. Межидов С.Х., Моисеев В.А. // Проблемы криобиологии. - 1995. - 4. - С. 50-51. 1278-12819.
5. Межидов С.Х., Нардид О.А., Моисеев В.А. // Биофизика. - 1996. - №6. - С. 1278-1283.
6. Межидов С.Х., Моисеев В.А. // Проблемы криобиологии. - 1997. - 3. - С. 55-56.
7. Моисеев В.А., Межидов С.Х., Нардид О.А. // Биофизика. - 1989. - №6. - С. 993-996.
8. Пулкар Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. - Киев: Наук. думка, 1978. - 204 с.
9. Цымбал Л.В., Моисеев В.А. // Проблемы криобиологии. - 1992. - №2. - С. 13-20.233.
10. Farrant J., Woolgar A.E. // Cryobiology. - 1972. - №1. - P. 9-15.
11. Ivanov L.V., Tsimbal L.V., Moiseyev V.A., Gavrilova I.I. // Second international conference on water and ions in biological sustems. - Bucharest (Rumania). - 1982. - P. 157-158.