

П-327423

Ж-14038

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету № 450

Біофізичний Вісник

2000

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 (Сур), розмір шрифту 10 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем.

Математичні та хімічні символи, рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою комп'ютерної техніки. Рисунки, у вигляді повністю придатному до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки виготовляються з використанням комп'ютерної техніки або виконуються тушшю на білому папері з друківаними 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 йде 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.

(Зразок оформлення статті на останній сторінці журналу)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету

№ 450, 1999

БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК

Заснований у 1998 році

випуск 4(2)

д.б.н., проф. Мейсєв В.О.
д.ф.н.-м.н. Осєцький О.І.
д.б.н., доц. Перєгєвський Є.Є.
д.ф.н.-м.н. Семєнов М.О.
д.ф.н.-м.н. Сєрєжєв В.О.

д.ф.н.-м.н., проф. Бєлєтов Ю.І.
д.б.н., проф. Бєнєдєрєнко Я.А.
д.б.н. Тєрєбієвський Є.О.
д.б.н., доц. Дєрєвєлєв В.І.
д.ф.н.-м.н., проф. Кєзєвєвський В.Є.

Відповідальні секретарі: д.б.н., доц. Тєлєшєв С.Я., к.ф.н.-м.н., доц. Сєлєпєтєв Л.Д.

Друкється за рішенням вченої ради біофізичного факультету ХДУ
протокол № 6 від 18.06.99

Адреса редакційної колегії: 310077, м. Харків, пл. Сєвєродєлєцький
Харківський державний університет, кафедра молекулярної та прикладної біофізики
тел.: 38 0372 427276, e-mail: gazeta@univer.kharkov.ua

УДК 577.3

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.Е.**
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 № 6 від 18.06.99

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

© Харківський державний університет, 1998

© Гаташ С.В., 1998 – оформлення

Центральна наукова бібліотека
ХНУ ім. В.Н.Каразіна

MINISTRY OF EDUCATION OF UKRAINE

Visnyk Kharkivskogo universytetu

№ 450, 1999

BIOPHYSICAL BULLETIN

Founded in 1998

Issue 4 (2)

Editorial Board

D.Sc., Prof. Blazni Yur.P.
D.Sc., Prof. Bondarenko V.A.
D.Sc., Assoc. Prof. Ostapko A.I.
D.Sc., Assoc. Prof. Korotkiy Y.Ye.
D.Sc., Assoc. Prof. Semenov M.A.
D.Sc., Assoc. Prof. Sorokin V.A.

Executive Secretaries: Ph.D., Assoc. Prof. Galash S.V., Ph.D., Assoc. Prof. Stepin E.D.

Address: Chann of Molecular and Applied Biophysics
Radio Physics Department
Kharkov State University

phone: 38 0372 437276, e-mail: galash@univer.kharkov.ua
38 0372 437276, e-mail: galash@univer.kharkov.ua

V.A. Pashinskaya, M.V. Kossach, A. Gomeri, K. Vekay, O.B. Korotkovskaya,
E.N. Lisitskiy, Yu.N. Blazniy. Массо-спектрометрическое исследование
сложных комплексов биополимерных соединений

S.V. Denchenko, A.I. Drevak. Дослідження структури плазматичних мембран
ліфоцитів флуоресцентними методами

Kharkiv
1999

Dear readers and authors:

Biophysical Bulletin is a new series of *Visnyk* of Kharkiv State University. The periodicity of the journal varies from two to four times per year depending on the number of the papers submitted.

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

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

You are welcome for fruitful cooperation!

Editorial Board

D.Sc., Prof. Maleev V.Ya. – *Editor-in-Chief*

D.Sc., Prof. Blagoi Yu.P.

D.Sc., Prof. Bondarenko V.A.

D.Sc. Gordienko Ye.A.

D.Sc., Assoc. Prof. Dreval V.I.

D.Sc., Prof. Kazanskiy V.B.

D.Sc., Prof. Moiseev V.A.

D.Sc. Osetskiy A.I.

D.Sc., Assoc. Prof. Perskiy Ye.Ye.

D.Sc. Semenov M.A.

D.Sc. Sorokin V.A.

Executive Secretaries: Ph.D., Assoc. Prof. Gatash S.V., Ph.D., Assoc. Prof. Stepin L.D.

Address: Chair of Molecular and Applied Biophysics

Radio Physics Department

Kharkov State University

Svobody Sq. 4,

310077, Kharkov, Ukraine

phone: 38 0572 457576, e-mail: Sergiy.V.Gatash@univer.kharkov.ua

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- Yu.V. Rubin, J. Leszczynski** The investigation of physical properties on 5-azacytosine-guanine dimer 7
- T.O. Hushcha, Yu.N. Naboka, A.I. Luik** Structural changes of human serum albumin under the interaction with drugs 12
- А.В. Шестопалова, Д.Б. Анищенко, В.Я. Малеев** Изучение гидратации различных структурных форм полирибозитидиловой кислоты и ее компонентов методом Монте Карло. 1. Влияние протонирования на гидратацию цитозина 17
- А.Н. Веселков, П.А. Болотин, С.Г. Осетров** Комплексообразование антрациклиновых антибиотиков с изомерными дезокситетрануклеотидами 5'-d(ACGT), 5'-d(AGCT) и 5'-d(TGCA) в водном растворе 23
- Г.М. Глибицкий** Применение электродинамической модели при измерениях диэлектрической проницаемости водных растворов 31

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- O.V. Korzovskaya, V.A. Pashinskaya, M.V. Kosevich, L.N. Lisetski** Interaction of antimicrobial agents decamethoxinum and aethonium with model membranes 35
- Г.П. Горбенко** Влияние фосфолипидов на структурно-динамические свойства рибонуклеазы 40
- А.В. Финашин, В.В. Товстяк** Исследование модифицированного действия быстрых электронов на ферментативную активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФаз плазматических мембран эритроцитов 45
- Л.И. Гардаш, Е.А. Гордиенко** Физико-математический анализ начальной стадии процесса продавливания эритроцита через цилиндрический микрокапилляр 53
- В.А. Пашинская, М.В. Косевич, А. Гомори, К. Векей, О.В. Корзовская, Л.Н. Лисецкий, Ю.П. Благой** Масс-спектрометрическое исследование невалентных комплексов бисчетвертичных аммониевых солей с фосфолипидами 59
- С.В. Демченко, В.І. Древаль** Дослідження структури плазматичних мембран лімфоцитів флуоресцентними методами 63

- В.А. Филенко, В.С. Холодный, В.Н. Горбенко, Н.А. Бабенко** Некоторые морфофункциональные характеристики эритроцитов больных раком щитовидной железы

68

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- Н.Д. Безуглый, Н.А. Гордиенко, А.В. Медведевский** Волнометрия яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. I. Физико-математические основы и технические подходы к измерению изменений клеточного объема

72

- Г.И. Соляник** Влияние глюкозы на пролиферативную гетерогенность ЕМТ6/Ро многоклеточных опухолевых сфероидов

80

- Г.І. Довбешко, Н.Я. Гридіна** Особливості інфрачервоних спектрів нуклеїнових кислот з пухлинних тканин

85

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

- О.В. Дубовицкая, В.А. Кашпур, В.Я. Малеев** Влияние γ -облучения на гидратацию полирибоадениловой кислоты

88

- Е.Б. Круглова, Г.И. Довбешко, Н.А. Крутько, Е.П. Пащук, Н.А. Карпенко, М.Ю. Алесина, А.А. Красницкая** Исследование структурных повреждений в молекулах ДНК из гамма-облученных крыс

92

- В.П. Берест, С.В. Гаташ, М.А. Воробейчик** Влияние гамма-облучения на агрегацию тромбоцитов

96

Abstracts

100

УДК 577.332

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

THE INVESTIGATION OF PHYSICAL PROPERTIES ON 5-AZACYTOSINE - GUANINE DIMER

Yury V. Rubin, Jerzy Leszczynski *

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Science, Kharkov, 310164, Ukraine

*Department of Chemistry, Jackson State University, Jackson, Mississippi 39217, USA

Received June 8, 1999

Fundamental physical characteristics of 5-azacytosine - guanine dimer such as geometry, dipole moment, vibrational frequencies, electron density distribution, excited state energies were calculated by means of *ab initio* and semiempirical methods. Analysis of bond lengths, vibrational frequencies and atomic charges in dimer showed a change of bond lengths, vibrational frequencies and 15-20% increase of atomic charges in fragments participating in forming hydrogen bonds. The excited state energy calculations predict a high-frequency shift of the first band in UV absorption spectrum of dimer in comparison with ones of the 5-azacytosine and guanine molecules.

Key words: 5-azacytosine, dimers, quantum-mechanical calculations, infra-red and electronic spectra.

It was shown earlier that 5-azacytosine (5azaC) has antitumour properties [1]. There are evidences that 5azaC depresses the biochemical processes, mainly the biosynthesis of pyrimidines and proteins [2]. 5azaC also can be incorporated into DNA instead of cytosine - about 50% of cytosine may be substituted by 5azacytosine [3]. After incorporation in DNA 5azaC blockades the cytosine-methyltransferase and inhibits the DNA methylation [4, 5].

Recently the medicinal form of 5azaC - Fazarabine, in which 5-azacytosine is combined with azabinose was on clinical trial [6,7]. Fazarabine is the synthetic analogue of AraCyt and 5azaC that combines structural and biological properties of both preparations.

There is investigation showing the 5azaC mutagenic activity [8]. The experimental and theoretical studies of the 5azaC solid film UV absorption spectra were carried out earlier [9].

Earlier we performed the theoretical study of physico-chemical properties of 5azaC [10] by using *ab initio* and semiempirical methods and estimated the interaction energy in H-bonded dimer of 5azaC with guanine [11]. The aim of this work is the theoretical study of physical characteristics of 5azaC-guanine H-bonded dimer: geometry, dipole moment, electron density distribution, vibrational frequencies and electronic spectrum.

METHODS

The *ab initio* LCAO-MO [12] method was used to study the 5-azacytosine - guanine H-bonded dimer. The structure formula of the dimer calculated is shown in figure 1. The calculation of geometry, dipole moment, charge distribution and vibrational frequencies of 5-azacytosine-guanine dimer were performed by using HF/6-31G** level of theory [12]. These *ab initio* calculations were carried out using Gaussian 92 and Gaussian 94 packages [13].

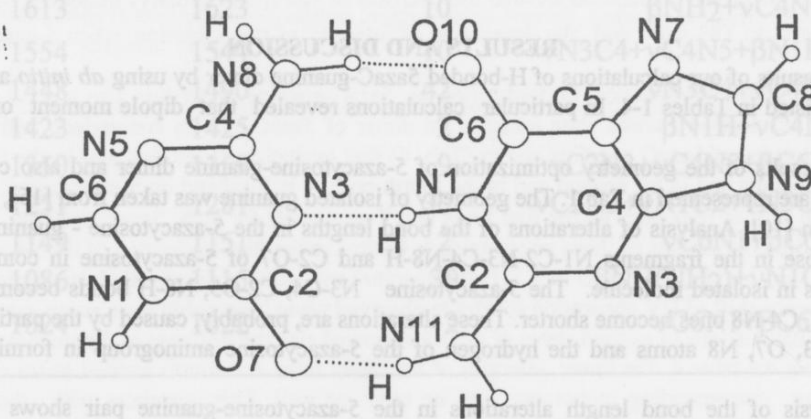


Fig.1 The structure formula of H-bonded 5azacytosine - guanine dimer.

The excited state energies, oscillator strengths and localization of excitation in excited states of the 5azaC-guanine dimer, 5azaC and guanine were calculated by using the CNDO/S methods and software described previously [14]. The geometries of 5azaC and guanine calculated by using HF/6-31G**level [10,15] were used in these calculations. In addition the calculations of dipole moments in ground and excited states of the 5azaC, guanine and cytosine were performed.

Table 1.

Bond lengths (Ao) in 5-azacytosine - guanine dimer and in guanine [15] and 5-azacytosine isolated molecules [10].

Guanine			5-azacytosine		
Bond	Dimer	Isol. molec.	Bond	Dimer	Isol. mol
N1-C2	1.360	1.359	N1-C2	1.399	1.412*
N1-C6	1.395	1.416*	C2-N3	1.343	1.355*
C2-N3	1.302	1.288*	N3-C4	1.316	1.299*
N3-C4	1.346	1.356*	C4-N5	1.378	1.377
C4-C5	1.373	1.368	N5-C6	1.274	1.277
C5-C6	1.427	1.436*	C6-N1	1.340	1.334
C5-N7	1.381	1.378	C2-O7	1.204	1.192*
N7-C8	1.276	1.278	C4-N8	1.314	1.332*
C8-N9	1.377	1.374	N8-H	1.007	0.995*
C8-H	1.071	1.070	N8-H	0.992	0.993
N9-H	0.992	0.994	C6-H	1.076	1.073
C6-O10	1.210	1.193*	N1-H	0.995	0.996
C2-N11	1.337	1.363*			
N11-H	0.991	0.994			
N11-H	0.999	0.994			
N1-H	1.006	0.996			
N3c-Hg	2.019	----			

* Monomer bond lengths differ from analogous ones of dimer more than by 0.01 Å.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of our calculations of H-bonded 5azaC-guanine dimer by using *ab initio* and semiempirical methods are listed in Tables 1-4. In particular calculations revealed that dipole moment of 5azaC-guanine dimer is 6.1D.

The results of the geometry optimization of 5-azacytosine-guanine dimer and also components of an isolated dimer are represented in Tab.1. The geometry of isolated guanine was taken from [15], the one of 5azaC was taken from [10]. Analysis of alterations of the bond lengths in the 5-azacytosine - guanine pair shows the changes of those in the fragments N1-C2-N3-C4-N8-H and C2-O7 of 5-azacytosine in comparison with the analogous ones in isolated molecule. The 5-azacytosine N3-C4, C2-O5, N8-H bonds become longer and the N1-C2, C2-N3, C4-N8 ones become shorter. These alterations are, probably, caused by the participation of the 5-azacytosine N3, O7, N8 atoms and the hydrogen of the 5-azacytosine aminogroup in forming the hydrogen bonds.

Analysis of the bond length alterations in the 5-azacytosine-guanine pair shows the bond length alterations of C5-C6-N1, C2-N3-C4, C6-O10 and C2-N11-H, N1-H fragments of the guanine. The C2-N3, C6-O10 and N1-H bond lengths of guanine in dimer structure become longer, while the N3-C4, C5-C6, N1-C6, C2-N11 bonds become shorter. These changes are caused by the participation of the guanine N1, O8, N11 atoms and the attached to the N1 hydrogen in forming the hydrogen bonds and accord with alterations of bond lengths in the guanine molecule when it forms dimer with cytosine [16].

Table 2.

Atomic charge distribution on the atoms of 5-azacytosine in isolated state [10], in dimer and difference between them (Δ).

Atom	Isol.	Dimer	Δ
N1	-0.751	-0.751	0.000
C2	0.963	0.995	0.032
N3	-0.681	-0.782	0.101
C4	0.810	0.848	0.038
N5	-0.639	-0.620	0.019
C6	0.464	0.455	0.009
O7	-0.628	-0.660	0.032
N8	-0.751	-0.754	0.003
HN8	0.339	0.412	0.073
HN8	0.335	0.331	0.004
HC6	0.199	0.200	0.001
HN1	0.348	0.347	0.001

Table 3

Calculated frequencies (scaled by 0.9), their assignments of 5-azacytosine molecule in isolated state and in dimer and difference between them (Δ).

	Frequencies			Assignments
	Isol. state	Dimer	Δ	
1	3612	3552	60	as(ν NH ₂)
2	3496	3496	0	ν N1H
3	3478	3303	175	ν N1H
4	3039	3035	4	ν C6H
5	1810	1771	39	ν C2O7
6	1679	1679	0	ν N5C6
7	1613	1623	10	β NH ₂ + ν C4N8
8	1554	1544	10	ν N3C4+ ν C4N5+ β N1H
9	1448	1490	42	ν N3C4+ ν C4N8
10	1423	1425	2	β N1H+ ν C4N5
11	1350	1359	9	ν C2N3+ ν C4N8+ β C6H
12	1251	1281	30	ν C2N3+ ν N1C2+ ν N3C4
13	1149	1151	2	ν C6N1+ β C6H
14	1086	1115	39	β NH(NH ₂)+ ν N1C2
15	1024	1022	2	ν C6N1+ β C6H

Analysis of the atomic charge alterations in the 5-azacytosine molecule in dimer structure and in the isolated state shows (Tab. 2) that atomic charges increase on the N3, O7, H aminogroup atoms, participating in forming the hydrogen bond.

The largest changes are observed on the nitrogen N3 and hydrogen of aminogroup - by 15% and 21% respectively. The 5% increase of charge is also observed on the O7 atom participating in the hydrogen bond

forming. The small changes are observed on C2, C4 and N5 atoms -charges are changed at 3%, 4% and 2% respectively. The charges do not change practically on the N1 and C6 atoms and on the hydrogens attached to these atoms.

Table 3 represents the results of the calculation of the gas phase 5-azacytosine molecule vibrational frequencies in the range of 1000-4000 cm^{-1} . Although vibrational frequencies of nucleic acid bases calculated by using the HF level of theory are usually greater than experimentally observed ones by using the matrix isolation method (in particular, for cytosine [17]), however after multiplying the calculated frequencies by factor 0.9 as it was performed in our previous works [17], the calculated frequencies differ from ones obtained experimentally not greater than by 5%. Therefore, 5azaC and its dimer vibrational frequencies calculated by us may be useful for interpretation of future experimental investigations on IR spectra of 5azaC and its complexes in the inert gas matrix, films and solutions.

Analysis of the vibrational frequencies of 5azaC in the 5-azacytosine-guanine pair shows (Tab.3) the decrease of N-H ones in the aminogroup, the C=O group, and the increase of the N1-C2, C2-N3, C4-N8

Table 4

Calculated excited state energies (E, eV) and oscillator strengths (f) of 5azaC+Gua pair and isolated 5azaC and Gua molecules.

	Dimer E, eV (f)	5azaC E, eV (f)	Gua E, eV (f)
S1 $\pi\pi^*$	5.04 (0.24)	----	4.90 (0.32)
S2 $\pi\pi^*$	5.46 (0.12)	5.26 (0.08)	----
S3 $\pi\pi^*$	5.64 (0.41)	----	5.70 (0.30)
S4 $\pi\pi^*$	6.25 (0.22)	6.34 (0.20)	----
n π_1	4.77	4.71	----
n π_2	5.92	----	5.42
T1 $\pi\pi^*$	4.05	----	3.67
T2 $\pi\pi$	4.36	4.13	----

group frequencies. These data correlate with results presented in Tab.1 on lengthening and shortening of the 5-azacytosine molecule bonds when forming the hydrogen bonds with guanine.

The performed calculation showed the decrease of vibrational (rotary) frequency of 5azaC aminogroup from 248 cm^{-1} to 183 cm^{-1} and the decreasing of intensity of this vibration, when 5-azacytosine forms the dimer.

Calculation of electronic excited states on 5azaC-guanine dimer was also carried out. Analysis of the calculations of electron excited state energies on dimer of 5azaC-Gua in comparison with analogous ones of isolated molecules of 5azaC and Gua shows (Tab. 4) that excitation in the first and in the third singlet states is located on guanine and in the second and in the fourth ones it is localized on 5-azacytosine. The analysis shows also the high shift of frequency on the first S $\pi\pi^*$ and T $\pi\pi^*$ levels for both 5azaC and Gua. This correlates with decrease of dipole moments of those compounds in excited states (the diminution of dipole moment from 5.26D to 1.6D for 5azaC and from 5.80D to 3.51D for guanine) and with experimental observations for cytosine where a high frequency shift of UV absorption spectra is observed when it is going from argon matrix to water solution [19,20]. Our calculations of excited states of cytosine showed also the decrease of dipole moment in excited state.

From the table 4 the lower energies of the dimer third and fourth excited states relatively the second excited states corresponding monomers can be seen as well. This correlates with the increase of dipole moments of those in the second excited states. As seen from the table 4, the high frequency shift of the electron n π^* level location takes place in 5azaC and guanine.

Conclusions.

This study reveals fundamental properties of the 5-azacytosine-guanine dimer. Analysis of the bond lengths, the vibrational frequencies and the atomic charges in dimer has shown the alteration of the bond lengths,

vibrational frequencies and the increase of atomic charges (to 15-20%) in the fragments participating in forming the hydrogen bonds. Small changes of bond lengths and vibrational frequencies are also observed for the molecule fragments adjacent to ones participating in forming the hydrogen bonds.

The excited state energy calculations predict a high-frequency shift of the first band in UV absorption spectrum of dimer in comparison with ones of the 5-azacytosine and guanine molecules.

REFERENCES

1. Sorm F., Skoda J. // *Acta Un. Int. Cancer*. 1964. v. 20. p. 37-45.
2. Skoda J. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, New Series, Springer Verlag Berlin - Heidelberg-New-York: 1975. v. 37. p. 348.
3. Pace V., Doskocil J., Sorm F. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1968. v. 161. p. 352-359.
4. Som S., Friedman S. // *EMBO Journal*. 1993. v. 12, N11. p. 4297-4303.
5. Gabbara S., Sheluho D., Bhagwat A.S. // *Biochem.* 1995. v. 43, N27. p. 8914-8923.
6. Kees, U.R.; Avramis, V.I. // *Anti-Cancer Drugs* 1995, v.6, p. 303-309.
7. Goldberg R.M. // *Clin. Cancer Res.* 1997. v. 3. p. 2363-2371
8. Jackson-Grusby L., Laird P.W., Magge S.N., Moeller B.J., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. v. 94. p. 4684-4685.
9. Baksani K., Foldvary I., Fidi J., Kittler L. // *Biopolymers*. 1978. v. 17. p. 887-896.
10. Rubin Yu.V. // *Visnik problem biologii i medicini*. 1998. 4. p.151-156 (in Russian).
11. Rubin Yu. V., Leszczynski J. // *Nucleosides and nucleotides*. 1999. v. 18. p.79-83
12. Hehre W.J., Radom L., Schleyer P. v. R., Pople J.A. // *Ab initio Molecular Orbital Theory*. Wiley: New York, 1986.
13. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Gill P.M.W., Johnson B.G., Robb P.Y., Chen W., Binkley J.S., Defrees D.J., Baker J., Stewart J.P., Heard-Gordon M., Gonzalez C., and Pople J.A. // *Gaussian 94*, Revision E.1, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1995.
14. Baranov V.I., Savin F.A., Gribov L.A. *Programma rascheta elektronno-kolebatel'nih spektrov mnogoatomnih molecul*. M. Nauka, 1983 (in Russian).
15. Leszczynski, J. *Mol. Struct. (Theochem)*. // 1994. v. 311. p. 37-46.
16. Florian, J.; Leszczynski, J. // *Int. Journ. Quant. Chem. Quant. Biol. Symp.* 1995. v. 22. p. 201-219.
17. Kwiatkowski J.S., Leszczynski J. J. // *Phys. Chem.* 1996. v. 100. 941-953.
18. Sheina G.G., Radchenko E.D., Plohotnichenko A.I., Blagoy Yu.P. // *Biophysica*. 1986. v. 27. p. 983-986 (in Russian).
19. Morozov Yu.V., Bazgulina N.P. *Elektronnoye stroyeniye i reatsionnaya sposobnost' molecul*. M. Nauka, 1989 (in Russian).

ВИВЧЕННЯ ФІЗИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ДИМЕРУ 5-АЗАЦИТОЗИН-ГУАНІН

Ю.В. Рубін, Е. Лециньський*

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, 310164 Харків, пр. Леніна, 47, Україна.

*Університет м. Джексон, Міссісіпі, 39217, США

За допомогою неемпіричних та напівемпіричних методів зроблено розрахунок фундаментальних фізичних характеристик димеру 5-азацитозину з гуаніном: геометрії, дипольного моменту, коливальних частот, розподілу електронної густини, енергій електронно-збуджених станів. Аналіз геометрії, коливальних частот і зарядів на атомах у димері показав зміну довжини зв'язків, коливальних частот та збільшення на 15-20% зарядів на атомах у фрагментах, які беруть участь у формуванні водневих зв'язків.

Ключові слова: 5-азацитозин, димери, квантовомеханічні розрахунки, інфрачервоні та електронні спектри.

УДК 577.322

STRUCTURAL CHANGES OF HUMAN SERUM ALBUMIN UNDER THE INTERACTION WITH DRUGS

T.O. Hushcha, Yu.N. Naboka, A.I. Luik

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Murmans'ka Str. 1, 253094 Kyiv, Ukraine, E-mail: hushcha@bioorganic.kiev.ua

Received 23 March 1999

The effect of binding of ten drugs on structural organization of human serum albumin in aqueous solutions has been studied using two biophysical methods. The hydrodynamic sizes of albumin globule and its subunits were obtained from diffusion coefficients measured by quasi elastic light scattering. The adiabatic volume compressibility of albumin was evaluated from ultrasonic velocity and density measurements. It has been shown, that the interaction with propranolol, clonidine, phenylephrine, carbachol and tripeptide fMLP induces unfolded and elastic conformation of albumin with a high motility of separate subdomains, whilst at the interaction with isoproterenol, yohimbine, diphenhydramine, chlorpromazine and atropine the albumin subdomains adopt a closed compressible configuration. The results obtained are consistent with the idea of structural and pharmacological similarity among the drugs inside the marked groups.

KEYWORDS: albumin, drugs, binding, quasi elastic light scattering, ultrasound, size, compressibility, conformation

In the previous papers [1-3] the hierarchical classification of physiologically active compounds (PAC) has been proposed. At the first stage all compounds have been divided into two major classes according to their action on the main cellular signal systems. The PAC activating adenylate cyclase (AdC) and hindering Ca-polyphosphoinositide (Ca-PPI) signal cascades were ascribed to the first class, and the PAC with the opposite action on the indicated signal cascades were attributed to the second class. It has been suggested, that rather heterogeneous compounds united in each of the major classes may cause similar structural and physiological effects on biological systems [1,3]. In order to verify this concept we decided to investigate the influence of ten PAC on the molecular structure of human serum albumin (HSA). The drugs used in this study have been previously assigned to the first (isoproterenol, yohimbine, diphenhydramine, chlorpromazine, atropine) or to the second (propranolol, clonidine, phenylephrine, carbachol, tripeptide fMLP) major classes of PAC [1].

There is now considerable evidence that most drugs bind reversibly to a number of binding sites on albumin. Amongst numerous publications on the matter there are several studies [4-6] reporting on conformational changes in HSA induced by the interaction with low molecular weight drugs. These changes, as revealed by fluorescence [6] and optical rotation [4] measurements, are expected to affect the secondary and tertiary structure of HSA. In view of reports on X-ray studies of the three-dimensional structure of this molecule [7] and the spatial configuration of molecular subdomains in aqueous solution [8] it is important to estimate effect of drugs on the overall HSA structure. The aim of the present work was to examine the modifications in characteristic sizes and elastic properties of HSA globule as a response to its interaction with drugs and to compare the effects of the drugs assigned to different classes. The hydrodynamic diameters of albumin globule and its subunits were obtained from diffusion coefficients measured by quasi elastic light scattering. The adiabatic volume compressibility of albumin was evaluated from ultrasonic velocity and density measurements.

MATERIALS AND METHODS

The lyophilized albumin from human serum (Reanal, >95%) was first purified from eximer fractions using gel-chromatography with Sephadex G-150. All experiments were performed with 0.5 % (w/v) HSA solutions in sodium phosphate buffer (0.15 M) with 0.9 % NaCl. The investigations of HSA interaction with drugs (Sigma, >99%) were carried out at physiological value of pH 7.4. The drug/HSA molar ratio was varied within 1 and 100 taking the molecular weight of HSA to be 68 kDa [9]. The HSA solutions without drugs but at various pH between 5.4 and 8.0 were studied as well for the comparison.

The spectra of quasi elastic light scattering in the samples were measured by 64-channel Malvern Digital Correlator (type 7023) at 298 ± 0.1 K. The hydrodynamic Stokes diameters of the scattering particles were computer calculated from the experimental spectra. The details of experiment and analysis procedure have been described elsewhere [10].

Ultrasonic velocity was measured using the resonator method [11] with computer controlled spectrometer constructed on the basis of function generator HP 33120A and voltage level meter ФК2-29 both connected to PC Pentium 430 TX via the standard interface IEEE-488. The temperature 298 K was maintained by liquid thermostat Lauda RM 6B and controlled with platinum resistance probe Pt 100-80 to within 0.01 K. The

Structural changes of human serum albumin under the interaction with drugs

resonator cell was of the Eggers type [12] with the sample volume of 1 ml and quality factor of 10^4 . The sound velocity u of the sample was evaluated with the accuracy of $\pm 0.1\text{ m/c}$ from the maxima location f_n on the amplitude-frequency characteristic of the resonator measured in the frequency range between 3 and 7 MHz

$$u = 2x(f_n - f_{n-1}) \quad , \quad (1)$$

where x is the distance between piezoelectric quartz transducers of the resonator cell; x value was obtained from the independent measurements with reference liquid (water).

Density ρ of the sample was measured with pycnometer at the same temperature of $298 \pm 0.1\text{ K}$; the error did not exceed 0.1%.

The apparent molar compressibility of albumin in the studied dilute solutions was obtained from the equation [13]

$$\phi_a = \left\{ \frac{M}{\rho_0} - 2([u] + [\rho]) \right\} \frac{1}{\rho_0 u_0^2} \quad , \quad (2)$$

where square brackets denote concentration increments of density $[\rho] \equiv (\rho - \rho_0)/\rho_0 C$ and sound velocity $[u] \equiv (u - u_0)/u_0 C$, M and C are molecular weight and molar concentration of HSA, respectively; u, ρ and u_0, ρ_0 refer to the HSA solution and buffer solution, respectively, both with or without the drugs added.

RESULTS AND DISCUSSION

In Fig.1 the results of analysis of quasi elastic light scattering spectra for HSA in buffer solutions at different pH are shown. For physiological value of pH 7.4 a single peak is displayed on the diagram (Fig.1, curve 1) corresponding to the diffusion in buffer solution of protein globule with the effective diameter of 59-62 Å. At low basic pH 8.0 a single peak is recorded as well, however the corresponding effective diameter increases to 72-81 Å (Fig.1, curve 2). The globule size increases again to the values of 68 - 80 Å at the acidic shift of pH. By this the additional peak arises on the diagram corresponding to the diffusion of particles with the effective hydrodynamic diameter ranging from 32 to 40 Å (Fig.1, curves 3, 4). The latter conforms to the dimensions of HSA subdomains obtained in X-ray experiments [7,8]. Thus, the additional peak can be assigned to the light scattering on the albumin subdomains.

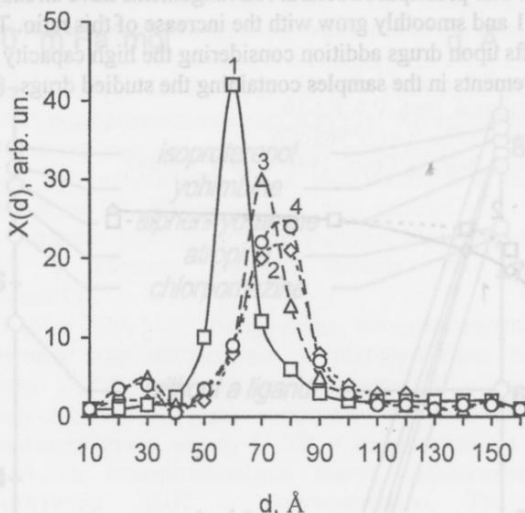


Fig.1. Normalized distribution functions $X(d)$ of scatterers sizes d for solutions of 0.5 % HSA in buffer at 298 K and different pH as obtained from the dynamic light scattering spectra using the regularization procedure. 1 - pH 7.4, 2 - pH 8.0, 3 - pH 6.4, 4 - pH 5.4.

In Fig.2 the compressibility values obtained from velocity and density data according to eq. (2) are shown at different pH. A decrease of ϕ_a value, which is observed in Fig.2 at acidic shifts of pH, reflects an increase of hydrated surface of albumin globule [13] corresponding to unfolding of its polypeptide chains. At the basic shifts of pH the rise of the molar compressibility of HSA indicates a decrease of hydrated surface and transition to a closed structure with a small elasticity.

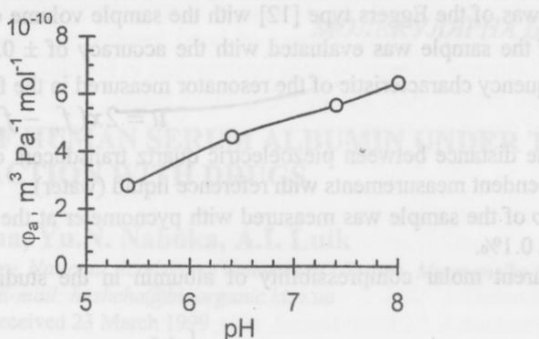


Fig.2. Apparent molar compressibility ϕ_a of HSA at 298 K plotted versus pH of buffer solution

Summarization of the light scattering and compressibility results yields the consecutive description of structural changes. These results testify to the most compact configuration of HSA molecule at conditions close to physiological (pH 7.4). Its tertiary structure is characterized by the globule of minimum size (59 - 62 Å) and the average molar compressibility. Moderate pH deviations from physiological values to either acidic or basic ones cause the increase of HSA globule size, however, the structural changes are different. This confirms J. Foster's [9] assumptions about the changes of albumin structure under the so-called A-N-B conformational transitions. The latter occur at pH shifts in the ranges of 5.5 - 7.0 - 9.0 respectively. At acidic N-A transitions the interactions between the subdomains evidently become weaker, they form an unfolded configuration with a large hydrated surface and significant mobility of separate subunits, which become apparent in the structure of dynamic light scattering spectra. The basic N-B transitions, according to obtained results, cause the increase in size and compressibility of protein globule, that corresponds to formation of closed subdomain structure with a small hydrated surface.

In Fig. 3 and 4 the characteristic examples of the dependencies of globule size and compressibility upon the drug/HSA molar ratio are shown. The principal structural rearrangements have already been displayed in every case at drug/HSA molar ratio of 1 and smoothly grow with the increase of this ratio. The found conformational changes cannot be due to pH shifts upon drugs addition considering the high capacity of buffer system used. This was confirmed by the pH measurements in the samples containing the studied drugs.

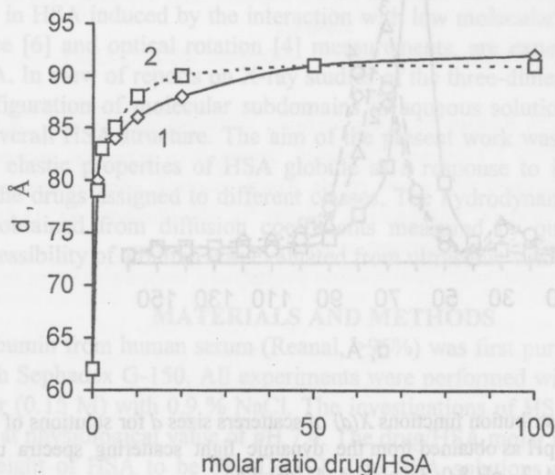


Fig. 3. Dependence of hydrodynamic diameter d for HSA (0.5 %) in buffer solution pH 7.4 at 298 K upon molar ratio of propranolol/HSA (1) and diphenhydramine/HSA (2)

Structural changes of human serum albumin under the interaction with drugs

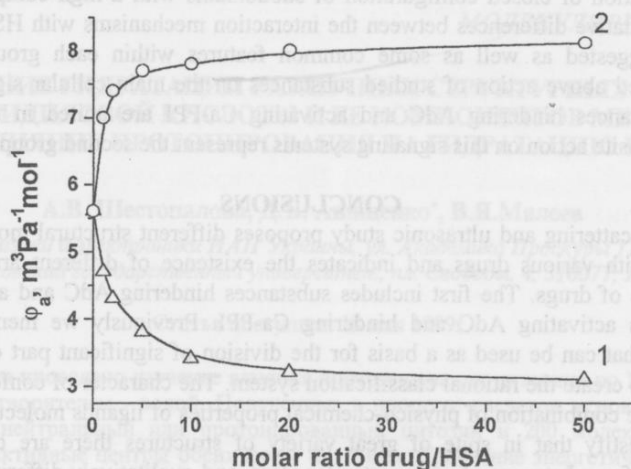


Fig. 4. Dependence of apparent molar compressibility ϕ_a for HSA (0.5%) in buffer solution pH 7.4 at 298 K upon molar ratio of clonidine/HSA (1) and diphenhydramine/HSA (2).

The hydrodynamic sizes of HSA molecule obtained at the interaction with drugs are shown in Fig.5 together with compressibility values. From these data and in conformity with presented above analysis of HSA rearrangements at pH alterations one can conclude, that under the interaction with propranolol, clonidine, phenylephrine, carbachol and tripeptide fMLP HSA subdomains adopt an extended configuration with high motility of separate subdomains, the overall structure is characterized by large hydrated surface and high elasticity. The interaction with isoproterenol, yohimbine, diphenhydramine, chlorpromazine and atropine, on the

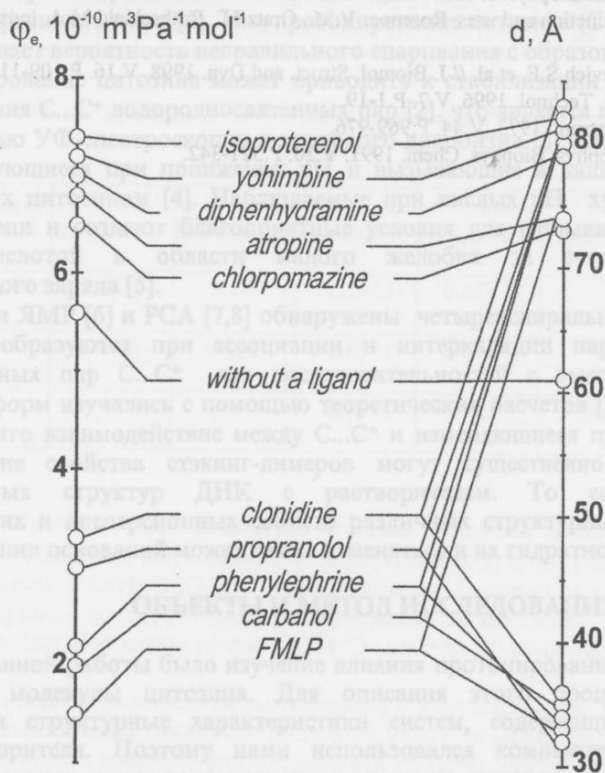


Fig.5. Scales of hydrodynamic sizes d and apparent compressibility ϕ_a of HSA in buffer pH 7.4 at 298 K and drug/HSA molar ratio of 1.

contrary, leads to formation of closed configuration of subdomains with a high compressibility of the overall structure. Thus the qualitative differences between the interaction mechanisms with HSA for the drugs of these two groups can be suggested as well as some common features within each group can be distinguished. Considering the indicated above action of studied substances on the main cellular signaling cascades one can conclude that the substances hindering AdC and activating Ca-PPI are united in the first group while the substances with the opposite action on this signaling systems represent the second group.

CONCLUSIONS

The present light scattering and ultrasonic study proposes different structural models for HSA in solution under the interaction with various drugs and indicates the existence of different arrangements of molecular domains for two groups of drugs. The first includes substances hindering AdC and activating Ca-PPI and the second does substances activating AdC and hindering Ca-PPI. Previously we mentioned [1] a number of pharmacological signs that can be used as a basis for the division of significant part of existing PAC into two initial classes in order to create the rational classification system. The character of conformational rearrangement in HSA is defined by the combination of physico-chemical properties of ligands molecules. Therefore the results of the present paper testify that in spite of great variety of structures there are definite physico-chemical characteristics common for substances of each particular class and qualitatively differing these classes one from the other.

This work was supported by the Commission of the European Communities, project INTAS 96-1115.

REFERENCES

1. Luik A.I. // *Teoreticheskaya i Eksperimental'naya Khimiya*. 1998. V.34. P.199-213.
2. Luik A.I., Mogilevich S.E. // *Canad. J. Physiol. and Pharmacol.* 1994. V.72. P.561-565.
3. Kukhar V.P., Luik A.I. et al. *Chemistry of bioregulatory processes*. Kiev. Naukova dumka, 1992. 368 p.
4. Walji F., Rosen A., Hider R.C. // *J. Pharm. Pharmacol.* 1993. V.45. P.551-558.
5. Bree F., Urein S., Nguyen P. et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* 1993. V.45. P.1050-1053.
6. Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. // *Mol. Pharmacol.* 1976. V.12. P.1052-1061.
7. He X.M., Carter D.C. // *Nature*. 1992. V.358. P. 209-215.
8. Olivieri J.R., Craievich A.F. // *Eur. Biophys. J.* 1995. V.24. P.77-84.
9. Foster J.F. // *Albumin structure, function and uses*. Rosenoer V.M., Oratz M., Rothschild M.A. (eds). Oxford. Pergamon Press, 1977. P.53-84.
10. Luik A.I., Naboka Yu.N., Mogilevich S.E. et al. // *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 1998. V.16. P.109-114.
11. Eggers F., Kaatz U. // *Meas. Sci. Technol.* 1996. V.7. P.1-19.
12. Eggers F., Funk T. // *Rev. Sci. Instrum.* 1973. V.44. P.969-976.
13. Sarvazyan A.P. // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991. V.20. P.321-342.

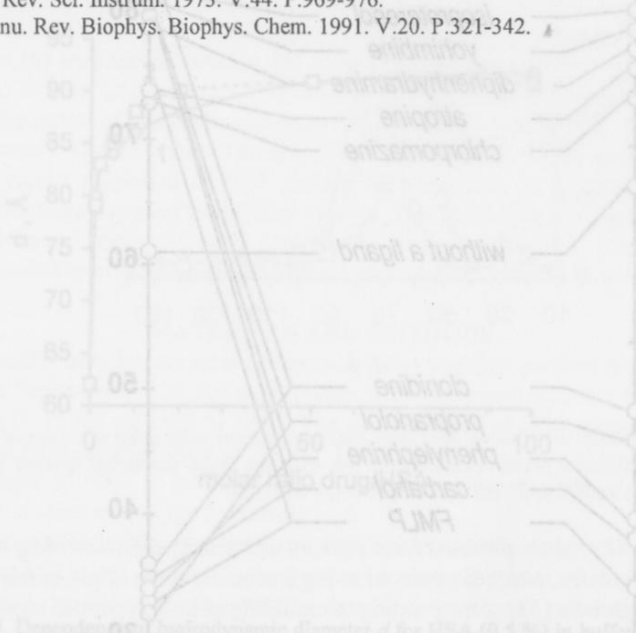


Fig. 2. Scales of hydrodynamic size R_h and apparent compressibility β_{app} of HSA in buffer pH 7.4 at 298 K.

УДК 577.32

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ФОРМ ПОЛИРИБОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ МЕТОДОМ МОНТЕ КАРЛО. 1. ВЛИЯНИЕ ПРОТОНИРОВАНИЯ НА ГИДРАТАЦИЮ ЦИТОЗИНА

А.В. Шестопалова, Д.Б. Анищенко*, В.Я. Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, 310085, Харьков;

* Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077, Харьков

Статья поступила 18 мая 1999г.

Методом Монте Карло проведено изучение влияния протонирования цитозина по N3 положению на его взаимодействие с растворителем - водой. Полученные в процессе расчетов мгновенные конфигурации систем, содержащих нейтральный или протонированный цитозин и 200 молекул воды, позволили определить гидратноактивные центры обеих форм цитозина. Сравнение энергетических и структурных характеристик исследуемых систем дало возможность выявить и описать различия во взаимодействии нейтрального и протонированного цитозина с водным окружением. Показано, что протонирование оказывает комплексное воздействие на формирование первичной и вторичной гидратных оболочек цитозина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитозин, протонирование, гидратация, метод Монте Карло, энергетические и структурные характеристики

Протонирование оснований, входящих в состав ДНК и РНК, влияет на характер взаимодействия между основаниями и их окружением, вызывая в некоторых случаях изменение структуры нуклеиновых кислот. В результате протонирования возможно образование неправильных пар, что может быть причиной нарушения конформации нуклеиновых кислот или процессов белково-нуклеинового узнавания.

Более десяти лет назад были выполнены квантово-химические расчеты, позволившие оценить влияние протонированных оснований и, в частности, цитозина (C), на образование и стабильность неправильных пар [1]. Так, протонирование цитозина (C⁺) приводит к дестабилизации GC-пары и повышает вероятность неправильного спаривания с образованием AC-комплексов.

Протонирование цитозина может приводить к стабилизации различных олигонуклеотидов за счет образования C...C⁺ водородносвязанных пар [2], что является причиной появления шпилек и петель. С помощью УФ-спектроскопии и кругового дихроизма [3] были исследованы хугстиновские дуплексы, образующиеся при понижении pH и вызывающие в дальнейшем появление шпилек в участках, богатых цитозином [4]. Наблюдаемые при кислых pH хугстиновские пары улучшают стэкинг вдоль цепи и создают благоприятные условия для связывания различных соединений с нуклеиновой кислотой в области малого желобка за счет изменения распределения электростатического заряда [5].

Методами ЯМР [6] и РСА [7,8] обнаружены четырехспиральные формы ДНК, названные i-ДНК, которые образуются при ассоциации и интеркаляции параллельных цепей дуплексов водородносвязанных пар C...C⁺ для последовательностей с высоким содержанием цитозина. Свойства таких форм изучались с помощью теоретических расчетов [9]. Авторами было высказано предположение, что взаимодействие между C...C⁺ и изменяющиеся при протонировании цитозина электростатические свойства стэкинг-димеров могут существенно влиять на взаимодействие интеркалированных структур ДНК с растворителем. То есть наряду с изменением электростатических и дисперсионных свойств различных структурных форм нуклеиновых кислот при протонировании оснований может также изменяться и их гидратное окружение.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данной работы было изучение влияния протонирования цитозина по N3-положению на гидратацию молекулы цитозина. Для описания этого процесса мы должны получить энергетические и структурные характеристики систем, содержащих изучаемые соединения и молекулы растворителя. Поэтому нами использовался компьютерный метод Монте Карло, позволяющий получить такие характеристики, а также мгновенные картинки, необходимые при построении моделей гидратного окружения исследуемых молекул. Применение метода Монте Карло для изучения гидратации биомолекул подробно описано в работах [10,11].

В расчетах использовалось кластерное приближение. Суть его состоит в том, что исследуемое соединение в кластере молекул воды помещается в центр сферы с жесткими отражательными

стенками. Радиус выбирается таким, чтобы объем сферы, необходимый для создания нормальной плотности раствора, был в несколько раз меньше используемого. Радиусы сфер в наших расчетах составляли 25 Å. Расчеты проводились при температуре 298К, с последующим уточнением положения молекул воды вблизи центров гидратации при 5К. Для расчетов энергии межмолекулярного взаимодействия использовался модифицированный потенциал Леннарда-Джонса 1-6-12, с параметрами, полученными Полтевым с соавторами [12], а для расчетов взаимодействий вода-вода - полуэмпирический потенциал 1-6-exp [13]. Протонирование учитывалось посредством модификации частичных атомных зарядов, рассчитанных *ab initio* с использованием метода MP2 (Moller-Plesset) / 6-31G* [14].

Для установления равновесного состояния каждой системы длина генерируемой марковской цепи составляла 4.000.000 элементарных конфигураций. На стационарном участке при вычислении термодинамических характеристик и функций распределения длина цепи равнялась 4.000.000 элементарных конфигураций.

Влияние протонирования на гидратное окружение цитозина изучалось с помощью сферических и секторных функций распределения. Атом-атомные радиальные функции распределения $g_{ij}(r)$ отражают пространственную организацию атомов j вблизи атома i как вероятность нахождения атома j на расстоянии r от атома i . Для получения секторных функций сфера, в которую помещалась исследуемая система, разделялась на угловые сектора согласно структуре молекулы цитозина (нумерация секторов соответствует нумерации атомов молекулы цитозина - рис.1). Границы секторов перпендикулярны плоскости основания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния протонирования на гидратацию цитозина нами были получены энергетические и структурные характеристики систем, содержащих нейтральный (С) и протонированный цитозин (С⁺) в кластере 200 молекул воды. Аналогичные характеристики получены и для чистого водного кластера из 200 молекул воды.

Результаты расчетов энергетических характеристик систем С+Н₂О и С⁺+ Н₂О представлены в таблице 1. Здесь U_{sum} - полная средняя энергия взаимодействия в системе, U_{ww} - средняя энергия взаимодействия вода-вода, U_{wb} - средняя энергия взаимодействия вода-основание, $U_{ww/l}$ и $U_{sum/l}$ - удельные значения энергий взаимодействия вода-вода и полной энергии систем.

Таблица 1. Энергетические характеристики систем С и С⁺ в кластере из 200 молекул воды и кластера «чистой» воды

п, мол. воды	Система	U_{sum} ккал/моль	U_{ww} ккал/моль	U_{wb} ккал/моль	$U_{ww/l}$ ккал/моль	$U_{sum/l}$ ккал/моль
200	С	-1636.0	-1541.5	-94.6	-7.70	-8.18
	С ⁺	-1656.5	-1549.1	-107.4	-7.74	-8.28
	Н ₂ О		-1591.2		-7.93	

Энергетически более выгодной является система С⁺+Н₂О, значение потенциальной энергии которой на 20.5 ккал/моль ниже соответствующего значения для системы С+Н₂О. Значение величины энергии взаимодействия вода-вода U_{ww} в системах С⁺+Н₂О, С+Н₂О и чистая вода показывают, что при переносе молекулы основания из газовой фазы в воду структура воды разрушается практически одинаково. Большая стабильность системы С⁺+Н₂О определяется большей энергией взаимодействия вода-основание U_{wb} .

Энергетические характеристики и равновесные мгновенные конфигурации изученных систем (рис.1а,б) позволили определить их точки гидратации. Анализ мгновенных конфигураций показал, что основной вклад в величину энергии взаимодействия цитозин - вода вносят четыре молекулы воды, расположенные вблизи С=О, NH₂ и N3 групп. Одна из молекул воды занимает мостиковое положение между группами NH₂ и N3. С молекулой протонированного цитозина водородные связи (ВС) образуют пять молекул воды, расположенные у С=О, NH₂ и N3Н групп.

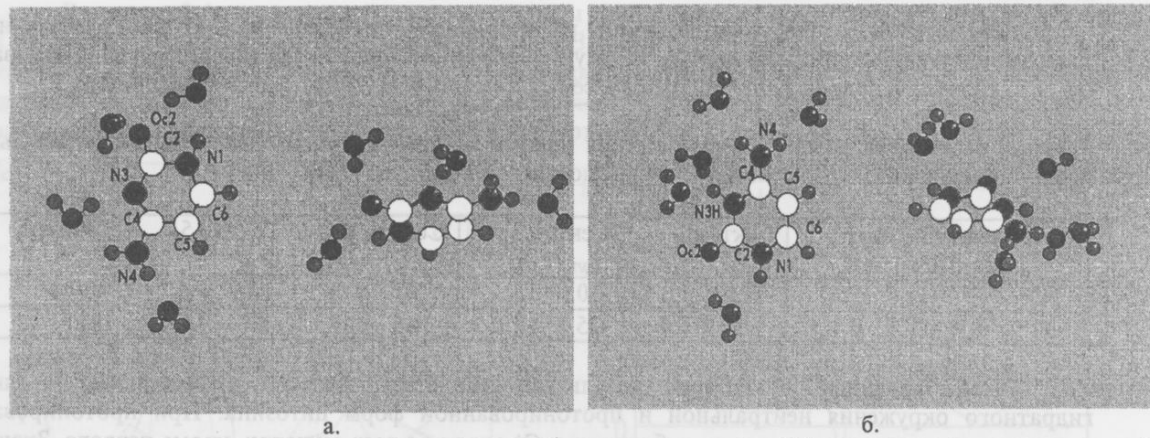


Рисунок 1. Цитозин и молекулы воды, образующие с ним ВС; две проекции мгновенной конфигурации: а. нейтральная форма; б. протонированная форма.

Для более подробного изучения влияния протонирования на гидратное окружение С и С⁺ нами были рассчитаны различные функции распределения. На рис. 2а приведена функция распределения атомов кислорода молекул воды g_o . По положению первого минимума этой функции определяется протяженность первой гидратной оболочки, а при интегрировании получают число молекул воды, ее образующих. Для системы С+Н₂О она достигает своего наибольшего значения в области 4 Å, имеет границу в районе 4.3 Å и содержит ~ 7 молекул воды. Функция распределения g_o для системы С⁺+Н₂О достигает максимума в точке с координатой 4.3 Å. Первичная гидратная оболочка протонированного цитозина шире, чем у нейтрального и содержит ~ 15 молекул воды.

На рис. 2б показаны зависимости средней энергии взаимодействия одной молекулы воды с основанием от расстояния до центра основания (g_{wb}). Анализ зависимостей показал, что для цитозина область сильного взаимодействия с водой лежит в пределах от 2.6 до 5.7 Å. Первый максимум расположен на расстоянии 3.45 Å и составляет -5.06 ккал/моль. Второй максимум значительно ниже -2.54 ккал/моль и находится на расстоянии 4.8 Å. График функции g_{wb} для протонированного цитозина, в отличие от графика для нейтрального, имеет глубокий минимум в районе 3 Å.

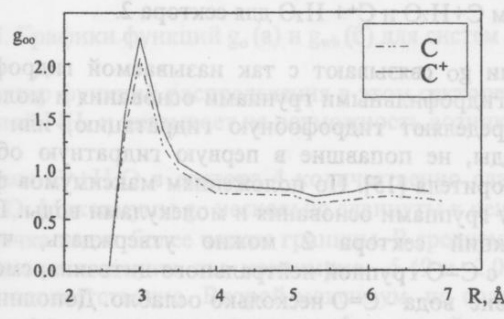
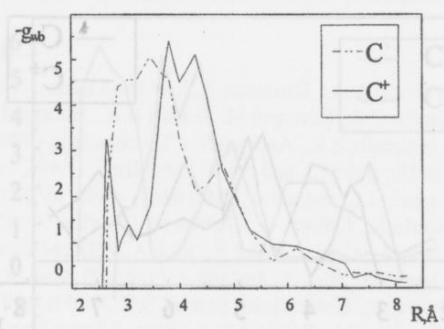
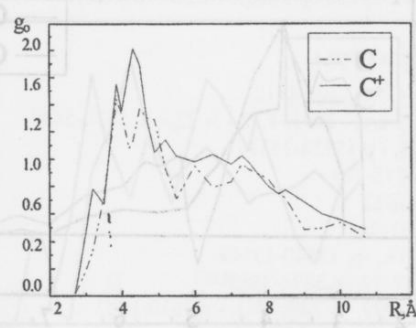


Рис 2. Графики функций g_o (а), g_{wb} (б) и g_{oo} (в) для систем С+Н₂О и С⁺+ Н₂О

Рассмотрим радиальные функции распределения по угловым секторам основания в зависимости от расстояния до центра молекулы. Значения энергий взаимодействия вода-основание U_{WB} и число молекул воды n , находящихся в секторе с радиусом 7.7 Å, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Угловое распределение молекул воды и их энергий взаимодействия с нейтральным и протонированным цитозинами (данные для подсистем в радиусе 7.7Å).

Подсистема	Сектор 1		Сектор 2		Сектор 3		Сектор 4		Сектор 5		Сектор 6	
	U_{WB}	n	U_{WB}	n	U_{WB}	n	U_{WB}	n	U_{WB}	n	U_{WB}	n
C	-11.8	9.6	-19.6	10.3	-10.0	10.3	-13.7	10.4	-10.9	6.5	-8.9	6.7
C ⁺	-19.1	8.1	-11.8	10.6	-25.4	12.1	-21.9	10.7	-20.4	7.5	-15.7	7.1

Представленные в таблице результаты свидетельствуют о существенном различии гидратного окружения нейтральной и протонированной форм цитозина. При протонировании увеличивается число молекул воды в ближних к C⁺ слоям во всех секторах, кроме первого. Значение U_{WB} увеличивается во всех секторах, кроме второго. Наиболее заметные изменения гидратного окружения наблюдается в секторе 3. Действительно, знак цитозина при протонировании стал +1, но этот дополнительный заряд делокализован [14]. При этом в секторе 3 произошло наибольшее изменение частичного заряда в процессе протонирования.

Для более детального анализа отмеченных изменений рассмотрим функции распределения для секторов 2, 3 и 4 (группы C2=O, N3H, N4H₂), у которых происходит наибольшее изменение зарядов при протонировании.

В секторе 2 функция g_O (рис.3а) для системы C+H₂O имеет несколько максимумов начиная с расстояния 3.2 Å, их величина не превышает 2.1. Первый максимум функции g_{WB} (рис.3б) этой системы расположен на расстоянии 3.05 Å, а последний, величиной -6.03 ккал/моль, на расстоянии 4.8 Å. В секторе 2 протонированной системы наблюдается уменьшение толщины первого гидратного слоя и значительное сужение области сильного взаимодействия молекул воды с основанием. Максимальное значение энергии взаимодействия не превышает 4.1 ккал/моль, что в 1.46 раза меньше соответствующего значения для системы C+H₂O. Первый максимум функции распределения g_O расположен на расстоянии 3.45 Å и составляет 1.38. Самый удаленный (7Å) максимум соответствует области слабого взаимодействия основания с водой и представляет собой высокоструктурированный слой молекул воды.

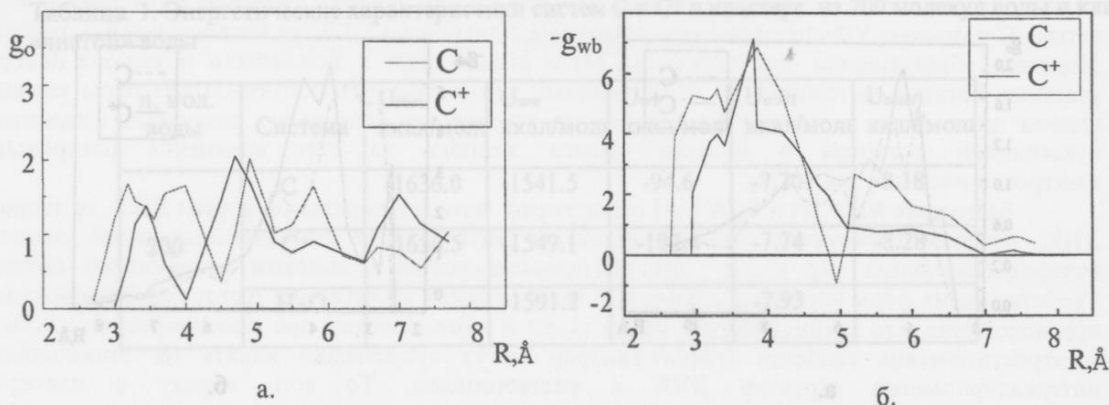
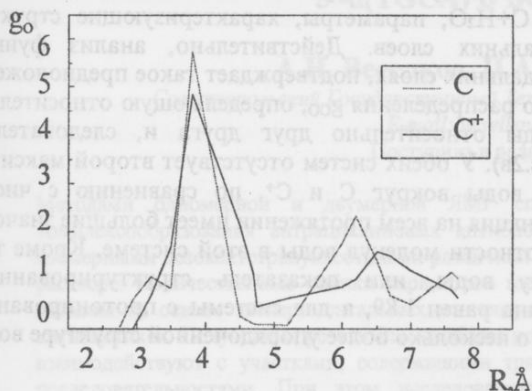


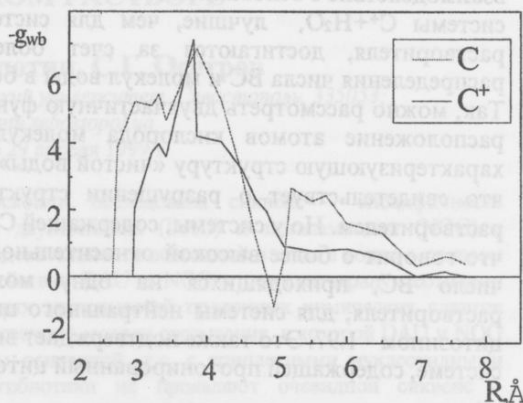
Рис. 3. Графики функций g_O (а) и g_{WB} (б) для систем C+H₂O и C⁺+H₂O для сектора 2.

Положение первого максимума функции g_O связывают с так называемой гидрофильной гидратацией, то есть с образованием ВС между гидрофильными группами основания и молекулами воды. По положению второго максимума определяют гидрофобную гидратацию, или вторую гидратную оболочку, в которой молекулы воды, не попавшие в первую гидратную оболочку, формируют упорядоченный слой молекул растворителя [15]. По положениям максимумов функции g_{WB} судят о возможности образования ВС между группами основания и молекулами воды. Поэтому на основании анализа рассмотренных функций сектора 2 можно утверждать, что при протонировании часть молекул воды, связанная с C=O группой нейтрального цитозина, сместилась из ближних слоев в более дальние, взаимодействие вода - C=O несколько ослабло. Дополнительное же число молекул воды образовало вторичный гидратный слой начиная с расстояния ~ 5 Å и далее.

В секторе 3 функция g_o нейтральной системы (рис.4а) имеет два максимума на расстояниях 3.8 и 6.2 Å величиной 5.72 и 2.32, соответственно. Значения функции g_{wb} (рис.4б), превышающие энергию ВС, лежат в области от 2.8 до 4.3 Å; ее второй максимум расположен на расстоянии 5.2 Å. Исходя из характера функций g_o и g_{wb} можно заключить, что между атомом N3 и ближайшими молекулами воды, лежащими в этом секторе, образуются ВС.



а.

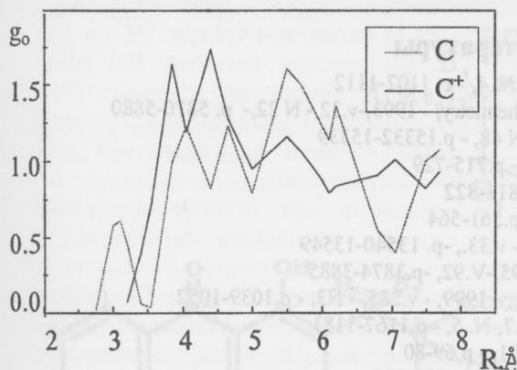


б.

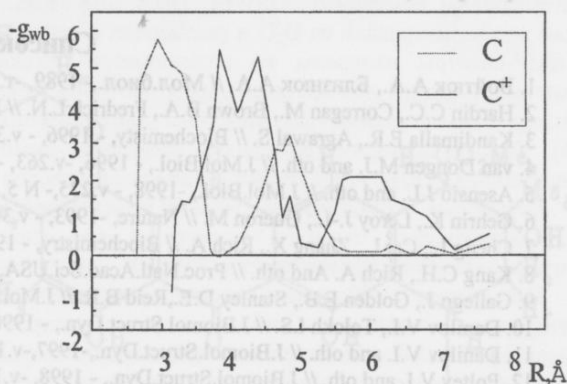
Рис.4. Графики функций g_o (а) и g_{wb} (б) для систем $C+H_2O$ и C^++H_2O для сектора 3.

В системе C^++H_2O тоже образуются ВС с N3Н-группой. Функция g_o этой системы имеет два максимума в точках с координатами 3.8 и 6.5 Å. Отличия системы C^++H_2O выражаются в отсутствии второго максимума функции g_{wb} и области ее положительных значений. Максимум этой функции расположен на расстоянии 3.8 Å и составляет -7.15 ккал/моль. В секторе 3 в среднем находится 12.1 молекул воды. Очевидно, практически все молекулы воды, расположенные вблизи группы N3Н, ориентированы на взаимодействие с ней. На это указывает и большее чем в 2 раза увеличение (по абсолютной величине) энергии взаимодействия вода-основание. При этом упорядоченная структуры молекул воды вблизи этой группы не образуется даже на расстояниях 7 Å и более.

В секторе 4 функция g_o (рис.5а) системы $C+H_2O$ имеет размытые максимумы, первый из которых находится на расстоянии 3.1 Å, а последующие лежат в области от 3.85 до 6.8 Å. Первый максимум функции g_{wb} (рис.5б) расположен на удалении 2.95 Å, а второй - 4.65 Å, их величина, соответственно, -5.76 и -2.84 ккал/моль. Среднее число молекул воды в секторе составляет 10.4.



а.



б.

Рис.5. Графики функций g_o (а) и g_{wb} (б) для систем $C+H_2O$ и C^++H_2O для сектора 4.

Характер функций распределения в этом секторе связан с лежащей в нем структурно более сложной группой NH_2 и указывает на возможность возникновения ВС с молекулами воды. Функции g_o и g_{wb} для

системы C^++H_2O в секторе 4 количественно слабо отличаются от аналогичных функций системы $C+H_2O$. Максимумы g_o несколько сдвинуты к центру в область от 3.7 до 4.7 Å, и первичная гидратная оболочка имеет более четкие границы. В среднем в секторе находится 10.7 молекул воды. У функции g_{wb} можно выделить два максимума: -5.49 и -2.09 ккал/моль, расположенные на расстояниях 3.85 и 5.8 Å соответственно. Второй максимум, по сравнению с максимумом для системы $C+H_2O$, более размыт и смещен от центра, а по абсолютной величине меньше в 1.53 раза. То есть вблизи группы

NH_2 у протонированной системы увеличивается первая гидратная оболочка за счет усиления взаимодействия вода-основание, а вторичная гидратная оболочка не так упорядочена, как у нейтральной системы. Аналогичные выводы можно сделать и для секторов 1, 5 и 6.

Очевидно, ближайшие слои растворителя в протонированной системе ориентированы на взаимодействие с основанием в большей степени, чем в случае нейтральной системы. Наблюдаемые у системы $\text{C}^+ + \text{H}_2\text{O}$, лучшие, чем для системы $\text{C} + \text{H}_2\text{O}$, параметры, характеризующие структуру растворителя, достигаются за счет более дальних слоев. Действительно, анализ функций распределения числа ВС и молекул воды в более дальних слоях, подтверждает такое предположение. Так, можно рассмотреть двухчастичную функцию распределения g_{oo} , определяющую относительное расположение атомов кислорода молекул воды относительно друг друга и, следовательно, характеризующую структуру «чистой воды» (рис.2в). У обеих систем отсутствует второй максимум, что свидетельствует о разрушении структуры воды вокруг C и C^+ , по сравнению с чистым растворителем. Но у системы, содержащей C^+ , функция на всем протяжении имеет большие значения, что говорит о более высокой относительной плотности молекул воды в этой системе. Кроме того, число ВС, приходящихся на одну молекулу воды, или показатель структурированности растворителя, для системы нейтрального цитозина равен 1.89, а для системы с протонированным цитозином - 1.97. Это также подтверждает вывод о несколько более упорядоченной структуре воды в системе, содержащей протонированный цитозин.

ВЫВОДЫ

Таким образом, протонирование цитозина по N3 -положению вызывает изменение энергетических и структурных характеристик в системе «основание + вода». При внесении протонированного цитозина в водный кластер происходит несколько меньшее разрушение структуры жидкой воды, чем при внесении его нейтральной формы. Это отражается в уменьшении (по абсолютной величине) энергии взаимодействия вода-вода и увеличении среднего числа ВС в системе. Изменения функции g_{oo} было отмечено во всех угловых секторах. Так как наибольшее перераспределение заряда при протонировании происходит во 2, 3 и 4 секторах, то именно в них наблюдаются наиболее значительные изменения структурных и энергетических параметров. Более чувствительной к данному фактору оказалась функция g_{wv} . В секторах 2 и 4 под влиянием протонирования ее максимальные значения уменьшились приблизительно в 1.5 раза; в секторе 2 и 3 исчезла область положительных значений, а в секторах 3 и 4 размывается и пропадает второй максимум. Поэтому на основании анализа всех полученных результатов можно утверждать, что протонирование оказывает комплексное влияние на взаимодействие цитозина с водой и вызывает перестройку ближайшего водного окружения, изменяя характер гидратации цитозина.

Список литературы

1. Войтюк А.А., Близнюк А.А. // Мол.биол., - 1989, -т.23, - № 4, - с. 1107-1112
2. Hardin C.C., Corregan M., Brown B.A., Fredrick L.N. // Biochemistry, - 1993, -v.32, - N 22, - p. 5870-5880
3. Kandimalla E.R., Agrawal S. // Biochemistry, - 1996, - v.35, - N 48, - p.15332-15339
4. van Dongen M.J. and oth. // J.Mol.Biol., - 1996, -v.263, - N5, - p.715-729
5. Asensio J.L. and oth. // J.Mol.Biol., -1998, - v.275, - N 5, - p. 811-822
6. Gehrin K., L  roy J.-L., Gueron M. // Nature, -1993, - v.361, - p.561-564
7. Cheng L., Cai L., Zhang X., Rich A. // Biochemistry, - 1994, - v.33, -p. 13540-13549
8. Kang C.H., Rich A. And oth. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA, - 1995, -V.92, -p.3874-3885
9. Gallego J., Golden E.B., Stanley D.E., Reid B.R. // J.Mol.Biol., - 1999, - v.285, - N3, - p.1039-1052
10. Danilov V.I., Tolokh I.S. // J.Biomol.Struct.Dyn., - 1990, - v.7, -N. 5, - p.1167-1183
11. Danilov V.I. and oth. // J.Biomol.Struct.Dyn., -1997, -v.15, -N 1, - p.69-80
12. Poltev V.I. and oth. // J.Biomol.Struct.Dyn., - 1998, -v.16, -N 2, - p.289-300
13. Poltev V.I., Groklina T.I., Malenkov G.G. // J.Biomol.Struct.Dyn., - 1984, -v.2, -N 3, - p.413-429
14. Sponer J., Leszczynsky J., V.Vetterl, P.Hobza // J.Biomol.Struct.Dyn., -1996, - v.13, -N.4, - p.695-706
15. Kulinska K., Kulinski T., Stawinski J., Laaksonen A. // J.Biomol.Struct.Dyn., -1998, -v15, -N 5, - p. 987-998

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ С ИЗОМЕРНЫМИ ДЕЗОКСИТЕТРАНУКЛЕОТИДАМИ 5'-d(ACGT), 5'-d(AGCT) И 5'-d(TGCA) В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

А.Н. Веселков, П.А. Болотин, С.Г. Осетров

Севастопольский Государственный Технический университет, Севастополь, 335053;

E-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua

Поступила в редакцию 29 апреля 1999 г.

Методами одномерной и двумерной ЯМР спектроскопии исследована сиквенс – специфичность комплексообразования антрациклиновых антибиотиков дауномицина (DAU) и ногаламицина (NOG) с изомерными дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в цепи в водно – солевом растворе. Количественные оценки параметров взаимодействия DAU и NOG с дезокситетрануклеотидами сделаны на основе экспериментальных концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов антибиотиков. Полученные результаты наиболее полно отвечают модели связывания, в которой DAU и NOG взаимодействуют с участками, содержащими три пары оснований, т.е. с триплетными нуклеотидными последовательностями. При этом исследованные антибиотики не проявляют очевидной сиквенс – специфичности при связывании как с дуплексной, так и одониточной формами олигонуклеотидов. По найденным значениям индуцированных протонных химических сдвигов и данным 2М – ЯМР спектроскопии рассчитаны наиболее вероятные структуры 1:2 комплексов DAU с тетрануклеотидами. Показано, что ориентация хромофора DAU в комплексах в водном растворе зависит от последовательности оснований в месте интеркаляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дезокситетрануклеотиды, дауномицин, ногаламицин, интеркаляция, специфичность к последовательности, ЯМР – спектроскопия.

Многие антибиотики, используемые в клинической практике, образуют комплексы с двухспиральной ДНК. При этом антибиотики, отличающиеся по своей химической и пространственной структуре, обладают различным сродством и селективностью связывания с определёнными нуклеотидными последовательностями и характеризуются различными способами комплексообразования с двойной спиралью ДНК [1-3].

Дауномицин (DAU) и ногаламицин (NOG) (рис. 1) являются природными антибиотиками антрациклиновой группы, обладающей эффективным антиопухолевым и антибактериальным действием [1,2].

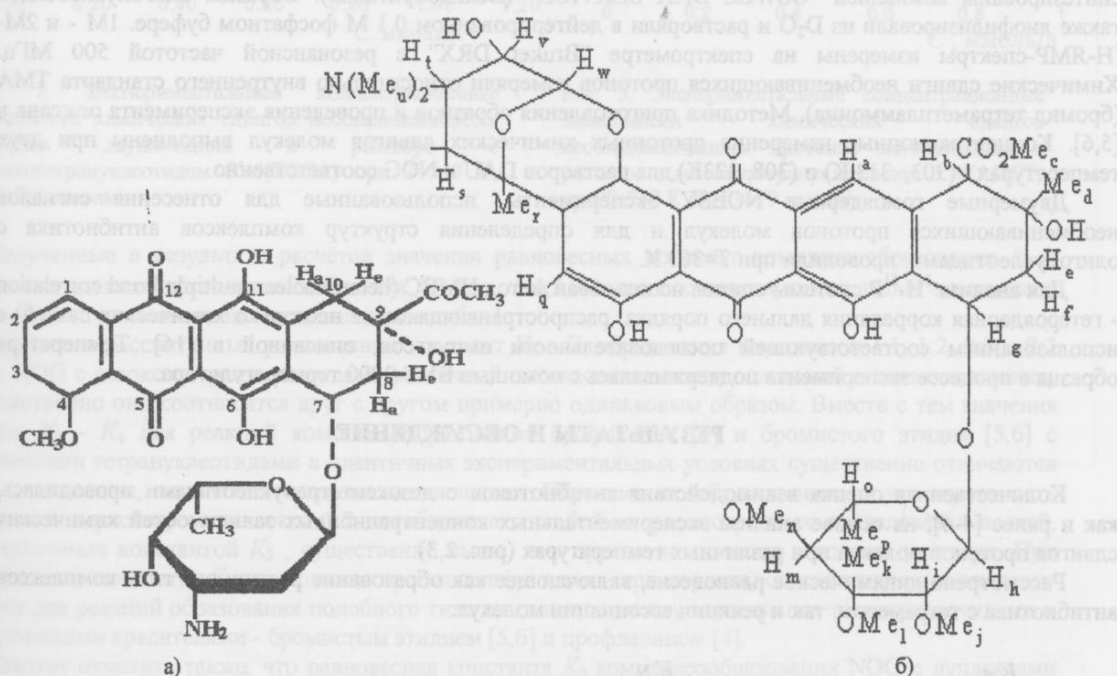


Рис. 1. Структурные формулы антибиотиков дауномицина (а) и ногаламицина (б).

Для детального выяснения молекулярного механизма взаимодействия ароматических молекул антибиотиков с нуклеиновыми кислотами и их компонентами необходимо иметь информацию о структурных и термодинамических параметрах комплексообразования молекул в растворе [4-6]. Несмотря на то, что опубликовано довольно много работ по исследованию комплексов антибиотиков DAU и NOG с ДНК как в растворе [7-11 и ссылки в них], так и в кристалле [12,13], сведения о селективности связывания антибиотиков с определенными нуклеотидными последовательностями в литературе противоречивы.

Вывод о селективности связывания того или иного низкомолекулярного соединения с определенным сайтом нуклеотидной последовательности можно сделать на основании сравнительного анализа величин равновесных констант взаимодействия лигандов с олигонуклеотидами различной длины, состава и последовательности оснований в цепи [5,6]. При этом изучение процессов комплексообразования в различных молекулярных системах должно проводиться в одинаковых экспериментальных условиях.

В настоящей работе методом одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии изучено комплексообразование антибиотиков дауномицина и ногаламицина с изомерными дезокситетрануклеотидами 5'-d(ACGT), 5'-d(AGCT) и 5'-d(TGCA) различной последовательности оснований в цепи с целью определения сиквенс-специфичности связывания лигандов.

Особенности динамического равновесия молекул в растворе, возможные типы комплексов антибиотиков с дезокситетрануклеотидами и их структуры определяли на основе исследования концентрационных зависимостей протонных химических сдвигов взаимодействующих молекул и двумерной ЯМР-спектроскопии.

Двумерная гомоядерная корреляционная ПМР-спектроскопия (2M-TOCSY и 2M-NOESY) и гетероядерная ^1H - ^{31}P 2M-спектроскопия использованы для полного отнесения сигналов необменивающихся протонов и ядер фосфора взаимодействующих молекул, а также для определения мест преимущественной посадки лиганда на олигомерную последовательность и структур интеркалированных комплексов антибиотик-ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дауномицин и ногаламицин ("Sigma") использовали без дополнительной очистки, лиофилизировали из D_2O с изотопной чистотой 99.95 % D и растворяли в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере (pD 7.1), содержащем 10^{-4} моль/л EDTA. Концентрацию антибиотиков определяли спектрофотометрически - коэффициент экстинкции $\epsilon = 11500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ($\lambda = 480 \text{ нм}$) [14] и $\epsilon = 11200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ($\lambda = 460 \text{ нм}$) [15] для DAU и NOG соответственно. Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфаты 5'-d(AGCT), 5'-d(ACGT) и 5'-d(TGCA) синтезированы компанией "OSWEL DNA SERVICE" (Великобритания). Образцы олигонуклеотидов также лиофилизировали из D_2O и растворяли в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере. 1M - и 2M- ^1H -ЯМР-спектры измерены на спектрометре "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Химические сдвиги необменивающихся протонов измеряли относительно внутреннего стандарта ТМА (бромид тетраметиламмония). Методика приготовления образцов и проведения эксперимента описана в [5,6]. Концентрационные измерения протонных химических сдвигов молекул выполнены при двух температурах - (303, 313 K) и (308, 323K) для растворов DAU и NOG соответственно.

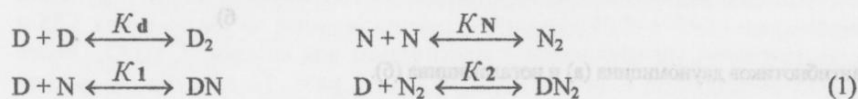
Двумерные гомоядерные NOESY эксперименты, использованные для отнесения сигналов необменивающихся протонов молекул и для определения структур комплексов антибиотика с олигонуклеотидами, проводили при $T = 303 \text{ K}$.

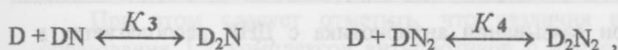
Для анализа ^1H - ^{31}P системы спинов использован метод HMBС (heteronuclear multiple-bond correlation - гетероядерная корреляция дальнего порядка, распространяющаяся на несколько химических связей) с использованием соответствующей последовательности импульсов, описанной в [16]. Температура образца в процессе эксперимента поддерживалась с помощью BVT-3000 терморегулятора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественная оценка взаимодействия антибиотиков с дезокситетрануклеотидами проводилась, как и ранее [4-6], на основе анализа экспериментальных концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов молекул при различных температурах (рис. 2,3).

Рассмотрено динамическое равновесие, включающее как образование различного типа комплексов антибиотика с тетрамером, так и реакции ассоциации молекул:





где D и N - концентрации мономеров дауномицина и тетрануклеотида.

При расчёте по этой схеме наблюдаемый протонный химический сдвиг в молекуле антибиотика представлен в виде [4,5]:

$$\delta = D/D_0(\delta_m + 2K_d D \delta_d + K_1 N \delta_1 + K_N K_2 N^2 \delta_2 + 2K_1 K_3 D N \delta_3 + 2K_N K_2 K_4 D N^2 \delta_4). \quad (2)$$

Минимизацию функционала невязки между экспериментальными и расчетными значениями δ проводили по восьми параметрам: $\delta_1 - \delta_4$ - предельные значения химических сдвигов протонов антибиотика в составе 1:1 (DN), 1:2 (DN₂), 2:1 (D₂N) и 2:2 (D₂N₂) комплексов, $K_1 - K_4$ - равновесные константы соответствующих типов комплексов [4,5]. Детальное описание вычислительной процедуры нахождения параметров изложено в предыдущих работах [4-6].

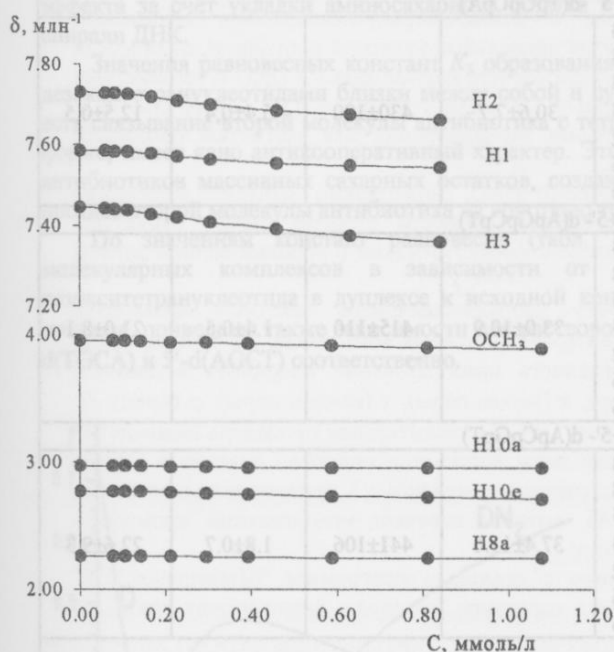


Рис. 2. Экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов дауномицина в растворе с дезокситетрануклеотидом 5'-d(TGCA) при $T=313$ K, $D_0=0.783$ ммоль/л.

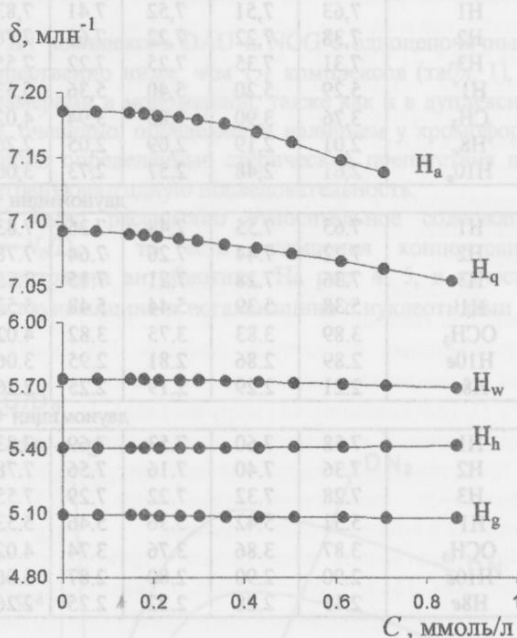


Рис. 3. Экспериментальные концентрационные зависимости химических сдвигов необменивающихся протонов ногамицина в растворе с дезокситетрануклеотидом 5'-d(AGCT) при $T=318$ K, $D_0=0.679$ ммоль/л.

Полученные в результате расчётов значения равновесных констант комплексообразования K_i и химических сдвигов протонов антибиотика δ_i , где $i=1,2,3,4$ для соответствующих типов комплексов дауномицина и ногамицина представлены в табл. 1.

Сравнение рассчитанных равновесных констант $K_1 - K_4$ образования комплексов 1:1, 1:2, 2:1 и 2:2 DAU и NOG с дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в цепи показывает, что качественно они соотносятся друг с другом примерно одинаковым образом. Вместе с тем значения констант $K_1 - K_4$ для реакций комплексообразования профлавина [4] и бромистого этидия [5,6] с аналогичными тетрануклеотидами в идентичных экспериментальных условиях существенно отличаются как в качественном, так и в количественном отношении. Обращает на себя внимание то, что вероятность образования в растворе комплекса 1:2 антибиотика с любой из рассмотренных последовательностей, характеризуемая константой K_2 , существенно выше, чем других комплексов в водном растворе. При этом величина константы K_2 значительно превышает (на один – три порядка) соответствующие значения констант для реакций образования подобного типа комплексов между изученными тетрануклеотидами и ароматическими красителями - бромистым этидием [5,6] и профлавином [4].

Следует отметить также, что равновесная константа K_2 комплексообразования NOG с дуплексами тетрамеров существенно больше константы образования аналогичных комплексов с DAU что, очевидно, связано со структурными отличиями рассматриваемых антрациклиновых антибиотиков. Наличие в NOG

бициклического сахарного остатка, который при связывании антибиотика с ДНК располагается в большой канавке двойной спирали, приводит к дополнительной, по сравнению с DAU, энергетической стабилизации интеркалированного комплекса [17]. Следует отметить, что столь высокие значения константы образования 1:2 комплекса NOG с дуплексом ДНК не позволяет провести экспериментальные исследования по взаимодействию антибиотика с GC – содержащими дезокситетрануклеотидами d(GpCpGpC) и d(CpGpCpG), т.к. при этом наблюдается медленный обмен взаимодействующих молекул во временном масштабе ЯМР.

Табл. 1. Параметры комплексообразования антрациклиновых антибиотиков (δ_i , м. д.; K_i , л/моль) с дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в цепи (0.1M, рD=7.1, T=303 K и T=308 K для дауномицина и ногаламицина соответственно).

комплекс	1:1	1:2	2:1	2:2	-	1:1	1:2	2:1	2:2
протон	δ_1	δ_2	δ_3	δ_4	δ_m	$K_1, 10^3$	$K_2, 10^3$	$K_3, 10^3$	$K_4, 10^3$
дауномицин +5'- d(TpGpCpA)									
H1	7,63	7,51	7,52	7,41	7,83	30,6±7,7	430±100	5,4±0,4	12,5±0,5
H2	7,38	7,22	7,22	7,63	7,78				
H3	7,31	7,35	7,25	7,22	7,55				
H1'	5,29	5,20	5,40	5,36	5,53				
CH ₃	3,76	3,90	3,83	3,94	4,02				
H8 _e	2,01	2,19	2,09	2,05	2,26				
H10 _e	2,61	2,48	2,57	2,73	3,06				
дауномицин +5'- d(ApGpCpT)									
H1	7,65	7,55	7,48	7,36	7,83	33.0±10.9	415±110	1.4±0.5	21.0±8.1
H2	7,22	7,44	7,26	7,64	7,78				
H3	7,36	7,28	7,21	7,15	7,55				
H1'	5,38	5,39	5,44	5,48	5,53				
OCH ₃	3,89	3,83	3,75	3,82	4,02				
H10 _e	2,89	2,86	2,81	2,95	3,06				
H8 _e	2,21	2,29	2,19	2,25	2,26				
дауномицин +5'- d(ApCpGpT)									
H1	7,58	7,60	7,53	7,69	7,83	37.4±11.6	441±106	1.8±0.7	22.6±9.3
H2	7,36	7,40	7,16	7,56	7,78				
H3	7,28	7,32	7,22	7,29	7,55				
H1'	5,31	5,42	5,36	5,46	5,53				
OCH ₃	3,87	3,86	3,76	3,74	4,02				
H10 _e	2,90	2,90	2,80	2,87	3,06				
H8 _e	2,15	2,28	2,22	2,25	2,26				
ногаламицин + (TpGpCpA)									
H _q	7,01	7,23	6,99	7,15	7,28	120±28	2050±420	2,7±0,6	171±33
H _w	5,64	5,78	5,80	5,76	5,80				
H _h	5,31	5,38	5,38	5,47	5,47				
H _g	5,09	5,21	4,98	4,89	5,20				
ногаламицин + (ApGpCpT)									
H _q	7,00	7,05	7,03	7,14	7,28	88±23	2130±460	3,0±0,7	102±28
H _w	5,67	5,39	5,74	5,72	5,80				
H _h	5,36	5,74	5,36	5,51	5,47				
H _g	5,03	5,11	5,01	5,18	5,20				
ногаламицин + (ApCpGpT)									
H _q	7,00	7,18	7,37	7,15	7,28	160±33	2490±420	3,0±0,8	150±90
H _w	5,69	5,61	5,75	5,71	5,80				
H _h	5,37	5,32	5,35	5,38	5,47				
H _g	5,03	5,00	5,02	5,06	5,20				

Из табл. 1 видно, что значения равновесной константы K_4 , характеризующей вероятность образования в растворе комплекса 2:2 антрациклиновых антибиотиков с любым из рассмотренных дезокситетрануклеотидов, независимо от числа пиримидин-пуриновых (pur-pur) или pur-pur сайтов в последовательности, довольно низкие, то есть связывание второй молекулы антибиотика с дуплексом тетрамеров имеет явно антикооперативный характер. Этот факт, с учётом данных 2M- NOESY и результатов по комплексообразованию ароматических красителей профлавина и бромистого этидия с аналогичными дезокситетрануклеотидами в идентичных экспериментальных условиях, однозначно свидетельствует, что местами преимущественной посадки антибиотика дауномицина являются как минимум триплетные нуклеотидные последовательности.

При этом следует отметить, что различия в значениях равновесных констант K_2 реакций образования 1:2 комплексов антибиотиков с дуплексом рассмотренных дезокситетрануклеотидов не превышает 20 % (табл. 1), то есть дауномицин не проявляет явной сиквенс - специфичности при замене А-Т-пары на Г-С-пару в триплетной последовательности. По-видимому, селективность связывания DAU и NOG, главным образом, определяется наличием Г-С-пар оснований в триплете, образованием водородных связей между антибиотиком и соседними основаниями гуанина и цитозина в интеркалированном комплексе [12,13].

Что касается взаимодействия антибиотиков с одноцепочечным дезокситетрануклеотидом, то равновесные константы K_1 образования 1:1 комплекса дауномицина с тетрамерами оказываются совпадающими в пределах погрешности их определения для всех исследованных последовательностей. Вместе с тем, для 1:1 комплексов NOG с дезокситетрануклеотидами наблюдаются более существенные различия в значениях K_1 (до 40%), что, по-видимому, связано с большей конформационной свободой одноцепочечной молекулы, меньшей вероятностью образования специфических водородных связей в такой последовательности между основаниями ДНК и антибиотиками и отсутствием стабилизирующего эффекта за счёт укладки аминокислотного остатка в малой бороздке, как это имеет место в двойной спирали ДНК.

Значения равновесных констант K_3 образования 2:1 комплексов DAU и NOG с одноцепочечными дезокситетрануклеотидами близки между собой и существенно ниже, чем 1:1 комплексов (табл. 1), то есть связывание второй молекулы антибиотика с тетрамерами в мономерной, также как и в дуплексной форме, имеет явно антикооперативный характер. Это, очевидно, определяется наличием у хромофоров антибиотиков массивных сахарных остатков, создающих определённые стерические препятствия при посадке второй молекулы антибиотика на короткую тетрануклеотидную последовательность.

По значениям констант равновесия (табл. 1) было рассчитано относительное содержание молекулярных комплексов в зависимости от $r = N_0/D_0$, то есть отношения концентраций дезокситетрануклеотида в дуплексе к исходной концентрации антибиотика. На рис. 4, 5, в качестве примера, приведены также зависимости для растворов дауномицина и ногамицина с нуклеотидами 5'-d(TGCA) и 5'-d(AGCT) соответственно.

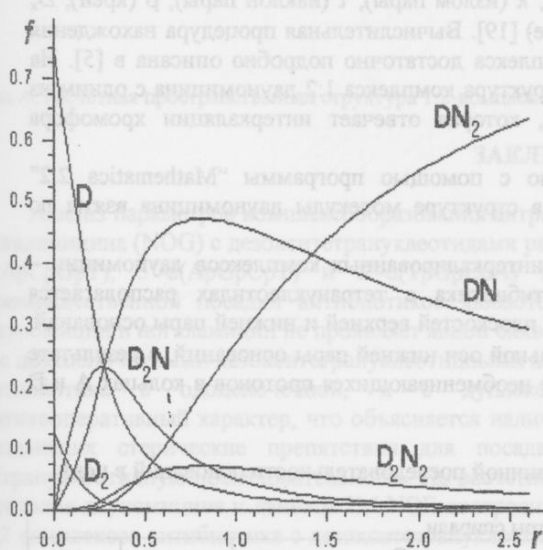


Рис 4. Зависимости относительного содержания мономеров дауномицина и комплексов антибиотика с 5'-d(TGCA) в водном растворе от $r = N_0/D_0$, $T = 303$ K.

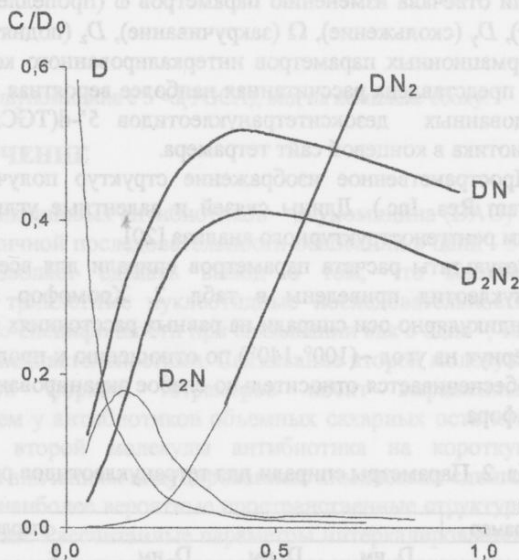


Рис 5. Зависимости относительного содержания мономеров дауномицина и комплексов антибиотика с 5'-d(AGCT) в водном растворе от $r = N_0/D_0$, $T = 318$ K.

Относительное содержание комплексов 1:1 и 2:1 антибиотика с одной нитью тетрануклеотида оказывается довольно значительным при малых r ($r < 0.5$), в то время как доля комплекса 1:2 становится преобладающей при $r > 1.4$ и $r > 0.7$ для растворов тетрамеров с DAU и NOG, соответственно. Как отмечалось и ранее [5,6], максимумы на концентрационных кривых для комплексов 1:1 2:1 и 2:2 соответствуют значениям r , близким к стехиометрическим соотношениям исходных концентраций лиганда и тетрануклеотида для соответствующих типов комплексов.

Структуры 1:2 комплексов антибиотиков с дуплексами дезокситетрануклеотидов

Индукцированные химические сдвиги протонов дауномицина и ногаламицина $\Delta\delta_i = \delta_m - \delta_p$, где $i=1, 2, 3, 4$ соответствует типу комплекса (табл. 1), существенно меньше, чем рассчитанные величины $\Delta\delta_i$ для аналогичных комплексов исследованных тетрануклеотидов с красителями профлавином и бромистым этидием [4-6]. Относительно низкое экранирование необменивающихся протонов DAU и NOG в комплексах с одноцепочечным и двухспиральным дезокситетрануклеотидом предполагает, что взаимная ориентация хромофора антибиотика и плоскостей пар оснований существенно отлична от наблюдаемой для ароматических молекул красителей профлавина и бромистого этидия. В частности, можно сделать заключение, что хромофоры антибиотиков DAU и NOG ориентированы не параллельно, а перпендикулярно продольным осям плоскостей пар оснований в спирали, как это имеет место в кристаллических структурах интеркалированных комплексов этих молекул [12,13]; необменивающиеся протоны в А и D кольцах хромофоров, а также в боковых сахарных кольцах NOG (рис. 1) располагаются при этом достаточно далеко от плоскостей пар оснований в интеркалированном комплексе, и их экранирование невелико.

Анализ структур 1:2 комплексов дауномицина с дезокситетрануклеотидными дуплексами проводили, как и раньше [4-6], на основании рассчитанных предельных значений протонных химических сдвигов (табл. 1) и данных 2М – ЯМР - спектроскопии. При расчете комплексов 1:2 DAU с тетрамерами использовали модифицированную модель эквивалентных магнитных диполей [5], полученную в результате аппроксимации квантово-механических кривых экранирования для азотистых оснований нуклеиновых кислот [18].

Наличие в хромофоре антибиотика NOG, в отличие от DAU, существенно меньшего количества необменивающихся протонов (см. табл. 1), не позволяет провести строгий расчет структуры интеркалированного комплексов 1:2 антибиотика с дезокситетрануклеотидами с использованием данной методики.

В настоящей работе рассчитывали экранировку необменивающихся протонов хромофора дауномицина парами G-C, C-G; A-T, G-C и A-T, C-G в интеркалированных комплексах 1:2 при вариации конформационных параметров спирали. Последовательность преобразований координат в двойной спирали отвечала изменению параметров ω (пропеллер), κ (излом пары), τ (наклон пары), ρ (крен), D_x (сдвиг), D_y (скольжение), Ω (закручивание), D_z (поднятие) [19]. Вычислительная процедура нахождения конформационных параметров интеркалированного комплекса достаточно подробно описана в [5]. На рис. 6 представлена рассчитанная наиболее вероятная структура комплекса 1:2 дауномицина с одним из исследованных дезокситетрануклеотидов 5'-d(TGCA), которая отвечает интеркаляции хромофора антибиотика в концевой сайт тетрамера.

Пространственное изображение структур получено с помощью программы "Mathematica 2.2" (Wolfram Res. Inc.). Длины связей и валентные углы в структуре молекулы дауномицина взяты по данным рентгеноструктурного анализа [20].

Результаты расчета параметров спирали для всех интеркалированных комплексов дауномицин – тетрануклеотид приведены в табл. 2. Хромофор антибиотика в тетрануклеотидах располагается перпендикулярно оси спирали на равных расстояниях от плоскостей верхней и нижней пары оснований, и повернут на угол $\sim(100^\circ-140^\circ)$ по отношению к продольной оси нижней пары оснований, в результате чего обеспечивается относительно слабое экранирование необменивающихся протонов в кольцах А и D хромофора.

Табл. 2. Параметры спирали для тетрануклеотидов различной последовательности оснований в цепи.

тетрамер	параметры спирали								
	$D_y, \text{нм}$	$D_x, \text{нм}$	$D_z, \text{нм}$	κ	ω	Ω	τ	ρ	ψ
d(TGCA)	0,15	0,08	0,70	-2,0°	-6,0°	35°	7,8°	3,5°	110°
d(ACGT)	-0,13	0,07	0,71	4,5°	-7,0°	32°	12,0°	4,5°	100°
d(AGCT)	-0,04	-0,04	0,71	4,5°	-9,0°	35°	-3,2°	4,5°	140°

В расчётных наиболее вероятных структурах 1:2 комплексов (рис. 6) аминокислотный остаток располагается в малой бороздке двойной спирали и фактически блокирует третью пару оснований, что, по-видимому, является основной причиной низкой вероятности связывания второй молекулы антибиотика с коротким дезокситетрануклеотидным дуплексом. Важно отметить, что раскручивание спирали в месте интеркаляции практически отсутствует и составляет лишь $1^\circ-4^\circ$ ($\Omega=35^\circ-32^\circ$). Полученный результат хорошо согласуется с рентгеноструктурными данными [13].

Следует отметить, что при встраивании хромофора дауномицина в *pur-pur* d(AG)-сайт дезокситетрануклеотида d(AGCT) существенно меняется угол поворота хромофора антибиотика в сравнении с интеркалированными комплексами в *pur-pur* и *pur-pur* сайты других исследованных

тетрамеров и составляет $\sim 140^\circ$ по отношению к продольной оси нижней пары оснований (табл.2). Можно сделать заключение, что ориентация хромофора дауномицина в комплексе с дезокситетрануклеотидным дуплексом в растворе существенно зависит от последовательности оснований в сайтах интеркаляционного связывания антибиотика. Вместе с тем характерные структурные особенности интеркалированных комплексов дауномицина с фрагментами ДНК сохраняются для всех исследованных дезокситетрануклеотидов независимо от последовательности оснований в цепи.

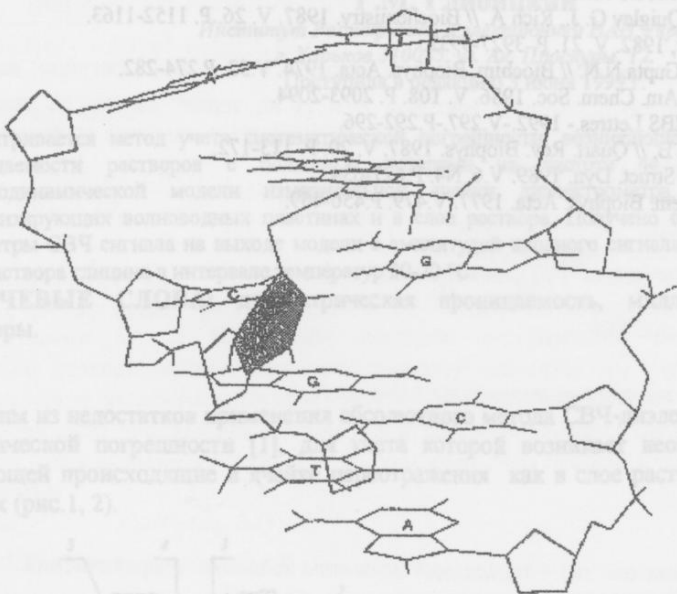


Рис. 6. Расчётная пространственная структура 1:2-комплекса дауномицина с 5'-d(TGCA), вид на комплекс сбоку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ параметров комплексообразования антрациклиновых антибиотиков – дауномицина (DAU) и ногаламицина (NOG) с дезокситетрануклеотидами различной последовательности оснований в цепи - 5'-d(ApCpGpT), 5'-d(ApGpCpT) и 5'-d(TpGpCpA) позволяет сделать вывод о том, что местами преимущественной посадки антибиотиков являются триплетные нуклеотидные последовательности. Дауномицин и ногаламицин не проявляет явной сиквенс-специфичности при связывании как с одно-, так и с двухцепочечными дезокситетрануклеотидными последовательностями. Связывание второй молекулы антибиотика с одоцепочечной, и с дуплексной формой тетрамеров носит выраженный антикооперативный характер, что объясняется наличием у антибиотиков объемных сахарных остатков, создающих стерические препятствия для посадки второй молекулы антибиотика на короткую тетрануклеотидную последовательность. По расчётным значениям индуцированных химических сдвигов протонов дауномицина и данным 2M-NOE построены наиболее вероятные пространственные структуры 1:2 комплексов антибиотика с дезокситетрануклеотидами. Рассчитанные параметры интеркалированных комплексов 1:2 DAU с тетрануклеотидными дуплексами находятся в хорошем согласии с результатами рентгеноструктурных исследований подобных комплексов в кристаллах.

Благодарность Объединённому исследовательскому центру Лондонского университета за предоставленную возможность в Беркбек колледже использовать для измерений ЯМР-спектрометр 500 МГц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gale E. F., Cundliffe E., Reynolds P. E., Richmond M. H., Waring M. J The Molecular Basis of Antibiotic Action. 2nd edn. N. Y.: John Wiley, 1981, 500 p.
2. Arcamone F., Penco S. Anthracyclines and Anthracenedione-based Anticancer Agents. Lown J. W. ed. N. Y.: Elsevier, 1988. P. 1-43.
3. Searle M. S. // Progr. NMR spectr. 1993. V. 25. P. 403-480.
4. Davies D.B., Djimant L.N., Veselkov A.N. //Nucleos. & Nucleot. 1994. V.13. P.637- 655.

5. Davies D.B., Veselkov A.N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1996. V.92. P.3545-3557.
6. Davies D.B., Karawajew L., Veselkov A.N. // Biopolymers. 1996. V.38. P.745-757.
7. Chaires J. B. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 4204-4211.
8. Chaires J. B., Fox K. R., Herrera J. E., Britt M., Waring M. J. // Biochemistry, 1987. V. 27. P. 8227-8236.
9. Zhang X., Patel D.J. // Biochemistry. 1990. V.29. P.9451-9466.
10. Searle M.S., Bicknell W. // Eur. J. Biochem. 1992. V.205. P.45-58.
11. Robinson H., Yang D., Wang A.H.-J. // Gene. 1994. V.149. P.237-258.
12. Smith C.K., Brannigan J.A., Moore M.H. // J. Mol. Biol. 1996. V.263. P.237-258.
13. Wang A. H.-J., Ughetto G., Quigley G. J., Rich A. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 1152-1163.
14. Chaires J. B. // Biochemistry, 1982. V. 21. P. 3927-3932.
15. Das G.C., Dasgupta S., Das Gupta N.N. // Biochim. Biophys. Acta. 1974. V.53. P.274-282.
16. Bax A., Sammers M. F. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2093-2094.
17. Searle M.S., Lane A.N. // FEBS Lettres. - 1992.-V.297.-P.292-296.
18. Giessner-Prettre C., Pullman B. // Quart. Rev. Biophys. 1987. V. 20. P. 113-172.
19. Dickerson R.E. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1989. V.6, N4. P.627-634.
20. Neidle S., Taylor G. // Biochem. Biophys. Acta. 1977. V.479. P.450-459.

УДК 621.3.029.65:577

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПРИ ИЗМЕРЕНИЯХ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Г.М. Глибицкий

Институт Радиофизики и электроники НАН Украины,

г. Харьков 310085, ул. Ак. Проскуры, 12.

Поступила в редакцию 3 июня 1999 г.

Рассматривается метод учета систематической погрешности, возникающей при измерении комплексной проницаемости растворов с большими потерями на частоте 44 ГГц. Обосновывается выбор электродинамической модели измерительной ячейки диэлектromетра, учитывающей отражения в герметизирующих волноводных пластинах и в слое раствора. Получено общее выражение, связывающее параметры СВЧ сигнала на выходе модели с амплитудой входного сигнала. Приведены данные измерений 20% раствора глицина в интервале температур 20-70 °С.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диэлектрическая проницаемость, миллиметровые волны, водные растворы.

Одним из недостатков применения абсолютного метода СВЧ-диэлектromетрии является появление систематической погрешности [1], для учета которой возникает необходимость перейти к модели, описывающей происходящие в ячейке переотражения как в слое раствора, так и в герметизирующих пластинах (рис. 1, 2).

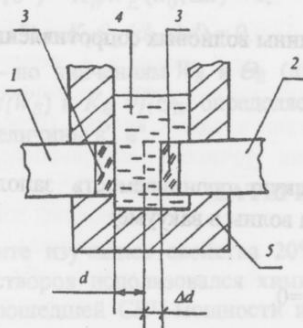


Рис. 1. Конструкция ячейки. 1 – входной волновод; 2 – выходной волновод; 3 – герметизирующие пластины; 4 – раствор; 5 – корпус ячейки.

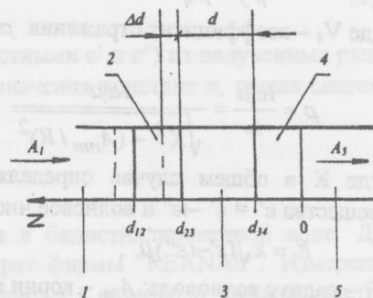


Рис. 2. Модель ячейки. 1 – входной волновод; 2, 4 – герметизирующие пластины; 3 – раствор; 5 – выходной волновод

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Рассматривая конструкцию кюветы при малой величине слоя водного раствора (0.5 – 1.0 мм), мы можем предположить [2], что дифракционное поле в этом промежутке является участком плоской волны, распространяющейся в границах цилиндра диаметром, равным диаметру волновода, излучающего СВЧ – мощность в ячейку. Таким образом, мы можем взять в качестве приближенной модели, описывающей процессы распространения в ячейке, сочлененные отрезки круглого цилиндрического волновода; исследовав зависимость амплитуды выходного сигнала и его фазы от величины амплитуды входного сигнала, мы попытаемся определить соответствие указанной упрощенной волноводной модели аналогичной зависимости для экспериментальной ячейки на примере вещества с известными диэлектрическими параметрами (воды при различных значениях температуры) и получить необходимые данные для учета систематической погрешности (калибровочные константы).

Рассмотрим сочленение нескольких волноводных отрезков круглого поперечного сечения, которые отличаются значением диэлектрической постоянной заполняющего их диэлектрика (рис.2) и имеют различные толщины. Стенки волноводных отрезков будем считать идеально проводящими; диэлектрики 2 и 4 – лишенными потерь ($\epsilon' = 4$), а диэлектрик 3 обладает комплексной проницаемостью $\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon''$, соответствующей какому-либо значению проницаемости дистиллированной воды из диапазона температур 20-70 °С.

Для получения зависимости выходного сигнала от величины входного мы воспользуемся методом Бреховских [3]: определим отношение тангенциальных составляющих поля в круглом волноводе E_h и H_h как [4]

$$\frac{E_h}{H_h} = i\omega\mu \frac{q_h}{\frac{dq_h}{dz}}$$

где $q_h = Ae^{-ihz} + Be^{ihz}$ - комплексная амплитуда двух встречных ТЕ - волн, бегущих вдоль волновода. Поскольку тангенциальные составляющие векторов E и H не терпят скачка на границе, то и их отношение должно быть непрерывно; поэтому мы можем записать в качестве граничных условий для сред 4 и 5 следующую систему уравнений:

$$\begin{aligned} i\omega\mu \frac{A_4e^{-ih_4z} + B_4e^{ih_4z}}{(A_4e^{-ih_4z} + B_4e^{ih_4z})'_z} &= i\omega\mu \frac{A_5e^{-ih_5z}}{(A_5e^{-ih_5z})'_z} \\ A_4e^{-ih_4z} + B_4e^{ih_4z} &= A_5e^{-ih_5z} \end{aligned} \quad (1)$$

откуда при $z = 0$ получаем выражение амплитуды A_5 через A_4 :

$$\begin{aligned} A_5 &= A_4(1 + V_4) \\ V_4 &= \frac{\rho_5 - \rho_4}{\rho_5 + \rho_4} \end{aligned} \quad (2)$$

где V_4 - коэффициент отражения. $\rho_{4,5}$ - определяют величины волновых сопротивлений:

$$\rho = \frac{i\omega\mu}{h} = \frac{i\omega\mu}{\sqrt{K^2 - (A_{nm}/R)^2}}$$

где K в общем случае определяется через комплексную проницаемость заполняющего волновод вещества $\varepsilon^* = \varepsilon' - i\varepsilon''$ и волновое число $k = 2\pi/\lambda$ (λ - длина волны в вакууме)

$$K = k\sqrt{(\varepsilon' - i\varepsilon'')\mu};$$

R - радиус волновода; A_{nm} - корни функции Бесселя $J_n(x)=0$.

Аналогично, для отрезков 3 и 4 запишем

$$\begin{aligned} i\omega\mu \frac{A_3e^{-ih_3(z-d_{34})} + B_3e^{ih_3(z-d_{34})}}{(A_3e^{-ih_3(z-d_{34})} + B_3e^{ih_3(z-d_{34})})'_z} &= i\omega\mu \frac{A_4e^{-ih_4z} + B_4e^{ih_4z}}{(A_4e^{-ih_4z} + B_4e^{ih_4z})'_z} \\ A_3e^{-ih_3(z-d_{34})} + B_3e^{ih_3(z-d_{34})} &= A_4e^{-ih_4z} + B_4e^{ih_4z} \end{aligned}$$

При $z = d_{34}$ получим значение A_4 через величину A_3 :

$$A_4 = A_3e^{ih_4d_{34}} \frac{1 + V_3}{1 + V_4e^{2ih_4d_{34}}} = A_3C_{43};$$

$$V_3 = \frac{\rho_4^y - \rho_3}{\rho_4^y + \rho_3};$$

где

$$\rho_4^y = \frac{1 + V_4e^{2ih_4d_{34}}}{1 - V_4e^{2ih_4d_{34}}}.$$

Рассматривая далее граничные условия для отрезков 2 и 1, получим окончательно

$$A_5 = A_1(1 + V_4)C_{12}C_{23}C_{34}$$

или в общем виде

$$A_n = A_1(1 + V_{n-1}) \prod_{j=1}^{j=n-1} C_{j,j+1}$$

Согласно методу переменной толщины необходимо определить отношение интенсивностей сигналов при двух величинах слоев раствора (d_0 и $d_0 + \Delta d$), а также соответствующий величине Δd набег фаз; поэтому необходимо рассчитать по предложенной модели значение отношения интенсивностей

$$W_M = \frac{(\operatorname{Re}(A_5(d_0)))^2 + (\operatorname{Im}(A_5(d_0)))^2}{(\operatorname{Re}(A_5(d_0 + \Delta d)))^2 + (\operatorname{Im}(A_5(d_0 + \Delta d)))^2}$$

Аналогично фазовый набег

$$\theta_M = \arctg\left(\frac{\operatorname{Im}(A_5(d_0 + \Delta d))}{\operatorname{Re}(A_5(d_0 + \Delta d))}\right) - \arctg\left(\frac{\operatorname{Im}(A_5(d_0))}{\operatorname{Re}(A_5(d_0))}\right)$$

Отношения амплитуд W_M , W_E (функция поглощения СВЧ мощности в растворе) и разность аргументов θ_M , θ_E (функции фазового сдвига СВЧ-волны на длине Δd) являются независимыми величинами (буквами M , E обозначены значения, рассчитанные по модели и измеренные экспериментально соответственно); при этом каждому значению W_E (θ_E) будет соответствовать определенное значение калибровочной константы $K_W = W_M/W_E$ ($K_\theta = \theta_M/\theta_E$).

Поэтому в процессе определения величин ε' и ε'' раствора решаются следующие задачи:

1) прямая задача – нахождение констант K_W , K_θ при измерении веществ с известными ε' и ε'' при этом решаются уравнения

$$W_M(d_0, \Delta d, \varepsilon', \varepsilon'') - K_W W_E(d_0, \Delta d) = 0; \quad (3)$$

$$\theta_M(d_0, \Delta d, \varepsilon', \varepsilon'') - K_\theta \theta_E(d_0, \Delta d) = 0.$$

2) обратная задача – по значениям W_E и θ_E (для растворов с неизвестными ε' и ε'') из полученных ранее зависимостей $K_W = f(W_E)$ и $K_\theta = f(\theta_E)$ определяем соответствующие значения констант и, решая систему (3), рассчитываем величины ε' , ε'' .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте изучались свойства 20% растворов глицина в бидистиллированной воде. Для приготовления растворов использовался химически чистый препарат фирмы "REANAL". Измерения интенсивностей прошедшей СВЧ-мощности и набег фазы производился с помощью диэлектromетра, описанного в [1]. Температура стабилизировалась ультратермостатом с точностью 0.1 °C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены величины, рассчитанные по волноводному методу [5] – данные о коэффициенте поглощения воды α_{WAT} и раствора α_{GL} , рассчитанного из отношения величин сигналов I_{d_0} , $I_{d_0+\Delta d}$ при соответствующих расстояниях между торцами входного и выходного волноводов

$$\alpha = -\ln(I_d / I_{d+\Delta d}) / 2\Delta d = -\ln(W_e) / 2\Delta d \quad (4)$$

фазовые константы β_{WAT} и β_{GL}

$$\beta = (\varphi_{d+\Delta d} - \varphi_d) / \Delta d = \theta_e / \Delta d \quad (5)$$

и значения ε'_{GL} и $\varepsilon''_{\text{GL}}$ для раствора глицина:

$$\varepsilon'_{\text{GL}} = (\lambda / \lambda_{\text{кр}})^2 + (\lambda / 2\pi)^2 (\beta^2 - \alpha^2)$$

$$\varepsilon''_{\text{GL}} = 2(\lambda / 2\pi)^2 \alpha \beta$$

Кроме того, в таблице приведены значения проницаемостей $\varepsilon'_{\text{GL-M}}$ и $\varepsilon''_{\text{GL-M}}$ раствора глицина, рассчитанные по модели (3).

Таблица 1.

t, °C	α_{WAT}	β_{WAT}	α_{GL}	β_{GL}	ε'_{GL}	$\varepsilon''_{\text{GL}}$	$\varepsilon'_{\text{GL-M}}$	$\varepsilon''_{\text{GL-M}}$
20	2.50	4.31	2.4	4.21	14.35	23.65	12.5	21.2
25	2.45	4.48	2.55	4.40	15.50	26.32	14.8	23.5
30	2.65	4.65	2.75	4.42	14.26	28.38	17.2	26.7
35	2.51	4.95	2.60	4.78	19.30	29.15	22.5	29.1
40	2.48	5.17	2.65	4.87	20.05	30.27	23.1	28.0
45	2.54	5.26	2.85	5.02	20.46	33.56	26.0	30.5
50	2.52	5.43	2.62	5.21	23.78	30.74	27.3	29.5
55	2.60	5.49	2.67	5.17	22.90	31.17	29.1	24.6
60	2.31	5.60	2.60	5.20	24.21	31.72	34.6	31.7
65	2.26	5.80	2.54	5.32	26.06	31.70	35.5	26.2
70	2.31	6.02	2.55	5.72	31.28	34.26	42.6	28.3

Как видно из полученных данных, вычисленные по модели (3) значения проницаемостей отличаются от рассчитанных по волноводному методу (4), (5) на 10-30%; с другой стороны, расчет статической проницаемости для воды по данным α_{WAT} и β_{WAT} показывает отличие от известных [7] величин на 2-10%.

ВЫВОДЫ

В связи с полученными результатами можно сделать вывод о том, что модель (3) не достаточно полно отражает процесс прохождения СВЧ мощности через слой раствора в кювете; с другой стороны, численный анализ модели (3) показал высокую чувствительность выходных данных (расчетные величины $\varepsilon'_{\text{GL-M}}$ и $\varepsilon''_{\text{GL-M}}$) относительно малых изменений входных данных (коэффициентов K_W , K_θ и значений W_E , θ_E). Следовательно, для повышения точности модельного расчета необходимо использовать наиболее близкие значения K_W , K_θ из зависимостей $K=f(W, \theta)$ по полученным значениям проницаемостей растворов с известными константами в широком диапазоне их изменения.

Повышенное значение коэффициента поглощения раствора глицина α_{GL} по сравнению с коэффициентом α_{WAT} поглощения СВЧ мощности для воды (по данным табл. 1) можно объяснить вкладом в релаксационный процесс мономерных цвиттерионов глицина, имеющих время релаксации на 30% меньше, чем у воды [6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глибickий Г.М. // Радиофизика и электроника. 1997. Т. 2, № 2, с. 156-159.
2. Вайнштейн Л.А. Электромагнитные волны. М. Сов. радио, 1957. 581 с.
3. Бреховских Л.М. Волны в слоистых средах. М. АН СССР, 1957, 489 с.
4. Кисунько Г.В. Электродинамика полых систем. Л. Воен. Ак. связи. 1949. 356 с.
5. Брандт А.А. Исследование диэлектриков на сверхвысоких частотах. М. Физматгиз, 1963. 404 с.
6. Зулфугурзаде К.Э., Мирзоев Ф.Г., Иманов Л.М. // Изв. АН Азерб. ССР. 1979, № 4, с. 111-114.
7. Ахадов Я.Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов. М., Наука, 1977, 400 с.

INTERACTION OF ANTIMICROBIAL AGENTS DECAMETHOXINUM AND AETHONIUM WITH MODEL MEMBRANES

O.V. Korzovskaya*, V.A. Pashinskaya, M.V. Kosevich, L.N. Lisetski*

*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine,
47, Lenin Avenue, Kharkov, 310164, Ukraine*

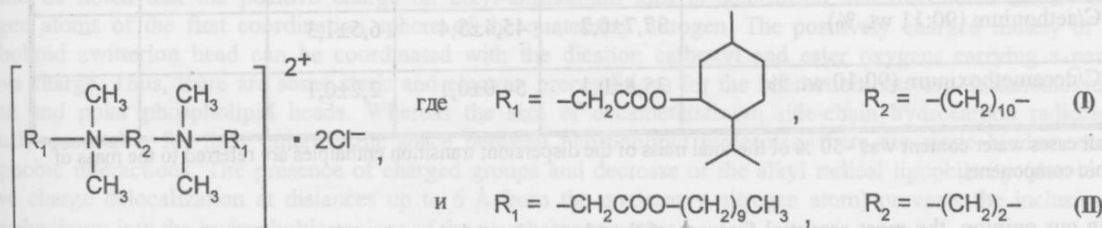
* *Institute for Single Crystals, 60, Lenin Ave., Kharkov, 310001*

Received 22 January 1999

Interaction of antimicrobial drugs decamethoxinum and aethonium, based on bisquaternary ammonium compounds, with model membranes is studied using scanning differential calorimetry and UV spectroscopy. It is shown that while the both drugs can interact with membrane structures based on hydrated dipalmitoylphosphatidylcholin, the mechanisms of such interactions for decamethoxinum and aethonium differ significantly. 4 °C decrease of the dipalmitoylphosphatidylcholin temperature of transition T_c to lamellar L_α -phase without considerable increase of the half-width of the calorimetry peak and enthalpy of the phase transition under the decamethoxinum action points to the interaction of this agent with polar heads of the phospholipids. Simultaneous decrease of T_c and smearing of the peak under aethonium action evidence a twofold character of its interaction both with the phospholipid polar head and non-polar tails. Correlation between the observed differences in the mechanisms of interaction with differences in the structure and electronic parameters of the dications of the two bisquaternary agents is discussed.

KEY WORDS: antimicrobial agents, decamethoxinum, aethonium, model membranes, hydrated phospholipids, phase transitions.

Cationic surface-active agents based on salts of mono- and bisquaternary ammonium compounds are known to possess bactericidal properties, and some of them are used as components of antimicrobial drugs [1, 2]. Among well-known examples of such drugs are decamethoxinum (I), [3, 4] and aethonium (II), [3, 5]:



As one can see, the two compounds differ both in length of the central polymethylene chain R_2 between the quaternary nitrogen atoms and in size and type of the side-chain substituent R_1 . Their antimicrobial action is somewhat different too: while both of them are active with respect to grampositive bacteria, decamethoxinum has, in addition, some fungicide activity [3].

The molecular mechanisms of the antimicrobial action of the drugs based on bisquaternary ammonium compounds have not yet been fully elucidated [6]. A number of data indicate that some effects of surface-active compounds cannot be related only with their damaging effect on cell membranes, but should be due to more complex processes involving cell metabolism [6]. The first stage of the drug-cell interaction, however, is a contact with a cell membrane. The elucidation of the nature of such interaction is an important problem of membrane biophysics and molecular pharmacology [7]. As all membranes are complex multicomponent systems, it is often more convenient to use model membranes of strictly determined composition, allowing to clear up some specific features of the action of membranotropic agents on the membrane lipid components.

One of the experimental methods widely used for this purpose is differential scanning calorimetry (DSC). In a recent review [8] a number of results are presented concerning changes in calorimetric peaks of phase transitions in hydrated 1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholynes on doping with different membranotropic agents. Similar data were reported in [9, 10], where we observed membranotropic agents of different classes (steroids, fatty acids, oligo- and polypeptides) to exhibit different mechanisms of interaction with the same model membrane structure. The method could be substantially extended through a parallel study of the behavior of the same membranotropic agents in a thermotropic liquid crystalline matrix based on cholesterol esters, as well as by analysis (for both types of matrices) of the temperature-dependent optical absorption and selective transmission spectra.

The aim of the present work was to clear up the mechanisms of interaction between the antibacterial agents (decamethoxinum and aethonium) and model membranes by the methods of DSC and UV-spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

The model membrane structure was formed by hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The compounds under investigation were added to DPPC in required concentrations (~ 10 wt. %), and then their water dispersions (50:50 wt. %) were prepared as described in [11].

DSC-thermogrammes were obtained using a thermoanalytical system Mettler TA 3000 (scan rate $2\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$). Absorption spectra in the near- and middle-UV region were obtained using a spectrophotometer Hitachi - 330 equipped with temperature cell on heating (sample thickness was $10\text{ }\mu\text{m}$).

RESULTS AND DISCUSSION

Quantitative data which bear witness to the effects of decamethoxinum and aethonium on calorimetric parameters of the phase transitions in hydrated DPPC are presented in Table 1. The data obtained under the same conditions for cholesterol and poly-L- α -alanin [10] are given for comparison. Typical temperature dependencies of UV-absorption spectra are given in Fig. 1; their good agreement with DSC data should be noted.

Table 1. Temperatures and enthalpies of the phase transitions in hydrated DPPC doped with membranotropic substances.

Composition of organic components *	Transition to L_{α} -phase			Transition L_{β} - P_{β}	
	T_c , °C	ΔH_c , кДж/кг	ΔT_c , °C	T_m , °C	ΔH_m , кДж/кг
DPPC	$42,3 \pm 0,4$	$50,0 \pm 4,7$	$2,2 \pm 0,5$	$36,5 \pm 0,6$	$4,7 \pm 1,7$
DPPC/ poly-L- α -alanin (90:10 wt. %)	$42,5 \pm 0,4$	$52,1 \pm 4,8$	$2,3 \pm 0,1$	$36,6 \pm 0,4$	$6,4 \pm 3,2$
DPPC /cholesterol (90:10 wt. %)	$41,1 \pm 0,3$	$20,2 \pm 1,6$	$6,5 \pm 0,5$	—	—
DPPC/aethonium (90:11 wt. %)	$37,7 \pm 0,2$	$45,4 \pm 5,4$	$6,5 \pm 1,3$	—	—
DPPC/decamethoxinum (90:10 wt. %)	$35,8 \pm 0,1$	$54,0 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	—	—

* In all cases water content was ~ 50 % of the total mass of the dispersion; transition enthalpies are referred to the mass of organic components.

In our opinion, the most essential features of the obtained results are the following. Under doping of DPPC with decamethoxinum, the temperature of DPPC transition to L_{α} -phase (T_c) decreased significantly, whereas its enthalpy and peak half-width remained almost unchanged. Doping with cholesterol, on the contrary, led to considerable broadening of the peak with practically no effect on T_c . Such behavior was noted repeatedly in the literature (see, e.g. [12, 13]. At the same time, practically no influence of poly-L- α -alanin on the transition to L_{α} -phase (as well as on the transition L_{β} - P_{β}) could be noted. Evidently, the substances studied present examples of quite distinct mechanisms of the drug interaction with model membrane structures.

Presumably, decamethoxinum, interacting with phospholipid polar heads, leads to their considerable disordering within a layer, which cause T_c decrease, similar to the effect of non-mesogenic dopants on temperatures of mesomorphic transition. At the same time, there is no evident influence of decamethoxinum on the ordering of DPPC alkyl tails and eventual change of this ordering during the transition to L_{α} - phase, which would lead to the peak broadening.

Cholesterol interacts mainly with hydrophobic acyl tails of phospholipid molecules and, consequently, flattens the transition peak due to its ordering action on the tails in the high-temperature phase and disordering action in the low-temperature one [12, 13], leading to a decrease in the transition entropy ΔS (and consequently, ΔH). Then, since cholesterol does not interact with polar heads of phospholipid molecules, T_c related to the ordering remains unchanged.

The behavior of poly-L- α -alanin is rather indifferent in this respect, for its specific interactions with both heads and tails of phospholipid are relatively weak.

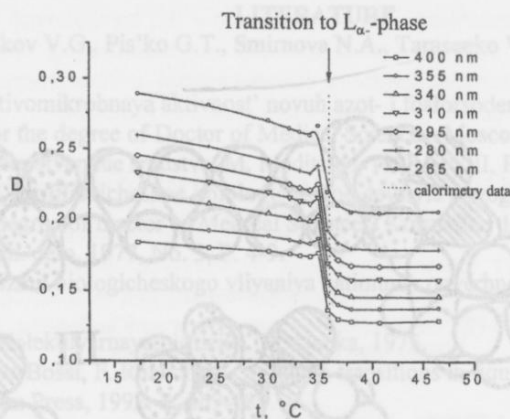


Fig. 1. Temperature dependences of optical absorption D in UV spectra for the 1:1 water dispersion DPPC/decamethoxinum (90:10 wt.%).

It was of interest to analyze in greater detail the correlation between the difference in the molecular structure of decamethoxinum and aethonium dications and the difference in the mechanisms of their interaction with model membranes. The dication structural and electronic parameters were determined from quantum-mechanics calculations using computer software package MOPAC-6 (method AM1) [14]. In Fig. 2 the optimized geometry of the decamethoxinum dication is shown. Two polar phospholipid heads are also shown to assess a geometrical correlation. It is clear that there may be some steric correlation between the negatively charged phosphate group in the polar phospholipid head and a region of the increased positive charge density at the ammonium groups in decamethoxinum. It should be noted that the positive charge on alkyl-ammonium ions is delocalized and distributed mainly over hydrogen atoms of the first coordination sphere of the quaternary nitrogen. The positively charged moiety of the phospholipid zwitterion head can be coordinated with the dication carboxyl and ester oxygens carrying a partial negative charge. Thus, there are some steric and electron preconditions for the interaction between decamethoxinum dication and polar phospholipid heads. Whereas the size of decamethoxinum side-chain hydrocarbon radicals is obviously unsuitable for their entering the space between phospholipid molecules, there are steric hindrances for hydrophobic interactions. The presence of charged groups and decrease of the alkyl radical lipophilicity (due to the positive charge delocalization at distances up to 6 Å from the quaternary nitrogen atom) prevents the inclusion of decamethoxinum into the hydrophobic regions of the membrane structure.⁴

Fig. 3 demonstrates the stretched and bended conformations of aethonium. The stretched structure (Fig. 3a) is the most favorable in the case of an isolated molecule. The bended one can be realized in the ordered condensed phases: the aethonium dication, due to its conformational mobility, can have a structure similar to the phospholipid one, which provides almost parallel arrangement of the side-chain alkyl radicals. In principle, the both of limiting conformations, as well as a number of transitional states, allow the inclusion of aethonium alkyl chains into a membrane. At the same time, a contact between the agent polar groups and the phospholipid heads can take place.

Thus, some structural features of the two agents determine the difference in mechanisms of their interaction with model membranes. Within the framework of the proposed concept we can say that decamethoxinum decreases the phase transition temperature T_c without the calorimetric peak broadening, increases the "effective temperature", inside the membrane, which is determined by its liquid crystalline state (similarly to thermotropic liquid crystals containing non-mesogenic dopants [16, 17]). In particular, this may be one of the factors responsible for bactericidal properties of decamethoxinum. As for aethonium, one can assume a similar mechanism of its antimicrobial action, partly modified due to its interaction with the phospholipid tails.

CONCLUSIONS

Analysis of the influence of membranotropic agents decamethoxinum and aethonium on calorimetric parameters allowed us to obtain information on specific features of their interaction with model membrane structures based on hydrated phospholipids. In particular, it has been shown that decamethoxinum interacts mainly with polar heads of phospholipids, decreasing the temperature of the transition to L_α -phase. Whereas for aethonium, its interaction with the phospholipid tails plays a dominant role. The data obtained are in good agreement with molecular structure features of the two agents, as well as with data on the behavior of other membranotropic agents in phospholipid matrices.

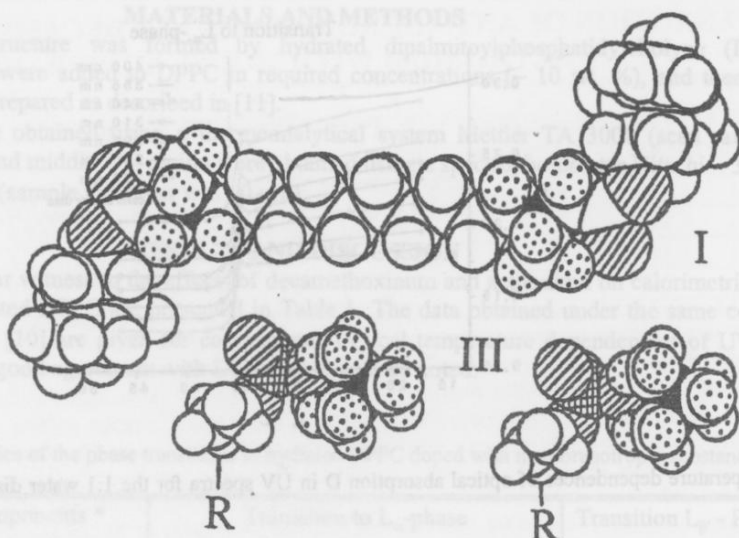


Fig. 2. Comparison of geometric parameters of decamethoxinum dication (I) and phosphatidilcholine polar heads (II) (R – the linkage chain and hydrophobic tails of the phospholipids). Diameters of the spheres are proportional to van der Waals atomic radii according to data [15]. Heteroatoms legend: O – section lining, P – netting, N – black color; the hydrogen atoms carrying the main positive charge are labeled by points.

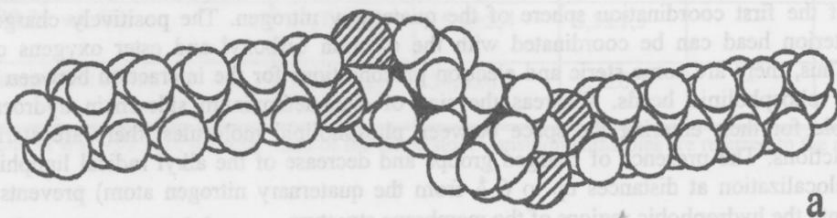
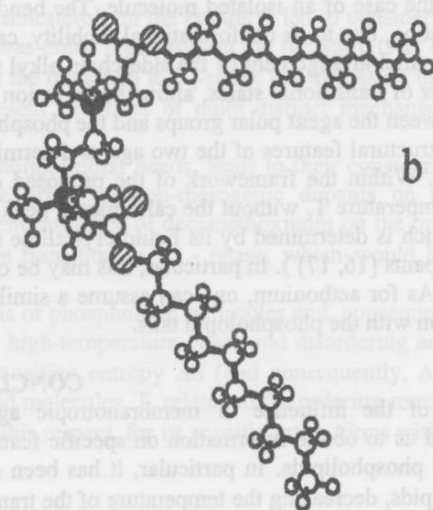


Fig. 3. Stretched (a) and bended (b) conformations of the aethonium dication.



LITERATURE

1. Gud' O.V., Ovchinnikov V.G., Pis'ko G.T., Smirnova N.A., Tarasenko V.S. // Mikrobiol. zhurn. 1987, V. 49, P. 82-85.
2. Volyanskiy Yu.L. Protivomikrobnaya aktivnost' novuh azot- i fosforsoderzhashchih organicheskikh soedineniy, fenolov i ferrotsenov: Thesis for the degree of Doctor of Medical Sciences. Moscow, 1981.
3. Mashkovskiy M.D. Lekarstvennye sredstva. M. Meditsina, 1978. Ch. II. P. 311, 366.
4. Paliy G.K. Lechebnoe, profilakticheskoe i biologicheskoe deystvie novogo antimikrobnogo preparata dekametoksina: Thesis for the degree of Doctor of Medical Sciences. Krasnodar, 1973.
5. Pis'ko G.T. // Vrachebn. delo. 1977, No. 3, P. 4-9.
6. Vievskiy A.N. Mehanizmu biologicheskogo vliyaniya kationnykh poverhnostno-aktivnykh veshchestv. Moscow, 1990. 249 P.
7. Vol'kenshteyn M.V. Molekulyarnaya biofizika. M. Nauka, 1975.
8. G. Albertini, M.G. Ponzi-Bossi, F. Rustichelli. In: Phase transitions in liquid crystals. Ed. S. Martellucci and A.N. Chester. New York, Plenum Press, 1992. P. 469-489.
9. Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Panikarskaya V.D., Antonyan T.P. // Zhurn. fiz. khimii. 1998, V. 72, No. 10. P. 1896-1898.
10. Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Panikarskaya V.D. // Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya. 1998, V. 62, No. 8, P. 1695-1697.
11. Korzovskaya O.V., Lisetski L.N., Panikarskaya V.D. // Biofizichnyi visnik. 1998, No. 2, P. 85-89.
12. H.J. Hinz, J.M. Sturtevan V. // J. Biol. Chem. 1972, V. 247, No. 11, P. 3697-3700.
13. Biochemical Thermodynamics. Ed. M.N. Jones. Elsevier, Amsterdam. 1979. Ch. 6.
14. Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. A new general purpose quantum mechanical molecular model // J. Amer. Chem. Soc. 1985, V. 107, P. 3902-3909.
15. Mikel'saar R.-H.N., Bruskov V.I., Poltev V.I. Novue pretseziionnye atomno-molekulyarnye modeli. Pushchino, ONTI NTsBI AN SSSR, 1985, 40 P.
16. Antonyan T.P., Lisetski L.N. // Zhurn. fiz. khimii. 1980, V. 55, No. 5, P. 1169-1173.
17. Chilaya G.S., Lisetski L.N. // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1986, V. 140, No. 2, P.243-286.

ВЗАЄМОДІЯ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ЕТОНІУ З МОДЕЛЬНИМИ МЕМБРАНАМИ

О.В. Корзовська*, В.А.Пашинська, М.В.Косевич, Л.М. Лисецький*

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І.Веркина НАН України,
310164, Харків, пр. Леніна, 47

*Інститут монокристалів НАН України, 310001, Харків, пр. Леніна, 60
Надійшла до редакції 22 січня 1999 р.

Вивчено взаємодію антимікробних препаратів декаметоксину та етонію, що належать до класу бісчвертинних амонійних сполук, з модельними мембранами, використовуючи методи диференціальної скануючої калориметрії та УФ-спектроскопії. Виявлено, що обидва препарати можуть взаємодіяти з мембранними структурами на основі дипальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ), проте механізми таких взаємодій для декаметоксину та етонію значно розрізняються. Так, під впливом декаметоксину температура переходу ДПФХ до L_α - фази (T_c) зменшується на 4°C без зміни напівширини калориметричного піка та ентальпії фазового переходу, що вказує на взаємодію цього препарату з полярними голівками фосфоліпідів. Під впливом етонію спостерігається водночас зниження T_c та розмивання форми піка, що свідчить про подвійний характер його взаємодії - як з полярними голівками, так і з неполярними гідрофобними хвостами ДПФХ. Обговорюється зв'язок виявленої відмінності взаємодій із різницею у структурі та електронних параметрах дикатіонів двох бісчвертинних сполук.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антимікробні препарати, декаметоксин, етоній, модельні мембрани, гідратовані фосфоліпіди, фазові переходи.

УДК 577.37

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РИБОНУКЛЕАЗЫ

Г.П.Горбенко

Харьковский государственный университет, пл. Свободы 4, 310077

Поступила в редакцию 15 июня 1999 г.

С использованием метода тушения собственной флуоресценции белков внешними тушителями исследовано влияние фосфолипидов на структурно-динамическую организацию рибонуклеазы. Разработан подход, позволяющий на основе комбинированного применения ионного (иод) и нейтрального (акриламид) тушителей оценить константу тушения и доступность поверхностных и внутренних белковых флуорофоров. Обнаружено индуцируемое фосфолипидами повышение вклада экспонированных ароматических остатков в общую флуоресценцию и увеличение константы тушения поверхностных и внутренних флуорофоров акриламидом. Эти данные интерпретированы в рамках представлений о частичном разворачивании молекулы рибонуклеазы и возрастании внутримолекулярной подвижности белка при образовании белок-липидных комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибонуклеаза, липосомы, белок-липидные комплексы, тушение флуоресценции, конформационные изменения белка

К настоящему времени стало общепризнанным, что прогресс в понимании структурно-функциональных взаимоотношений в мембранных системах невозможен без детального изучения динамических свойств белковых молекул, ассоциированных с липидами [1,2]. В наших предыдущих исследованиях были выявлены закономерности действия фосфолипидов на структурно-динамическую организацию гемоглобина и цитохрома С [3,4]. С использованием метода тушения собственной флуоресценции белков было обнаружено повышение флукуационной подвижности белковых молекул в комплексе с модельными мембранами, состоящими из фосфатидилхолина (ФХ) и дифосфатидилглицерина (ДФГ). С целью выяснения вопроса о том, существуют ли универсальные механизмы модификации структурной динамики белков под влиянием фосфолипидов, в настоящей работе были исследованы динамические аспекты поведения модельных систем, содержащих в качестве белкового компонента рибонуклеазу – катионный белок, не входящий в состав биомембран, но обладающий способностью к образованию комплексов с липидами, стабилизируемых, главным образом, электростатическими взаимодействиями [5]. Информация о закономерностях действия фосфолипидов на структурно-динамическую организацию рибонуклеазы была получена при исследовании тушения собственной флуоресценции белка внешними тушителями – ионами иода (I^-) и акриламидом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ФХ, ДФГ (Концерн “Биолек”, Харьков), рибонуклеазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота (“Reanal”, Венгрия). Липосомы формировали из смесей ФХ с ДФГ методом этанольной инъекции [6]. Чистоту препаратов фосфолипидов контролировали с помощью тонкослойной хроматографии в системе хлороформ : метанол : уксусная кислота : вода (25:15:4:2). В экспериментах использовали 5 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.4. Концентрацию липидов определяли по неорганическому фосфату [7].

Флуоресценцию остатков тирозина рибонуклеазы возбуждали и регистрировали при длинах волн 280 и 340 нм, соответственно. При получении зависимостей интенсивности флуоресценции от концентрации ионов иода ионную силу поддерживали постоянной путем добавления KCl. Для поддержания иодида в восстановленном состоянии в исследуемые образцы вводили 10 мМ $Na_2S_2O_3$. Измеряемую интенсивность флуоресценции корректировали с целью учета поглощения тушителей при длинах волн возбуждения и испускания, используя коэффициенты [8]:

$$k = \frac{(1 - 10^{-A_s})A_s}{(1 - 10^{-A})A} \quad (1)$$

где A - оптическая плотность флуорофора, A_s - общая оптическая плотность образца при длине волны возбуждения или регистрации флуоресценции. Константы тушения и доступность флуорофоров различных типов тушителем определяли на основе анализа массивов данных, полученных при изучении комбинированного тушения флуоресценции белков ионами иода и акриламидом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В зависимости от механизма, лежащего в основе дезактивации возбужденного состояния флуорофора, различают два основных типа тушения - статическое и динамическое [9,10]. Статическое тушение происходит при образовании нефлуоресцирующего комплекса между тушителем и флуорофором. Динамическое тушение, обусловленное диффузией тушителя в течение времени жизни возбужденного состояния и столкновением тушителя с флуорофором, в простейшем случае описывается уравнением Штерна-Фольмера [10]:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

где I_o, I - интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя и при концентрации тушителя $[Q]$, K_{sv} - константа Штерна - Фольмера.

Для корректной интерпретации данных по тушению флуоресценции важно оценить соотношение вкладов статического и динамического механизмов в величину I_o/I . Если в исследуемой системе реализуются оба механизма тушения, ур-е (2) принимает вид:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + K_m[Q] \quad (3)$$

где K_m - кажущаяся константа скорости тушения, зависящая от констант скорости динамического (k_{dyn}) и статического (k_{st}) тушения:

$$K_m = k_{dyn} + k_{st} + k_{dyn}k_{st}[Q] \quad (4)$$

Из ур-й (3) и (4) получаем:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + (k_{dyn} + k_{st})[Q] + k_{dyn}k_{st}[Q]^2 \quad (5)$$

Как следует из соотношения (4), по наклону зависимости K_m от $[Q]$ можно определить $k_{st}k_{dyn}$, а по пересечению с осью Y - значение $k_{st} + k_{dyn}$, а затем, путем решения квадратного ур-я (5) найти k_{st} и k_{dyn} . Наличие статического компонента тушения проявляется в нелинейности графиков Штерна-Фольмера (их отклонении вверх и вогнутости по отношению к оси Y). Противоположные изменения этих графиков (их изгиб вниз) являются следствием гетерогенности флуорофоров по эффективности тушения [9].

Собственная флуоресценция рибонуклеазы A , исследуемой в настоящей работе, обусловлена остатками тирозина, которые локализируются как на поверхности, так и внутри белковой молекулы [11]. Анализ результатов проведенных нами экспериментов показал, что зависимости I_o/I от концентрации используемых тушителей характеризуются изгибом вниз, а произведение $k_{st}k_{dyn}$ близко к 0. Это может служить аргументом в пользу незначительного вклада статического механизма и гетерогенности флуорофоров по эффективности тушения. Как известно, если в системе имеется n типов флуорофоров тушение флуоресценции можно описать соотношением: [9]:

$$\frac{I_o}{I} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{f_i}{1 + K_i[Q]} \right)^{-1} \quad (6)$$

где f_i и K_i соответствуют вкладу в излучение и эффективной константе тушения флуорофора i -го типа. Поскольку значение параметра n точно определить, как правило, невозможно, обычно рассматривают два типа флуорофоров - полностью доступные и недоступные тушителю. В этом случае тушение описывается модифицированным уравнением Штерна-Фольмера:

$$\frac{I_o}{I_o - I} = \frac{1}{fK_{sv}[Q]} + \frac{1}{f} \quad (7)$$

где f - доля начальной флуоресценции, подвергаемой тушению.

На рис. 1 представлены модифицированные графики Штерна-Фольмера, характеризующие тушение флуоресценции рибонуклеазы ионами иода. Как известно, ионы I^- тушат флуоресценцию ароматических остатков, расположенных на поверхности белковой молекулы [10]. Эффективность тушения зависит от физико-химических параметров микроокружения флуорофора - его полярности, заряда и релаксационных свойств. Для ионов I^- принципиально важным является распределение заряженных

групп в окружении ароматических остатков, оказывающее влияние на локальную концентрацию тушителя и частоту его столкновений с флуорофором. В отличие от ионных тушителей, акриламид способен тушить флуоресценцию не только поверхностных, но и внутренних флуорофоров. Коэффициент диффузии акриламида внутри белковой матрицы зависит от флуктуационной подвижности белка [12].

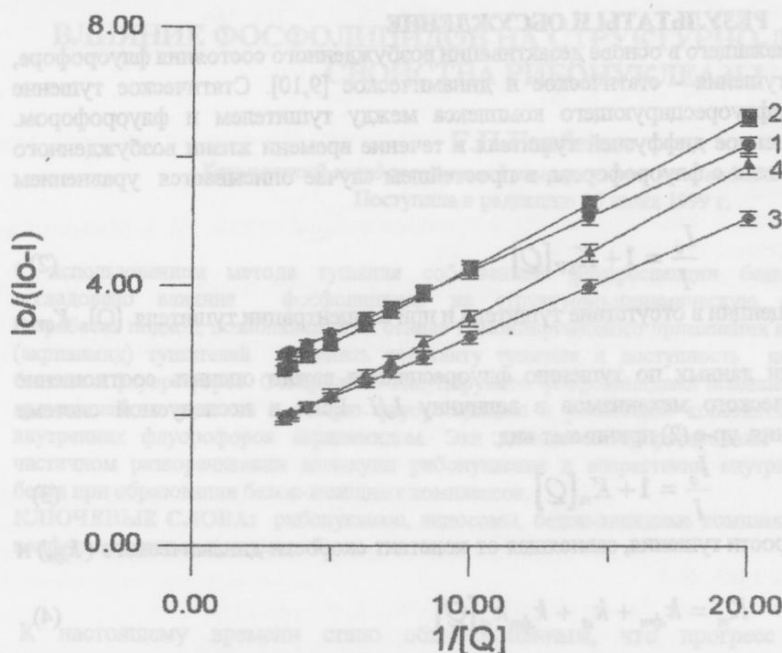


Рис. 1 Модифицированные графики Штерна - Фольмера для тушения собственной флуоресценции рибонуклеазы ионами иода: 1 - белок в 5 мМ натрий-фосфатном буфере, 2 - 4 - белок в суспензии липосом, состоящих из ФХ и ДФГ. Содержание ДФГ, мол.-%: 2 - 11, 3 - 25, 4 - 67.

Из данных о структуре рибонуклеазы известно, что два остатка тирозина (Тут₉₂ и Тут₉₇) расположены рядом с положительно заряженными остатками лизина, которые могут обуславливать повышение локальной концентрации ионов J⁻ [11]. Вблизи этого участка находится и остаток Тут₁₁₅. Остальные ароматические остатки (Тут₂₅, Тут₇₃, Тут₇₆) локализируются в гидрофобной области белковой глобулы. Поскольку молекула рибонуклеазы содержит остатки тирозина различной локализации, при исследовании структурно-динамических свойств белка представлялось целесообразным комбинированное применение тушителей двух типов - ионного и нейтрального, проникающего во внутреннюю область белковой глобулы. В настоящей работе в качестве такого рода тушителей были использованы ионы иода и акриламид. При анализе экспериментальных данных полагали, что в исследуемой системе содержится три типа ароматических остатков - поверхностные, внутренние и не подверженные тушению, относительные вклады которых в общую интенсивность флуоресценции равны f_e , f_i и f_n , соответственно ($f_e + f_i + f_n = 1$). В отсутствие тушителей интенсивность флуоресценции флуорофоров различных типов определяется выражениями:

$$I_{oe} = f_e I_o; I_{oi} = f_i I_o; I_{on} = f_n I_o \quad (8)$$

При селективном тушении флуоресценции поверхностных остатков ионами иода интенсивность флуоресценции равна:

$$I_1 = \frac{f_e I_o}{1 + K_{1e} [Q_1]} + f_i I_o + f_n I_o \quad (9)$$

где $[Q_1]$ - концентрация ионов иода, K_{1e} - константа тушения флуоресценции ионами иода. Введение в исследуемую систему второго тушителя - акриламида приводит к дополнительному уменьшению интенсивности флуоресценции:

$$I_{12} = \frac{f_e I_o}{1 + K_{1e} [Q_1] + K_{2e} [Q_2]} + \frac{f_i I_o}{1 + K_{2i} [Q_2]} + f_n I_o \quad (10)$$

где K_{2e} , K_{2i} - константы тушения поверхностных и внутренних остатков акриламидом, $[Q_2]$ - концентрация акриламида. Из ур-й (9) и (10) получаем:

$$Y = \frac{I_1 - I_{12}}{I_o} = f_e \left(\frac{1}{1 + K_{1e} [Q_1]} - \frac{1}{1 + K_{1e} [Q_1] + K_{2e} [Q_2]} \right) + f_i \left(1 - \frac{1}{K_{2i} [Q_2]} \right) \quad (11)$$

Влияние фосфолипидов на структурно-динамические свойства рибонуклеазы

На рис.2 представлены типичные зависимости параметра Y от концентрации акриламида, полученные при постоянной концентрации ионов иода ($0.2M$). Аппроксимация подобного рода зависимостей, измеренных при различных концентрациях иода, ур-ем (11), позволила определить параметры K_{2s} , K_2 и f_s . Значения K_{1s} и f_s находили, используя ур-е (7) для анализа данных по тушению флуоресценции ионами иода в отсутствие акриламида (Рис. 1). Как видно из табл. 1, в растворе $\sim 44\%$ общей флуоресценции рибонуклеазы обусловлено поверхностными остатками тирозина, и $\sim 56\%$ - внутренними. Важно иметь в виду, что параметры f_s и f_i зависят не только от числа остатков различных типов, но и от их квантовых выходов [13].

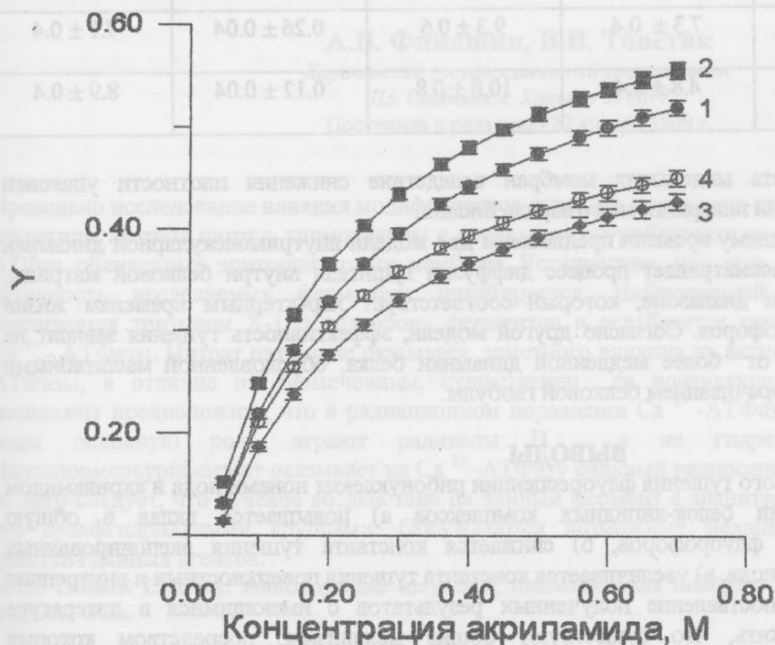


Рис. 2 Результаты комбинированного тушения собственной флуоресценции рибонуклеазы ионами иода и акриламидом. Параметр Y рассчитывали по ур-ю (11). Концентрация иода - $0.2M$.

В присутствии липосом наблюдалось возрастание вклада поверхностных остатков в общую флуоресценцию белка (Табл. 1). Обнаруженное повышение параметра f_s может быть обусловлено двумя основными факторами: а) увеличением числа экспонированных остатков тирозина и б) возрастанием квантового выхода поверхностных флуорофоров. Поскольку тирозин характеризуется низкой чувствительностью к полярности и релаксационным свойствам окружения [13,14], значительное увеличение квантового выхода флуорофоров представляется маловероятным. Можно предположить, что в комплексе с фосфолипидами происходит частичное разворачивание молекулы рибонуклеазы, сопровождающееся повышением степени экспонированности тирозиновых остатков. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения может служить увеличение константы тушения внутренних флуорофоров акриламидом, свидетельствующее о возрастании флуктуационной подвижности связанного с липидами белка (Табл. 1). Возрастание эффективности тушения белковой флуоресценции акриламидом обнаружено нами ранее при изучении взаимодействия гемоглобина [4] и цитохрома С с бислоями из ФХ и ДФГ [3]. Согласно литературным данным, аналогичный эффект наблюдался в системе альдолаза - фосфатидилинозитол [15].

Одной из возможных причин уменьшения константы тушения флуоресценции рибонуклеазы ионами иода является снижение концентрации анионов I^- вблизи отрицательно заряженной поверхности липосомальных мембран. О правомерности такого предположения свидетельствует усиление рассматриваемого эффекта при повышении содержания отрицательно заряженного фосфолипида - ДФГ в липидном бислое. Индуцируемое липидами увеличение константы тушения экспонированных тирозиновых остатков сложно объяснить увеличением коэффициента диффузии тушителя, поскольку тушение флуоресценции поверхностных флуорофоров как свободного, так и связанного белка происходит в водной среде. В то же время, учитывая зависимость константы динамического тушения от локальной концентрации тушителя [9], можно предположить, что в данном случае важную роль играет эффект распределения тушителя между липидной и водной фазами. К сожалению, в литературе нам не удалось найти сведения об особенностях распределения акриламида в исследуемой системе. Вместе с тем, не исключено, что тушитель концентрируется в полярной области липидного бислоя, или на границе

раздела липид-вода. Примечательно, что с увеличением содержания ДФГ в липидном бислое повышение K_{2e} становилось более выраженным (Табл. 1). Это можно объяснить возрастанием степени проникновения

Таблица 1

Параметры тушения собственной флуоресценции рибонуклеазы ионами иода и акриламидом

Система	f_e	K_{1e}, M^{-1}	K_{2e}, M^{-1}	f_i	K_{2i}, M^{-1}
Буфер	0.44 ± 0.03	11.6 ± 0.6	7.1 ± 0.5	0.56 ± 0.03	5.4 ± 0.3
ФХ:ДФГ (8:1)	0.52 ± 0.04	8.2 ± 0.6	8.3 ± 0.6	0.48 ± 0.04	6.3 ± 0.3
ФХ:ДФГ (3:1)	0.74 ± 0.04	7.3 ± 0.4	9.3 ± 0.6	0.26 ± 0.04	7.1 ± 0.4
ФХ:ДФГ (1:2)	0.88 ± 0.04	4.8 ± 0.4	10.8 ± 0.8	0.12 ± 0.04	8.9 ± 0.4

акриламида в полярную область модельных мембран вследствие снижения плотности упаковки липидных молекул при увеличении поверхностного заряда бислоя.

Важно отметить, что к настоящему времени предложены две модели внутримолекулярной динамики белка [16,17]. Первая модель рассматривает процесс диффузии тушителя внутри белковой матрицы, происходящий в наносекундном диапазоне, который соответствует характерным временам жизни флуоресценции белковых флуорофоров. Согласно другой модели, эффективность тушения зависит не только от наносекундной, но и от более медленной динамики белка, обусловленной масштабными флуктуациями и локальным разворачиванием белковой глобулы.

ВЫВОДЫ

Исследование комбинированного тушения флуоресценции рибонуклеазы ионами иода и акриламидом показало, что при образовании белок-липидных комплексов а) повышается вклад в общую флуоресценцию поверхностных флуорофоров, б) снижается константа тушения экспонированных ароматических остатков ионами иода, в) увеличивается константа тушения поверхностных и внутренних флуорофоров акриламидом. Сопоставление полученных результатов с имеющимися в литературе данными позволяет предположить, что существуют общие механизмы, посредством которых осуществляется модифицирующее воздействие фосфолипидов на конформацию водорастворимых белков. Одним из таких механизмов, по-видимому, является дестабилизация структуры белка, проявляющаяся в возрастании флуктуационной подвижности и частичном разворачивании белковой молекулы. Очевидно, что конкретные пути реализации этих механизмов могут быть различными в зависимости от особенностей структурной организации белка, природы липидов, физико-химических параметров липидного бислоя и условий комплексообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benga G., Holmes R. // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 1984. V. 43. P. 195-257.
2. Garavito M., White S. 1997. V.7. P. 533-536.
3. Горбенко Г.П. Дисс. канд. биол. наук: Минск, 1991. 138 с.
4. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. // *Биофизика*. 1990. Т. 35. С. 925-927.
5. Parahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E., Isac T. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1975. V.401. P. 317-335.
6. Batzli S., Korn E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1973. V. 298. P. 1015-1019.
7. Кейтс М. Техника липидологии. - М. Мир, 1975. 322 с.
8. Современные методы биофизических исследований. М. Высш. шк., 1988. 359 с.
9. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. Киев. Наук. думка, 1988. 277 с.
10. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М. Мир, 1986. 496 с.
11. Бурштейн Э.А. // *Биофизика*. 1968. Т. 718. С. 718-720.
12. Eftink M., Ghiron C. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 114. P. 199-227.
13. Бурштейн Э.А. // *Итоги науки и техники. ВИНТИ. М. Сер. Биофизика*. 1976. Т.6. 214 с.
14. Конев С.В., Аксентьев С.Л., Черницкий Е.А. Кооперативные переходы белков в клетке. Минск. Наука и техника, 1970. 202 с.
15. Gutowicz J., Kosmider-Schmidt A. // *Biophys. Chem.* 1987. V. 27. P. 97-102.
16. Woodward C., Hilton B. // *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.* 1979. V.8. P. 99-128.
17. Miller S., Narutis V. // *Biochemistry*. 1984. V. 23. P. 5113-5118.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 539.1.04:577.352.334

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ БЫСТРЫХ ЭЛЕКТРОНОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} - И Mg^{2+} - АТФаз ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

А.В. Финашин, В.В. Товстяк

Харьковский государственный университет,

Пл. Свободы, 4, Харьков 310077

Поступила в редакцию 22 января 1999 г.

Проведено исследование влияния модификаторов лучевого поражения тритона X-100, глутарового альдегида, нитрата натрия, тиомочевины и парахлормеркурибензоата на активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} - АТФаз облученных эритроцитарных мембран. Установлено, что при дозе облучения 1000 Гр активность исследуемых ферментов ингибируется. Наблюдаемый радиационный эффект усиливается тритоном X-100 для обоих ферментов и ослабляется глутаровым альдегидом для Ca^{2+} - АТФазы. Нитрат натрия не оказывает заметного влияния на активность облученной Ca^{2+} - АТФазы, в отличие от тиомочевины, существенно ее подавляющей. Полученные данные позволяют предположить, что в радиационном поражении Ca^{2+} - АТФазы продуктами радиолитического распада воды основную роль играют радикалы $\text{H}^\bullet$, а не гидратированные электроны. Парахлормеркурибензоат оказывает на Ca^{2+} - АТФазу сильный радиосенсибилизирующий эффект, из чего следует, что лучевое воздействие на данный фермент в значительной мере опосредовано его сульфгидрильными группами. Обсуждаются возможные механизмы модифицирующего действия данных агентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионизирующее излучение, плазматическая мембрана эритроцита, Ca^{2+} - АТФаза, Mg^{2+} - АТФаза.

К настоящему времени гипотеза о роли плазматической мембраны в качестве мишени действия ионизирующего излучения на организм получила теоретическое и экспериментальное обоснование с учетом многосторонних функциональных и регуляторных связей мембраны с клеточным метаболизмом [1-3]. Регуляция клеточного метаболизма осуществляется в значительной мере посредством изменений в распределении ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} между внутри- и внеклеточной средами [4]. За создание электрохимических градиентов данных ионов между клеткой и средой и поддержание их в определенном динамическом равновесии отвечают системы первично-активного транспорта. К таким системам относятся натриевый и кальциевый насос, рабочими молекулами которых являются соответственно Na^+ , K^+ - и Ca^{2+} - АТФазы. Многочисленные исследования доказывают, что основным звеном в патологическом изменении ионного гомеостаза при радиационном повреждении клетки являются нарушения процессов транспорта ионов через биологические мембраны [5,6].

В частности, изменение уровня ионизированного кальция в клетке наблюдается на самых ранних этапах лучевого воздействия [7,8]. Происходящие вслед за этим биохимические нарушения клеточного метаболизма развиваются по каскадному механизму, но в основе своей сводятся к кальцийзависимой активации или инактивации целого набора ключевых ферментов, играющих регуляторную роль в функционировании клетки. В связи с этим внимание исследователей привлекают системы, поддерживающие гомеостаз ионов Ca^{2+} в клетке. Выяснение закономерностей функционирования этих систем позволило бы глубже понять молекулярные механизмы поражающего действия радиации на организм, а также разработать методы регуляции этих систем для компенсации патологического перераспределения катионов, вызванного лучевым воздействием.

К числу кальцийтранспортирующих систем, обладающих ранней радиочувствительностью, относится Ca^{2+} - АТФаза [9,10]. В мембранах эритроцитов данный фермент изучен более полно по сравнению с другими клетками, однако результаты исследований воздействия радиации, приведенные в литературе, весьма противоречивы. Среди возможных видов лучевого воздействия на эритроцитарные мембраны наиболее подробно исследованы рентгеновское и гамма-излучение [11,12]. Значительно меньше внимания уделялось изучению взаимодействия пучков заряженных частиц с этими

биоструктурами. Вместе с тем известно, что биологическое действие быстрых электронов характеризуется рядом особенностей, связанных с неравномерностью пространственно-временного распределения энергии излучения и исключительно высокой мощностью дозы [13,14]. Важно также отметить, что вторичные электроны, образующиеся при взаимодействии рентгеновского или гамма-излучения с биоструктурами, в значительной степени определяют формирование радиационных эффектов [15,16]. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования действия быстрых электронов на системы активного транспорта ионов Ca^{2+} в плазматических мембранах эритроцитов, одной из которых является Ca^{2+} -АТФаза. Практически неизученным остается вопрос о функционировании при радиационном воздействии другого фермента эритроцитарной мембраны - Mg^{2+} -АТФазы.

Ферментативная активность данных белков при воздействии ионизирующего излучения в значительной мере определяется структурно-динамическим состоянием клеточных мембран. Поэтому с целью установления закономерностей радиационного повреждения Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФаз эритроцитарной мембраны было проведено исследование модифицирующего влияния детергента тритона X-100 (TX-100) и глутарового альдегида (ГА) на радиочувствительность этих ферментов.

Для ответа на вопрос о том, как (прямо или опосредованно) оказывают свое действие электроны с энергией 5 МэВ, изучалась зависимость степени инактивации Ca^{2+} -АТФазы от концентрации мембранного белка в растворе [17]. Также для выяснения конкретных механизмов повреждающего действия ионизирующей радиации на биомакромолекулы и тех структурных компонентов этих молекул, которые подвергаются радиационному поражению, был проведен ряд экспериментов с использованием таких модификаторов радиационного воздействия, как нитрат натрия NaNO_3 , тиомочевина (ТМ) и параклормеркурибензоат (ПХМБ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали тени эритроцитов (ТЭ) выделенные из бычьей крови или крови крыс [18]. Средой суспендирования полученных мембран служил 5 мМ Na-фосфатный буфер (рН – 7,6). Концентрацию белка в суспензии мембран определяли по методу Лоури и соавт. [19]. Мембраны подвергали облучению быстрыми электронами на линейном ускорителе в дозе 1000 Гр.

Для модификации структурного состояния мембран применяли TX-100 и ГА, добавки которых к суспензии мембран производились за 24 часа до облучения до конечных концентраций TX-100 – 0,001 и 0,005 %, ГА – 0,002 и 0,01%. При выяснении вопроса о прямом или опосредованном пути воздействия облучения на белки использовались суспензии ТЭ из бычьей крови с концентрацией мембранного белка 0,62 и 6,2 мг/мл. Конечные концентрации NaNO_3 , ТМ и ПХМБ в суспензии облученных мембран составляли 7 мМ, 17 мМ и 5 мкМ соответственно. Данные модификаторы добавлялись к суспензии ТЭ непосредственно перед облучением, чтобы избежать их самостоятельного воздействия на мембраны.

Ферментативную активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФаз определяли, как описано ранее [20]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из представленных в табл.1 данных можно видеть, что облучение суспензий мембран в дозе 1000 Гр вызывает ингибирование активности Ca^{2+} - АТФазы в пределах 15-17 % ($p < 0.05$). При 0,001 %-ной концентрации TX-100 в суспензии облученных мембран этот показатель возрастает до 32 % ($p < 0.05$). Динамика отмеченного эффекта нарастает с увеличением концентрации TX-100. Присутствие 0,005 %-ной концентрации данного агента приводит к 45 %-ному ингибированию Ca^{2+} - АТФазной активности в сравнении с облученным образцом, не содержащим TX-100 ($p < 0.05$).

Данные табл.2 приводят к выводу о существенно более высокой радиорезистентности Mg^{2+} -АТФазы по сравнению с Ca^{2+} - АТФазой, так как ее ферментативная активность ингибируется при дозе 1000 Гр лишь на 5% ($p < 0.05$). Полученный эффект не сохраняется в случае предварительного внесения TX-100 в облучаемую суспензию. Как видно из полученных данных, при концентрациях TX-100 в 0,001 и 0,005 %, ингибирование Mg^{2+} -АТФазы возрастает до 15 и 22% соответственно. Следует отметить, что TX-100 оказывает в ходе облучения относительно большее влияние на Mg^{2+} -АТФазу в сравнении с Ca^{2+} -АТФазой при каждой из исследованных концентраций TX-100. При 0,001%-ной концентрации данного модификатора в суспензии мембран эффект облучения увеличивается для Ca^{2+} -АТФазы в 2,1 раза, а для Mg^{2+} -АТФазы – в 3 раза в сравнении с облученным образцом, не содержащим TX-100 ($p < 0.05$). В случае 0,005%-ной концентрации TX-100 эффекты облучения для Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФаз возрастают в 2,6 и 4,4 раза соответственно ($p < 0.05$).

При интерпретации полученных экспериментальных данных следует учитывать современные представления о механизмах взаимодействия TX-100 с биомембранами. Отличительным свойством этого

Таблица 1

Влияние тритона X-100 и глутарового альдегида на изменение активности Ca^{2+} -АТФазы при радиационном воздействии

Ферментативная активность и ее относительное изменение	Контроль	Облучение	Контроль + модификатор	Облучение + модификатор	Концентрация модификатора, %	Тип модификатора
1	$29,4 \pm 0,6$	$25,0 \pm 0,9$	$28,3 \pm 0,2$	$19,2 \pm 0,8$	0,001	TX-100
2	100	85 ± 3	100	68 ± 3		
1	$32,3 \pm 1,0$	$26,8 \pm 0,3$	$30,8 \pm 0,6$	$16,9 \pm 1,5$	0,005	
2	100	83 ± 1	100	55 ± 5		
1	$29,4 \pm 0,6$	$25,0 \pm 0,9$	$30,8 \pm 0,9$	$29,3 \pm 0,6$	0,002	ГА
2	100	85 ± 3	100	95 ± 2		
1	$32,3 \pm 1,0$	$26,8 \pm 0,3$	$34,1 \pm 0,7$	$32,7 \pm 0,7$	0,01	
2	100	83 ± 1	100	96 ± 2		

1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 - относительное изменение ферментативной активности, %

Таблица 2

Влияние тритона X-100 и глутарового альдегида на изменение активности Mg^{2+} -АТФазы при радиационном воздействии

Ферментативная активность и ее относительное изменение	Контроль	Облучение	Контроль + модификатор	Облучение + модификатор	Концентрация модификатора, %	Тип модификатора
1	$198,3 \pm 5,9$	$188,3 \pm 4,0$	$200,6 \pm 4,0$	$170,5 \pm 2,0$	0,001	TX-100
2	100	95 ± 2	100	85 ± 1		
1	$192,6 \pm 3,9$	$183,0 \pm 5,8$	$195,4 \pm 5,9$	$152,4 \pm 3,9$	0,005	
2	100	95 ± 3	100	78 ± 2		
1	$198,3 \pm 5,9$	$188,3 \pm 4,0$	$208,2 \pm 8,3$	$199,9 \pm 6,2$	0,002	ГА
2	100	95 ± 2	100	96 ± 3		
1	$192,6 \pm 3,9$	$183,0 \pm 5,8$	$203,2 \pm 2,0$	$193,3 \pm 4,0$	0,1	
2	100	95 ± 3	100	95 ± 2		

1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 - относительное изменение ферментативной активности, %

Исследование модифицированного действия быстрых электронов...

неионогенного детергента является мягкое мембранное действие. Встраиваясь в биологические мембраны, молекулы TX-100 разрушают липид-липидные и белок-липидные мембранные гидрофобные взаимодействия, однако данные нарушения не носят тотального характера при достаточно низких концентрациях данного детергента. При соблюдении этого же условия TX-100 практически не затрагивает белок-белковых взаимодействий, не нарушая нативных конформаций мембранных белков.

В формировании радиационно-индуцированных изменений конформации белков важную роль играет характер белок-липидных взаимодействий. Нарушение свойственных данному белку белок-липидных взаимодействий, реализуемых через аннулярное кольцо, вызывает изменение нативной конформации белковой молекулы. Возможный механизм наблюдаемых эффектов может сводиться к вытеснению аннулярных мембранных липидов и замещению их молекулами TX-100. Мембранный фермент будет переходить при этом в некую «напряженную», нестабильную конформацию. В этой конформации фермент сохраняет способность практически без изменений осуществлять свои каталитические функции, что подтверждается данными табл. 1 и 2, из которых видно, что активности обоих ферментов примерно одинаковы для необлученных образцов, как в присутствии, так и в отсутствие TX-100. Однако, «напряженная» конформация фермента по сравнению с нативной характеризуется существенно меньшей устойчивостью к радиационному воздействию. Следовательно в основе сенсibilизации Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФаз к облучению посредством добавления TX-100 лежит нарушение естественных белок-липидных мембранных взаимодействий.

Действие глутарового альдегида на биологические мембраны отличается от мембранных эффектов TX-100. ГА стабилизирует белково-липидный матрикс, взаимодействуя посредством карбоксильных групп с обращенными во внеклеточную среду свободными аминогруппами полипептидных цепей мембранных белков. Это сопровождается увеличением вязкости мембраны и снижением всех видов подвижности белка [22].

Из данных табл.1 можно видеть, что активность Ca^{2+} - АТФазы в облученных в присутствии ГА суспензиях ТЭ незначительно отличается от контрольных образцов, содержащих модификатор. Изменение величины ингибирования находится в пределах 4-5 % ($p < 0.05$). В отсутствие модификатора эффект облучения существенно больше. Ингибирование ферментативной активности Ca^{2+} - АТФазы в этом случае составляет 15-17 % ($p < 0.05$). Следовательно, предварительное внесение ГА в облучаемую суспензию в конечных концентрациях 0,002 и 0,01% позволяет уменьшить эффект радиационной инактивации фермента в 3 и 4,2 раза соответственно ($p < 0.05$). В отношении Mg^{2+} -АТФазы, как следует из представленных в табл. 2 данных, не удалось зарегистрировать существенного влияния ГА на изменение ферментативной активности в облучаемых суспензиях мембран ($p < 0.05$).

Интерпретируя экспериментальные данные, полученные при модификации радиационного воздействия на суспензии ТЭ посредством ГА, следует принимать во внимание молекулярные механизмы действия лучевого фактора на белковые структуры. Показано, что радиационно-индуцированные изменения структурного состояния белков могут определяться множеством факторов – разрывом водородных, дисульфидных, пептидных связей, окислением сульфгидрильных групп и ароматических аминокислотных остатков, образованием сшивок между пептидными цепями, нарушением вторичной и третичной структуры белковых молекул. Возникновение подобных индуцированных структурных перестроек в составе молекул ферментов в значительной мере определяется их конформационной подвижностью. Можно предположить, что ГА, при стабилизации мембраны, ограничивает конформационную подвижность молекул Ca^{2+} - АТФазы, их способность к радиационно-индуцированным перестройкам, что ведет в возрастанию радиорезистентности фермента. Mg^{2+} -АТФаза подвергается в присутствии ГА аналогичному воздействию, но ее исходная высокая радиорезистентность (ингибирование составляет лишь 5%) не позволяет зафиксировать статистически достоверных изменений активности при модифицированном ГА облучении суспензий.

Известно, что лучевая энергия может воздействовать на биомакромолекулы прямо или опосредованно, т.е. через продукты радиолиза воды. В связи с этим облучению подвергали суспензии ТЭ с концентрацией мембранного белка 0,62 и 6,2 мг/мл. Данные экспериментов (табл. 3) показывают, что степень инактивации Ca^{2+} - АТФазы для более концентрированного раствора существенно выше. Это позволяет предположить, что в данном случае воздействие радиации реализуется, как минимум двумя путями. При низких концентрациях мембранного белка в облучаемой суспензии ТЭ, поражающий эффект связан в основном с образованием активных продуктов радиолиза воды – радикалов Н, ОН и гидратированных электронов $e_{\text{гидр}}$. С увеличением концентрации мембранного белка на этот эффект накладывается и начинает играть преобладающую роль прямое действие радиации на Ca^{2+} - АТФазу.

Радиолиз воды приводит к образованию целого ряда активных продуктов, к которым относятся радикалы Н, ОН, $e_{\text{гидр}}$ и перекисные радикалы. Поражающее действие на молекулы фермента может оказывать любой из перечисленных продуктов. Чтобы ответить на вопрос, какие именно продукты радиолиза воды ответственны за инактивацию Ca^{2+} - АТФазы, применялись перехватчики радикалов. Нитрат натрия NaNO_3 добавлялся к мембранам до конечной концентрации 7мМ. Это вещество является

Таблица 3

Зависимость активности Ca^{2+} -АТФазы от концентрации мембранного белка

Воздействие	Контроль	Облучение	
Концентрация белка мембран, мг/мл	6,2	0,62	6,2
Ферментативная активность, нМ/мг/мин	$20,8 \pm 0,2$	$17,9 \pm 0,4$	$13,9 \pm 0,6$
Относительное изменение ферментативной активности, %	100	86 ± 2	67 ± 3

Таблица 4

Влияние различных модификаторов на активность Ca^{2+} -АТФазы

Воздействие		Контроль	Облучение	Контроль + модификатор	Облучение + модификатор	
Тип модифи- катора	Нитрат Натрия	1	27,8 ± 0,5	23,3 ± 0,8	25,3 ± 0,3	20,5 ± 0,8
		2	100	84 ± 3	100	81 ± 3
	Тиомочевина	1	27,8 ± 0,5	23,3 ± 0,8	23,8 ± 0,4	16,9 ± 1,2
		2	100	84 ± 3	100	71 ± 5
	ПХМБ	1	27,8 ± 0,5	23,3 ± 0,8	27,7 ± 2,2	18,0 ± 1,1
		2	100	84 ± 3	100	65 ± 4

1 – ферментативная активность, нМ/мг/мин

2 – относительное изменение ферментативной активности, %

перехватчиком гидратированных электронов. Из представленных данных (табл. 4) следует, что после облучения в присутствии NaNO_3 степень ингибирования Ca^{2+} -АТФазы практически такая же, как и в его отсутствие. Это позволяет сделать вывод, что в радиационном поражении молекул фермента гидратированный электрон не играет существенной роли.

В отличие от NaNO_3 , ТМ связывает не только $e_{\text{гидр}}$, но и радикалы $\text{OH}^\cdot$. Из данных экспериментов (табл. 4) следует, что добавление ТМ до конечной концентрации 17 мМ приводит к существенному снижению активности Ca^{2+} -АТФазы в облученной суспензии. Интерпретировать данный эффект можно следующим образом. Связывая радикалы $\text{OH}^\cdot$, ТМ увеличивает при той же дозе облучения выход радикалов $\text{H}^\cdot$, так как меньшее их число может рекомбинировать до молекул воды. Таким образом, наблюдается корреляция между увеличением выхода радикалов $\text{H}^\cdot$ и падением активности Ca^{2+} -АТФазы. Можно предположить, что радикалы $\text{H}^\cdot$ и являются одним из основных поражающих агентов для этого фермента.

Согласно данным литературы, в повреждающем действии радиации на мембранные белки важную роль занимает окисление сульфгидрильных групп [23-25]. В связи с этим было исследовано модифицирующее влияние ПХМБ при облучении тений эритроцитов в дозе 1000 Гр. Конечная концентрация ПХМБ в облучаемой суспензии составляла 5 мкМ. Из приведенных данных (табл. 4) следует, что ПХМБ оказывает на Ca^{2+} -АТФазу сильный радиосенсибилизирующий эффект. Степень ингибирования при добавлении ПХМБ в 2,2 раза больше, чем в его отсутствие. Интерпретировать данный эффект можно следующим образом. ПХМБ является достаточно специфичным и чувствительным реагентом на свободные тиогруппы. Связываясь с экспонированными SH-группами Ca^{2+} -АТФазы, он защищает их от действия продуктов радиолитического распада воды. Однако при этом активные радикалы воды реализуют свое повреждающее действие по другим химическим связям молекулы фермента, причем с большим выходом инактивированных молекул Ca^{2+} -АТФазы. Это позволяет предположить, что воздействие радиации на Ca^{2+} -АТФазу в значительной мере опосредовано SH-группами фермента.

Авторы выражают благодарность Крушину В.Д. за помощь в проведении облучения.

ВЫВОДЫ

Облучение быстрыми электронами суспензий ТЭ при дозе 1000 Гр ингибирует активность Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФаз. Mg^{2+} -АТФаза отличается большей радиорезистентностью по сравнению с Ca^{2+} -АТФазой. ТХ-100 сенсибилизирует оба фермента к действию радиации. ГА подавляет радиационный эффект для Ca^{2+} -АТФазы. При низких концентрациях мембранного белка в облучаемой суспензии активность Ca^{2+} -АТФазы ингибируется продуктами радиолитического распада воды. При увеличении концентрации мембранного белка преобладает прямое действие радиации на фермент. Основным поражающим агентом среди продуктов радиолитического распада воды для облученной Ca^{2+} -АТФазы являются, предположительно, радикалы $\text{H}^\cdot$. Действие быстрых электронов на Ca^{2+} -АТФазу опосредовано в значительной мере SH-группами фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alper T. // Br. J. Radiol., 1974, V. 47, P. 240.
2. Chandra S., Stefani S. // Int. J. Radiat. Biol., 1981, V.40, # 3, P. 305-311.
3. Konings A // J. Radiat. Res., 1979, V.20, P.259-263.
4. Болдырев А.А. Биологические мембраны и транспорт ионов, М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985, 208 с.
5. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии, М.: Наука, 1986, 228 с.
6. Пасынский А.Г. // Радиобиология, 1961, Т.1, вып. 1, С. 3-9.
7. Rasmussen H., Goodman D.B.P. // Physiol. Revs., 1977, V. 57, # 7, P. 421-510.
8. Williamson J.R., Cooper R.H., Hock J.B. // Biochim. et Biophys. Acta, 1981, V. 639, # 3-4, P. 243-295.
9. Дворецкий А.И., Слепченко В.А. Влияние ионизирующей радиации на отдельные системы регуляции внутриклеточного кальция // Современные проблемы экспериментальной биологии и биотехнологии, Днепропетровск, 1985, С. 39-44.
10. Patrick G. // Mammalia cell membranes - Vatterworth etc., 1977, V. 5, P. 72-104.
11. Palecz D., Leyko W. // Int. J. Radiat. Biol., 1983, V. 44, # 3, P. 293-299.
12. Scutari G., Balletrín G., Venturelli E. et al. // Acta Radiol. Onad. Radiat. Then. Phys. and Biol., 1982, V. 21, # 6, P. 427-431.
13. Биологическое действие излучения высоких энергий, М.: Атомиздат, 1977, 143 с.
14. Даренская Н.Г., Кознова Л.Б., Акоев М.Г., Невская Г.Ф. Относительная биологическая эффективность излучения. Фактор времени облучения, М.: Атомиздат, 1968, 375 с.

15. Савинский А.К. Взаимодействие электронов с тканезквивалентными средами, М.: Энергоатомиздат, 1984, 112 с.
16. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных, М.: Высш. школа, 1977, 368 с.
17. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Радиационная биофизика, М.: Изд-во МГУ, 1979, 240 с.
18. Dodge I., Mitchell C., Hanahan D. // Arch. Biochem. and Biophys., 1963, V. 100, P. 119-130.
19. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem., 1951, V. 193, # 1, P. 265-275.
20. Финашин А.В., Крупин В. Д., Товстяк В.В. // Укр. биохим. журн., 1997, Т.69, № 1, С. 99-103.
21. Кокунин В.А. // Укр. биохим. журн., 1975, т.47, С. 776-791.
22. Максимов Г.В., Мусуралиева Г.Т., Чуринов А.А., Пащенко В.З. // Биофизика, 1989, Т. 34, вып. 3, С. 420-424.
23. Shapiro B., Kolmann G. // Radiat. Res., 1968, V. 34, #2, P. 335-346.
24. Sutherland R., Pihl A. // Radiat. Res., 1968, V. 34, #2, P. 300-314.
25. Sutherland R., Stannard J., Weed R. // Int. J. Radiat. Biol., 1967, V. 12, P. 551-564.

УДК 577.352.4:611.018.51

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПРОЦЕССА ПРОДАВЛИВАНИЯ ЭРИТРОЦИТА ЧЕРЕЗ ЦИЛИНДРИЧЕСКИЙ МИКРОКАПИЛЛЯР

Л.И. Гардаш, Е.А. Гордиенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015

Поступила в редакцию 10 июня 1999 г.

Получены аналитические выражения для определения времени от момента, в который эритроцит перекрывает входное отверстие микрокапилляра, до момента, при котором радиус кривизны втянутой в микрокапилляр части мембраны становится равным радиусу микрокапилляра, в зависимости от перепада давления на нем, вязкости раствора и модуля упругости клеточной мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: деформация, микрокапилляр, эритроцит.

Пусть ось z цилиндрических координат z, ρ, φ совпадает с осью симметрии цилиндрического микрокапилляра, а ее начало расположено в центре входного отверстия в микрокапилляр. Изменение формы эритроцита в процессе его продавливания через цилиндрический микрокапилляр проанализировано в работе [1]. Решение пространственной краевой задачи существенно упрощается в

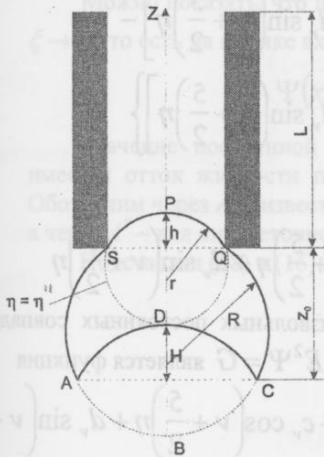


Рис. 1. Форма эритроцита, втягиваемого в микрокапилляр при $R_0 - \sqrt{R_0^2 - r_p^2} < h < r_p$

том случае, когда граничные условия заданы на координатных поверхностях. Как следует из результатов работы [1], участки мембраны эритроцита AS и SP (рис. 1) являются координатными поверхностями в торроидальной системе координат ξ, η, φ , которая связана с цилиндрическими координатами следующим образом [2]:

$$z = \frac{r_p \sin \eta}{ch \xi - \cos \eta}, \quad \rho = \frac{r_p sh \xi}{ch \xi - \cos \eta}, \quad \varphi' = \varphi \quad (1)$$

Поэтому можно предположить, что именно в этой системе криволинейных координат легче всего решить уравнение движения жидкости внутри эритроцита на рассматриваемой нами стадии процесса.

Трехмерное аксиально-симметричное течение несжимаемой жидкости описывается стоксовой функцией тока Ψ . При малых числах Рейнольдса стационарное течение описывается уравнением движения [1]

$$E^4 \Psi = 0 \quad (2)$$

где в произвольной ортогональной сопряженной системе координат вращения

$$E^2 = \frac{\rho}{h^2} \left[\frac{\partial}{\partial \xi} \left(\frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \xi} \right) + \frac{\partial}{\partial \eta} \left(\frac{1}{\rho} \frac{\partial}{\partial \eta} \right) \right] \quad (3)$$

Коэффициенты Лямэ, соответствующие торроидальной системе координат ξ, η и φ , равны

$$h_\xi = h_\eta = h = \frac{r_p}{ch \xi - \cos \eta}, \quad h_\varphi = \frac{r_p sh \xi}{ch \xi - \cos \eta} \quad (4)$$

Таким образом в торроидальной (правой) системе координат ξ, η, φ

$$E^2 = \frac{1}{h^2} \left[\frac{\partial^2}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2}{\partial \eta^2} - \frac{1 - ch \xi \cos \eta}{sh \xi (ch \xi - \cos \eta)} \frac{\partial}{\partial \xi} + \frac{\sin \eta}{ch \xi - \cos \eta} \frac{\partial}{\partial \eta} \right] \quad (5)$$

Введем обозначение

$$E^2 \Psi = G \quad (6)$$

с помощью которого можно представить (2) в виде

$$E^2 G = 0 \quad (7)$$

Решение уравнения (7) будем искать в виде

$$G = \rho^{1/2} P(\xi) Q(\eta) \quad (8)$$

Разделение координат и решение соответствующих обыкновенных дифференциальных уравнений приводит к следующему решению уравнения (7)

$$G = h^{1/2} [x P_\nu(x) - P_{\nu-1}(x)] \cdot \left[a_\nu \cos\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + b_\nu \sin\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta \right] \quad (9)$$

где $x \equiv \chi\xi$, $P_\nu(x)$ — функция Лежандра первого рода степени ν , a_ν , b_ν и ν — произвольные константы.

Полученное решение (9) подставляем в правую часть уравнения (6) и отыскиваем частное решение этого неоднородного уравнения в следующем виде:

$$\Psi_r = h^{3/2} [x P_{\nu+1}(x) - P_\nu(x)] \cdot U_\nu(\eta) \quad (10)$$

Подставляя (10) в левую часть уравнения (6), после громоздких, но несложных преобразований получаем

$$\begin{aligned} E^2 \Psi_r = 2h^{1/2} \{ & \nu(x P_\nu - P_{\nu-1}) \cdot \left[a_\nu \cos\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + b_\nu \sin\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta \right] - \\ & - \left(\nu + \frac{1}{2}\right)(x P_{\nu+1} - P_\nu) \cdot \left[a_\nu \cos\left(\nu + \frac{3}{2}\right)\eta + b_\nu \sin\left(\nu + \frac{3}{2}\right)\eta \right] - \\ & - \left(\nu + \frac{5}{2}\right)(x P_{\nu+1} - P_\nu) \cdot \left[c_\nu \cos\left(\nu + \frac{3}{2}\right)\eta + d_\nu \sin\left(\nu + \frac{3}{2}\right)\eta \right] - \\ & - (\nu + 2)(x P_{\nu+2} - P_{\nu+1}) \cdot \left[c_\nu \cos\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta + d_\nu \sin\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta \right] \} \end{aligned} \quad (11)$$

где положено

$$U_\nu = a_\nu \cos\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + b_\nu \sin\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + c_\nu \cos\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta + d_\nu \sin\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta$$

Поскольку правая часть уравнения (11) с точностью до произвольных постоянных совпадает с функциями $G(\xi, \eta)$, то частным решением неоднородного уравнения $E^2 \Psi = G$ является функция

$$\psi_r = h^{3/2} [x P_{\nu+1}(x) - P_\nu(x)] \cdot \left[a_\nu \cos\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + b_\nu \sin\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + c_\nu \cos\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta + d_\nu \sin\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta \right] \quad (12)$$

Общее решение уравнения (6) или (2) можно теперь представить в следующем виде

$$\begin{aligned} \Psi \doteq h^{3/2} [x P_{\nu+1} - P_\nu] \cdot \left[a_\nu \cos\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + b_\nu \sin\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta \right] + c_\nu \cos\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta + \\ + d_\nu \sin\left(\nu + \frac{5}{2}\right)\eta + h^{1/2} [x P_\nu - P_{\nu-1}] \cdot \left[l_\nu \cos\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta + f_\nu \sin\left(\nu + \frac{1}{2}\right)\eta \right] \end{aligned} \quad (13)$$

Рассмотрим область движения жидкости $\pi/2 \leq \eta \leq \eta''$, $0 \leq \xi \leq \infty$, где $\eta = \eta''$ — координатная поверхность, которая касается поверхности зеркально выпуклой части эритроцита в точке ее пересечения с осью симметрии $\xi = 0$ (рис. 1, D) В статье [1] получены зависимости величин R , H от h (рис 1). С учетом связи этих величин с тороидальными координатами может быть установлена однозначная связь между η' и η'' , так что в дальнейшем фигурирующие в соотношениях величины η'' предполагаются выраженными через координату лобовой части поверхности мембраны η' . Как известно,

$$\lim_{x \rightarrow \infty} P_\nu(x) \approx \frac{2^\nu \Gamma\left(\nu + \frac{1}{2}\right)}{\sqrt{\pi} \Gamma(1 + \nu)} x^\nu \quad (14)$$

Поэтому для того, чтобы решение (13) было конечным при $\xi \rightarrow \infty$ (что соответствует конечному потоку жидкости через входное отверстие микрокапилляра), достаточно положить $\nu = -1/2$. Кроме того, поскольку поток несжимаемой жидкости через любую поверхность $\eta = \text{const}$, ограниченную контуром входного отверстия микрокапилляра $\xi = \infty$ в рассматриваемой области течения должен быть одним и тем же, предел $\lim_{x \rightarrow \infty} \Psi$ не может зависеть от координаты η . Следовательно, наряду с условием $\nu = -1/2$ необходимо положить $c_\nu = d_\nu = 0$, так что

$$\Psi(x, \eta) = Ah^{3/2} \left(xP_{1/2} - P_{-1/2} \right) + Bh^{1/2} \left(xP_{-1/2} - P_{1/2} \right) \quad (15)$$

где учтено, что $P_{-1/2} = P_{1/2}$ [3].

Функция тока связана с составляющими скорости движения жидкости следующим образом

$$V_\xi = -\frac{1}{\rho h} \frac{\partial \Psi}{\partial \eta}, \quad V_\eta = \frac{1}{\rho h} \frac{\partial \Psi}{\partial \xi} \quad (16)$$

и с градиентом давления как

$$\frac{\partial p}{\partial \xi} = -\frac{\mu}{\rho} \frac{\partial}{\partial \eta} G, \quad \frac{\partial p}{\partial \eta} = -\frac{\mu}{\rho} \frac{\partial}{\partial \xi} G \quad (17)$$

где μ — динамическая вязкость жидкости.

Можно показать, что при $B \neq 0$ составляющая скорости течения V_η обращается в бесконечность при $\xi \rightarrow \infty$, то есть на кромке входного отверстия в микрокапилляр. Поэтому полагаем $B = 0$, так что

$$\Psi(x, \eta) = Ah^{3/2} \left(xP_{1/2}(x) - P_{-1/2}(x) \right) \quad (18)$$

Значение постоянной A для внутриклеточной и внеклеточной жидкости различны, поскольку имеется отток жидкости по зазору между клеткой и кромкой входного отверстия микрокапилляра. Обозначим через A неизвестную постоянную в выражении для функции тока внутриклеточной жидкости, а через A^* — для внеклеточной.

Подставляя (18) в (16) и (17), вычисляем

$$V_\xi = \frac{3A}{2r_p} \frac{\sin \eta}{sh \xi} h^{1/2} \left(xP_{1/2} - P_{-1/2} \right) \quad (19)$$

$$V_\eta = \frac{3A}{2r_p} h^{1/2} \left(P_{-1/2} - \cos \eta P_{1/2} \right) \quad (20)$$

$$\frac{\partial p}{\partial \eta} = -\frac{3A\mu}{2r_p^2} h^{1/2} \left(P_{1/2} - \cos \eta P_{-1/2} \right) \quad (21)$$

Перепад давления на клетке вдоль оси симметрии $\xi = 0$ от втянутой в микрокапилляр части мембраны (точка Р на рис.1) до точки D (рис.1) можно вычислить, интегрируя (21) от η'' до η' при $\xi = 0$:

$$\Delta P_c = -\frac{3A\nu^{in}}{r_p^{3/2} \left(\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''} \right)} \quad (22)$$

где ν^{in} — динамическая вязкость внутриклеточного раствора, $\eta = \eta''$ координатная поверхность, касающаяся мембраны втягиваемой в микрокапилляр клетки.

Аналогично вычисляется и перепад давления между точкой ($\eta = \pi/2$, $\xi = 0$) и лобовой частью клетки:

$$\delta P = -\frac{3A^*\nu^{out}}{r_p^{3/2}} \left(1 - \sqrt{1 + \cos \eta'} \right) \quad (23)$$

где ν^{out} — динамическая вязкость внеклеточного раствора.

Тангенциальные составляющие напряжений, действующих на мембрану со стороны вне- и внутриклеточной жидкости соответственно равны [2]

$$X_{\xi}^{out} = 2v^{out} \left[\frac{1}{h} \frac{\partial v_{\eta}^{out}}{\partial \xi} + \frac{1}{h} \frac{\partial v_{\xi}^{out}}{\partial \eta} - \frac{1}{h^2} v_{\xi}^{out} \frac{\partial h}{\partial \eta} - \frac{1}{h^2} v_{\eta}^{out} \frac{\partial h}{\partial \xi} \right] \quad (24)$$

$$X_{\xi}^{in} = 2v^{in} \left[\frac{1}{h} \frac{\partial v_{\eta}^{in}}{\partial \xi} + \frac{1}{h} \frac{\partial v_{\xi}^{in}}{\partial \eta} - \frac{1}{h^2} v_{\xi}^{in} \frac{\partial h}{\partial \eta} - \frac{1}{h^2} v_{\eta}^{in} \frac{\partial h}{\partial \xi} \right]$$

Подставляя (19) и (20) в (24), находим

$$X_{\xi}^{out} = \frac{3A^* v^{out}}{2r_p^2} h^{\frac{1}{2}} \frac{1 - \cos^2 \eta'}{sh \xi} \left(xP_{\frac{1}{2}} - P_{-\frac{1}{2}} \right) \quad (25)$$

$$X_{\xi}^{in} = \frac{3A v^{in}}{2r_p^2} h^{\frac{1}{2}} \frac{1 - \cos^2 \eta'}{sh \xi} \left(xP_{\frac{1}{2}} - P_{-\frac{1}{2}} \right)$$

При механическом равновесии суммарная тангенциальная нагрузка $X_{\xi}^{in} + X_{\xi}^{out}$ уравнивается создаваемым в мембране при ее деформации напряжения в соответствии с уравнением [4]

$$(x^2 - 1) \frac{\partial T_{\xi}}{\partial x} + 2 \frac{1 - x \cos \eta'}{x - \cos \eta'} T_{\xi} + \rho (X_{\xi}^{in} + X_{\xi}^{out}) = 0 \quad (26)$$

где T_{ξ} — тангенциальная составляющая натяжения, создаваемого в деформируемой путем растяжения при постоянной площади мембране.

Можно показать, что

$$T_{\xi} = \frac{M}{2} \frac{F}{G} \frac{(x-1)}{(x+1)} \cdot \frac{(x-1)F + 2(x+1)G}{(x-1)F + (x+1)G} \quad (27)$$

где введены обозначения $F = \cos^2 \eta_0 - \cos^2 \eta'$, $G = (1 - \cos \eta')^2$, M — коэффициент растяжения мембраны эритроцита при постоянной площади.

В соответствии с результатами работы [1]

$$\eta_0 = \arcsin \sqrt{\frac{4\pi}{S_0}} \cdot r_p \quad (28)$$

S_0 — площадь поверхности мембраны недеформированного эритроцита.

Подставляя (27) в (26) получаем

$$\begin{aligned} & M \frac{F}{G} \frac{x^2 - 1}{(x+1)^2 [(x-1)F + (x+1)G]^2} \{ [(x-1)F + (x+1)G]^2 + \\ & + G^2 (x+1)^2 + \frac{1 - x \cos \eta'}{x - \cos \eta'} [(x-1)F + 2(x+1)G] \cdot [(x-1)F + (x+1)G] \} + \\ & + \frac{3A v^{in}}{2r_p^2} h^{\frac{3}{2}} (1 - \cos^2 \eta') \cdot (xP_{\frac{1}{2}} - P_{-\frac{1}{2}}) + \frac{3A^* v^{out}}{2r_p^2} (1 - \cos^2 \eta') \cdot (xP_{\frac{1}{2}} - P_{-\frac{1}{2}}) = 0 \end{aligned} \quad (29)$$

В области микрокапилляра $r_p \leq z \leq L$ (L — длина микрокапилляра) функцию тока представим в виде

$$\Psi' = c \rho^2 \left(1 - \frac{1}{2} \frac{\rho^2}{r_p^2} \right), \quad (30)$$

который соответствует параболическому распределению осевой компоненты скорости по радиальной координате

$$V_z = 2c \left(1 - \frac{\rho^2}{r_p^2} \right)$$

и удовлетворяет условию прилипания жидкости к стенке микрокапилляра.

Осевая составляющая градиента давления в этом случае равна

$$\frac{dp}{dz} = -\frac{v^{out}}{\rho} \frac{\partial G}{\partial \rho} = \frac{8c v^{out}}{r_p^2} \quad (31)$$

Интегрируя (31) по z от $z = r_p$ до $z = L$, находим перепад давления между выходом из капилляра и плоскостью $z = r_p$

$$p_{Lr_p} = \frac{8c v^{out}}{r_p} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) \quad (32)$$

Поскольку поток жидкости через любое поперечное сечение микрокапилляра в области $r_p \leq z \leq L$ равен потоку жидкости через любую поверхность $\eta = \text{const}$ в области $\eta' \leq \eta \leq \pi/2$, опирающуюся на кромку входного отверстия микрокапилляра, то

$$\frac{c r_p^2}{2} = A^* r_p^{3/2} \quad (33)$$

Поэтому (32) с помощью (33) можно представить в виде

$$p_{Lr_p} = \frac{16 A^* v^{out}}{r_p^{3/2}} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) \quad (34)$$

Суммируя (34), (22) и (23), находим полный перепад давления на микрокапилляре:

$$\Delta p = \frac{16 A^* v^{out}}{r_p^{3/2}} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) - \frac{3 A^* v^{out}}{r_p^{3/2}} (1 - \sqrt{1 - \cos \eta'}) - \frac{3 A v^{in}}{r_p^{3/2}} (\sqrt{1 - \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''}) \quad (35)$$

откуда следует

$$\frac{3 A v^{in}}{r_p^{3/2}} = \frac{1}{\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''}} \left\{ -r_p \Delta p - \frac{3 A^* v^{out}}{r_p^{3/2}} \left[1 - \sqrt{1 + \cos \eta'} - \frac{16}{3} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) \right] \right\} \quad (36)$$

С учетом (36) можно представить суммарную силу, действующую в тангенциальном направлении со стороны вне- и внутриклеточной жидкости, как

$$\begin{aligned} \rho (X_{\xi}^{in} + X_{\xi}^{out}) &= \frac{1}{2} \frac{(1 - \cos^2 \eta')}{(x - \cos \eta')^{3/2}} \frac{x^{P_{1/2}} - P_{-1/2}}{\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''}} \times \\ &\times \left\{ -r_p \Delta p + \frac{3c v^{out}}{2} \left[2\sqrt{1 + \cos \eta'} - 1 - \sqrt{1 + \cos \eta''} - \frac{16}{3} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) \right] \right\} \end{aligned} \quad (37)$$

Подставляя (37) в (29) и переходя к пределу $x \rightarrow \infty$, получаем параметрическую зависимость постоянной c от положения лобовой части мембраны $\eta = \eta'$ втягиваемого в микрокапилляр эритроцита и

от параметров $\frac{\Delta p \cdot r_p}{v^{out}}$, $\frac{M}{\eta^{out}}$ и $\frac{L}{r_p}$:

$$c = \frac{2}{3} \frac{1}{2\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''} - 1 - \frac{16}{3} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right)} \times \quad (38)$$

$$\times \left\{ \frac{\Delta p \cdot r_p}{v^{out}} - \frac{2M}{v^{out}} \frac{F}{G} \left[1 + \frac{G^2}{(F+G)^2} - \cos \eta' \frac{F+2G}{F+G} \right] \left[\frac{\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''}}{1 - \cos^2 \eta'} \right] \right\}$$

Объем втянутой в микрокапилляр части клетки равен

$$\Delta V = -\frac{\pi r_p^3}{2} \left[\text{ctg} \frac{\eta'}{2} + \frac{1}{3} \text{ctg}^3 \frac{\eta'}{2} \right] \quad (39)$$

откуда следует

$$d\Delta V = \pi r_p^3 \frac{d\eta'}{(1 - \cos \eta')^2} \quad (40)$$

С другой стороны, из связи между функцией тока и объемным расходом жидкости

$$\frac{d\Delta V}{dt} = 2\pi \Psi'(\rho = r_p) \quad (41)$$

следует

$$dt = \frac{r_p d\eta'}{(1 - \cos \eta')^2 C} \quad (42)$$

Принимая во внимание (38), получаем

$$\frac{\Delta p}{v_{out}} dt = \frac{3}{2} \frac{d\eta' \left[2\sqrt{1 + \cos \eta'} - 1 - \sqrt{1 + \cos \eta''} - \frac{16}{3} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) \right]}{(1 - \cos \eta')^2 \left\{ 1 - \frac{2M}{\Delta p \cdot r_p} \frac{F}{G} \frac{\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''}}{1 - \cos^2 \eta'} \left[1 + \frac{G^2}{(F + G)^2} - \cos \eta \frac{F + 2G}{F + G} \right] \right\}}$$

Интегрируя (43) в пределах от $\eta = \eta_0$ до $\eta = \pi/2$, находим искомое время t_s , за которое радиус втягиваемой в микрокапилляр лобовой части мембраны эритроцита становится равным r_p , в зависимости от параметров $\frac{M}{\Delta p \cdot r_p}$ и $\frac{L}{r_p}$.

$$\frac{\Delta p}{v_{out}} t_s = \frac{3}{2} \int_{\eta_0}^{\pi/2} \frac{d\eta' \left[2\sqrt{1 + \cos \eta'} - 1 - \sqrt{1 + \cos \eta''} - \frac{16}{3} \left(\frac{L}{r_p} - 1 \right) \right]}{(1 - \cos \eta')^2 \left\{ 1 - \frac{2M}{\Delta p \cdot r_p} \frac{F}{G} \frac{\sqrt{1 + \cos \eta'} - \sqrt{1 + \cos \eta''}}{1 - \cos^2 \eta'} \left[1 + \frac{G^2}{(F + G)^2} - \cos \eta \frac{F + 2G}{F + G} \right] \right\}}$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гардаш Л.И., Гордиенко Е.А. Біофізич. вісник, 1999, вип. 3. С. 88 - 91.
2. Хаппел Дж., Бреннер Г. Гидродинамика при малых числах Рейнольдса. М. Мир, 1976. 630с.
3. Прудников А.П., Брычков Ю.А., Маричев О.И.. Интегралы и ряды. Дополнительные главы. М, 1986. 800с.
4. Ивэнс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М. Мир, 1982. 304 с.

УДК: 577.3:621.384.8

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕВАЛЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ БИСЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ С ФОСФОЛИПИДАМИ

В. А. Пашинская¹, М. В. Косевич¹, А. Гомори², К. Векей²,
О. В. Корзовская³, Л. Н. Лисецкий³, Ю. П. Благой¹

¹Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины,
Харьков, 310164, пр. Ленина, 47; mkosevich@ilt.kharkov.ua

²Центральный институт химии Венгерской академии наук, Будапешт, Венгрия

³Институт монокристаллов НАН Украины; Харьков, 310001, пр. Ленина 60

Поступила в редакцию 14 июня 1999-

Изучены некоторые особенности невалентных взаимодействий бисчетвертичных аммониевых солей - антимикробных препаратов декаметоксина и этония с одним из компонентов биологических и модельных мембран фосфолипидом дипальмитоилфосфатидилхолином на основе данных вторично-ионной масс-спектрометрии. Впервые зарегистрированы двухзарядные супрамолекулярные комплексы дикатионов этих солей с одной, двумя и тремя молекулами фосфолипида. Обсуждается определяющая роль электростатических взаимодействий в стабилизации таких комплексов. С использованием тандемной масс-спектрометрии проведены оценки энергетических характеристик метастабильного распада двухзарядных комплексов фосфолипида с дикатионами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: декаметоксин, этоний, дипальмитоилфосфатидилхолин, невалентные комплексы, тандемная жидкостная вторично-ионная масс-спектрометрия

Биологически-активные соединения, относящиеся к классу бисчетвертичных аммониевых солей (БЧАС), широко используются в медицинской практике в качестве антимикробных агентов [1]. Однако молекулярные механизмы их биологического действия до конца не выяснены и остаются актуальным предметом исследования молекулярной биологии и биофизики [2]. Известно, что неинтеркалирующие антибиотики на основе БЧАС могут связываться с ДНК, препятствуя ее функционированию [3], но для этого им надо сначала проникнуть в цитоплазму клетки через плазматическую мембрану. Ряд физико-химических свойств БЧАС позволяет отнести их к разряду мембранотропных веществ; взаимодействие их с клеточной мембраной само по себе может нарушать ее нормальное функционирование [4] и, как следствие, жизнедеятельность всей клетки в целом. В связи с этим представляет значительный интерес исследование взаимодействия БЧАС с биологическими мембранами и, на модельном уровне, с их компонентами. Важно отметить, что действие этих соединений основано, прежде всего, не на химических реакциях и вмешательстве в биохимические циклы, а на невалентных межмолекулярных взаимодействиях и образовании комплексов с биомолекулами. Установление молекулярного механизма действия таких препаратов включает в себя получение ответов на следующие вопросы: может ли в принципе осуществляться взаимодействие данного биологически активного соединения с биомолекулой-мишенью и если да, то какова стехиометрия и структура образующихся комплексов; насколько эти комплексы стабильны, и какие типы межмолекулярных взаимодействий принимают участие в их стабилизации.

Одним из эффективных экспериментальных методов изучения межмолекулярных взаимодействий является мягкоионизационная масс-спектрометрия, причем непрерывное развитие и совершенствование масс-спектрометрической техники сделало возможным в настоящее время получение супрамолекулярных комплексов биомолекул и биологически активных соединений со сравнительно большим молекулярным весом [5].

В рамках систематического изучения возможных механизмов действия препаратов на основе БЧАС декаметоксина и этония [6, 7] в настоящей работе была поставлена цель изучить взаимодействие данных препаратов с одним из компонентов биомембран - дипальмитоилфосфатидилхолином (ДПФХ), используя возможности жидкостной вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС) и приемы анализа путей метастабильного распада и высвобождающейся в этом процессе кинетической энергии [8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Масс-спектрометрические измерения производили на тандемном двухсекторном масс-спектрометре VG-ZAB (Micromass, Англия) с ионизацией образца ионами Cs⁺ с энергией 30 кэВ. Разрешающая

способность прибора составляла 2000. При анализе метастабильных ионов регистрировали продукты распада ионов-предшественников в бесполом пространстве между магнитным и электростатическим анализаторами. Величину кинетической энергии, выделяющейся при распаде комплексов, определяли на основе анализа формы метастабильных пиков по методике, описанной в [8, 9].

В качестве матрицы использовали нитробензиловый спирт (NOBA) производства "Reanal", Венгрия. Препараты декаметоксин ($C_{38}H_{74}N_2O_4Cl_2$, моноизотопная молекулярная масса, рассчитанная путем суммирования масс наиболее распространенных изотопов, составляет 692,5) и этоний ($C_{30}H_{62}N_2O_4Cl_2$, молекулярная масса 584,4) были синтезированы в Институте органической химии НАН Украины, Киев. Синтетический фосфолипид дипальмитоилфосфатидилхолин ($C_{40}H_{80}NO_8P$, молекулярная масса 733,5) произведен фирмой "Sigma".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модельные системы, представляющие собой разбавленные растворы смеси фосфолипида ДПФХ с БЧАС декаметоксином или этонием в растворителе NOBA, достаточно адекватно отражают взаимодействия в модельных мембранах, поскольку исследуемые поверхностно-активные соединения выпесняются на границу раздела фаз и образуют монослой на поверхности матрицы. Полярные цвиттерсионные головки молекул ДПФХ и полярные группы БЧАС должны быть обращены в сторону полярного растворителя, а неполярные углеводородные хвосты - в вакуум, считающийся, в принципе, неполярной средой. Вся поверхность матрицы занята слоем растворенных веществ, о чем свидетельствует тот факт, что в ВИМС масс-спектрах как индивидуальных ДПФХ и БЧАС, так и их смеси полностью отсутствуют пики, соответствующие матрице-растворителю. Процессы, которые могут происходить в объеме матрицы, например, мицеллообразование, никак не сказываются на характере спектров, поскольку распыление ионов происходит из приповерхностных слоев образца толщиной не превышающей 10 нм [10].

ВИМС масс-спектры растворов смеси ДПФХ с декаметоксином и этонием содержали пики, соответствующие индивидуальным компонентам, основными из которых являются для ДПФХ - протонированная молекула MH^+ , m/z 734,5; для декаметоксина - дикатион соли Ca^{2+} , m/z 311, и его комплекс с противоионом хлора $Ca^{2+} \cdot Cl^-$, m/z 657,5; для этония - $Ca^{2+} \cdot Cl^-$, m/z 549,4; а также ряд пиков, которые были отнесены к нескольким типам комплексов ДПФХ с БЧАС, перечисленных в Табл.1. На Рис. 1 представлен участок ВИМС масс-спектра смеси ДПФХ с декаметоксином, содержащий пики однозарядных ионов мономеров MH^+ , $Ca^{2+} \cdot Cl^-$, а также пик, соответствующий их комплексу ДПФХ с органическим дикатионом декаметоксина $M \cdot Ca^{2+}$, m/z 678. Подтверждением двухзарядной формы данного иона является в два раза меньшее расстояние между изотопными пиками в сравнении с однозарядными ионами (см. Рис. 1). Также были зарегистрированы комплексы дикатионов с двумя и тремя молекулами фосфолипида $nM \cdot Ca^{2+}$, и однозарядные комплексы типа $M \cdot Ca^{2+} \cdot Cl^-$ (см. Табл. 1).

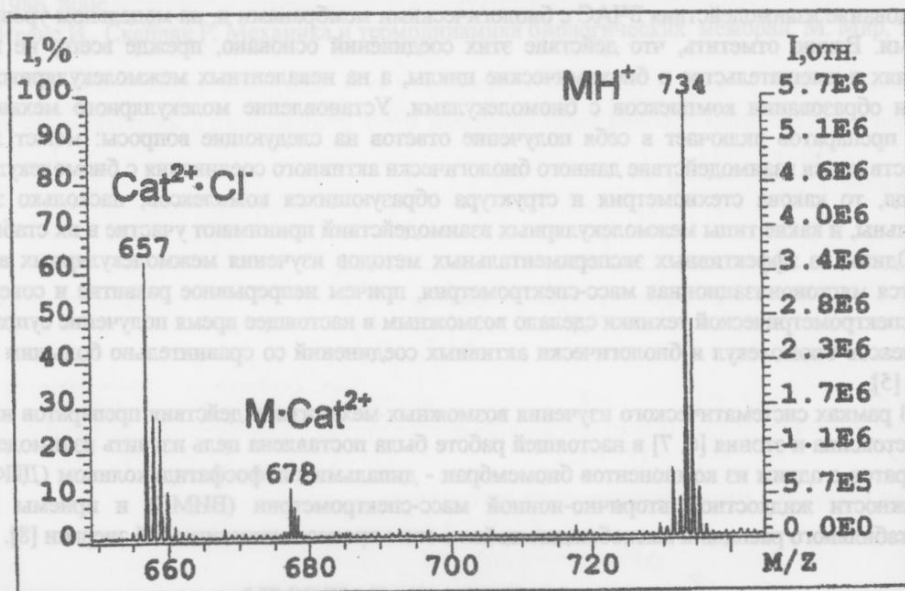


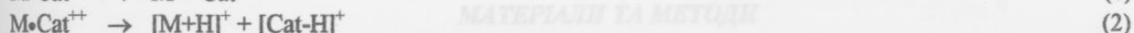
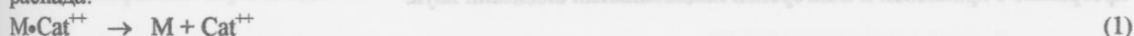
Рис. 1. Участок жидкостного ВИМС масс-спектра раствора смеси ДПФХ с декаметоксином в матрице NOBA, содержащий пики, соответствующие мономерным компонентам и их супрамолекулярному комплексу.

Таблица 1. Основные пики, зарегистрированные в ВИМС масс-спектрах растворов смеси ДПФХ (М) с декаметоксином и этонием

Исследуемая система	Основные ионы, наблюдаемые в спектре	Величина m/z
Декаметоксин + ДПФХ	Cat^{++}	311
	$\text{Cat} \cdot \text{Cl}^+$	657
	MH^+	734
	$\text{M} \cdot \text{Cat}^{++}$	678
	$2\text{M} \cdot \text{Cat}^{++}$	1045
	$3\text{M} \cdot \text{Cat}^{++}$	1412
Этоний + ДПФХ	$[\text{M} \cdot \text{Cat} \cdot \text{Cl}]^+$	1391
	$\text{Cat} \cdot \text{Cl}^+$	549
	MH^+	734
	$\text{M} \cdot \text{Cat}^{++}$	624
	$2\text{M} \cdot \text{Cat}^{++}$	990
	$[\text{M} \cdot \text{Cat} \cdot \text{Cl}]^+$	1283

Образование достаточно интенсивного двухзарядного иона в условиях ВИМС, причем не индивидуальной молекулы, а невалентного комплекса, является нетривиальным фактом и свидетельствует о значительной стабильности такого комплекса. Дикатионы связываются с молекулами ДПФХ в поверхностном слое матрицы и образующиеся ассоциаты на разрушаются при переводе (распылении) их в газовую фазу под воздействием бомбардировки ускоренными частицами. Можно высказать предположение, что заметная стабилизация достигается за счет достаточно сильного электростатического взаимодействия между отрицательно заряженной областью цвиттерной головки фосфолипида и положительно заряженными четвертичными группами органического дикатиона БЧАС.

Далее были получены спектры метастабильного распада двухзарядных супрамолекулярных комплексов $\text{M} \cdot \text{Cat}^{++}$. Для комплекса ДПФХ с дикатионом декаметоксина были обнаружены два пути распада:



Интенсивность фрагментных ионов на несколько порядков ниже интенсивности родительских ионов, что также свидетельствует в пользу высокой стабильности комплексов. Путь (1) соответствует прямому распаду комплекса на два исходных мономерных компонента с сохранением двухзарядного состояния дикатиона. Отметим, что для комплекса с этонием этот путь не характерен, поскольку дикатион этония нестабилен в газовой фазе и отсутствует в спектре индивидуального соединения. Путь (2) проходит по более сложному механизму с переносом протона и характерен для комплексов ДПФХ как с декаметоксином, так и с этонием. Реализация такого механизма в газовой фазе указывает на принципиальную возможность участия БЧАС, связанных с модельными или природными мембранами, в процессах с переносом протона.

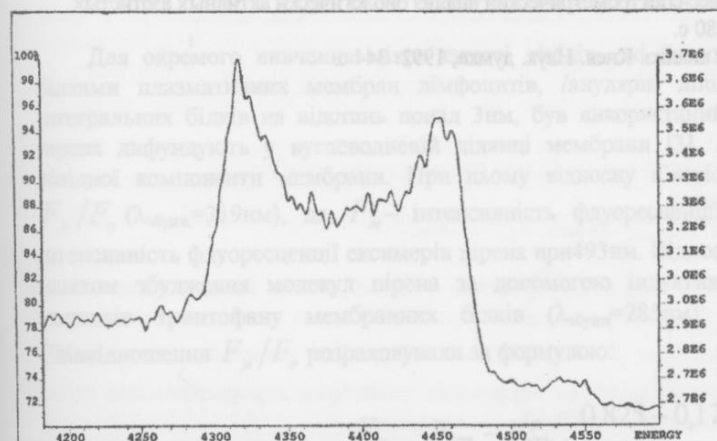


Рис. 2. Форма пика метастабильного фрагментного иона $[\text{M} + \text{H}]^+$, $m/z = 734$, образующегося при распаде двухзарядного иона комплекса ДПФХ с органическим дикатионом декаметоксина по реакции (2). Массовая шкала по оси абсцисс пересчитана в энергетическую.

Метастабильные пики $[\text{M} + \text{H}]^+$, соответствующие продуктам распада комплексов имеют характерную уширенную форму (Рис. 2), и при пересчете массовой шкалы в энергетическую, могут быть использованы для определения величины кинетической энергии T , высвобождающейся (kinetic energy release [8]) при распаде двухзарядного иона на два однозарядных. Основной вклад в эту величину вносит энергия кулоновского отталкивания между двумя положительными зарядами, которая может считаться одной из энергетических характеристик комплексов.

Величина T вычислялась на основании анализа формы метастабильного пика по следующей формуле [8, 9]:

$$T = \frac{y^2 m_1^2 eV}{16 x m_2 m_3} \left(\frac{\Delta E}{E} \right)^2, \quad (3)$$

где m_1 – масса двухзарядного родительского иона; m_2 и m_3 – массы однозарядных дочерних ионов, x – заряд родительского иона, y – заряд дочернего иона; V – величина ускоряющего напряжения, ΔE – ширина соответствующего пика на полувысоте по энергетической шкале, а E – значение энергии на середине пика. Величина T для распада по пути (2) комплекса ДПФХ с декаметоксином составила 0,65 эВ, а для комплекса ДПФХ с этонием – 0,53 эВ.

ВЫВОДЫ

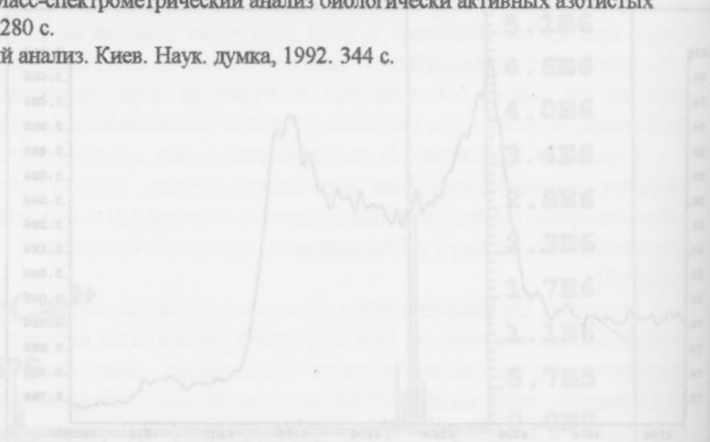
Проведенное исследование дает следующие ответы на вопросы, сформулированные во введении:

- 1) БЧАС декаметоксин и этоний могут взаимодействовать с фосфолипидами, в частности с ДПФХ;
- 2) в условиях ВИМС дикатионы БЧАС образуют супрамолекулярные комплексы с несколькими молекулами ДПФХ $nM \cdot Cat^{++}$ ($n = 1, 2, 3$ в комплексах с декаметоксином и $n = 1, 2$ – с этонием); возможно включение в комплекс аниона $[M \cdot Cat \cdot Cl]^-$;
- 3) комплексы отличаются заметной стабильностью обусловленной, по всей видимости, ионным типом взаимодействия между БЧАС и ДПФХ; кинетическая энергия, высвобождаемая при метастабильном распаде комплексов составляет 0,65 эВ и 0,53 эВ для ассоциатов с декаметоксином и этонием соответственно.

Благодарности: Данная работа стала возможной благодаря межакадемической исследовательской программе Украинской и Венгерской национальных академий наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М. Медицина. 1978. Ч.2. С.311
2. Виевский А.Н. Механизмы биологического влияния катионных поверхностно-активных веществ. Москва. Б.И., 1990. 249 с.
3. Zakrzewska K., Lavery R., Pullman B. // Nucl. Acids Res. 1983. V 11, N24, P. 8825-8839
4. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. М. Наука, 1975. 616 с.
5. Siuzdak G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego. Academic Press, 1996. 162 p.
6. Kosevich M.V., Pashinskaya V.A., Stepanian S.G., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. // Вісник Харківського університету № 434. Biophysical Bulletin. 1999. № 1. С. 31-38
7. Пашинская В.А., Косевич М.В., Степанян С.Г. // Вісник проблем біології і медицини. 1999. № 9. С. 118-122
8. Cooks R. G., Beynon J.H., Caprioli R.H., Lester G.R. Metastable ions. Amsterdam. Elsevier, 1973. 296 p.
9. Терентьев П.Б., Станкявичукос А.П. Масс-спектрометрический анализ биологически активных азотистых оснований. Вильнюс. Мокслас, 1987. 280 с.
10. Черепин В.Т. Ионный микрозондовый анализ. Киев. Наук. думка, 1992. 344 с.



УДК .577.23

ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ЛІМФОЦИТІВ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМИ МЕТОДАМИ

С.В. Демченко, В.І. Древалъ

Харківський державний університет Пл. Свободи, 4, Харків 310077

Надійшла до редакції 7 травня 1999 р.

Структурна рухомість мембранних білків, мікро-язкість ліпідного компонента мембрани, просторова організація білок-ліпідних комплексів були вивчені на лімфоцитах людини. Для визначення цих параметрів використовувалися флуоресцентні зонди пірен та АНС, а також дифузний гасій акриламід.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лімфоцити, плазматична мембрана лімфоцитів, структура мембранних білків, мікро-язкість мембранних білків.

Для розуміння характеру процесів, які лежать в основі імунологічної реактивності лімфоцитів, важливим є дослідження структури плазматичних мембран. У цій роботі здійснено спробу дослідити деякі властивості плазматичних мембран лімфоцитів із використанням спектрофлуоресцентних методів. Із цією метою ми використали флуоресцентні зонди пірен та АНС, які відрізняються локалізацією в мембрані, та дослідили структуру мембранових білків методом гасіння власної флуоресценції триптофанів акриламідом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Лімфоцити виділяли з крові людини фікол-урографінним методом [1] і суспендували в розчині Хенкса рН7,0.

Концентрацію лімфоцитів у суспензії визначили на спектрофотометрі СФ-46 при 570 нм [1].

Флуоресценцію реєстрували на спектрофлуориметрі "Hitachi-850" (Японія) у кварцових кюветах, які термостатували при 25°C. Щоб мінімізувати можливі відхилення внаслідок розсіювання в суспензії лімфоцитів, реєстрацію здійснювали з опромінюваної поверхні під кутом 60° до напрямку пучка світла, що збуджується.

Статистичну обробку результатів дослідження виконували методами варіаційної статистики [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для окремого вивчення мікро-язкості ліпідів, які безпосередньо контактують із інтегральними білками плазматичних мембран лімфоцитів, /анулярні ліпіди/, і вільних ліпідів, віддалених від інтегральних білків на відстань понад 3нм, був використаний флуоресцентний зонд пірен. Молекули пірена дифундують у вуглеводневій ділянці мембрани [3], що дозволило визначити мікро-язкість ліпідної компоненти мембрани. При цьому відносну в'язкість вільних оцінювали за відношенням F_m/F_e ($\lambda_{\text{збудж}}=319\text{нм}$), де F_m – інтенсивність флуоресценції мономерів пірена при 373нм, F_e – інтенсивність флуоресценції ексімерів пірена при 493нм. Відносну в'язкість анулярних ліпідів визначали шляхом збудження молекул пірена за допомогою індуктивно-резонансного перенесення енергії із залишків триптофану мембранних білків ($\lambda_{\text{збудж}}=285\text{нм}$) та зміни ступеня ексімеризації [4]. Співвідношення F_m/F_e розраховували за формулою:

$$\frac{F_m}{F_e} = \frac{F_{373} - F_{373}^p}{F_{493} - F_{493}^p} * \frac{0,825 - 0,175 \frac{\alpha}{\alpha+1}}{0,825 - 0,175 \frac{1}{\alpha+1}} \quad (1)$$

де: F_{373} – інтенсивність флуоресценції при 373нм;

F_{493} - інтенсивність флуоресценції при 493нм;

F_{373}^p - інтенсивність флуоресценції залишків триптофану після додавання пірена при 373нм;

F_{493}^p - інтенсивність флуоресценції залишків триптофану після додавання пірена при 493нм;

α - степінь ексімеризації пірена при $\lambda_{\text{будж}} = 319\text{нм}$.

Установлено, що співвідношення F_m/F_e для анулярних ліпідів складає 0,105, а для вільних ліпідів 0,277. Цим пояснюється вища в'язкість анулярних ліпідів плазматичних мембран лімфоцитів і підтверджується одержаними раніше даними про вищу в'язкість анулярних ліпідів, установлених для плазматичних мембран тімоцитів [5] і еритроцитів [6].

Важливу роль у реалізації імунологічних властивостей лімфоцитів, відіграють білки плазматичних мембран [7]. З метою дослідження структурної динаміки білків плазматичних мембран лімфоцитів був використаний метод гасіння триптофаної флуоресценції білків акриламідом [8]. Залежність інтенсивності флуоресценції триптофанів від концентрації акриламіда (Мал.1) описується модифікаційним рівнянням Штерна-Фольмера:

$$F_0/(F_0 - F) = (f * K_{sv} [Q])^{-1} + f^{-1} \quad (2)$$

де: F_0 та F - інтенсивність флуоресценції за відсутності та наявності гасителя;

K_{sv} - константа Штерна-Фольмера;

$[Q]$ - концентрація акриламіда;

f - доля початкової флуоресценції, доступної для гасіння.

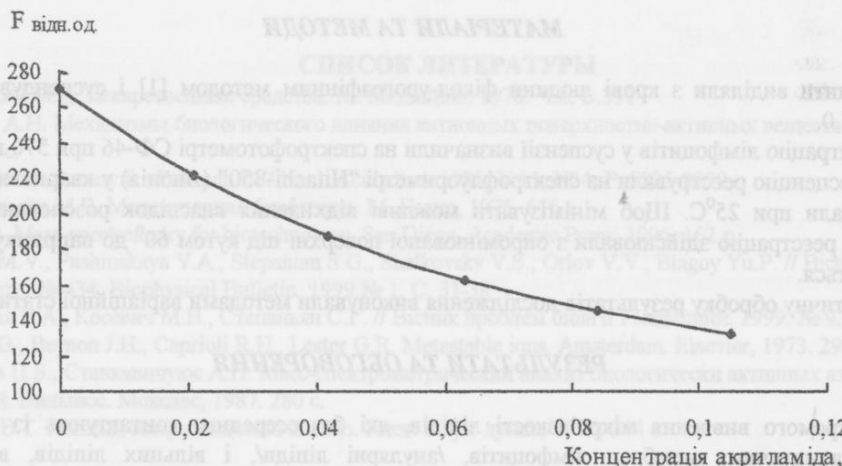


Рис. 1. Залежність гасіння флуоресценції триптофанів білків плазматичних мембран лімфоцитів від концентрації акриламіда.

Концентрація лімфоцитів $2 \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$, $\lambda_{\text{будж}} = 286\text{нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 330\text{нм}$.

Це дозволило установити наявність двох типів флуорофорів у мембранних білках, один з яких неприступний для гасіння акриламідом. Розрахунки дозволили установити, що для білків плазматичних мембран лімфоцитів $K_{sv} = 7,96 \text{ М}$, а величина $f = 0,51$. Це дозволяє зробити висновок про те, що 51% триптофанів нативного білка плазматичних мембран лімфоцитів може бути використана для гасіння акриламідом, можливо, за рахунок експонтування у зовнішнє середовище.

Структурною основою біомембран є білок-ліпідні комплекси [9], і можна передбачити, що зміна структури білків та ліпідів у мембранах визначає просторове розміщення білків та ліпідів у мембрані. Для дослідження білково-ліпідних комплексів плазматичних мембран лімфоцитів був використаний метод, що ґрунтується на рестрації ферстерівського переносу енергії між залишками триптофанів

Дослідження структури плазматичних мембран лімфоцитів...

мембранних білків /донори/ та піреном /акцептор енергії/, який має смугу поглинання в області флуоресценції триптофанів [10]. Під час додавання пірена до суспензії лімфоцитів відбувається гасіння флуоресценції триптофанів (Мал.2), що дозволяє розрахувати кількість донорів білкової флуоресценції, віддалених від ліпідного бішару на відстань понад 3,2нм $(1 - \beta)$ [10]:

$$F/F_0 = |1 - \beta| + \beta * \exp|\alpha P C_a| \quad (3)$$

де: F_0 та F - інтенсивність флуоресценції залишків триптофану за відсутності пірену та

після додавання;

C_a - концентрація пірена.

Параметр P залежить від геометрії мембрани, а параметр α - від взаємної рухомості та орієнтації донорів і акцепторів [11].

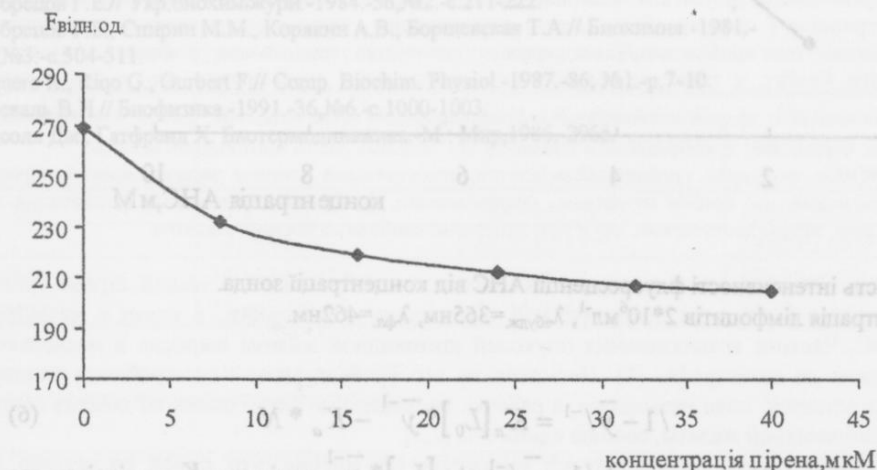


Рис.2. Залежність інтенсивності флуоресценції триптофанів білків плазматичних мембран лімфоцитів від концентрації пірена.

Концентрація кліток $2 \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$, $\lambda_{\text{збудж.}} = 286 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 330 \text{ нм}$.

У відповідності до вищенаведеного рівняння стало можливим розрахувати, що для плазматичних мембран лімфоцитів частка білків, віддалених від фосфоліпідного бішару мембран на відстань понад 3,2нм, складає 29,6%.

Вивчення поверхневих властивостей плазматичних мембран лімфоцитів проводили, використовуючи флуоресцентний зонд 1-анілінонафталін-8-сульфоната /АНС/ [12]. Передбачається, що під час зв'язування з мембраною фенольне кільце молекули АНС притискується до гліцеринових ділянок молекул фосфоліпідів, а друга члстина молекули контактує з водою [3]. Залежність інтенсивності флуоресценції АНС при титруванні лімфоцитів перемінними концентраціями АНС наведена на Мал.3. Якщо припустити, що зв'язування АНС з плазматичною мембраною лімфоцитів відбувається як молекулярна реакція: $\text{АНС} + \text{М} \leftrightarrow \text{АНС} \cdot \text{М}$, то ступінь заповнення центрів сорбції зондом /ступінь насичення місць зв'язування/ $\bar{y}$ набуває значення від 0 до 1,0 [13]. Для кожної концентрації АНС це значення може бути вираховане як відношення інтенсивності флуоресценції при даній концентрації зонда $F_{\text{АНС}}$ до інтенсивності флуоресценції при насиченні всіх центрів сорбції F_{max} :

$$\bar{y} = \frac{F_{\text{АНС}}}{F_{\text{max}}} = \frac{[BL]}{N} \quad (4)$$

де: $[BL]$ - концентрація центрів, заповнених зондом,

N - повна концентрація центрів зв'язку.

Величина константи асоціації:

$$K_a = \frac{[BL]}{(N - [BL])(L_0 - [BL])} \quad (5)$$

де: $[L_0]$ - концентрація АНС.

Але якщо $[BL] = \bar{y}N$, то після перетворення одержуємо:

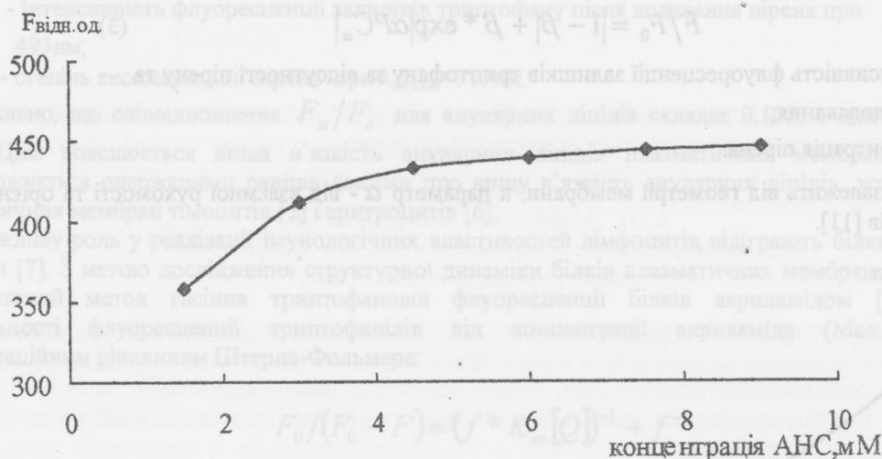


Рис.3. Залежність інтенсивності флуоресценції АНС від концентрації зонда.
Концентрація лімфоцитів $2 \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$, $\lambda_{\text{будж.}} = 365 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 462 \text{ нм}$.

$$1 - \bar{y}^{-1} = K_a [L_0] * \bar{y}^{-1} - K_a * N \quad (6)$$

Тоді тангенс нахилу графіка залежності $1 - \bar{y}^{-1}$ від $[L_0] * \bar{y}^{-1}$ дорівнює K_a , а відрізок, що відсікається на осі абсцис, дає кількість місць зв'язування N . Величини K_a та N вираховували за методом найменших квадратів [14]. Встановлено наявність на плазматичній мембрані лімфоцитів двох типів центрів сорбції АНС, що відрізняються як числом, так і величиною константи сполучення. (Таблиця 1).

Таблиця 1.

Характеристики сорбції АНС плазматичними мембранами лімфоцитів.

($M \pm m$, $n=10$)

Центри зв'язування	Параметри зв'язування	
	$N, \text{mM}/10^6$	K_a, M^{-1}
1	$0,2 \pm 0,07$	$634,79 \pm 38,78$
2	$0,7 \pm 0,25$	$1924,65 \pm 262,16$

ВИСНОВКИ

З використанням методів флуоресцентної спектроскопії визначені особливості структурної організації плазматичних мембран лімфоцитів, які характеризуються наявністю двох типів центрів сорбції АНС, в'язкість анулярних ліпідів в 2,6 рази вище в'язкості вільних ліпідів, а 29,6% білків мембран, віддаленні від фосфоліпідного бішару на відстань зверх 3,2 нм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротейдов. -М.: Наука, 1989.-277с.
2. Бейли Н. Статистические методы в биологии. -М.: ИЛ, 1962.-260с.
3. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. -М.:Наука, 1972.-252с.
4. Литвинов И.С., Образцов В.В.// Биофизика.-1982.-27, №1.-с.81-86.
5. Древал В.И.// Радиобиология.-1993.-33, №1.-с.45-48.
6. Сичевская Л.В.// Биофизический вестник.-1998, вып. 1.-с.128-132.
7. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. -М.: Высш. шк., 1985.-287с.
8. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. -М.: Мир, 1986.-496с.
9. Твердислов В.А. Физические механизмы функционирования биологических мембран. -М.: Мир, 1987.-189с.
10. Добрецов Г.Е.// Укр. биохим. журн.-1984.-56, №2.-с.211-222.
11. Добрецов Г.Е., Спирин М.М., Корякин А.В., Борщевская Т.А.// Биохимия.-1981.-46, №3.-с.504-511.
12. Aquero R., Rigo G., Gurbert F.// Comp. Biochim. Physiol.-1987.-86, №1.-p.7-10.
13. Древал В.И.// Биофизика.-1991.-36, №6.-с.1000-1003.
14. Эдсолл Дж., Гатфренд Х. Биотермодинамика. -М.: Мир, 1986.-296с.

УДК: 616.441 - 006.6 - 07: 616.15

НЕКОТОРЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В. А. Филенко, В. С. Холодный, В. Н. Горбенко*, Н. А. Бабенко

НИИ биологии Харьковского государственного университета, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4

*Харьковский областной клинический онкологический диспансер, 310070, Харьков, Померки, 70

Поступила в редакцию 28 мая 1999 г.

В данной работе представлены результаты экспериментального исследования некоторых морфофункциональных особенностей эритроцитов (средний объем клетки, относительная ширина распределения эритроцитов по объему, электрический ток пробоя мембраны, среднее количество гемоглобина в клетке) с помощью гемоцитометра типа Coulter, а также содержания ряда нейтральных (холестерина, ди- и триглицеридов, свободных жирных кислот и эфиров холестерина) и фосфолипидов (сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, церамидов) в эритроцитах и плазме крови больных раком щитовидной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит, средний объем клетки, относительная ширина распределения эритроцитов по объему, электрический ток пробоя мембраны, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, церамиды, холестерин, эфиры холестерина, ди- и триглицериды, свободные жирные кислоты.

В последние годы частота возникновения онкологических заболеваний в нашей стране существенно повысилась в результате ухудшения экологической обстановки, в частности, в связи с катастрофой на Чернобыльской АЭС. Частота возникновения опухолей щитовидной железы выросла в несколько раз по сравнению с периодом до катастрофы [1]. Несмотря на это уровень знаний по проблеме канцерогенеза щитовидной железы остается пока невысоким, а работы, посвященные исследованиям обмена веществ при развитии опухолей щитовидной железы, вообще единичны [2,3].

За последнее время рядом исследователей высказывается мнение, что одной из причин развития процессов малигнизации могут быть биохимические изменения, происходящие в клеточных мембранах [4,5]. Поскольку липиды (насыщенные и ненасыщенные) являются одним из основных компонентов биомембран, возможно предположить, что именно изменения в липидной составляющей обуславливают некоторые особенности метаболизма клеточных мембран при канцерогенезе [6,7].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение некоторых морфофункциональных характеристик эритроцитов, а также ряда показателей липидного обмена в эритроцитах и плазме крови больных раком щитовидной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Так как частота возникновения рака щитовидной железы у женщин наблюдается в среднем в три раза чаще, чем у мужчин [1], в качестве доноров мы использовали женщин в возрасте 47-62 л. Первую опытную группу составили женщины, по клиническим показателям подлежащие операции с диагнозом - рак щитовидной железы. Во вторую опытную группу входили женщины той же возрастной категории, перенесшие операцию субтотальной тиреоидэктомии по поводу рака щитовидной железы 3-4 года назад. Контрольную группу составили женщины того же возраста без данной патологии и гормональных отклонений. Забор крови осуществляли утром натощак.

В работе изучали некоторые морфофункциональные особенности эритроцитов (средний объем эритроцитов MCV, относительную ширину распределения эритроцитов по объему RDW, электрический ток пробоя мембраны I_m , среднее количество гемоглобина в клетке C_{Hb}) с помощью гемоцитометра типа Coulter [8]. Во избежание эффекта деформации все измерения были выполнены при малой скорости потока 0.002 мл/с, соответствующей давлению в отверстии 1.5 см рт.ст. Все исследования были выполнены при комнатной температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Кроме этого, нами был определен ряд показателей липидного обмена в эритроцитах и плазме крови больных: содержание нейтральных (холестерин, ди- и триглицериды, свободные жирные кислоты и эфиры холестерина) и фосфолипидов (сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, церамиды). Для изучения липидного спектра мембран эритроциты отделяли от плазмы методом Варда и др. [9]. Экстракцию липидов проводили по методике Блайя и Дайера в модификации Кейтса [10]. Разделение липидов на фракции проводилось методом тонкослойной хроматографии, используя пластинки размером 8x12 см с силикагелем. Хроматографию проводили в системах гексан - эфир - ледяная уксусная кислота (73:25:2) для нейтральных липидов и хлороформ - метанол - вода (40:10:1) для фосфолипидов. По окончании хроматографии липидные фракции очищали от силикагеля с помощью центрифугирования в

Некоторые морфофункциональные характеристики эритроцитов...

смеси хлороформ-метанол-аммиак (56:42:2) при 3000 об/мин в течение 10 минут для осаждения сорбента. Количество липидов определяли по методу Марча и Вейнштейна [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных, представленных в таблице 1, нами наблюдалось достоверное увеличение среднего объема MCV эритроцитов в 1-ой опытной группе по сравнению с контролем и некоторое его уменьшение с тенденцией к нормализации во 2-ой группе. Показатель RDW в 1-ой опытной группе был достоверно увеличен по сравнению с контролем и снижился во 2-ой опытной группе, что может свидетельствовать о большей степени анизоцитоза эритроцитов с преобладанием макроцитов у раковых больных. Величина электрического тока пробоя I_m была снижена в 1-ой группе и стремилась к контрольным величинам во 2-ой группе, что, возможно, также отражает нарушение стабильности эритроцитарных мембран при раке щитовидной железы. При сравнении опытных групп между собой среднее содержание гемоглобина в одной клетке C_{Hb} практически не изменялось.

Табл. 1

Некоторые морфофункциональные особенности эритроцитов больных раком щитовидной железы

Показатель	Контрольная группа	Больные карциномой щитовидной железы (1-я группа)	Больные после операции через 3-4 года (2-я группа)
MCV, фл	97.8±2.14	148.46±2.58*	112.72±3.81*
RDW	34.78±1.28	64.33±2.17**	39.85±2.84**
I_m , мкА	150.14±4.87	116.8±5.09	139.18±6.27
C_{Hb} , пг/кл	23.9±1.25	29.14±0.14	30.72±1.30

*- достоверно относительно контроля: $p < 0,002$;

** - достоверно относительно контроля: $p < 0,05$.

Полученные результаты свидетельствуют о перестройке структуры мембран эритроцитов у раковых больных. Поэтому следующим шагом исследования стало изучение липидного состава эритроцитов при данной патологии. Нам удалось установить, что у больных 1-ой опытной группы достоверно снижается содержание некоторых фракций липидов эритроцитарных мембран (в пересчете на 1 мг белка): общих фосфолипидов, диацилглицеридов, жирных кислот (рис.1). Среди отдельных фракций фосфолипидов достоверно уменьшается содержание фосфатидилхолина и церамидов при неизменном количестве сфингомиелина и фосфатидилэтаноламина. Кроме того, изменяется распределение липидных фракций внутри классов (в процентном отношении): относительное содержание холестерина, сфингомиелина, фосфатидилэтаноламина увеличивается, а уровень общих фосфолипидов, диглицеридов, жирных кислот и церамидов достоверно снижается (рис. 2). Соотношение между насыщенными и ненасыщенными липидами остается практически без изменений (табл. 2).

Во 2-ой группе пациентов, по нашим наблюдениям, не происходит нормализация липидного спектра эритроцитов: количественное содержание фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, сфингомиелина, церамидов и диглицеридов достоверно снижается по сравнению как с контролем, так и с 1-ой группой

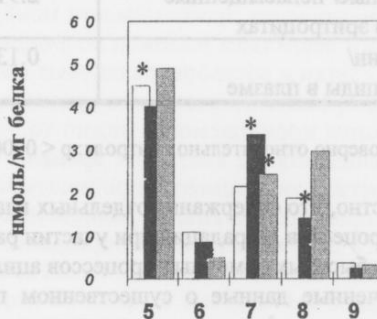
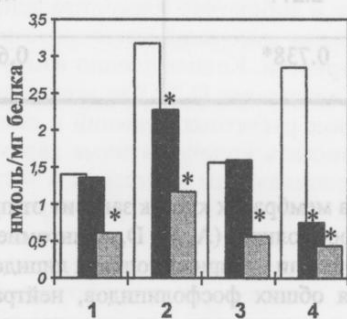


Рис. 1. Количественное содержание липидов в эритроцитах: 1-сфингомиелин, 2-фосфотидилхолин, 3- фосфотидилэтаноламин, 4-церамиды, 5-общие фосфолипиды, 6-диглицериды, 7-холестерин, 8-жирные кислоты, 9-триглицериды; □ - контроль; ■ - 1-я группа; ▒ - 2-я группа; * - достоверно относительно контроля: $p < 0,002$.

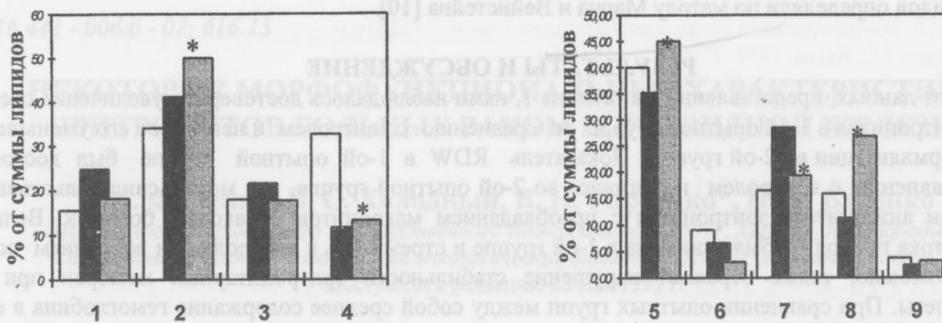


Рис. 2. Относительное содержание липидов в эритроцитах: 1 - сфингомиелин, 2 - фосфотидилхолин, 3 - фосфотидилэтаноламин, 4 - церамиды, 5 - общие фосфолипиды, 6 - диглицериды, 7 - холестерин, 8 - жирные кислоты, 9-триглицериды; □ - контроль; ■ - 1-я группа; ▒ - 2-я группа; * - достоверно относительно контроля: $p < 0,002$.

пациентов (рис. 1). Кроме того, наблюдаются разноплановые изменения в относительном содержании как нейтральных, так и фосфолипидов, не приближающиеся к контрольным уровням (рис. 2).

Известно, что липидная структура эритроцитарных мембран может формироваться при созревании клеток в красном костном мозге, а также в результате обмена между клетками и липопротеидами плазмы крови. Можно предположить, что наблюдаемые изменения липидного спектра эритроцитарных мембран могут являться результатом изменения обмена между липопротеидами сыворотки крови и клетками. Поэтому следующая серия исследований была проведена на плазме крови.

Установлено, что содержание фосфолипидов, диглицеридов и жирных кислот в плазме больных раком щитовидной железы, так же как и в эритроцитарных мембранах, существенно падает. В то же время уровень холестерина и эфиров холестерина остается практически без изменений. Но соотношение между холестерином и фосфолипидами увеличивается в несколько раз (табл.2). Увеличено относительное содержание свободных жирных кислот и триацилглицеридов, что может свидетельствовать о глубоких нарушениях липидного обмена, так как триацилглицериды являются основными компонентами липопротеидов плазмы крови.

Некоторые соотношения между липидами

Табл. 2

Соотношение	Контрольная группа	Больные карциномой щитовидной железы (1-я группа)	Больные после операции через 3-4 года (2-я группа)
холестерин/ фосфолипиды в эритроцитах	0.485	0.424	0.430
насыщенные/ ненасыщенные липиды в эритроцитах	2.918	2.277	4.063
холестерин/ фосфолипиды в плазме	0.137	0.738*	0,685*

* - достоверно относительно контроля: $p < 0,002$.

Известно, что содержание отдельных классов липидов в мембранах клеток зависит от процессов синтеза de novo, процессов деградации при участии разнообразных фосфолипаз (A, A₁, D, сфингомиелиназ), а также в результате быстрых обменных процессов ацильных компонент или полярных головок липидов.

Полученные данные о существенном падении уровня общих фосфолипидов, нейтральных липидов, холестерина и его эфиров могут свидетельствовать о резком подавлении их синтеза в эритроцитах, что может отражать угнетение их синтеза de novo. Об этом может свидетельствовать резкое уменьшение содержания предшественников фосфолипидов - диацилглицеридов как в плазме, так и в эритроцитарных мембранах, а также уменьшение содержания их продуктов - триглицеридов. В то же время разнонаправленные процессы изменения содержания отдельных фракций липидов (сфингомиелин, фосфатидилхолин, церамиды, фосфатидилэтаноламин) и нейтральных липидов (холестерина и жирных кислот) отражают, по-видимому,

Некоторые морфофункциональные характеристики эритроцитов...

изменения в согласованности работы ферментов быстрой перестройки липидного спектра, а именно различных фосфолипаз и трансфераз.

ВЫВОДЫ

Проведенные в настоящей работе исследования выявили достоверные изменения некоторых морфофункциональных особенностей эритроцитов больных раком щитовидной железы.

Изучение липидного спектра эритроцитов, в частности, количественное определение общих фосфолипидов, сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, церамидов, жирных кислот, триглицеридов, эфиров холестерина показало, что при карциноме щитовидной железы у женщин в возрасте 47-62 лет меняется распределение всех фракций как фосфо-, так и нейтральных липидов. После субтотальной тиреоидэктомии у пациентов не достигается нормализация липидного спектра; содержание фосфолипидов и некоторых нейтральных липидов в мембранах эритроцитов и плазме крови достоверно отличается от контроля.

Полученные данные позволяют нам говорить о том, что у женщин, больных раком щитовидной железы, наблюдаются глубокая перестройка липидного спектра мембран эритроцитов и нарушения липидного обмена в плазме крови, не нормализующиеся при обычных методах лечения рака щитовидной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баллукс Ф. В. Рак: иллюзии, реалии, надежды. С.- Петербург: Наука, 1992 г.- 212 с.
2. Особенности липидного обмена у больных раком щитовидной железы/ Бердинов В. А. // Лаб. дело.- 1978, № 2.- С. 28-32.
3. Radioimmune induced thyroid cancer/ Robbins J., Schneiderb A. B. // Trends in Endocrinology and Metabolism.- 1988, № 9.- P. 87-94.
4. Липиды опухолей и их влияние на структуру и функционирование клеточных мембран/ Дятловицкая Э. В., Бергельсон Л. Д. // Вестн. АМН СССР.- 1982.- № 3.- С. 42-47.
5. Фосфолипиды опухолей/ Дятловицкая Э. В.// Сб.: Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М., Наука, 1977 г.- С. 53-57.
6. Регуляторная функция мембран при злокачественном росте/ Бурлакова Е. Б., Пальмина Н. П. // Вестн. АМН СССР.- 1982, № 3.- С. 74-86.
7. Состав нейтральных липидов эритроцитов и плазмы крови больных с опухолями молочной железы и больных после лучевой терапии/ Кальнова Н. Ю., Пальмина Н. П. // Усп. мед. химии.- 1982, № 3-4.- С. 71-75.
8. Richieri G.V., Akeson S.P. Measurement of biophysical properties of red blood cells by resistive pulse spectroscopy: volume, shape, surface area, and deformability // Journal of Biochemical and Biophysical Methods.-1985.- №11.- P.117-131
9. Ward E., Bullock J. R., Fasal P/ J. Immunol.- 1977, V. 106.- P. 888-891.
10. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975.- 256 с.

УДК591.15.16

ВОЛЮМОМЕТРИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. I. ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗМЕРЕНИЮ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЕМА

Н.Д.Безуглый, Н.А.Гордиенко, А.В.Медведовский

Харьковский биотехнологический центр, 312120 Харьков, п/о Кулинич, E-mail cryo@animal.kharkov.ua

Поступила в редакцию 30 апреля 1999 г.

В статье описан метод изучения осмотической реакции эмбрионов и яйцеклеток млекопитающих. Этот метод позволяет на основе косвенного измерения изменений клеточного объема с использованием физико-математической модели определять осмотический состав клеток, рассчитывать коэффициенты проницаемости цитоплазматических мембран яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих к воде и проникающим веществам, а также коэффициенты отражения и энергию активации транспорта веществ через мембраны. Описаны три технических подхода к реализации данного метода и проведено их сравнение.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эмбрион, осмотическая реакция, проницаемость цитоплазматических мембран, клеточный объем, коэффициент проницаемости.

Общеизвестно, что биологические мембраны обладают избирательной проницаемостью. Из этого следует, что при помещении в растворы осмотически активных веществ, отличных по составу или осмолярности от физиологических, клетки будут изменять свой объем в соответствии с законом Вант-Гоффа. Скорость изменения объема клетки при данной температуре зависит от значения коэффициента проницаемости к воде и проникающим веществам и поверхностно-объемного отношения. Различные типы клеток различаются характерными временами осмотической реакции. Характерное время осмотической реакции в растворах непроникающих веществ обратно пропорционально коэффициенту проницаемости к воде L_p и поверхностно-объемному отношению S/V [1]. Так, например, для спермиев быка (в растворе непроникающих веществ $L_p=10.4$ мкм³/мкм²*мин.*атм при 25°C и $(S/V)=4.1$ 1/мкм) характерное время осмотической реакции τ для воды составляет 0.190 сек. Это означает, что уравнивание спермиев с окружающей средой произойдет в течение долей секунды. Зарегистрировать скорость этого уравнивания у одиночной клетки невозможно. Эмбрионы и яйцеклетки млекопитающих, одни из самых крупных клеток в организме, имеют размеры, в несколько десятков раз превышающие таковые у большинства клеток млекопитающих. Из этого следует, что они имеют малые поверхностно-объемные отношения. Так, например, для ооцита коровы $(S/V)=0.05$ 1/мкм. Это позволило нам предположить, что характерное время осмотической реакции эмбрионов и яйцеклеток млекопитающих может быть намного больше, чем для других клеток, и составит доли или единицы минут, и процесс изменения объема клетки можно наблюдать под микроскопом и фиксировать его [1]. Качественные наблюдения за изменением объема ооцитов и эмбрионов мыши и коровы в гипертонических растворах NaCl подтвердили правильность такого предположения и послужили основой для разработки методики, названной нами волюмометрией.

В основу изучения проницаемости мембран яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих к воде и проникающим веществам положен косвенный метод измерения изменений клеточного объема при помещении клетки в растворы различного состава и осмолярности. Количественно изменения объема клетки во времени описываются уравнениями Кедема-Качальского [2,3]. Для экспериментального исследования проницаемости важно то, что сопоставление расчетных решений и полученных в опыте значений объема клетки от времени позволяет вычислить количественные характеристики проницаемости: коэффициенты проницаемости к воде и проникающим веществам и энергии активации этих процессов, а анализ равновесных значений клеточного объема в растворах различной осмолярности дает возможность определить осмотический состав клетки: количество осмотически активной воды, осмотически неактивных веществ (балласта) и количество растворенных веществ.

В процессе наблюдения за клеткой под микроскопом, а также при микрофотографировании или анализе видеоизображения экспериментатор может измерить линейные размеры объекта или площадь поперечного сечения клетки, а для расчетов необходимо знание клеточного объема. Если погрешность измерения площади и линейных размеров одинакова, измерение площади поперечного сечения клетки предпочтительнее, так как дает намного меньшую погрешность в измерении объема. Это следует из того, что объем пропорционален линейным размерам в кубе, а площади - в степени 1,5. Следовательно, перед нами стояла задача определения объема клетки по площади попе-

речного сечения. Этот вопрос был крайне актуальным для определения объема ранних эмбрионов, поскольку они на некоторых стадиях развития имеют неправильную форму.

Качественные наблюдения за сжатием клеток в гипертонических растворах показали, что существует несколько видов сжатия клетки, которые условно были разделены нами на три типа (См. Рис.1).

I тип - однородное изотропное сжатие - поперечное сечение деформированной клетки подобно таковому для недеформированной (Рис.1, Б).

II тип - неоднородное изотропное сжатие - сжатая клетка имеет извилистые границы (принимает звездчатую форму), характерные размеры изгибов намного меньше размеров клетки, избранных направлений при сжатии нет (Рис.1, В).

III тип - неоднородное анизотропное сжатие - сжатие извилистым образом в одном или нескольких избранных направлениях (Рис.1, Г).

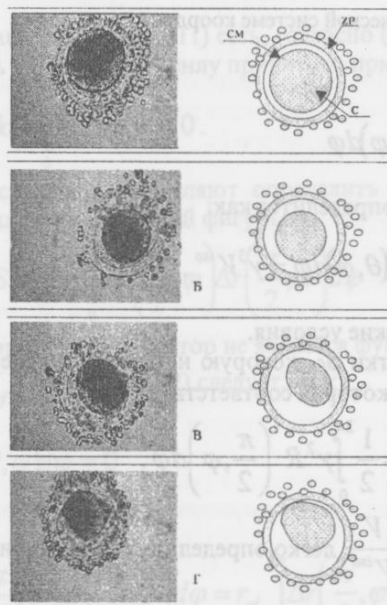


Рис.1. Микрофотографии (левый столбец) и схемы строения (правый столбец) яйцеклеток коровы в растворах различной осмолярности. А - в изотоническом растворе, Б,В,Г, - в гипертонических растворах. СМ - цитоплазматическая мембрана, ЗР - зона пеллюцида, С - собственно яйцеклетка.

Для каждого из этих случаев установим зависимость между соотношением площадей поперечного сечения и клеточных объемов.

В случае однородного изотропного сжатия при уменьшении объема клетки получается фигура, подобная начальной. Тогда, если $\vec{r}(\theta, \varphi)$ - радиус-вектор клетки в деформированном состоянии, а $\vec{R}(\theta, \varphi)$ - радиус-вектор клетки в изотонии, то

$$\vec{r}(\theta, \varphi) = \gamma * \vec{R}(\theta, \varphi), \quad (1)$$

где: θ и φ - полярные координаты, а γ - коэффициент подобия.

В сферической системе координат площадь поперечного сечения определяется выражением (см. Рис.2):

$$S'_\theta = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} r_\theta^2 d\varphi = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} r^2(\theta, \varphi) \sin^2 \theta d\varphi \quad (2)$$

При определении объема фигуры как суммы бесконечно тонких дисков площадью S'_θ и толщиной dh объем определяется как:

$$V = \int_\theta S'_\theta dh = \int_\theta S'_\theta r(\theta, \varphi) \sin \theta d\theta \quad (3)$$

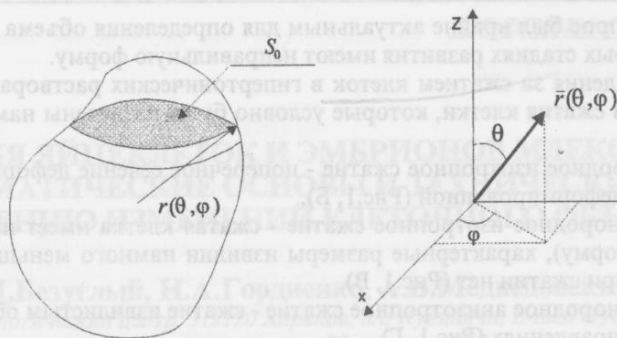


Рис.2. Фигура произвольной формы в сферической системе координат.

С учетом выражения 2 получим

$$V = \frac{1}{2} \int_0^\pi \sin^3 \theta d\theta \int_0^{2\pi} r^3(\theta, \varphi) d\varphi \quad (4)$$

С условием подобия объем клетки определится как:

$$V = \frac{1}{2} \int_0^\pi \sin^3 \theta d\theta \int_0^{2\pi} \gamma^3 R^3(\theta, \varphi) d\varphi = \gamma^3 V^{iso}, \quad (5)$$

где суперскрипт *iso* означает изотонические условия.

Площадь поперечного сечения клетки S_f , которую наблюдает экспериментатор, - это максимальная площадь поперечного сечения, которая соответствует $\theta = \pi/2$:

$$S_f = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} r^2\left(\frac{\pi}{2}, \varphi\right) d\varphi = \frac{1}{2} \int_0^{2\pi} \gamma^2 R^2\left(\frac{\pi}{2}, \varphi\right) d\varphi. \quad (6)$$

Относительный объем клетки $v = \frac{V}{V^{iso}}$ легко определить из уравнений 5-6:

$$v = \left(\frac{S_f}{S_f^{iso}} \right)^{3/2}. \quad (7)$$

Для случая неоднородного изотропного сжатия нарисуем фигуру, описываемую функцией $\bar{r}_{ef}(\theta, \varphi)$, которая будет подобна клетке в изотоническом растворе и будет иметь такой же объем, как и сжатая клетка (Рис.3).

Радиус-вектор сжатой клетки свяжем с радиусом-вектором нарисованной фигуры соотношением:

$$\bar{r}(\theta, \varphi) = \bar{r}_{ef}(\theta, \varphi) + \Delta \bar{r}(\theta, \varphi), \quad (8)$$

где $\Delta r(\theta, \varphi)$ - разность радиусов сжатой клетки и фигуры, подобной клетке в изотонии.

Наблюдения за деформацией клетки при неоднородном изотропном сжатии показывают, что:

$$|\Delta \bar{r}(\theta, \varphi)| \ll |\bar{r}(\theta, \varphi)|, |\bar{r}_{ef}(\theta, \varphi)| \quad (9)$$

Объем клетки описывается тем же выражением (4), что, с учетом (8), дает:

$$V = \frac{1}{2} \int_0^\pi \sin^3 \theta d\theta \int_0^{2\pi} (r_{ef} + \Delta r)^3 d\varphi \quad (10)$$

или с точностью до порядка $\Delta r/r$:

$$V = \frac{1}{2} \int_0^\pi \sin^3 \theta d\theta \int_0^{2\pi} r_{ef}^3 d\varphi + \frac{3}{2} \int_0^\pi \sin^3 \theta d\theta \int_0^{2\pi} r_{ef}^2 \Delta r d\varphi. \quad (11)$$

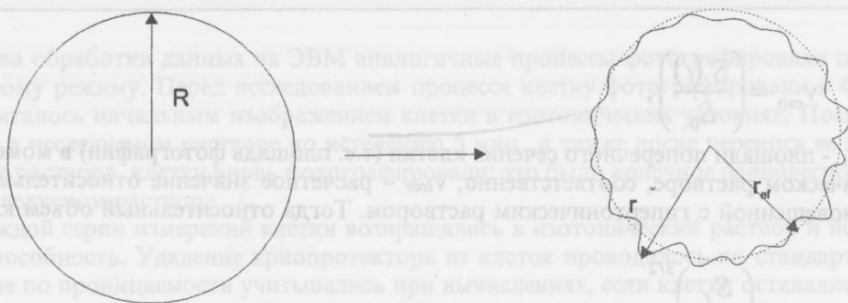


Рис.3. Деформация клетки при неоднородном изотропном сжатии.

Так как первое слагаемое суммы (11) есть, согласно (4), объем нарисованной фигуры, второе слагаемое должно быть равно нулю в силу принятого при изображении подобной фигуры условия:

$$\int_0^\pi \sin^3 \theta d\theta \int_0^{2\pi} r_{ef}^2 \Delta r d\varphi = 0. \quad (12)$$

Аналогичные рассуждения позволяют определить и площадь поперечного сечения сжатой клетки через таковую для нарисованной фигуры:

$$S_f = (S_f)_{ef} + \int_0^{2\pi} r_{ef} \left(\frac{\pi}{2}, \varphi \right) \Delta r \left(\frac{\pi}{2}, \varphi \right) d\varphi \quad (13)$$

Для клеток, у которых радиус-вектор не является функцией φ (яйцеклетки, зиготы), легко получить, что $S_f = (S_f)_{ef}$, так как из (12) следует, что:

$$\int_0^{2\pi} \Delta r(\theta, \varphi) d\varphi = 0 \quad (14)$$

при $0 \leq \theta \leq \pi$ и

$$\int_0^{2\pi} r_{ef} \left(\frac{\pi}{2}, \varphi \right) \Delta r \left(\frac{\pi}{2}, \varphi \right) d\varphi = r_{ef}^2 \int_0^{2\pi} \Delta r \left(\frac{\pi}{2}, \varphi \right) d\varphi = 0. \quad (15)$$

Для клеток, у которых радиус-вектор является функцией φ (эмбрионы) равенство площадей поперечного сечения выполняется приблизительно. Покажем это. В уравнениях (11) и (13) в подинтегральных выражениях вторых слагаемых знаменателем является функция $\Delta r(\theta, \varphi)$. Если проанализировать изменения радиус-векторов $\bar{r}_{ef}$ и $\bar{r}$ (Рис.4), то период изменения функции $\bar{r}_{ef} = f(\varphi)$ намного меньше периода функции $\bar{r}$ (и, соответственно, $\Delta \bar{r}$). Тогда можно предположить, что каждому значению функций r_{ef} и r_{ef}^2 соответствует одинаковое значение функции Δr положительного и отрицательного знака. Отсюда следует, что интегралы, содержащие Δr , в выражениях (11) и (13), равны нулю.

Следовательно, площадь поперечного сечения нарисованной фигуры равна таковой для сжатия клетки (объемы их равны по условию). Но, так как нарисованная фигура подобна клетке в изотоническом растворе, при неоднородном изотропном сжатии относительный объем клетки описывается, как и для однородного изотропного, сжатия выражением (7).

При неоднородном анизотропном сжатии существует одно или несколько избранных направлений деформации. В этом случае подход, применяемый для неоднородного изотропного сжатия, не приемлем, потому, что периоды $\bar{r}_{ef}$ и $\bar{r}$ одного порядка. В этом случае необходимо ввести коэффициент анизотропии α , вычисляемый по формуле:

$$\alpha = \frac{V_{теор}}{V_{exp}} \quad (16)$$

где: V_{exp} — значения относительного объема клетки, рассчитанные по следующим формулам:

$$v_{\text{exp}} = \left(\frac{S'(t)}{S'_0} \right), \quad (17)$$

где: $S'(t)$ и S'_0 - площади поперечного сечения клетки (т.е. площадь фотографии) в момент времени t и в изотоническом растворе, соответственно, $v_{\text{теор}}$ - расчетное значение относительного объема клетки, уравновешенной с гипертоническим раствором. Тогда относительный объем клеток определится как:

$$v = \alpha \left(\frac{S_f}{S_{iso}} \right)^{3/2}. \quad (18)$$

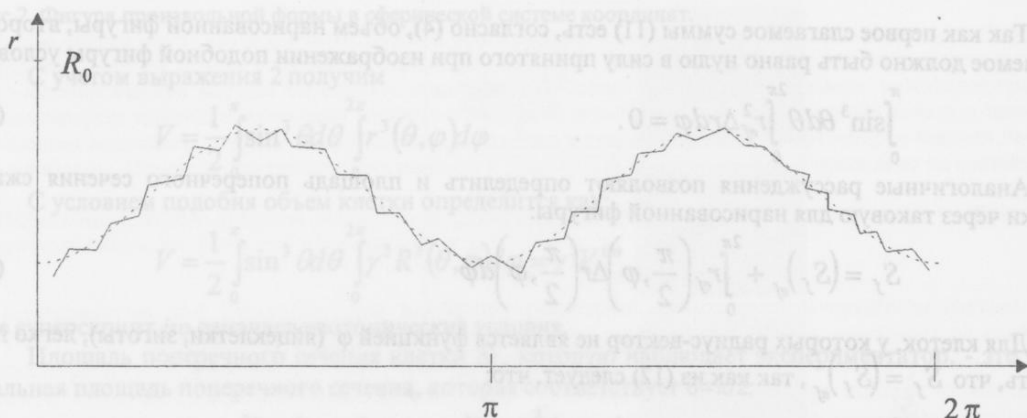


Рис.4. Изменения радиус-векторов сжатой неоднородной изотропной клетки $\vec{r}$ (сплошная линия) и вписанной в нее фигуры $\vec{r}_{ef}$ (пунктир).

Экспериментальная проверка показала, что коэффициент анизотропии близок к единице и лежит в пределах 0,9 – 1.

В течение 1980 г. вышли первые статьи [4,5] по изучению осмотической реакции мышинных яйцеклеток, в которых объем клеток вычислялся, считая их форму сферической. Однако это приближение описывает только I тип сжатия для яйцеклеток, и не применимо для II и III типа сжатия яйцеклеток и всех типов сжатия эмбрионов, не включая стадию зиготы.

Осмотическую реакцию можно изучать как в гипертонических, так и в гипотонических растворах при набухании клеток, однако, наличие зоны пеллюцида как жесткого каркаса позволяет изучать проницаемость интактных клеток только при сжатии. Как видно из формул (2...4), по изображениям наиболее просто определять относительный объем клетки. Поэтому в расчетные уравнения целесообразно было ввести именно эту величину.

Исследование осмотической реакции зародышей в растворах криопротекторов проводилось в течение довольно длительного времени. Первые эксперименты были нами проведены в 1980 г., а исследования новых биологических объектов с использованием метода волнометрии продолжают и в настоящее время. В течение этого периода времени метод претерпел большие изменения: удалось в значительной мере снизить трудоемкость операций, автоматизировать некоторые из них и повысить точность измерений. Разработку и усовершенствование методики волнометрии условно можно разбить на три этапа по методу определения площади клеток: (1) - использование фотографирования (1979-1982 г.г.), (2) - измерение интенсивности рассеянного клеткой света при темнопольной микроскопии (1981-1990 г.г.) и (3) - фиксирование изображения видеокамерой и запись его на ЭВМ (с 1990 г. по настоящее время).

Для фотографирования клетки с каплей исследуемого раствора помещали под микроскоп МБИ-12 или МБИ-15. Затем в течение 10...15 секунд находили биообъект в поле зрения и начинали фотографирование. При этом следили, чтобы клетка не вращалась. Время фиксировали секундомером и начинали отсчитывать от момента внесения биообъекта в исследуемый раствор. Фотографирование производили через удлиняющиеся промежутки времени в зависимости от общей длительности процесса.

Для удобства обработки данных на ЭВМ аналогичные процессы фотографировали по одинаковому временному режиму. Перед исследованием процесса клетку фотографировали в ФСБ: это изображение считалось начальным изображением клетки в изотонических условиях. После стабилизации объема в исследуемом растворе по истечению 5 мин., а также после переноса ее в другую каплю такого же раствора, клетку вновь фотографировали: это было конечное равновесное состояние клетки в исследуемом растворе.

В конце каждой серии измерений клетки возвращались в изотонический раствор и исследовались на жизнеспособность. Удаление криопротектора из клеток проводилось по стандартным методикам. Данные по проницаемости учитывались при вычислениях, если клетки оставались жизнеспособными после всех манипуляций. Результаты по изучению влияния оплодотворения яйцеклеток и стадии развития эмбриона на скорость транспорта учитывались, только если яйцеклетки дробились до двух бластомеров, а эмбрионы достигали следующей стадии дробления. После обработки фотопленок получали увеличенное изображение биообъекта на проекционном устройстве "Pentakta-L100", обводили изображение на тонкой однородной по толщине бумаге и затем вырезали его и взвешивали с точностью до 0.1%. Таким образом, площадь изображения клетки измерялась в нашей методике в единицах веса. Независимые многократные определения площади поперечного сечения одного и того же кадра несколькими операторами таким способом показали разброс значений не более 3%. Относительный объем клетки определяли по формулам 17-18, подставляя вместо площади вес изображения.

Вышеописанный вариант волюметрии достаточно широко использовался и используется исследователями при изучении осмотической реакции яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих [4,5,6,7]. Однако, этот метод имеет большую трудоемкость, т.к. большинство операций необходимо производить вручную. Так, для получения необходимой информации о реакции одной клетки в одном растворе необходимо не менее трех дней работы одного научного сотрудника и двух лаборантов при наличии необходимого количества объектов. Чтобы ускорить время проведения эксперимента и повысить его точность, нами был предложен метод определения площади яйцеклетки или эмбриона по интенсивности отраженного ими света. Этот метод был положен в основу полуавтоматической установки для изучения осмотической реакции клеток [8].

Для фиксации изменений клеточного объема эмбрион освещали по методу "темного поля". Этот тип микроскопии был выбран потому, что именно он обеспечивал максимальное соотношение сигнал/"шум" (в качестве сигнала - интенсивность отраженного объекта, в качестве шума - интенсивности освещения окружающего пространства). Количество отраженного света измерялось фотозлектронным умножителем (ФЭУ). При изменении клеточного объема изменялась площадь поверхности клетки и, следовательно, количество отраженного поверхностью клетки света. Таким образом, в разработанной установке площадь клетки измерялась в единицах освещенности. Для установления корреляции между изменением объема клеток и изменениями фототока ФЭУ были проведены модельные эксперименты на полупрозрачных шариках из стирола диаметром 65...150 мкм. В результате этих экспериментов было установлено, что существует корреляция между изменением клеточного объема эмбриона и изменениями напряжения на аноде ФЭУ. Этот факт послужил основанием для создания полуавтоматической экспериментальной установки для изучения осмотической реакции эмбрионов млекопитающих.

Блок-схема установки представлена на рис 5. Эмбрион 9 с помощью микроманипулятора помещается в измерительную камеру 1, в которую устройством подачи растворов 2 закачивается раствор необходимого состава и концентрации. Температура растворов и температура камеры поддерживается терморегулятором 7 с точностью $\sim 0,3^\circ\text{C}$ в диапазоне $+4^\circ\text{C} \dots +40^\circ\text{C}$. Объект освещается по методу "темного поля" (конденсор 8) и отраженный клеткой свет подается на ФЭУ 4, где оптический сигнал превращается в электрический. Далее сигнал усиливается и с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП) 5 электрический сигнал превращается в цифровой код, который поступает в персональную ЭВМ 6. ЭВМ фиксирует изменения сигнала и создает файл начальных данных, которые затем обрабатывались с помощью специальных программ.

Установка, смонтированная на базе люминисцентного микроскопа "Люам-И2", была изготовлена по нашим разработкам НПО "Биоприбор" Российской Академии Наук.

Калибровка фотоизмерительного устройства проводилась на яйцеклетках крупного рогатого скота. При этом яйцеклетки помещались в растворы непроникающих веществ, в которых их поведение было известно, измерялось напряжение на эталонном сопротивлении для каждого значения концентрации раствора и вычислялось значение относительного объема.

Анализ полученных результатов позволяет получить калибровочную кривую зависимости относительного объема клеток от относительного напряжения. Под относительным напряжением понимается отношение напряжения на эталонном сопротивлении при помещении клетки в изотонический раствор к напряжению на этом же сопротивлении при помещении клетки в исследуемый раствор.

Данная установка использовалась нами в течение нескольких лет для волуометрии яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. Она позволила автоматизировать наиболее трудоемкие операции метода и получать достаточную стабильность результатов с точностью до 5...9%.

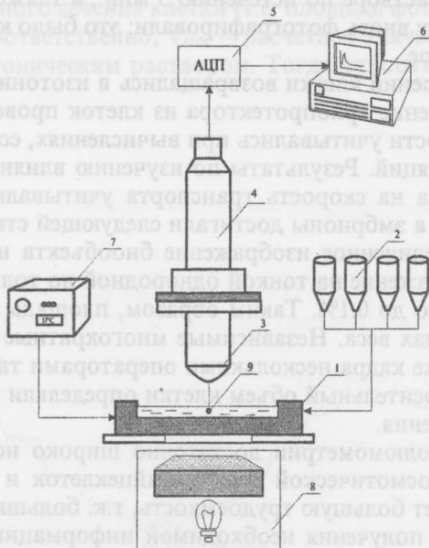


Рис.5 Блок-схема экспериментальной установки для изучения осмотической реакции яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. 1-камера, 2 - устройство смены растворов, 3 - объектив микроскопа, 4 - ФЭУ, 5 - АЦП, 6 - ЭВМ, 7- терморегулятор, 8 - конденсор "темного поля", 9 - эмбрион.

Однако, в ходе проведения экспериментов выяснилось, что фотоэлектронный умножитель и усилитель его сигналов очень чувствителен к изменению напряжения в сети и к освещенности окружающего исследуемый объект пространства. К тому же, определенные неудобства вызывает отсутствие изображения клеток в исследуемых растворах. Развитие компьютерной техники позволило нам заменить измерительный блок в установке на более современный. При этом изменение объема клетки контролировалось видеокамерой, которая через плату обработки видеосигнала была подключена к персональной ЭВМ. Программное обеспечение обработки видеосигнала позволяет определять необходимые геометрические характеристики (линейные размеры, площади и т.п.) яйцеклеток и эмбрионов и получать изображения клеток на экране дисплея. Именно такой вариант установки и используется сейчас в нашей лаборатории. На рис.6 показаны микрофотографии эмбриона коровы в течение его насыщения глицерином, полученные на этой установке, а на рисунке 7 график изменения его относительного клеточного объема, рассчитанного по формуле (7).

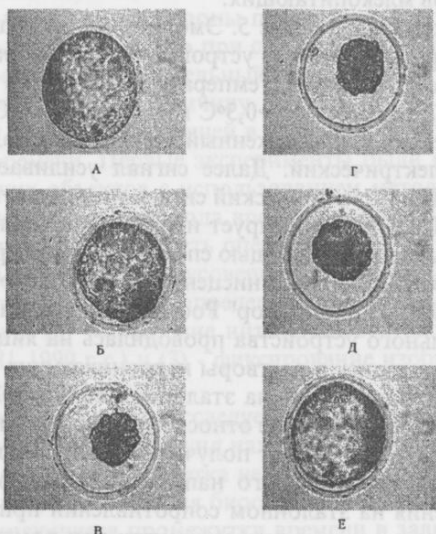


Рис.6. Микрофотографии эмбриона коровы при переносе его из изотонии А в 1,5М раствор глицерина через Б - 10 с, В - 80 с, Г - 130 с, Д - 250 с и Е - 420 с, соответственно.

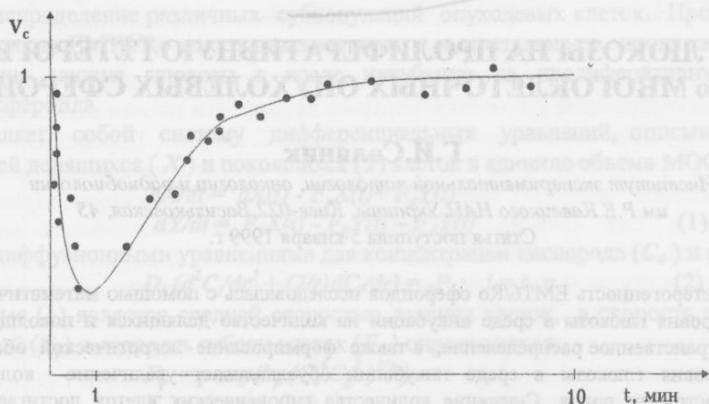


Рис.7. Изменения относительного клеточного объема эмбриона коровы при переносе его из изотонии А в 1,5М раствор глицерина. • - экспериментальные и — - расчетные значения, соответственно.

Разработанный нами метод воллюметрии яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих и установка для его реализации использовалась и используется для определения биофизических свойств этих биообъектов, в том числе и таких, которые определяют реакцию этих клеток на действие низких температур.

Метод расчета этих параметров и некоторые экспериментальные результаты будут приведены во второй статье публикуемой серии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглый Н.Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации // автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, - 1984 г., Харьков.
2. Kedem O., Katchalsky A. A thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. //Biochem. et biophys. acta. - 1958. - V.27. - N2. - p.229...246.
3. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability. //J. Gen. Physiol. - 1961. - V.45. - N1. - p.143...179.
4. Leibo S.P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. - In: The freezing of mammalian embryos (Ciba Found. Symp.). - Amsterdam:Elsevier. - 1977. - p.69...94.
5. Leibo S.P., Mazur P., Jackowski S.C. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing.//Exp. Cell Res.- 1974.- N89.- p. 79...88.
6. Безуглый Н.Д. Криоконсервация ооцитов крупного рогатого скота //Тезисы 1 Республиканской конференции молодых ученых и специалистов - 1984 г., г. Львов, Вільна Україна, с.73.
7. Гордиенко Н.А. Защитное действие глицерина при замораживании эмбрионов млекопитающих для их микрохирургического разделения и трансплантации // автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, - 1991 г., Харьков.
8. Безуглый М.Д., Медведовський О.В. Напівавтоматичний метод вивчення осмотичної реакції зародків та яйцеклітин ссавців //Тези доповіді I Республ. конференції "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку", 1990 р., Львів, с.6.

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЕМТ6/Ro МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ

Г.И.Соляник

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им.Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев-022, Васильковская, 45*

Статья поступила 5 января 1999 г.

Пролиферативная гетерогенность ЕМТ6/Ro сфероидов исследовалась с помощью математической модели с позиций влияния уровня глюкозы в среде инкубации на количество делящихся и покоящихся клеток в сфероиде, их пространственное распределение, а также формирование некротической области. Показано, что увеличение уровня глюкозы в среде инкубации обуславливает увеличение количества клеток, находящихся в состоянии покоя. Снижение количества гипоксических клеток достигается только при уменьшении уровня глюкозы.

Ключевые слова: математическая модель, многоклеточные опухолевые сфероиды, гетерогенность клеточного состава.

Считается, что для многих опухолей резистентность гипоксических клеток к действию противоопухолевых агентов является одним из важнейших факторов, лимитирующих эффективность противоопухолевой терапии [1,2]. Долгое время появление гипоксических клеток связывали с областями низкого уровня кислорода. При этом предполагалось, что области гипоксии не только граничат с некротическими зонами, но и обуславливают их возникновение. В настоящий момент ясно, что возникновение областей некроза не всегда обусловлено одной гипоксией. Так многочисленные экспериментальные исследования убедительно показали, что наряду с нехваткой кислорода значительную роль в формировании некрозов играют и другие факторы [3], существенное место среди которых занимает глюкоза.

Важным результатом этих исследований явилась идея о возможности влиять на фракцию гипоксических клеток опухоли (и, следовательно, на кинетику роста опухоли) путем изменения уровня глюкозы во внеклеточной среде.

Для проведения подобных исследований в настоящее время широко используются многоклеточные опухолевые сфероиды (МОС-трехмерные агрегаты опухолевых клеток), представляющие собой одну из наилучших экспериментальных (in vitro) моделей солидных опухолей на протяжении уже более двух десятилетий [4]. Одной из основных причин сходства между ростом МОС и небольшими опухолевыми образованиями является уменьшение в процессе роста доли пролиферирующих клеток и увеличение доли покоящихся [5,6] (заметим, что в данной работе термин "покоящиеся клетки" используется как синоним "гипоксических клеток" в виду рассмотрения только пролиферативных клеточных характеристик; совершенно очевидна возможная несостоятельность подобной унификации в других исследованиях). Экспериментальные исследования кинетики роста МОС в средах, содержащих различные уровни кислорода и глюкозы показали, что градиенты концентраций этих субстратов обуславливают неоднородное в пространстве сфероида распределение клеток, отличающихся пролиферативной активностью. В силу того, что экспериментальные исследования пролиферативной гетерогенности клеточного состава МОС, непрерывно изменяющейся в пространстве и во времени, связаны с известными трудностями и ограничениями, для анализа экспериментальных данных, получаемых с использованием трехмерных клеточных агрегатов, и для расширения возможностей этих исследований в последнее время широко используются математические модели кинетики роста МОС (7).

Целью настоящей работы явилось исследование влияния уровня глюкозы на пролиферативную гетерогенность клеточного состава ЕМТ6/Ro сфероида (трехмерный агрегат клеток саркомы молочной железы мышей). Отметим, что такой выбор типа сфероида обусловлен большим количеством экспериментальных и теоретических исследований (имеющихся в литературе) кинетики роста этих клеток как в монослое, так и в виде многоклеточных сфероидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с помощью математической модели кинетики роста многоклеточных опухолевых сфероидов, предложенной в работе [8]. В рамках модели клеточная гетерогенность

обусловлена взаимосвязанным влиянием кислорода и глюкозы на скорость перехода опухолевых клеток из пролиферации в покой и на образование некротической зоны, что позволяет определять пространственное распределение различных субпопуляций опухолевых клеток. Проведенный в работе [8] анализ кинетики роста EMT6/Ro показал адекватность и состоятельность предложенной модели для исследования влияния уровня глюкозы в среде инкубации на пролиферативную гетерогенность клеточного состава сфероидов.

Модель представляет собой систему дифференциальных уравнений, описывающих динамику изменения плотностей делящихся (X) и покоящихся (Y) клеток в единице объема МОС:

$$\begin{aligned} dX/dt &= bX(t) - F_p X(t) + F_q Y(t) \\ dY/dt &= F_p X(t) - F_q Y(t) - F_d Y(t) \end{aligned} \quad (1)$$

со стационарными диффузионными уравнениями для концентрации кислорода (C_o) и глюкозы (C_g)

$$D_i (d^2 C_i / dr^2 + (2/r) dC_i / dr) = -P_i; \quad i = o, g \quad (2)$$

Параметр b в системе (1) является средней скоростью деления клеток, а скорость перехода клеток из пролиферации в покой (F_p) и скорость гибели клеток (F_d) определяются:

$$\begin{aligned} F_p &= p \exp(k_p (C_o^6 C_g^2)^{1/n}) \\ F_d &= d \exp(-C_g / k_d) \end{aligned}$$

В системе (2) D_i - эффективный коэффициент диффузии кислорода ($i=o$) и глюкозы ($i=g$), а P_i характеризуют скорость потребления кислорода и глюкозы (соответственно) опухолевыми клетками (находящимися в единичном объеме сфероида) и определяются из:

$$\begin{aligned} P_o &= q_o C_o (1 + v_o / (C_g + w_o)) (C_o / (C_o + m_o)) X(t) \\ P_g &= q_g C_g (1 + v_g / (C_o + w_g)) (C_g / (C_g + m_g)) (X(t) + g Y(t)) \end{aligned}$$

Для определения количества делящихся, покоящихся и мертвых клеток, а также концентрации кислорода и глюкозы как функций радиуса сфероида и времени проводилось интегрирование системы (1) и (2) со следующими граничными условиями:

$$\begin{aligned} dC_i / dr &= 0 & \text{при } r &= 0 \\ C_g &= G_{ext}; C_o = O_{ext} & \text{при } r &= r_{max} = R \end{aligned}$$

При исследовании параметров модели для EMT6/Ro сфероида были взяты из работы [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы использовали математическую модель для анализа пролиферативной гетерогенности клеточного состава EMT6/Ro сфероидов при их росте в среде, содержащей различные концентрации глюкозы: 16.5 mM, 5.5 mM, 1.7 mM и 0.8 mM (при концентрации кислорода равной 0.28 mM).



Рис.1. Радиус некротической области как функция диаметра EMT6/Ro сфероида при различных уровнях глюкозы в среде инкубации: 16.5 mM (1), 5.5 mM (2), 1.7 mM (3), 0.8 mM (4).

Известно, что одной из характеристик пролиферативной гетерогенности клеточного состава сфероидов, наиболее легко исследуемой в эксперименте, является радиус некротической зоны, определяемый (визуально) в гистологических срезах МОС. Сопоставление радиуса некротической зоны сфероидов при его росте в среде с 5.5 mM глюкозы с его теоретическими оценками, полученными с помощью модели, показало, что в экспериментальных исследованиях к некротической зоне относят области сpherоида содержащие более 90% мертвых клеток. Эти оценки позволили предсказать влияние уровня глюкозы на радиус некротической области в МОС. На рис. 1 представлена динамика изменения радиуса некроза в процессе роста EMT6/Ro сфероидов в средах с различным уровнем глюкозы. Радиус сpherоида, при котором возникает некротическая область, существенным образом зависит от уровня глюкозы в среде и тем больше, чем выше этот уровень. Зависимость скорости роста радиуса некротической зоны от внеклеточной концентрации глюкозы наблюдается только в начальной фазе формирования некротической области: снижение уровня глюкозы обуславливает более высокую скорость роста этой зоны. В дальнейшем наблюдается стабилизация процесса формирования некротической области, которая проявляется, во-первых, в постоянстве скорости роста радиуса этой области (линейная зависимость радиуса некротической зоны от радиуса сpherоида) и, во-вторых, в независимости скорости роста радиуса некроза от уровня глюкозы в среде.

Еще одной характеристикой пролиферативной гетерогенности клеточного состава сpherоидов является ширина слоя живых клеток (СЖК), которая в рамках экспериментальных исследований определяется как разница между радиусом сpherоида и радиусом его некротической зоны. На рис.2 представлена динамика изменения ширины СЖК в процессе роста EMT6/Ro сpherоидов в средах с различным уровнем глюкозы. Изменение ширины СЖК в процессе роста сpherоида значительно зависит от уровня глюкозы в среде и носит немонотонный характер. В начале роста сpherоида ширина СЖК (равная радиусу сpherоида) растет и достигает максимального значения в момент возникновения некроза. Развитие некротической области сопровождается фазой быстрого, но незначительного уменьшения ширины СЖК с последующей стабилизацией ширины этого слоя.

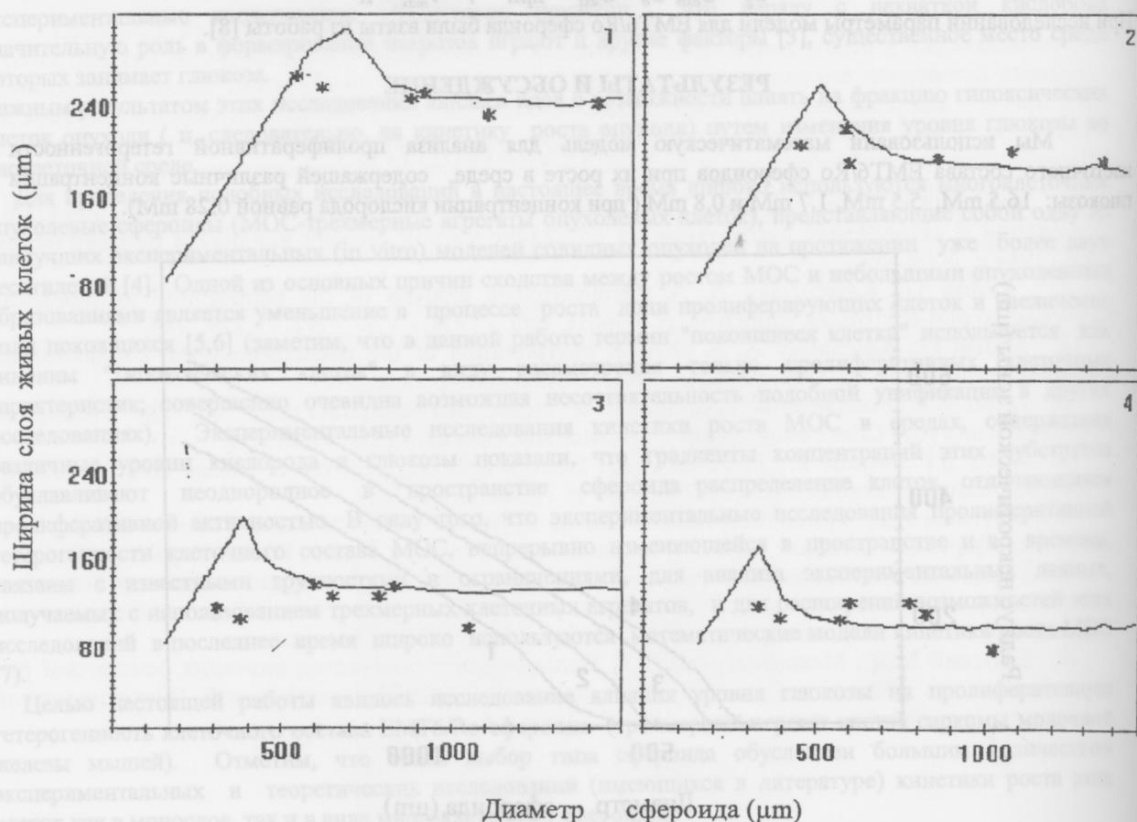


Рис.2. Ширина слоя живых клеток как функция диаметра сpherоида. Сплошные линии - предсказания модели, точками обозначены данные экспериментальных исследований Freyer & Sutherland. (1),(2),(3),(4) - как на рис. 1.

Влияние глюкозы на пролиферативную гетерогенность EMT6/Ro...

Хочется обратить внимание на очень хорошее совпадение предсказаний модели динамики изменения ширины СЖК (сплошные кривые) EMT6/Ro сфероидов при инкубации их в среде с различным уровнем глюкозы с данными соответствующих экспериментальных исследований, полученными Freyer, Sutherland [9].

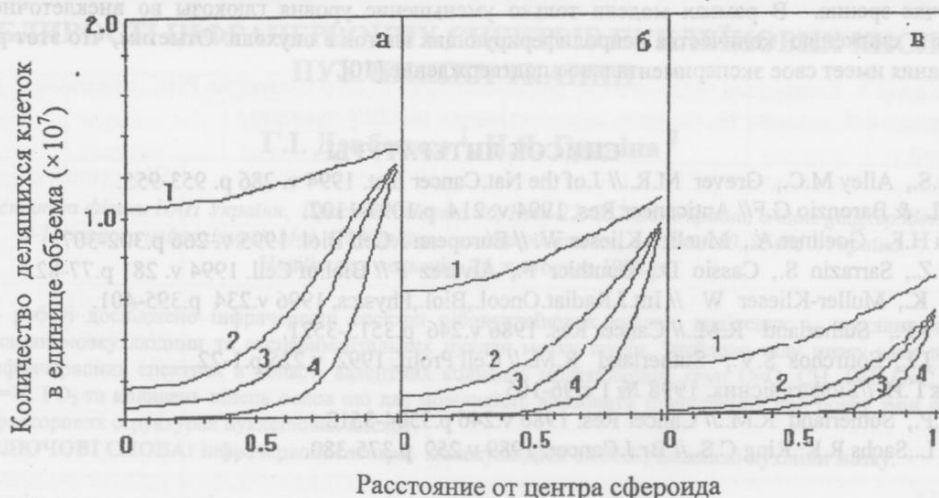


Рис.3. Радиальное распределение плотностей делящихся клеток в EMT6/Ro сфероиде с диаметром 300μm (1), 600μm (2), 800μm (3), 1500μm (4) при уровне глюкозы в среде 16.5 mM (а), 5.5 mM (б), 0.8 mM (в).

Наиболее важной характеристикой пролиферативной гетерогенности клеточного состава МОС без сомнения является количество делящихся и покоящихся клеток, а также их пространственное распределение в сфероиде (отметим, что прямые экспериментальные исследования этих характеристик ограничены, а в некоторых случаях, и невозможны). На рис.3 представлено пространственное распределение плотностей делящихся клеток в EMT6/Ro сфероидах с различными диаметрами, полученные с помощью математической модели. По мере роста сфероида наблюдается увеличение пролиферативного градиента, что проявляется в более резком (монотонном) снижении количества делящихся клеток во внутренних областях МОС. Такая зависимость сохраняется для всех уровней глюкозы в среде инкубации наряду с наблюдающейся тенденцией уменьшения суммарного пула

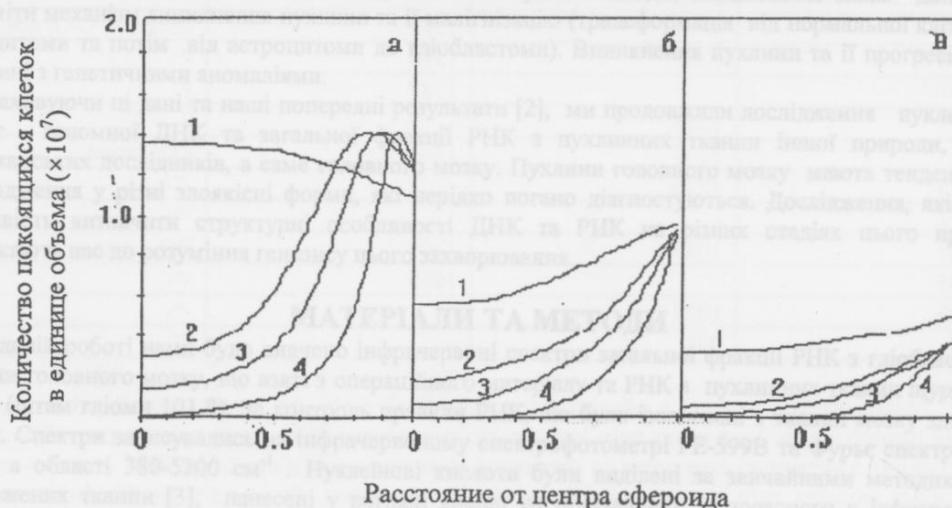


Рис.4. Радиальное распределение плотностей покоящихся клеток в EMT6/Ro сфероиде с диаметром 300μm (1), 600μm (2), 800μm (3), 1500μm (4) при уровне глюкозы в среде 16.5 mM (а), 5.5 mM (б), 0.8 mM (в).

пролиферирующих клеток при снижении уровня глюкозы. Увеличение концентрации глюкозы в среде инкубации обуславливает значительное увеличение пула покоящихся клеток (Рис.4). Этот результат исследования представляется важным, так как долгое время существовала точка зрения о возможности

уменьшать количество покоящихся (и, как правило, резистентных к действию многих противоопухолевых агентов) клеток путем увеличения уровня глюкозы в опухоли (в медицинской практике метод создания высоких концентраций глюкозы в организме перед проведением противоопухолевой терапии называется гипергликемией). Полученные нами данные противоречат такой точке зрения. В рамках модели только уменьшение уровня глюкозы во внеклеточной среде приводит к снижению количества непродлиферирующих клеток в опухоли. Отметим, что этот результат исследования имеет свое экспериментальное подтверждение [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steeg P.S., Alley M.C., Grever M.R. // J. of the Nat. Cancer Inst. 1994 v. 286 p. 953-955.
2. Freitas I. & Baronzio G.F. // Anticancer Res. 1994 v. 214 p.1097-1102.
3. Teutsch H.F., Goellner A., Mueller-Klieser W. // European J. Cell Biol. 1995 v. 266 p.302-307.
4. Tong J.Z., Sarrazin S., Cassio D., Gauthier F., Alvarez F // Biol. of Cell. 1994 v. 281 p.77-82.
5. Groebe K., Muller-Klieser W // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Physics. 1996 v.234 p.395-401.
6. Freyer J.P., Sutherland R.M. // Cancer Res. 1986 v.246 p.3513-3521.
7. Casciari J.J., Sotirchos S.V., Sutherland R.M. // Cell Prolif. 1992 v.225 p.1-22.
8. Соляник Г.И. // Биофиз. вестник. 1998 № 1 с.96-105.
9. Freyer J.P., Sutherland R.M. // Cancer Res. 1986 v.246 p.3504-3512.
10. Hlatky L., Sachs R.K., Ring C.S. // Br. J. Cancer. 1989 v.259 p.375-380.

Наиболее важной характеристикой пролиферативной способности клеток является количество покоящихся клеток в опухоли (или в сфероиде). Это количество можно определить с помощью математической модели, которая описывает динамику роста клеток в сфероидах. В данной работе мы исследовали влияние концентрации глюкозы в среде на количество покоящихся клеток в сфероидах. Для этого были проведены эксперименты, в которых концентрация глюкозы в среде была изменена в несколько раз. Результаты экспериментов показали, что увеличение концентрации глюкозы в среде приводит к увеличению количества покоящихся клеток в сфероидах. Это означает, что клетки в сфероидах чувствительны к уровню глюкозы в среде. Таким образом, можно сделать вывод, что уровень глюкозы в среде является важным фактором, влияющим на пролиферацию клеток в сфероидах.

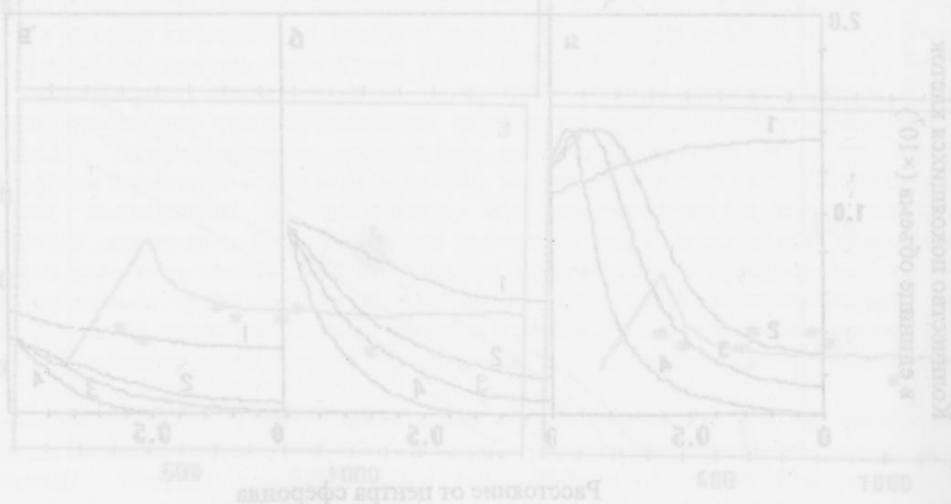


Рис. 4. Зависимость количества покоящихся клеток от расстояния от центра сфероида для различных концентраций глюкозы в среде. 1.5 mM (—), 3.0 mM (---), 4.5 mM (·····). Этот результат исследования имеет свое экспериментальное подтверждение [10].

УДК 577.3

ОСОБЛИВОСТІ ІНФРАЧЕРВОНИХ СПЕКТРІВ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ З ПУХЛИННИХ ТКАНИН

Г.І. Довбешко¹, Н.Я. Гридіна²

¹-Інститут фізики НАН України, Проспект Науки, 46, Київ-22, 252022, Україна, e-mail:gd@iop.kiev.ua

²-Інститут нейрохірургії Мед.АН України, вул.Мануїльського, 32, Київ-50, 254050, Україна.

Надійшла у редакцію 26 листопада 1998 р.

В роботі досліджено інфрачервоні спектри рибонуклеїнових кислот, виділених з пухлинних тканин мозку людини та експериментальних пухлин мозку шурів. Знайдено цілу низку змін в інфрачервоних спектрах в області валентних коливань молекулярних груп C=O, CH, OH, C=C, C=N, PO₂ та коливань кілець основ що дає можливість висловити припущення про появу змін в просторових структурах нуклеїнових кислот.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інфрачервоні спектри, молекули ДНК та РНК, злоякісні пухлини мозку.

Останнім часом оптичні та спектроскопічні методи набувають широкого використання поряд з традиційними генетичними методиками при діагностиці та прогнозуванні онкологічних захворювань. Ця проблема має особливу актуальність в умовах України, де кількість пухлинних захворювань значно підвищилась після Чорнобильської аварії. Тому розробка фізичних експрес-методів для визначення злоякісності тканин представляє безсумнівний науковий та практичний інтерес. Недавно американськими вченими було показано, що ДНК, ізольована з пухлинних тканин молочної залози значно відрізняється за своїми коливальними спектрами від ДНК з нормальної тканини [1]. Пізніше Маллінс із співробітниками розробили діагностичні критерії для спектроскопічного аналізу злоякісності тканини, а також запропонували методику для попередньої оцінки ймовірності переродження тканин, виходячи із структурних особливостей ДНК.

Властивістю багатьох пухлин є трансформація у більш анапластичні форми. Гліому, пухлину мозку, можна характеризувати різним ступенем злоякісності (анаплазії). Основні ступені злоякісності відрізняються за своїми характеристиками і називаються астроцитомою, анапластична астроцитомою та гліобластою. Аналіз гліобластою та астроцитомою на різних стадіях злоякісності може допомогти зрозуміти механізм виникнення пухлини та її малігнізацію (трансформація від нормальної клітини до астроцитомою та потім від астроцитомою до гліобластою). Виникнення пухлини та її прогресія тісно пов'язані з генетичними аномаліями.

Враховуючи ці дані та наші попередні результати [2], ми продовжили дослідження нуклеїнових кислот - геномної ДНК та загальної фракції РНК з пухлинних тканин іншої природи, ніж у американських дослідників, а саме головного мозку. Пухлини головного мозку мають тенденцію до переродження у різні злоякісні форми, які нерідко погано діагностуються. Дослідження, які дають можливість визначити структурні особливості ДНК та РНК на різних стадіях цього процесу, наближають нас до розуміння генезису цього захворювання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У даній роботі нами було вивчено інфрачервоні спектри загальної фракції РНК з гліобластою - пухлини головного мозку, що взяті з операційного матеріалу та РНК з пухлинних тканин шурів лінії Вістар (штам гліоми 101.8). За контроль правили РНК, що були ізольовані з тканин мозку здорових тварин. Спектри записувались на інфрачервоному спектрофотометрі PE-599B та Фур'є спектрометрі IFS-48 в області 380-5300 см⁻¹. Нуклеїнові кислоти були виділені за звичайними методиками із заморожених тканин [3], нанесені у вигляді краплі на підкладки із прозорого в інфрачервоній області спектру матеріалу- CaF₂ або Si та висушено. Спектри записувались зразу після приготування зразків.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У пухлинних зразках з РНК було знайдено цілий ряд змін у смугах, що відсутні в контрольних зразках (Табл.1.). Наші результати показують, що в нуклеїнових кислотах, виділених з тканин, що знаходились біля пухлинних тканин і залишились після операції, теж є структурні зміни на зразок

тих, що притаманні пухлині (Табл.1.). Найбільші зміни було зареєстровано у нуклеїнових кислотах з пухлин в області СН валентних коливань ($2800-3000\text{ см}^{-1}$) (Табл. 2.), $\text{C}=\text{O}$ коливань ($1500-1700\text{ см}^{-1}$) та коливань фосфатних груп ($1000-1300\text{ см}^{-1}$) (Табл.1.) порівняно з контролем. Зміни в групі -фосфат 2 зумовлено, напевно, конформаційними змінами, що пов'язані із зміною положення фосфатних груп в ланцюжку РНК, а зміни в області $\text{C}=\text{O}$ коливань- руйнуванням старих водневих зв'язків та утворенням нових водневих зв'язків з їхньою участю.

Таблиця 1. Коливальні частоти в см^{-1} , отримані з ІЧ та Фур'є спектрів РНК, ізолюваних з пухлинної, нормальної тканини та тканини, що знаходилась поблизу пухлини.

РНК з нормальної клітини	РНК з пухлинної клітини	РНК з тканини поблизу пухлини	Віднесення смуг
3410	3416	3420	валентні ОН
3235	3243	-	валентні NH
3163	3182	3163	-"
2965	-	-	валентні СН
2904	2925	2928	-"
	2860	2850	-"
2058	2053	2053	-"
1997	2040	-"	обертони
-	-	1736	$\text{C}=\text{O}$ протонована
1700	-	-	валентні $\text{C}=\text{O}$
1646	1650	1650	валентні $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$
1597	-	1592	кільця основ
1571	1567	-	-"
1527	1524	1537	валентні $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$
1495	1490	1483	-"
1460	1461	-	-"
1443	1448	1442	$\text{C}-\text{O}-\text{H}$
1412	1411	1411	валентні $\text{C}-\text{N}$, деф. $\text{N}-\text{H}$, деф. $\text{C}-\text{H}$
-	1402	-	-"
1390	-	1380	валентні $\text{C}-\text{O}$, деф. $\text{C}-\text{H}$
1360	1367	1376	-"
-		1287	?
-	1265	-	?
-	1247	1241	PO_2 .asym.
1225	1226	-	-"
1212	-	-	-"
1087	1097	1104	PO_2 .sym.
1064	-	1063	-"
1029	1022	-	-"
997	993	-	-"

Модифікація коливань в області груп CH , $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ та кільця основ може свідчити про модифікацію основ. Така низка змін означає, що в структурі РНК може змінюватись абсолютно все - починаючи з первинної структури до третинної. Невеликі зміни в структурі РНК можуть призводити до більш вагомих змін у вторинній та третинній структурах. Якщо клітинні біохімічні репаративні процеси не в змозі відновити ці численні зміни, то ці зміни закріплюються. Саме тому можна очікувати більшої кількості конформаційних станів у пухлинних ДНК та РНК порівняно з контролем.

Авторами роботи [4] повідомляється про структурні переходи нативної ДНК у численні невпорядковані Д-форми при малігнізації клітини. На нашу думку, стабільність цих станів визначається мікрооточенням, де керуючими параметрами згідно з [5] можуть бути температура та

Особливості інфрачервоних спектрів нуклеїнових кислот...

концентрація іонів. Формалізм потенціальних поверхонь конформаційних станів може бути корисним для моделювання поведінки РНК та ДНК у подібних системах [6].

Таблиця 2. Відношення інтегральної інтенсивності СН-валентних коливань поблизу 2850 см^{-1} до інтегральної інтенсивності смуги з максимумом на 3400 см^{-1} для молекул загальної фракції РНК, виділених з пухлинної тканини мозку.

Характеристика зразка	РНК з нормальної тканини 1 зразок	РНК з нормальної тканини 2 зразок	РНК з пухлини 1 зразок	РНК з пухлини 2 зразок	РНК з пухлини 3 зразок	РНК тканина поблизу пухлини 1 зразок	РНК тканина поблизу пухлини 2 зразок
I_{2850}/I_{3400}	0,02	0,014	0,06	0,25	0,133	0,14	0,54

Нами також визначено ряд смуг, що може бути використано як маркери злоякісності пухлини. Але питання діагностики злоякісності пухлин потребує окремого розгляду. По-перше, необхідно набрати достатню вибірку даних-спектрів, а потім проаналізувати їх за допомогою математичних методів, наприклад, використовуючи алгоритм нейронних сіток, а потім вже виробити критерії визначення ступеня пошкодженості структури нуклеїнових кислот.

ВИСНОВКИ

У нуклеїнових кислотах, що були відокремлені з пухлинних тканин мозку знайдено цілу низку змін у інфрачервоних спектрах, що свідчать про численні структурні перетворення цих молекул, ці зміни можуть знаходитися і в нуклеїнових кислотах, виділених з тканин, що знаходились біля пухлини.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Mallins, D.C., Polissar, N.L., Nishikida, K. etc. // Cancer. 1995.V.75. P.503-517.
2. Dovbeshko G., Gridina N.//in Spectr. of Biological Molecules: Modern Trends/ Ed. P.Carmona, R.Navarro, Hernanz, Kluwer Ac. Publ., Dordrecht-Boston-London, 1997. P.451-452.
3. Chomczynski, P., Sacchi, N.// Annal.Biochem. 1987. V.162. P.156-159.
4. Mallins, D.C., Polissar, N.L., Gunselman S.J.// Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 1997.V.94.P.3511-3517.
5. Phillippe Brion and Eric Westhof// Annu Rev.Biophys.Biomol.Struct. 1997.V.26.P.113-137.
6. Вирник К. М., Толсторуков М.Е.// В Вестнике проблем биологии и медицины. Харьков, 1998. №2. С.5-16.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

УДК 577.34

ВЛИЯНИЕ γ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ГИДРАТАЦИЮ
ПОЛИРИБОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

О.В. Дубовицкая, В.А. Кашпур, В.Я. Малеев

Институт радиопизики и электроники НАН Украины,

310085, г. Харьков, ул. Академика Проскуры, 12

Поступила в редакцию 17 июня 1999 г.

Изучено воздействие γ -радиации на диэлектрические свойства и степень гидратации полирибоадениловой кислоты (поли(А)). Методом дифференциальной диэлектрометрии в миллиметровом диапазоне длин волн получены данные о комплексной диэлектрической проницаемости водных растворов поли(А) в одно- и двухцепочечной конформации при различных дозах γ -облучения. Обнаружено, что в случае односпирального полинуклеотида доза 1650 Гр вызывает снижение степени гидратации (h) на 2-3 (20-30%) молекулы связанной воды на нуклеотид. Облучение двухспирального полинуклеотида в дозе 670 Гр приводит к увеличению значения h на 4 (~50%) с последующим уменьшением на 1-2 при дозе 1650 Гр. Показано, что наблюдаемые эффекты можно объяснить разрывами полинуклеотидных цепей, образованием продуктов модификации аденина и возникновением внутрицепочечных сшивок.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полирибоадениловая кислота, КВЧ-диэлектрометрия, гидратация, γ -облучение.

В настоящее время получено много сведений о различного рода изменениях, происходящих в структуре ДНК и синтетических полинуклеотидов под воздействием γ -радиации. В частности, в этих соединениях обнаружены одноцепочечные разрывы [1] и такие стабильные продукты модификации аденина, как 7,8-дигидро-8-оксааденин, 4,6-диамино-5-формаимидопиримидин, 8,5'-цикло-2'-дезоксаденозин, 8,5'-цикло-2'-дезоксаденозин-5'-монофосфат [2]. Отмечается также, что не менее важным структурным повреждением является модификация сахарного фрагмента полинуклеотидной цепи [3]. Однако влияние γ -облучения на характер изменений в гидратной оболочке нуклеиновых кислот почти не изучено, хотя известно, что связанная вода играет решающую роль в стабилизации структуры как ДНК [4], так и синтетических полинуклеотидов [5,6]. Данная работа посвящена изучению влияния γ -облучения на характеристики взаимодействия поли(А) в одно- и двухцепочечном состоянии с водным растворителем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась калиевая соль полирибоадениловой кислоты ("Serva", Германия) с константой седиментации $S_{20,w} \min = 10$. Изучали водные растворы односпирального поли(А) (концентрация 0,94%; pH 6,28) и двухспирального полинуклеотида поли(А)·поли(А) (концентрация 0,75%; 0,1М KCl; pH 4,04). Для создания двойной спирали использовали ацетатный буфер, состоявший из 82 мл 0,1н уксусной кислоты и 18 мл 0,1н ацетата натрия. Величину pH контролировали с помощью иономера И-115 с использованием ячейки для микроизмерений.

Для подтверждения наличия конформационного перехода поли(А) из одноцепочечного состояния в двухцепочечное были проведены измерения УФ-поглощения в области 240-275 нм. Из полученных нами спектров (рис.1,А) видно, что максимум поглощения поли(А) соответствует длине волны 256,6 нм, а $\lambda_{\max}$ поли(А)·поли(А) равна 251,2 нм, что согласуется с данными работы [7].

При уменьшении кислотности также было отмечено существенное увеличение вязкости раствора.

Облучение проводили на установке "Исследователь" γ -квантами ^{60}Co при мощности дозы 4 Гр/мин. Растворы одноцепочечной спирали поли(А) облучали в дозах 370 и 1650 Гр, а растворы двухспирального полинуклеотида - в дозах 670 и 1650 Гр.

Количество связанной полимером воды находили по комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon''$ в миллиметровом диапазоне длин волн (7,6 мм) и по электропроводности на частоте 10 кГц [8]. Изменения ϵ' и ϵ'' характеризуют изменение количества воды, прочно связанной с полинуклеотидом и не поглощающей в этом диапазоне в отличие от свободной воды. КВЧ-измерения проводили с помощью дифференциального диэлектрометрического метода, используя в качестве эталона необлученные растворы полинуклеотида. Электропроводность растворов измеряли мостом переменного тока Р568 в ячейке с платиновыми электродами.

Влияние γ -облучения на гидратацию полирибоадениловой кислоты

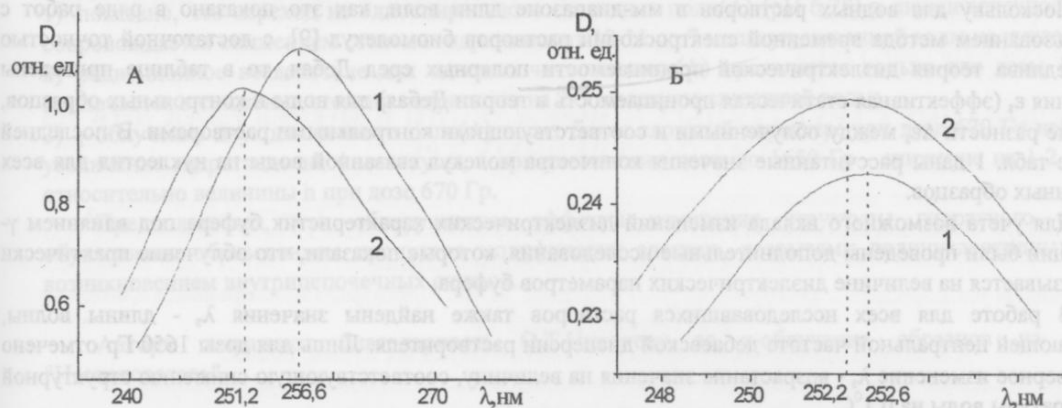


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения. А - поли(А)-1, поли(А)-поли(А)-2; Б - влияние γ -облучения на поли(А)-поли(А): 1- доза 670 Гр, 2- доза 1650 Гр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты приведены в таблице 1. Непосредственно измеряемыми параметрами являются разности коэффициентов поглощения $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$ облученных и соответствующих контрольных растворов одно- и двухспиральных полинуклеотидов. Величины $\Delta\epsilon'$ и $\Delta\epsilon''$ являются разностями компонент комплексных диэлектрических проницаемостей тех же растворов. Величины ϵ' и $\Delta\epsilon'$ даны с учетом электропроводности соответствующего раствора. Следует указать, что увеличение электропроводности для всех облученных образцов менее $10^{-5} \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$ дает вклад в $\Delta\epsilon''$, не превышающий погрешности определения этой величины.

Таблица 1. Влияние γ -облучения на характеристики растворов полирибоадениловой кислоты.

изучаемые параметры, $t=20^\circ\text{C}$	вода	раствор поли(А), концентрация 0,94%			раствор поли(А)-поли(А), концентрация 0,75%, ацетатный буфер+0,1М КСl		
доза γ -облучения, Гр		контроль	370	1650	контроль	670	1650
pH		6,28	6,28	6,23	4,04	4,47	4,46
λ_{max} , нм		256,6			251,2	252,6	252,2
α , Нп/мм	2,82	2,80			2,88		
$\Delta\alpha \times 10^4 (\pm 6 \times 10^{-4})$, Нп/мм			6	27		-27	-27
β , радиан/мм	4,93	4,91			5,21		
$\Delta\beta \times 10^4 (\pm 4 \times 10^{-4})$, радиан/мм			27	22		-21	-114
ϵ'	16,5	16,4			18,9		
$\Delta\epsilon' (\pm 0,01)$			0,02	0,12		-0,01	-0,10
ϵ''	27,8	27,5			30,0		
$\Delta\epsilon'' (\pm 0,01)$			0,02	0,30		-0,04	-0,10
ϵ_s	79,9	78,8			77,8		
$\Delta\epsilon_s (\pm 0,04)$			0,01	0,14		-0,18	-0,11
$h(\pm 1)$		10-11	10-11	8	7	11	9-10

Поскольку для водных растворов в мм-диапазоне длин волн, как это показано в ряде работ с использованием метода временной спектроскопии растворов биомолекул [9], с достаточной точностью справедлива теория диэлектрической проницаемости полярных сред Дебая, то в таблице приведены значения ϵ_s (эффективная статическая проницаемость в теории Дебая) для воды и контрольных образцов, а также разности $\Delta\epsilon_s$ между облученными и соответствующими контрольными растворами. В последней строке табл. 1 даны рассчитанные значения количества молекул связанной воды на нуклеотид для всех изученных образцов.

Для учета возможного вклада изменений диэлектрических характеристик буфера под влиянием γ -радиации были проведены дополнительные исследования, которые показали, что облучение практически не сказывается на величине диэлектрических параметров буфера.

В работе для всех исследовавшихся растворов также найдены значения λ_s - длины волны, отвечающей центральной частоте дебаевской дисперсии растворителя. Лишь для дозы 1650 Гр отмечено достоверное изменение λ_s - возрастание значения на величину, соответствующую снижению структурной температуры воды на $0,1^\circ\text{C}$.

Согласно табл. 1 степень гидратации необлученного односпирального поли(А) составляет 10-11 молекул воды на нуклеотид, что хорошо соответствует данным ИК-спектроскопии - $10-12(\pm 1)$ молекул связанной воды на звено [5]. Ранее было показано [10], что гидратация аденозинмонофосфата (АМФ) составляет 10-11 молекул воды, из которых 4-5 приходится на аденин, 1-2 связаны с рибозой и 4 - с фосфатной группой [11]. Поэтому можно считать, что гидратация АМФ и поли(А) носит одинаковый характер и осуществляется на одних и тех же центрах, которыми являются атомы N1, N3, N7, N9 и NH_2 аденина, а также атомы кислорода сахарофосфатного остова [5]. Однако в отличие от ДНК дополнительного связывания молекул воды, обусловленного формированием спиральной структуры из мономеров, в данном случае не наблюдается.

При облучении в дозе 370 Гр влияние радиации на односпиральный поли(А) практически отсутствует, а при дозе 1650 Гр происходит уменьшение количества связанной с нуклеотидом воды на 2 молекулы. Можно полагать, что образование пострadiaционных продуктов модификации аденина [2] приведет к нарушению стерических условий существования водных мостиков, например $\text{N1}\dots\text{H}-\text{O}-\text{H}\dots\text{N1}$ и $\text{N3}\dots\text{H}-\text{O}-\text{H}\dots\text{N3}$, между соседними адениновыми основаниями. С другой стороны, описываемое рядом авторов образование пострadiaционных внутрицепочечных сшивок [12], тоже будет уменьшать степень гидратации.

Из табл. 1 видно, что степень гидратации двухспирального поли(А) меньше на 3-4 молекулы, чем для односпирального поли(А), и равна 7. Отметим, что это значение намного меньше степени гидратации двухспиральной ДНК ($n=19$) [8]. Малая величина гидратации комплекса поли(А)-поли(А) обусловлена особенностями его структуры. Согласно рентгеноструктурным данным, почти все гидратно-активные центры аденина участвуют в образовании межтяжевых связей. Так, аминогруппа аденина одной цепи связана водородной связью с атомом N7 аденина и атомом O6 фосфатной группы противоположной цепи, а связанный с атомом N1 протон участвует в образовании сильной солевой связи с PO_4^- [4].

Облучение поли(А)-поли(А) в дозе 670 Гр приводит к увеличению степени гидратации до $h = 11$. Этот эффект, по-видимому, обусловлен изменением пространственной структуры двухспирального полинуклеотида. Во-первых, образование в результате облучения разрывов цепей приводит к появлению достаточно коротких фрагментов, для которых затруднено существование устойчивой двухспиральной конформации [7]. Во-вторых, облучение вызывает образование продуктов модификации аденина, что искажает межтяжевые связи. В связи с этим соответствующие гидратно-активные центры становятся доступными для взаимодействия с растворителем. Появление модифицированных оснований сопровождается дополнительным захватом протонов из раствора вновь образовавшимися центрами, что выразилось в понижении pH (см. табл. 1).

Дальнейшее увеличение радиационной дозы до 1650 Гр приводит к небольшому падению гидратации - на 1-2 молекулы. Этот эффект аналогичен радиационной дегидратации в случае облучения односпирального полинуклеотида при той же дозе и обусловлен, вероятно, тем же явлением образования внутрицепочечных сшивок.

Спектры УФ-поглощения облученных образцов поли(А)-поли(А) (рис. 1, Б) коррелируют с поведением гидратации. Радиационный эффект при дозе 670 Гр проявляется в сдвиге положения λ_{max} в длинноволновую область, характерную для одноцепочечного поли(А), а при дозе 1650 Гр наблюдается дополнительное смещение в противоположную сторону.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследований обнаружены радиационные эффекты изменения степени гидратации поли(А) в зависимости от его конформационного состояния, а именно:

- 1) показано, что переход из односпирального состояния поли(А) (рН 6,28) в двухцепочечное (рН 4,04) сопровождается снижением степени гидратации от 10-11 до 7 молекул связанной воды на нуклеотид;
- 2) радиационное воздействие для одноцепочечного поли(А) проявляется только для дозы 1650 Гр и заключается в снижении степени гидратации на 2-3 молекулы связанной воды;
- 3) γ -облучение двухцепочечного поли(А) носит более сложный характер: при дозе 670 Гр наблюдается увеличение гидратации на 4 молекулы, а при увеличении дозы до 1650 Гр - снижение на 1-2 молекулы относительно величины h при дозе 670 Гр.

Предполагается, что обнаруженные эффекты изменения структуры гидратного окружения обусловлены образованием продуктов модификации аденина, разрывами полинуклеотидных цепей и возникновением внутрицепочечных сшивок.

Авторы выражают благодарность О.Т.Николову за γ -облучение образцов на установке "Исследователь".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adinarayana M., Bothe E., Schulte-Frohlinde D. // Int. J. Radiat. Biol. 1988. V.54. №5. P.723-737.
2. Скалацкая С.И. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т.35. С.205-224.
3. Шарпаты В.А. // Радиобиология. 1992. Т.32 С.180-193.
4. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М. Мир, 1987. 584 с.
5. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Starikov E.B. // Studia biophysica. 1985. V.106 P.181-192.
6. Bolbukh T.V., Starikov E.B., Semenov M.A. // Studia biophysica. 1985. V.108 P.199-207.
7. Brahms J., Michelson A.M., Holde K.E. Van // J. Mol. Biol. 1966. V.15. P.467-488.
8. Кашпур В.А., Дубовицкая О.В., Красницкая А.А., Малеев В.Я. // Радиофизика и электроника. 1997. Т.2. №2. С.153-155.
9. Miura N., Asaka N., Shinyashiki N., Mashimo S. // Biopolymers. 1994. V. 34. P.357-365.
10. Семенов М.А., Кашпур В.А., Болбух Т.В., Малеев В.Я. // Биополимеры и клетка. 1987. Т.3. С.18-22.
11. Малеев В.Я., Кашпур В.А. // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты (под ред. акад. Н.Д.Девяткова). М. ИРЭ АН СССР, 1983. С.163-171.
12. Raap I.A., Grollmann U. // Makromolekulare Chemie/ Macromolecular Chemistry and Physics. 1983. V.184. P.123-134.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООб'єкти

УДК 577.32:[577.2:539.1.04]+577.346

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В МОЛЕКУЛАХ ДНК ИЗ ГАММА-ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС

Е.Б. Круглова, Г.И. Довбешко¹, Н.А. Крутько, Е.П. Пашук¹, Н.А. Карпенко²,
М.Ю. Алесина², А.А. Красницкая

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

¹Институт физики НАН Украины, проспект Науки 46, г.Киев, 252022

²Чернобыльский научно-технический центр международных исследований, ул. Школьная 6,
г.Чернобыль, 255620

Поступила в редакцию 17 мая 1999 г.

В работе с помощью Фурье-инфракрасной-спектроскопии и методом анализа температурных зависимостей УФ-спектров изучены структурные изменения в молекулах ДНК, выделенных из эпидидимуса семенников контрольных и облученных крыс разного возраста в интервале доз (0,7-57) сГр. ИК-спектры фиксируют изменения в структуре сахарофосфатного остова и модификацию оснований ДНК, а также нарушение сетки водородных связей, что более ярко выражено в образцах ДНК из 12-месячных животных. Эти данные коррелируют с результатами исследований кривых плавления соответствующих образцов ДНК и их комплексов с биологически активными нуклеозидами (NУС) цитозином арабинозидом и 6-азациитидином. Для ДНК, выделенной из облученных крыс, наблюдаются большие величины смещения кривых плавления смесей ДНК-NУС в высокотемпературную область относительно кривых плавления соответствующих свободных образцов ДНК. Дозовая зависимость структурных изменений не наблюдается.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, малые дозы радиации, кривые плавления, спектрофотометрия, цитозин арабинозид, 6-азациитидин, Фурье-инфракрасная спектроскопия.

При действии на организм животных и человека ионизирующего излучения в малых дозах в геноме возникают некоторые неспецифические трудно идентифицируемые изменения [1-3]. В настоящее время существуют точные методы оценки степени повреждения генома, которые позволяют получать интегральную характеристику состояния молекул ДНК, включая количество одно- и двунитевых разрывов, число щелочнолабильных мест [4-6], а также информацию о существенной модификации оснований нуклеиновых кислот под действием радиации [7-9]. В данной работе, для более детального анализа повреждений, возникающих в геноме при длительном воздействии малых доз ионизирующей радиации, исследовались ИК-спектры и кривые плавления образцов ДНК в смеси с биологически активными нуклеозидами, чувствительным к конформационным изменениям в молекулах ДНК [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК выделяли из эпидидимуса семенников самцов крыс популяции Вистар, которые подвергались хроническому внутреннему радиационному воздействию в малых дозах в условиях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС. Фоновое внешнее облучение составляло 40-60 мкР/час. Животные в течение 4 и 12 месяцев получали корм и питьевую воду, загрязненную радионуклидами, характерными для Чернобыльского аварийного выброса (в основном, $\text{Cs}^{134+137}$ и Sr^{90}). Суммарные поглощенные дозы (ПД) на гонады крыс, в виде трех дозовых нагрузок в каждой возрастной группе, составили от 0.7 до 57 сГр в разные периоды эксперимента. Контролем служили животные той же популяции и возраста, которые получали чистый корм в виварии г. Киева.

Выделение ДНК (пул от 5-6 животных) проводили стандартным детергентным методом [11]. Более детальные характеристики выделяемых образцов описаны в [12]. При тестировании конформационных изменений в исследуемых образцах ДНК использовались растворы ДНК и ее смесей с цитозином арабинозидом (Ага-С) и 6-азациитидином (6АЗС) при концентрациях $C=(6-10)\times 10^{-5}$ М лиганда и $C_p=(7-10)\times 10^{-5}$ М ДНК в молях фосфатов. Концентрацию ДНК и лигандов рассчитывали используя следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{260}(\text{P})=6400 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для ДНК, $\epsilon_{270}=9000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для Ага-С и $\epsilon_{265}=10000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для 6АЗС. Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевых термостатированных кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре "Specord M40". ИК спектры для пленок образцов ДНК были получены на Фурье-спектрометре IFS-48 ("Bruker", Германия) в области $900-3800 \text{ см}^{-1}$.

Используемые в работе лиганды Ага-С и 6АЗС (NUC), были синтезированы сотрудниками Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, под руководством к.х.н. Шаламая А.И. и использовались нами без дополнительной очистки. Поскольку спектры поглощения растворов Ага-С и 6АЗС в 0,01SSC (ISSC - 0,15 М NaCl + 0,015 М цитрат Na, pH 7,2) буферном растворе в области температур 35-70 °С меняются незначительно, мы могли следить за изменениями в поглощении смесей ДНК-нуклеозид от температуры не вводя поправок на изменения в поглощении свободного лиганда.

Величины ΔT_m , равные разности T_m и T_m^0 , характеризуют изменение температуры плавления смеси ДНК-лиганд (T_m) относительно температуры плавления свободной ДНК (T_m^0), где T_m и T_m^0 выбираются как точки, соответствующие значению $\theta=0,5$, а $(1-\theta)$ - доля денатурированных пар оснований в двойной спирали ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Спектры инфракрасного поглощения рассмотренных образцов ДНК были получены в областях основных валентных колебаний сахарофосфатного остова и оснований нуклеиновых кислот. Сравнение ИК-спектров позволяет зафиксировать различия в состоянии контрольных и облученных образцов ДНК в разных возрастных группах. Так для 12-ти месячных животных (рис.1) в области полос поглощения сахарофосфатного остова и дезоксирибозы (900-1300 см^{-1}) следует, что максимумы полос C=O дезоксирибозы (1059 см^{-1} - контроль, 1057 см^{-1} и 1055 7 см^{-1} для облученных крыс), для симметричных (1094,2 см^{-1} - контроль, 1093,2 см^{-1} для 5,7 cГр и 1092.1 см^{-1} для 57 cГр) и антисимметричных колебаний PO_2^- - групп (1238,1 см^{-1} контроль, 1237,4 для 5 cГр и 1235,8 для 57 cГр) различаются и смещаются в низкочастотную область, что свидетельствует об изменениях в состоянии сахарофосфатного остова в образцах ДНК, выделенных из 12-месячных облученных животных. Следует отметить, что для 4-х месячных крыс в данной области спектра не наблюдается практически никаких различий в положении максимумов соответствующих полос между контрольными и облученными образцами ДНК.

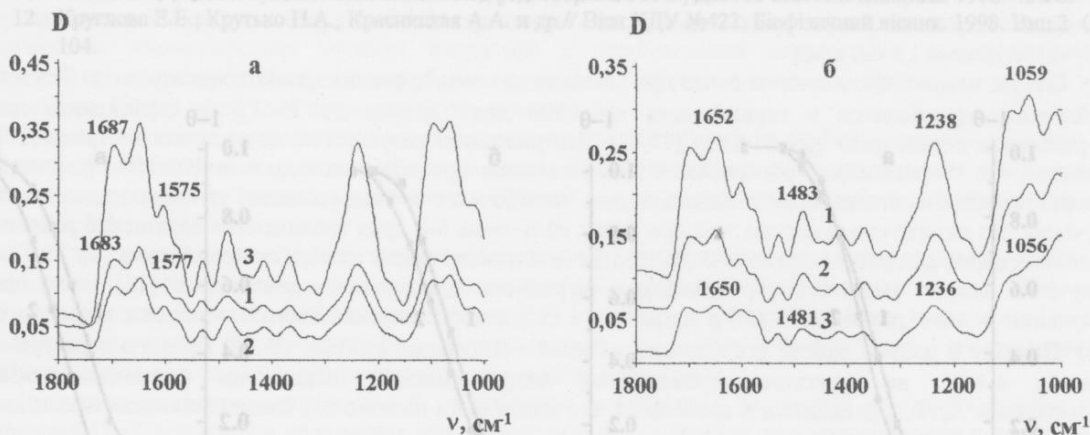


Рис.1. ИК-спектры образцов ДНК, выделенных из эпидидимуса 4-х месячных: 1- 0,7 cГр; 2-2 cГр; 3-25 cГр (а) и 12-ти месячных крыс: 1-контроль; 2-5,7 cГр; 3-57 cГр (б).

Анализ ИК-спектров в области валентных колебаний O-H, N-H и C-H групп 3800-2800 см^{-1} (данные не приведены) и в области поглощения оснований нуклеиновых кислот (1800-1300 см^{-1}) (рис.1) указывает на существенную модификацию оснований в ДНК из облученных животных и нарушение структуры водородных связей в исследованных образцах в обеих возрастных группах. Существующие различия связаны не столько со смещениями основных полос в облученных образцах ДНК по сравнению с контролем, как с изменением вклада интенсивностей разных полос в суммарное поглощение. Особенно ярко эти различия выражены в случае 12-ти месячных животных (рис.1, б). Наибольшие изменения в положении максимумов и интенсивностей полос в области поглощения оснований мы фиксируем для внутрикольцевых колебаний C=N групп аденина и гуанина (1602,5 см^{-1} , 1577 см^{-1} и 1483 см^{-1}) и C=O цитозина (1652 см^{-1}). Для 4-х месячных животных основные изменения связаны с незначительными смещениями полос и проявляются в меньшей степени. Наблюдаемые результаты могут свидетельствовать о модификации оснований и нарушении структуры водородных связей, что, в свою

очередь, может приводить к изменениям в пространственной структуре этих образцов ДНК. Следует отметить, что дозовая зависимость в этих спектральных областях не проявляется.

Наблюдаемые изменения в ИК-спектрах коррелируют с данными, полученными при анализе кривых плавления и спектров поглощения ДНК и ее смесей с биологически активными нуклеозидами в УФ-диапазоне. На рис. 2 и 3 приведены наблюдаемые изменения для исследованных образцов ДНК.

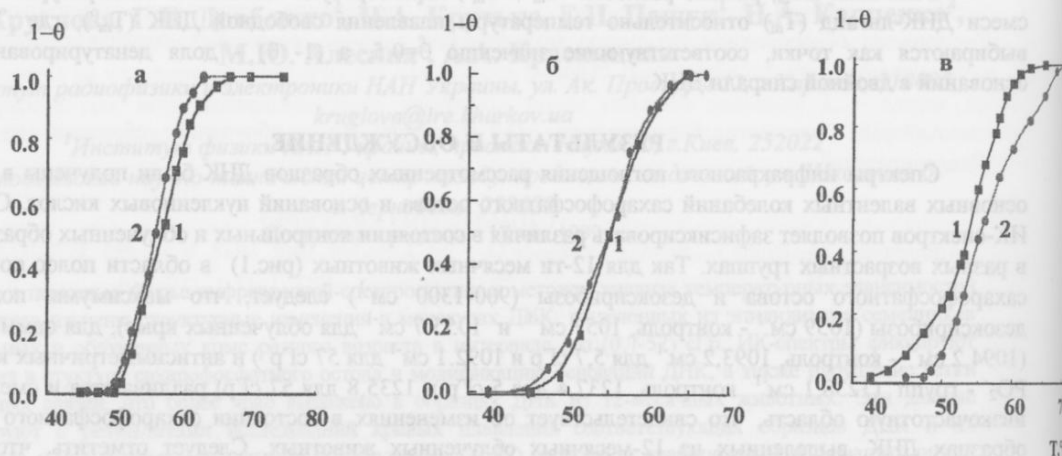


Рис.2. Кривые плавления свободной ДНК (1) и ее смеси с Ага-С (2) для образцов ДНК из контрольных крыс (а); облученных в течение 4-х месяцев с ПД = 25 сГр (б) и в течение 12-ти месяцев с ПД = 57 сГр (в).

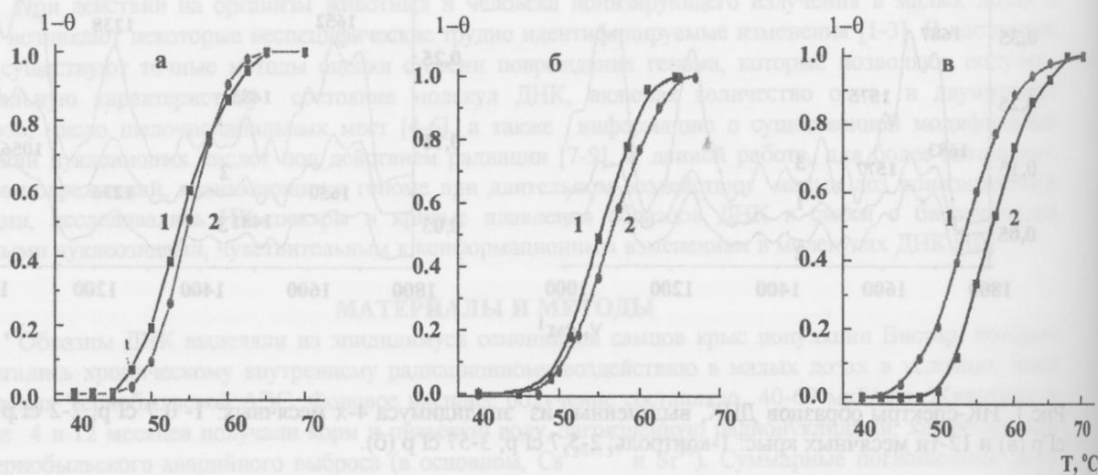


Рис.3. То же для 6AZC

Как видно из рисунков, кривые плавления и величины ΔT_m для контрольных образцов ДНК мало отличаются от кривых плавления ДНК в смеси с рассмотренными нуклеозидами. При больших дозах облучения наблюдается смещение кривых плавления смесей ДНК-нуклеозид относительно кривой плавления свободной ДНК в область более высоких температур. Такие изменения можно объяснить большей доступностью уже имеющихся (или появлением новых) мест связывания, например, в результате модификации оснований или изменения конформации молекул ДНК. В следствие этого, вероятно, увеличивается связывание лигандов [12]. Видно, что 6AZC более чувствителен к подобным изменениям в структуре молекул ДНК по сравнению с Ага-С, что выражается в больших величинах ΔT_m при одних и тех же концентраций ДНК и лиганда. Хорошо видно также, что для 4-х месячных животных даже максимальные повреждения при дозе облучения 25 сГр существенно меньше сказываются на

изменении кривых плавления, что согласуется с результатами анализа ИК-спектров. Как отмечалось выше, в ИК-спектрах образцов ДНК из 12-ти месячных крыс тенденция изменений структуры сахарофосфатного остова в зависимости от дозы облучения выражена в большей степени. Это, на наш взгляд, и является основной причиной наблюдаемых различий в кривых плавления смесей ДНК-NUC.

Таким образом можно заключить, что (1) сравнительный анализ кривых плавления свободной ДНК и ее смеси с Ага-С и 6АЗС позволяет обнаружить различия в конформационном состоянии молекул ДНК, выделенных из половых клеток крыс, подвергавшихся действию пролонгированного облучения в малых дозах; (2) изменения в кривых плавления коррелируют с изменениями в инфракрасных спектрах рассмотренных образцов и свидетельствуют о начальных изменениях в пространственной структуре молекул ДНК и перестройке сетки водородных связей; (3) разные нуклеозиды Ага-С и 6АЗС проявляют разную чувствительность к структурным изменениям в ДНК; (4) наблюдаемые изменения в структуре ДНК не коррелируют с дозой облучения, однако заметно связаны либо с возрастом животных, либо с длительностью облучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е.Б.//Вестн. РАН. 1994. Т.64. С.425-431.
2. Belyaev I.Ya., Harms-Ringdahl M.//Radiat.Res. 1996. V.145. P.687-693.
3. Шугалин А.В., Личина М.В., Жижица Г.П., Скалацкая С.И.//ДАН. 1996. Т.350. С.828-830.
4. Radivoyevitch T., Hoel D.G., Hahnfeld P.H., Rydberg B., Sachs R.K.//Radiat.Res. 1998. V.149. P.52-58.
5. Xapsos M.A., Pogozelski W.K.//Radiat. Res. 1996. 146. P.669-673.
6. Sailer K., Viaggi S., Nusse M.//Int.J.Radiat.Biol. 1996. V.69. P.601-613.
7. Ide H., Kow Y.W., Chen B.X., Erlanger B.F., Wallace S.S.//Cell Biol.Toxicol. 1997. V.13. P.405-417.
8. Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B., Chiang S.Y., Kow Y.W., Swenberg J.A.//Cancer Res. 1998. V.58. P.222-225.
9. Ninaber A., Goodfellow J.M.//J.Biomol.Struc.Dyn. 1998. V.16. P.651-661.
10. Kruglova E.B., Krasnitskaya A.A., Maleev V.Ya., Alesina M.Yu., and Karpenko N.A. 2-nd International conference: Long-term health consequences of the chernobyl disaster, Kiev. 1998. P.262-263.
11. Химия и биохимия нуклеиновых кислот/Под ред. Збарского И.Б., Дебова С.С. Л.: Медицина. 1968. 429 С.
12. Круглова Е.Б., Крутько Н.А., Красницкая А.А. и др.// Вісн.ХДУ №422. Біофізичний вісник. 1998. Вип.2. С.100-104.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БЮОБ'ЄКТИ

УДК 577.346+591.111.3

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

В.П.Берест, С.В.Гаташ, М.А.Воробейчик

Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077;

Поступила в редакцию 24 мая 1999 г.

При помощи метода светорассеяния исследована температурная зависимость (в области 4-40°C) агрегации тромбоцитов человека при действии γ -облучения *in vitro* в дозах 10-200 Гр. Получены дозовые зависимости степени и скорости АДФ-, адреналин- и тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Для каждой дозы облучения получены температурные зависимости параметров агрегации, индуцированной тремя агонистами. Показано, что максимальное увеличение степени и скорости агрегации в 1,2-1,5 раза наблюдается при облучении дозами 30-50 Гр. Оценен вклад ПОЛ мембран тромбоцитов в изменение функции клеток при γ -облучении. Сделан вывод о разной радиочувствительности различных мембранных рецепторов тромбоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, агрегация, мембранные рецепторы, гамма-облучение, температура.

В клинической практике концентрат тромбоцитов при хранении подвергается действию ионизирующего облучения для угнетения бактериального роста и минимизации посттрансфузионной иммунной реакции трансплантат – против хозяина [1,2]. Максимальная доза облучения, используемая при этом – 5000 рад [3]. Показано, что как рентгеновское [4], так и γ -облучение тромбоцитов дозами до 5000 рад и последующее их хранение в течении 1-5 суток в стандартных условиях (температура 22-24°C) заметно не изменяют морфологию тромбоцитов, характеристики сохранности клеток *in vitro*, способность к агрегации под действием АДФ, коллагена, ристоцетина [3,5-7], а также значительно не влияют на кинетику тромбоцитов *in vivo* после трансфузии [8]. Хотя в работе [9] указывается на снижение содержания фосфат-нуклеотидов и способности тромбоцитов к реакции высвобождения при γ -облучении дозами 1,5-2,0 крад.

Однако недавно было отмечено, что при увеличении срока хранения тромбоконцентрата до 7 суток, γ -облучение тромбоцитов в первый день хранения даже дозами до 75 Гр не эффективно для стерилизации концентрата тромбоцитов [10,11]. Экстраполяция результатов, полученных авторами [10], показала, что стерилизация тромбоконцентрата возможна при облучении дозами 100-150 Гр, однако функциональная полноценность и выживаемость тромбоцитов в этих условиях требуют дальнейшего изучения. Из литературы известно, что при дозах облучения 6-8 крад наблюдается нарушение реакции высвобождения, свидетельствующее о повреждении плазматической мембраны тромбоцита [9]. Гамма-облучение дозами выше 0,1 кГр ингибирует агрегацию и секрецию тромбоцитов [12], хотя при облучении *in vitro* дозами до 200 Гр сохраняется целостность плазматической мембраны тромбоцита [13]. Поэтому в данной работе исследовано влияние γ -излучения в дозах 10-200 Гр и температуры в области 4-40°C на агрегацию тромбоцитов, индуцированную основными физиологическими индукторами: АДФ, адреналином и тромбином, что может быть полезно для совершенствования методик хранения кровяных пластинок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) 27 здоровых доноров обоих полов. Агрегацию тромбоцитов вызывали индукторами АДФ ($2 \cdot 10^{-5}$ М), адреналином ($2 \cdot 10^{-5}$ М), тромбином (2 ед.НН/мл) – все препараты производства фирмы "Reanal" (Венгрия). Процесс агрегации регистрировался методом светорассеяния в интервале температур 4-40°C. Методика приготовления образцов и измерения агрегации подробно описаны ранее [14].

Образцы ОТП облучались на гамма-установке закрытого типа "Исследователь" дозами 10, 20, 30, 50, 100 и 200 Гр. Мощность излученной дозы гамма-лучей ^{60}Co в активной зоне составляла 700 Р/мин. Для каждой серии измерений использовалась кровь одного и того же донора. Во всех сериях в качестве контрольных были необлученные образцы. Все измерения проводились в интервале времени от 30 минут до 4 часов после облучения. Для исключения эффектов, связанных с зависимостью агрегационной способности тромбоцитов от времени, прошедшего после γ -облучения, все измерения температурных зависимостей были синхронизированы во времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получены зависимости степени и скорости агрегации тромбоцитов от дозы облучения. Агрегационная способность тромбоцитов значительно изменяется в зависимости от дозы облучения. При

Влияние гамма-облучения на агрегацию тромбоцитов

этом степень агрегации тромбоцитов, облученных в дозах меньше 200 Гр выше чем у необлученных, а при более высоких дозах – ниже. Плавный характер кривых свидетельствует об отсутствии резко выраженных нарушений или фазовых переходов в исследуемых объектах. Типичные кривые “доза-эффект” для степени и скорости агрегации облученных тромбоцитов представлены на рис. 1,2.

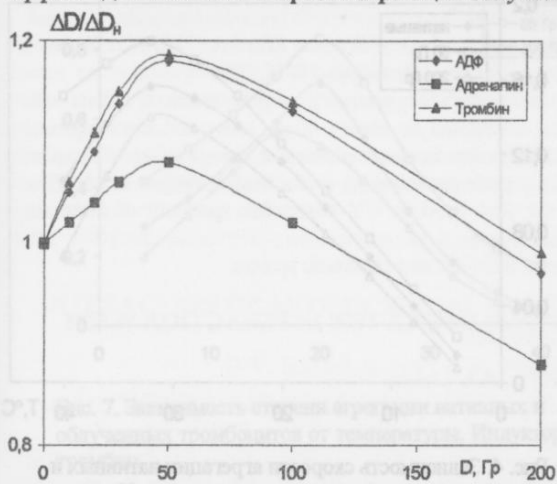


Рис. 1. Зависимость степени агрегации тромбоцитов от дозы гамма-облучения. Температура 20°C.

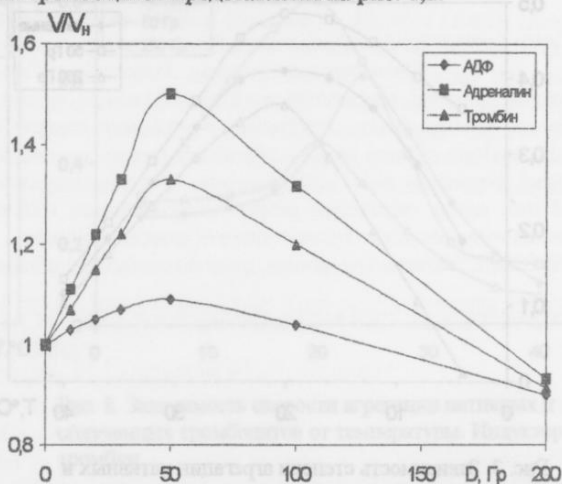


Рис. 2. Зависимость скорости агрегации тромбоцитов от дозы гамма-облучения. Температура 20°C.

Максимальная агрегация тромбоцитов наблюдается при облучении в дозах 30-50 Гр и выше чем у контроля в 1,2-1,5 раза. Тромбоциты – безядерные клетки, поэтому основной мишенью действия облучения являются мембраны клеток. Можно предположить, что в результате воздействия ионизирующего излучения в дозах до 50 Гр происходит изменения в структуре мембран тромбоцитов, облегчающие взаимодействия молекул индуктора с мембранными рецепторами и ускоряющие активацию тромбоцитов. Известно, что γ -облучение дозами 5000 рад не вызывает образования сшивок и расщепления белков мембран и цитоскелета тромбоцитов [5].

Снижение степени агрегации тромбоцитов в интервале доз облучения 50-200 Гр можно объяснить постепенной дезактивацией рецепторов тромбоцитов. При больших дозах ионизирующего облучения постепенно уменьшается степень агрегации тромбоцитов, их концентрация и количество фибриногена в плазме [12,15].

При облучении в мембранах происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). Показано, что γ -облучение тромбоцитов дозами 0,1-1 кГр приводит к повышению уровня ПОЛ и дозозависимому накоплению МДА в тромбоцитах [12]. Вовлечение липидов мембран в процессы ПОЛ вызывает изменение белок-липидных взаимодействий и может привести к повреждению мембраносвязанных белков и деструктивным изменениям в мембране.

Сравнение изменения агрегационной способности тромбоцитов, вызванной гамма-облучением и активацией ПОЛ аскорбатом показывает, что эффект облучения больше, чем максимальное увеличение параметров агрегации при активации ПОЛ [14]; кроме того при действии аскорбата отмечено смещение максимума степени агрегации в область более низких температур и его расширение, по сравнению с АДФ-индуцированной агрегацией нативных тромбоцитов. Это объясняется тем, что облучение не только вызывает процесс ПОЛ, но и прямо влияет на структуру белков и других веществ, которые участвуют в процессе агрегации [12]. Большие дозы облучения вызывают не только структурные перестройки мембраны, но и частичное ее разрушение, активируют процесс высвобождения [9] и вызывают спонтанную агрегацию тромбоцитов, но в целом при больших дозах наблюдается снижение агрегации, что вызвано повреждением белковых молекул-рецепторов и разрушением части тромбоцитов.

Для каждой дозы облучения получены температурные зависимости параметров агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, адреналином и тромбином. Примеры таких зависимостей для доз 10, 50 и 200 Гр приведены на рис. 3-8.

Для АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов максимум степени агрегации наблюдается при температуре 18-20°C. Его положение не изменяется во всем интервале доз облучения. Кривые зависимости степени агрегации от температуры для образцов облученной ОТП имеют более плавный максимум. При температурах ниже температуры максимума кривые имеют различный характер, что свидетельствует о "разупорядочивающем" действии гамма-облучения на липиды мембран тромбоцитов. Максимум скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов отмечается при температуре 30-32°C. Для всех доз облучения не наблюдается изменения положения максимума скорости агрегации. Характер

температурных зависимостей скорости агрегации облученных образцов ОТП отличается при температурах выше температуры максимума, зависимость имеет более плавный ход в области максимума по сравнению с контролем.

$\Delta D_{0.6}$

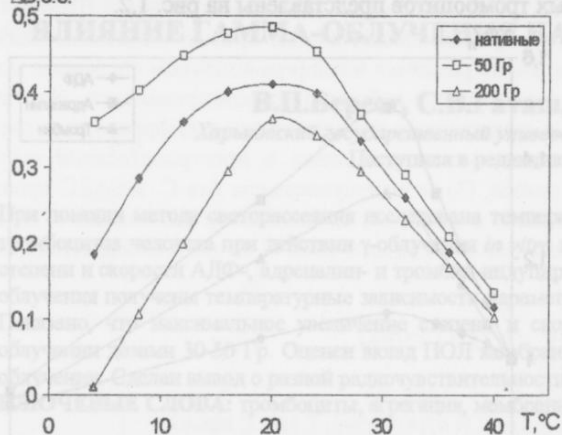


Рис. 3. Зависимость степени агрегации нативных и облученных тромбоцитов от температуры. Индуктор АДФ

$V_{0.6}/\text{мин}$

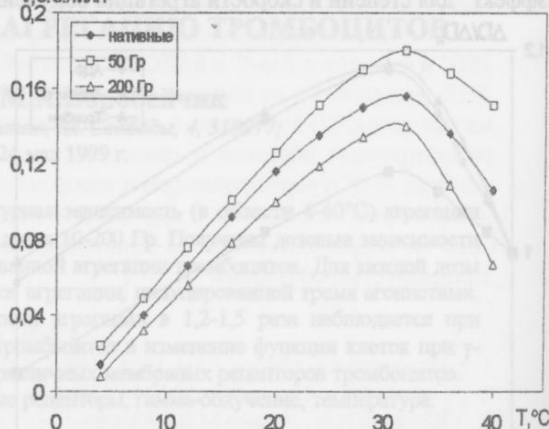


Рис. 4. Зависимость скорости агрегации нативных и облученных тромбоцитов от температуры. Индуктор АДФ

Для агрегации индуцированной адреналином (концентрация 1 мг/мл) максимум степени агрегации при облучении ОТП в дозах 10 и 200 Гр смещается в область более низких температур по сравнению с необлученной ОТП (рис. 5, 6). Это, по-видимому, связано с "разрыхлением" липидов тромбоцитов при действии гамма-облучения, вследствие чего фазовый переход в липидах происходит при более низкой температуре и максимум степени агрегации наблюдается при меньших температурах. Для образцов, облученных дозами 10 и 200 Гр кривые зависимости степени агрегации имеют более "острый" максимум и резко спадающие и нарастающие ветви при температурах выше и ниже максимума.

$\Delta D_{0.6}$

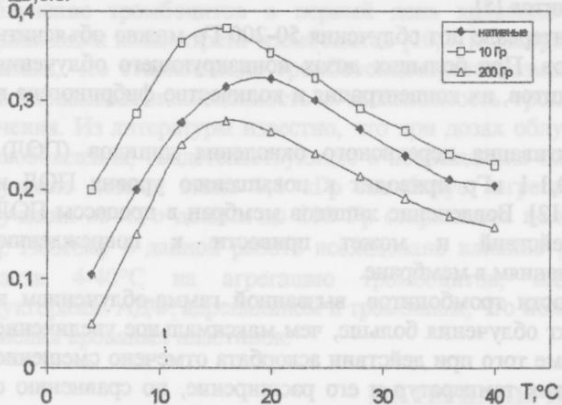


Рис. 5. Зависимость степени агрегации нативных и облученных тромбоцитов от температуры. Индуктор адреналин

$V_{0.6}/\text{мин}$

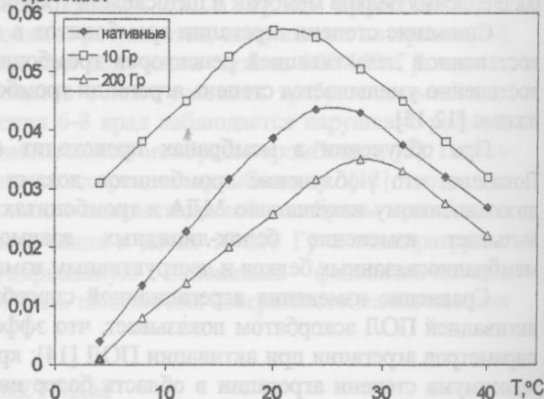


Рис. 6. Зависимость скорости агрегации нативных и облученных тромбоцитов от температуры. Индуктор адреналин

Максимум скорости адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов, облученных дозой 10 Гр смещается в область более низких, а при дозе 200 Гр в область более высоких температур, по сравнению с максимумом скорости агрегации необлученных тромбоцитов (20-22 °C). Изменяется и форма температурных зависимостей скорости адреналин-индуцированной агрегации, при гамма-облучении они имеют более острый максимум и меньшую полуширину.

Для агрегации, индуцированной тромбином, отмечено уменьшение температуры максимума степени агрегации при облучении дозой свыше 200 Гр, а также значительное изменение формы температурных зависимостей и снижение температуры максимума скорости агрегации при действии γ -облучения (рис. 7, 8).

Результаты показывают, что наибольшие изменения температурных зависимостей параметров агрегации тромбоцитов при гамма-облучении отмечены для скорости агрегации. Различия в характере и величине изменений температурных зависимостей степени и скорости агрегации тромбоцитов,

Влияние гамма-облучения на агрегацию тромбоцитов

индуцированной разными агонистами, вероятно, свидетельствуют о различной радиочувствительности мембранных рецепторов тромбоцитов.

$\Delta D_{0.6}$

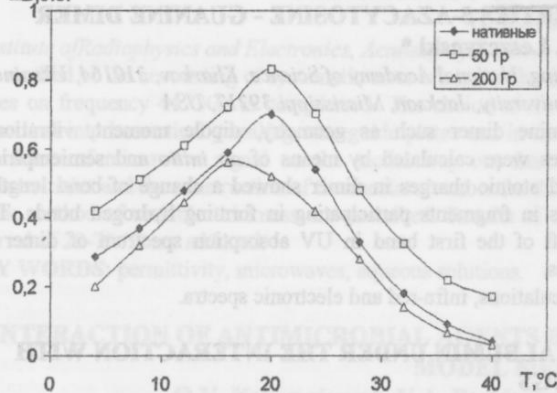


Рис. 7. Зависимость степени агрегации нативных и облученных тромбоцитов от температуры. Индуктор тромбин

$V, \text{о.е./мин}$

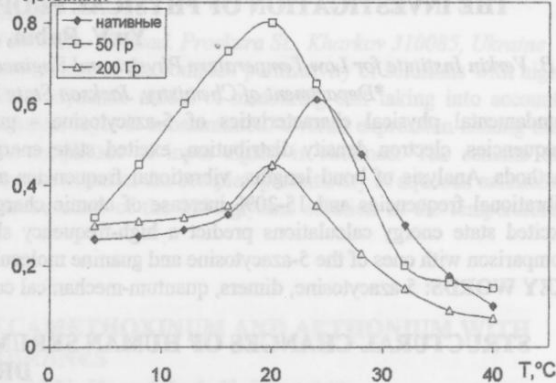


Рис. 8. Зависимость скорости агрегации нативных и облученных тромбоцитов от температуры. Индуктор тромбин

По-видимому, γ -облучение изменяет микровязкость плазматической мембраны тромбоцита, мембран внутриклеточных органелл и системы канальцев (в частности за счет активации ПОЛ). Это приводит к нарушению транспорта веществ и прежде всего ионов; смещению ионных и концентрационных градиентов; нарушению реакции высвобождения, а также оказывает влияние на структуру мембранных белков [16]. С другой стороны, прямая инактивация мембранных рецепторов может приводить к уменьшению количества вторичных посредников активации клеток, что отразится на "эффективности" этого процесса, а, следовательно, на скорости агрегации, что и наблюдается особенно отчетливо на температурных зависимостях скорости адреналин- и тромбин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Изменения количества и/или соотношения вторичных мессенджеров приведут к изменению количества экспрессированных на поверхности мембраны рецепторов для фибриногена. Изменится прочность связей клеток в агрегатах, их размеры и, следовательно, степень агрегации.

ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты показывают, что характер температурной зависимости степени агрегации определяется в основном структурным состоянием липидной фазы мембраны, а скорости агрегации – конформацией мембранных белков, а ее форма зависит от вида индуктора (что определяется различной структурой соответствующих мембранных рецепторов [17-19]) и изменяется при действии γ -излучения. АДФ-зависимая система активации тромбоцитов более радиационно устойчива, чем активируемая тромбином или адреналином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Follea G., Heŕve P., Andreu G. et al. // *Transfus. Clin. Biol.* 1996. V.3, № 2. P. 113-123.
2. Williamson L.M., Warwick R.M. // *Blood Rev.* 1995. V.9, № 4. P. 251-261.
3. Moroff G., George V.M., Siegl A.M., Luban N.L. // *Transfusion.* 1986. V.26, № 5. P. 453-456.
4. Kalovidouris A.E., Papayannis A.G. // *Acta Radiol. Oncol.* 1981. V.20, № 5. P. 333-336.
5. Prodouz K.N., Habraken J.W., Moroff G. // *J. Lab. Clin. Med.* 1990. V. 116, № 6. P. 766-770.
6. Espersen G.T., Ernst E., Christiansen O.B. et al. // *Vox Sang.* 1988. V. 55, № 4. P. 218-221.
7. Mockl C., Behr W., Schlimok G. // *Beitr. Infusionsther.* 1992. V. 30. P. 174-177.
8. Read E.J., Kodis C., Carter C.S., Leitman S.F. // *Transfusion.* 1988. V. 28, № 5. P. 446-450.
9. Witas H., Duda W., Kotelba-Witkowska B., Leyko W. // *Radiat. Environ. Biophys.* 1977. V. 14, № 4. P. 317-322.
10. Huston B.M., Brecher M.E., Bandarenko N. // *Am. J. Clin. Pathol.* 1998. V. 109, № 6. P. 743-747.
11. Stradley S.T., Kao Y.S. // *Am. J. Clin. Pathol.* 1999. V. 111, № 1. P. 137.
12. Wachowicz B., Krajewski T., Wodzinowska B., Reliszka L. // *Environ. Res.* 1984. V. 34, № 1. P. 1-7.
13. Лысоголов Н.В. Ультраструктура кровяных пластинок в норме и при лучевых поражениях. Автореф. дис... доктора биол. наук. М. 1972. 32 с.
14. Берест В.П., Гаташ С.В. // *Физиологический журнал.* 1998. Т.44, № 5-6. С. 89-94.
15. Гаташ С.В. Кинетика межклеточных взаимодействий тромбоцитов и влияние электромагнитных излучений. Автореф. дис... канд. биол. наук. Тбилиси. 1987. 22 с.
16. Longnonne J. L., Ducoussou R., Rocquet G., Kergonou G. F. // *J. Bioch.* 1985. V.9. P. 1015-1021.
17. Lips G. P. M., Sixma J. J., Schiphorst M. E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. V. 628. P. 451- 467.
18. Phillips D. R., Agin P. P. // *J. Biol. Chem.* 1977. V.252. P. 2121-2126.
19. Regan G. W., Nakata H., Demarinis R.M. et al. // *J. Biol. Chem.* 1986. V.261. P.3894-3900.

ABSTRACTS

THE INVESTIGATION OF PHYSICAL PROPERTIES 5-AZACYTOSINE - GUANINE DIMER

Yu.V. Rubin, J. Leszczynski *

*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Science, Kharkov, 310164, Ukraine***Department of Chemistry, Jackson State University, Jackson, Mississippi 39217, USA*

Fundamental physical characteristics of 5-azacytosine - guanine dimer such as geometry, dipole moment, vibrational frequencies, electron density distribution, excited state energies were calculated by means of *ab initio* and semiempirical methods. Analysis of bond lengths, vibrational frequencies and atomic charges in dimer showed a change of bond lengths, vibrational frequencies and 15-20% increase of atomic charges in fragments participating in forming hydrogen bonds. The excited state energy calculations predict a high-frequency shift of the first band in UV absorption spectrum of dimer in comparison with ones of the 5-azacytosine and guanine molecules.

KEY WORDS: 5-azacytosine, dimers, quantum-mechanical calculations, infra-red and electronic spectra.

STRUCTURAL CHANGES OF HUMAN SERUM ALBUMIN UNDER THE INTERACTION WITH DRUGS

T.O. Hushcha, Yu.N. Naboka, A.I. Luik

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Murmans'ka Str. 1, 253094**Kyiv, Ukraine, E-mail: hushcha@bioorganic.kiev.ua*

The effect of binding of ten drugs on structural organization of human serum albumin in aqueous solutions has been studied using two biophysical methods. The hydrodynamic sizes of albumin globule and its subunits were obtained from diffusion coefficients measured by quasi elastic light scattering. The adiabatic volume compressibility of albumin was evaluated from ultrasonic velocity and density measurements. It has been shown, that the interaction with propranolol, clonidine, phenylephrine, carbachol and tripeptide fMLP induces unfolded and elastic conformation of albumin with a high motility of separate subdomains, whilst at the interaction with isoproterenol, yohimbine, diphenhydramine, chlorpromazine and atropine the albumin subdomains adopt a closed compressible configuration. The results obtained are consistent with the idea of structural and pharmacological similarity among the drugs inside the marked groups.

KEYWORDS: albumin, drugs, binding, quasi elastic light scattering, ultrasound, size, compressibility, conformation

HYDRATTON OF THE VARIOUS STRUCTURAL FORMS OF POLYRIBOCYTIDILIC ACID AND ITS COMPONENTS BY A MONTE CARLO METHOD. 1. INFLUENCE OF PROTONATION ON THE CYTOSINE HYDRATTON.

A.V. Shestopalova, D.B. Anischenko*, V. Ya. Maleev

*Institute for Radiophysics and electronics National Academy of Sciences of Ukraine, 12 Acad. Proskura str., Kharkov, 310085,**Ukraine *Kharkov State University, 4 Svoboda Sq., Kharkov, 310077, Ukraine*

A study of influence cytosine-N3 site protonation on its interaction with a solvent - water has been carried out by a Monte Carlo method. The received monte-carlo configurations of systems containing neutral or protonated cytosine and 200 molecules of water have allowed to determine the hydration centres of both cytosine forms. The comparison of the energetic and structural characteristics of researched systems has enabled to reveal and to describe distinctions in interaction neutral and protonated cytosine with a water environment. It has shown that protonation renders complex influence on formation cytosine primary and secondary hydration shells.

KEY WORDS: Cytosine, protonation, hydration, a Monte Carlo method, energetic and structural characteristics.

COMPLEXATION OF ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS DAUNOMYCIN AND NOGALAMYCIN WITH ISOMERIC DEOXYTETRANUCLEOTIDES 5'-D(ACGT), 5'-D(AGCT) AND 5'-D(TGCA) IN AQUEOUS SOLUTION

A.N. Veselkov, P.A. Bolotin, S.G. Osetrov

Sevastopol State Technical University, Sevastopol 335053, Ukraine

One - dimensional and two - dimensional NMR spectroscopy has been used to investigate the sequence specificity of complex formation of anthracycline antibiotics daunomycin (DAU) and nogalamycin (NOG) with isomeric deoxytetranucleotides of different base sequence in aqueous salt solution. The quantitative estimations of the interaction of DAU and NOG with deoxytetranucleotides have been made using the experimental concentration dependences of proton chemical shifts of the antibiotics. The obtained results are most readily explained by binding models in which DAU and NOG interact with sites containing three adjacent base pairs, *i.e.* triplet recognition sequences. However the antibiotics do not show obvious sequence specificity of binding both with duplex and single - stranded forms of the oligonucleotides. The most favourable structures of 1:2 DAU - tetranucleotide complexes have been determined using the calculated induced proton chemical shifts together with 2D-NMR data. It has been shown that orientation of the chromophore of DAU in the antibiotic - deoxytetranucleotide complexes in aqueous solution substantially depends on the base sequence at the intercalation site.

KEY WORDS: deoxytetranucleotide, daunomycin, nogalamycin, intercalation, sequence specificity, NMR spectroscopy.

APPLICATION OF THE ELECTRODYNAMIC MODEL AT THE MEASUREMENTS OF THE PERMITTIVITY OF AQUEOUS SOLUTIONS

G.M.Glibitskiy

Institute of Radiophysics and Electronics, Academy of Sciences of Ukraine. 12 Acad. Proskura St., Kharkov 310085, Ukraine
The method of the accounting of systematic error arising at the measurement of the complex permittivity of solutions with high losses on frequency 44 GGz is considered. The choice of the electrodynamic model of measuring cell taking into account reflections into hermetically sealing waveguide plates and in the solution layer is substantiated. Overall expression linking the parameters of microwave signal on the model way out from the amplitude of input signal is obtained. The scheme of dielectrometer and the construction of thermostat chamber for the measurement of the complex permittivity of aqueous solutions by the method of variable thickness are described. Results of measurements of the 20% glycine solution in the temperature interval of 20-70 °C are adduced.

KEY WORDS: permittivity, microwaves, aqueous solutions.

INTERACTION OF ANTIMICROBIAL AGENTS DECAMETHOXINUM AND AETHONIUM WITH MODEL MEMBRANES

O.V. Korzovskaya*, V.A. Pashinskaya, M.V. Kosevich, L.N. Lisetski*

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47, Lenin Avenue, Kharkov, 310164, Ukraine **Institute for Single Crystals, 60, Lenin Ave., Kharkov, 310001*

Interaction of antimicrobial drugs decamethoxinum and aethonium, based on bisquatamary ammonium compounds, with model membranes is studied using scanning differential calorimetry and UV spectroscopy. It is shown that while the both drugs can interact with membrane structures based on hydrated dipalmitoylphosphatidylcholin, the mechanisms of such interactions for decamethoxinum and aethonium differ significantly. 4 °C decrease of the dipalmitoylphosphatidylcholin temperature of transition T_c to lamellar L_a -phase without considerable increase of the half-width of the calorimetry peak and enthalpy of the phase transition under the decamethoxinum action points to the interaction of this agent with polar heads of the phospholipids. Simultaneous decrease of T_c and smearing of the peak under aethonium action evidence a twofold character of its interaction both with the phospholipid polar head and non-polar tails. Correlation between the observed differences in the mechanisms of interaction with differences in the structure and electronic parameters of the dications of the two bisquatamary agents is discussed.

KEY WORDS: antimicrobial agents, decamethoxinum, aethonium, model membranes, hydrated phospholipids, phase transitions.

PHOSPHOLIPID EFFECT ON THE STRUCTURE AND DYNAMICS OF RIBONUCLEASE

G.P.Gorbenko

Kharkov State University, 4SvobodySq., Kharkov 310077, Ukraine

By examining the quenching of intrinsic protein fluorescence the phospholipid influence on the structure and dynamical properties of ribonuclease has been investigated. A method has been proposed, allowing to estimate the quenching parameters of the exposed and internal protein fluorophores by means of the combined application of the ionic (iodide) and neutral (acrylamide) quenchers. Phospholipids have been found to induce increase of the contribution of exposed aromatic residues in the total fluorescence and enhancing the quenching efficiency of the exposed and intrinsic fluorophores by acrylamide. These data have been interpreted as indicating partial unfolding of the protein molecule and increase of its conformational mobility upon the formation of protein-lipid complexes.

KEY WORDS: ribonuclease, liposomes, protein-lipid complexes, fluorescence quenching, protein conformational changes

STUDY OF MODIFICATED EFFECT OF FAST ELECTRONES ON THE ACTIVITY OF Ca^{2+} - AND Mg^{2+} -ATPASES OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

A.V. Finashin, V.V. Tovstiyak

Kharkov State University, 4 SvobodySq., Kharkov 310077, Ukraine

The effect of chemical modifiers such as glutaraldehyde, sodium nitrate, thiourea, triton X-100 and parachloromercurobenzoate on the radiosensitivity of Ca^{2+} - and Mg^{2+} -ATPases of erythrocyte membranes has been investigated. The results obtained suggest that radiative damage to Ca^{2+} -ATPase is determined mainly by the products of water radiolysis, interacting with the protein's sulphhydryl groups.

KEY WORDS: ionizing radiation, erythrocyte plasma membrane, Ca^{2+} -ATPase, Mg^{2+} -ATPase.

THE PHYSICO-MATHEMATICAL ANALYSIS OF THE INITIAL STAGE OF ERYTHROCYTE PRESSING THROUGH CYLINDRIC MICROCAPILLARY

L.L.Gardash, E.A. Gordienko

Institute/or Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine

The analytical expressions for determination of time interval from the moment, when erythrocyte blocks the entrance orifice of a microcapillary to the moment, when the curvature radius of the membrane part drawn into the microcapillary becomes equal

to the microcapillary radius have been obtained. Its depend on the pressure fall on the microcapillary, solution viscosity and the cell membrane elasticity modulus.

KEY WORDS: deformation, microcapillary, erythrocyte.

MASS SPECTROMETRIC INVESTIGATION OF NONVALENT COMPLEXES OF BISQUATERNARY AMMONIUM SALTS AND PHOSPHOLIPIDS

V.A. Pashinskaya¹, M.V. Kosevich¹, A. Ghomori², K. Vekey², O.V. Korzovskaya³,
L.N. Lisetski³, Yu.P. Blagoy¹

¹B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Science of Ukraine, 47, Lenin ave., Kharkov, 310164

Central Institute of Chemistry of the Hungarian Academy of Science, Budapest, Hungary ³Single Crystals Institute of the National Academy of Science of Ukraine, 60 Lenin ave., Kharkov, 310001

Some peculiarities of nonvalent interaction of bisquaternary ammonium salts - antimicrobial drugs the decamethoxinum and aethonium - with the phospholipid component of the biological and model membranes the dipalmytoilphosphatidilpholin have been studied in this work by secondary ions mass spectrometry. For the first time dicharged supramolecular complexes dication of this salts with one, two and three molecules of the phospholipids have been registered upon mass spectrometric conditions. The basic role of the electrostatic interaction in the stabilization of this complexes are discussed. Using data, obtained by tandem mass spectrometry, the estimation of the energetic characteristics of the metastable decay of dicharged complexes of phospholipid with dication have been obtained.

KEY WORDS: decamethoxinum, aethonium, dipalmytoilphosphatidilpholin, nonvalent complexes, tandem liquid secondary ion mass spectrometry.

THE INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF PLASMA MEMBRANE OF LYMPHOCITES BY USING FLUORESCENCE METHODS

S.V. Demchenko, V.J. Dreval

Kharkov State University, 4 SvobodySq., Kharkov 310077, Ukraine

The structural mobility of membrane proteins, microviscosity of membrane lipids, spatial arrangement of lipid-protein complexes of human lymphocytes was studied. Fluorescent probes piren and ANS and diffusion quencher acrilamide was used in order to determine above mentioned parameters.

KEY WORDS: lymphocytes, plasma membrane, membrane protein structure, membrane lipids microviscosity

SOME MORPHOFUNCTIONAL ERYTHROCYTES CHARACTERISTICS OF THYROID CANCER PATIENTS

V. A. Philenko, V. S. Cholodny, V. N. Gorbenko, N. A. Babenko

Kharkov State University, Institute of Biology, 310077, Kharkov, sq. Svobody, 4

Kharkov Regional Clinical Oncological Hospital, 310070, Kharkov, Pomerky, 70

Results of experimental investigation of some morphofunctional erythrocyte properties have been performed in this work. Average cell volume, relative volume distribution width, electrical current of membrane breakdown, average amount of cell hemoglobine and content of some neutral (cholesterine, di- and threeglycerides, free fatty acids, cholesterine ethers) and phospholipids (sphingomyeline, phosphatydilethanolamine, phosphatydilcholine, ceramides) in erythrocytes and blood plasma of thyroid cancer patients were measured.

KEY WORDS: erythrocyte, average cell volume, relative volume distribution width, electrical current of membrane breakdown, cholesterine, di- and threeglycerides, free fatty acids, cholesterine ethers, sphingomyeline, phosphatydilethanolamine, phosphatydilcholine, ceramides.

THE VOLUMETRE OF OVA AND EMBRYOS OF MAMMALIAN. I. THE PHYSIC-MATHEMATICAL BASIS AND TECHNIQUE FOR MEASUREMENT OF CELL VOLUME CHANGES

N.D. Bezugly, N.A. Gordienko, A.V. Medvedovsky

Kharkov Biotechnical Center, p/o Kulnichy, Kharkov, Ukraine 312120, E-mail cryo@animal.kharkov.ua

The method of studding of osmotic reaction of mammalian embryos and ova was described in the article. This method allows to determine the osmotic cell composition on basis indirect measurement of cell volume changes by using of physic-mathematical model and to calculate the coefficient of permeability of cytoplasm membrane of mammalian ova and embryos for water and permeable substances and also the coefficient of reflection and energy of activation of substances transport through membranes. Three technical approaches for the given method realization were described and their comparison was made.

KEY WORDS: embryo, osmotic reaction, permeability of cytoplasm membrane, cell volume, coefficient of permeability

INFLUENCE OF GLUCOSE ON THE PROLIFERATIVE HETEROGENEITY OF EMT6/Ro MULTICELLULAR SPHEROIDS

G.I. Solyanik

Jt. E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology. National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev 252022

The proliferative heterogeneity of EMT6/R.O multicellular tumor spheroids has been analyzed from the influence of glucose level on the number of proliferating and resting cells in spheroids, their spatial distribution and necrosis formation. It is shown that the increase in glucose level results in the growth of the resting cell number. Only low glucose level can stipulate the decrease in the number of hypoxic cells in tumor spheroids.

KEY WORDS: Mathematical model, multicellular tumor spheroids, heterogeneity of cellular composition

INFARED SPECTRA OF TUMOR NUCLEIC ACIDS.

G.I. Dovbeshko¹, N.Ya. Gridina²

¹*Institute of Physics of National Academy of Sci. of Ukraine, Prospect Nauki, 46, Kiev-22, 252022, Ukraine*

²*Romodanov Institute of Neurosurgery of Med. Academy of Sci., of Ukraine, Manuilsky str., 32, Kiev-50, 252050, Ukraine*
Infrared spectra of ribonucleic acids, isolated from brain tumor cells of human and experimental rats have been studied. A number of changes in valent vibrations of C=O, CH, OH, C=C, C=N, PO₂ groups and base ring vibrations of tumor nucleic acids were registered. The second and the third structure of tumor nucleic acids seems to be occur.

KEY WORDS: infrared spectra, DNA and RNA molecules, tumor, glioma.

INFLUENCE OF γ -IRRADIATION ON HYDRATION OF POLYRIBOADENYLIC ACID

O.V. Dubovitskaya, V.A. Kashpur, V.Ya. Maleev

*Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,
12 Acad. Proskura str., Kharkov 310085, Ukraine*

The γ -radiation influence on dielectric properties and hydration extent (h) of polyriboadenylic acid has been investigated. The data on dielectric permittivity of aqueous solutions of poly(A) in single stranded (ss) and double stranded (ds) conformation at different doses has been obtained using the differential dielectrometric method. It has been found that γ -irradiation of ss polynucleotide at 1650 Gy causes the diminution of h value by 2-3 bound water molecules per nucleotide. γ -irradiation of ds polynucleotide at dose 670 Gy leads to the increase of h by 4 with subsequent decrease by 1-2 at dose 1650 Gy. It has been shown that the effects revealed are due to the strand breaks, formation of products of modified adenine and appearance of intramolecular crosslinks.

KEY WORDS: polyriboadenylic acid, dielectrometric method, hydration, γ -irradiation.

STUDY OF STRUCTURAL DAMAGES IN DNA FROM GAMMA-IRRADIATED RATS

E. B. Kruglova, G.I. Dovbeshko¹, N. A. Krutko, O. P. Pashchuk¹, N. A. Karpenko²,

M. Yu. Alesina², A.A. Krasnitskaya

*Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,
12 Acad. Proskura St., Kharkov, 310085, Ukraine;*

¹*Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Prospekt Nauki, Kiev, 252028;*

²*Chernobyl Scientific and Technical Center for International Reseach, 6 Shkolnaya St., Chernobyl, 255620, Ukraine.*

Study of structural changes in DNA molecules, extracted from reference and irradiated (0.7-57 cGy) rats of different ages have been done with FTIR spectroscopy and by method of the temperature dependence of UV spectra. FTIR spectra have registered some changes, which could be connected with changes in structure of sugar-phosphate backbone (ostov) and modification of bases. Redistribution in the H-bond network have been observed also. All changes is more manifested for DNA from 12 month rats than for 4 month rats. This data correlate with increasing of bounding of biologically active nucleosides (NUC)- cytosine-arabinoside and 6-azacytidine with DNA molecules from irradiated cells. For DNA from irradiated cells, bounded with NUC, curves of melting shift to the more higher temperature than curves of melting for irradiated DNA without NUC. We have registered no dose dependence of structural changes.

KEY WORDS: DNA, low radiation doses, melting curves, UV spectrophotometry, cytosine arabinoside, 6-azacytidine, FTIR spectroscopy, DNA damages.

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON PLATELET AGGREGATION

V.P. Berest, S.V. Gatash, M.A. Vorobeychik

Kharkov State University, 4 Svobody Sq., 310077;

The temperature dependence (ranged 4-40°C) of human platelet aggregation under the influence of gamma irradiation within the dose range of 10-200 Gy was studied by means of turbidimetric method. The dose dependences of degree and rate of platelet aggregation induced by ADP, epinephrine and thrombin were obtained. The temperature dependences of parameters of platelet aggregation induced by three different agents were measured at each irradiation level. Maximal 1.2-1.5 times increase of degree and rate of platelet aggregation was observed after gamma irradiation with doses 30-50 Gy. The contribution of platelet membrane lipid peroxidation to alteration of their aggregation ability was estimated. The conclusion was made concerning different radiosensitivities of platelet plasma membrane receptors.

KEY WORDS: platelets, aggregation, membrane receptors, gamma irradiation, temperature.

TITLE OF THE PAPER

A.B. Author, C.D. Coauthor

Affiliations and Full Addresses

Received April 1, 1998

In the present paper.....

KEY WORDS: field of study, method,.....

Earlier [1, 2], an algorithm has been proposed to study.....

MATERIALS AND METHODS

RESULTS AND DISCUSSION

$$\frac{dX}{dt} = f(X) + \int_{\Omega} g(y) dy \quad (1)$$

CONCLUSIONS

REFERENCES

1. Zakrzewska K., Lavery R., Pullman B. // Nucl. Acid Res. 1997. V.11. P. 8825-8839
2. Stein W.D. The movement of molecules across cell membranes. New-York-London. Academic press, 1967. 369 p.

Підписано до друку 25.06.99. Формат 60x84 ¹/₈. Умов. друк. арк. 6,37.

Облік.-вид. арк. 8,83. Тираж 200 прим. Замовлення № 2578.

м. Харків, вул. Сумська, 37, ТОВ "Рейтинг", (0572) 470123

9-00

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

Видавничий центр ХДУ.

BIOPHYSICAL BULLETIN INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

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

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

Layout of the Manuscript

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

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

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

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

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

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

Please, pay attention to compact organization of the manuscript.

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