

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету № 410

Ж-14038

П326728

# Біофізичний ВІСНИК

Випуск

1'98

1998

## Увага!

З другого випуску "Біофізичного вісника" правила для авторів змінюються.

### ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направлення 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 принтер). Використовується редактор MS Word, шрифт Times New Roman (Сут), розмір шрифту 10 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем.

Математичні та хімічні символи, рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою комп'ютерної техніки. Рисунки, у вигляді повністю придатного до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки виготовляються з використанням комп'ютерної техніки або виконуються тушшю на білому папері з 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 ініціали та прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси організацій авторів (курсив, 9 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкується за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число-цифрами, місяць-прописом, рік-цифрами (шрифт прямий, 9 pt., вирівнювання по центру).

Після пропуску одного рядка вміщується реферат статті, 5-10 рядків, з коротким викладом методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів. 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 виділяється напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу іде один пустий рядок.

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

(продовження на 3 сторінці обкладинки)

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету  
№ 410, 1998

# БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК

Заснований у 1998 році

випуск 1

Харків  
1998

УДК 577.3

Від редакції:

### ***Шановні читачі та автори !***

Цим випуском ми починаємо видавати журнал "БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК", що є новою серією "Вісника Харківського університету" (ISSN 0453-8048). Запланована періодичність журналу – не менше двох разів на рік.

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

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

Журнал розрахований на науковців, викладачів вузів, аспірантів, студентів, що спеціалізуються у галузі біофізики.

### ***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. Древаль В.І.  
д.ф.-м.н., проф. Казанський В.Б.

д.б.н., проф. Моїсєєв В.О.  
д.б.н. Перський Є.Е.  
д.ф.-м.н. Семенов М.О.  
д.ф.-м.н. Сорокін В.О.  
д.ф.-м.н., проф. Суходуб Л.Ф.

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

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

© Харківський державний університет, 1998

© Гаташ С.В., 1998 – оформлення



## ЗМІСТ

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- Е.Г. Березняк, М.А. Семенов, Т.В. Больбух** Гидратация и стабильность нуклеиновых кислот с различным АТ и ГЦ-составом в конденсированном состоянии 5
- Ю.П. Благой, В.Н. Зозуля, А.С. Щербакова** Термодинамика переходов спираль-клубок в дуплексных комплексах олигоденилата с олиготимидилатом. Влияние ковалентно присоединенного красителя 21
- М.Е. Толсторуков, С.В. Гаташ, В.Я. Малеев** Распределенная модель конформационных переходов, индуцированных изменением относительной влажности в образцах нуклеиновых кислот 33
- К.М. Вирник, А.И. Гасан, А.В. Шестопалова, В.Я. Малеев** Энергетические и динамические свойства воды в гидратной оболочке ДНК 41
- Ю.В. Рубин, А.Ю. Рубина, В.А. Сорокин** Квантово-механическое изучение катионов оснований нуклеиновых кислот 50
- И.К. Галетич, С.Г. Степаньян, В.С. Шелковский, М.В. Косевич, Ю.П. Благой, Л. Адамович** Экспериментальное и теоретическое изучение межмолекулярных взаимодействий в узнающем комплексе метилурацила с акриламидом 57
- Е.В. Хакл, С.В. Корнилова, Ю.П. Благой** Изучение влияния  $\text{Ca}^{2+}$  на ДНК в водных растворах, содержащих 1,2-пропандиол и глицерин, методом ИК-спектроскопии 62
- В.П. Берест, С.В. Гаташ, Т.Ф. Морозова** Термотропные изменения конформации фибриногена 71
- А.И. Осецкий** Физико-математическая модель флуктуаций конфигурации биомакромолекулы в вязкой среде 75

## БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- Е.А. Гордиенко, Ю.Е. Панина** Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. I. Этап набухания 79
- Г.П. Горбенко, О.А. Нардид, Т.С. Дюбко** Применение анализа неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ для исследования структурных изменений модельных и природных мембран 86

## БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- Г.И. Соляник* Кинетика роста многоклеточных опухолевых сфероидов.  
Математическая модель 96
- Е.Б. Радзиевская, В.Г. Книгавко* Применение квазиполиномов в  
вероятностных моделях фармакокинетики 106

## ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

- В.А. Кашпур, О.В. Дубовицкая, А.А. Красницкая, В.Я. Малеев* Влияние  
 $\gamma$ -облучения на состояние ион-гидратной оболочки ДНК 111
- А.А. Красницкая, А.І. Гасан, К.М. Вірник* Вплив  $\gamma$ -радіації на  
структурний стан ДНК, що була опромінена при різних ступенях  
вологості 116
- Г.В. Зима, В.І. Древаль* Вплив іонізуючого випромінювання на активність  
 $Mg^{2+}$ -АТФази плазматичних мембран еритроцитів 124
- Л.В. Сичевская* Роль липидов и белков в радиационном поражении  
эритроцитарных мембран 128
- Б.Г. Емец* О возможных причинах наблюдения "резонансного" действия  
электромагнитного излучения сверхвысоких частот на биообъекты 133
- Abstracts** 138

УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

## ГИДРАТАЦИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С РАЗЛИЧНЫМ АТ и ГЦ - СОСТАВОМ В КОНДЕНСИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ

Е.Г.Березняк., М.А.Семенов, Т.В.Большух.

*Институт радиофизики и электроники НАН Украины,*

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

*e-mail: berez@ire.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 5 мая 1998 г.

В предлагаемом обзоре обобщаются результаты исследования влияния воды на структуру и стабильность нуклеиновых кислот (НК) на основе литературных данных и разработанного нами методического подхода к изучению особенностей гидратации большого набора НК с различным нуклеотидным составом в системе НК - вода с переменным содержанием воды. Проведенный анализ показал, что в общую энергию стабилизации спиральных структур нуклеиновых кислот вода вносит вклад до 70-75%, а вклад Н-связей в уотсон-криковских парах не превышает 25%. Эти результаты позволили наряду с влиянием воды выявить воздействие и других факторов на формирование и стабилизацию гидратных структур ДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нуклеиновые кислоты, ИК-спектроскопия, пьезогравиметрия, микрокалориметрия, теоретические расчеты, энергетика гидратации.

Исследование нуклеиновых кислот (НК) с помощью широкого арсенала традиционных и современных экспериментальных методов и теоретических расчетов позволило в настоящее время установить, что их структурное состояние, гидратно-ионное окружение и стабильность определяются различными типами внутри- и межмолекулярных взаимодействий [1]: водородными связями в парах, стэкинг-взаимодействием в «стопках» пар оснований и между цепочками (так называемый кросс-стэкинг), взаимодействием молекул воды с противоионами и гидратно-активными центрами нуклеиновых кислот, гидрофобными взаимодействиями, а также взаимодействием между «связанными» и «свободными» молекулами воды. В последнее время все большее признание получает гипотеза, согласно которой стабилизация спиральной структуры нуклеиновых кислот в основном обеспечивается их взаимодействием с гидратно-ионным окружением [2-5]. Эта гипотеза основывается на результатах многих экспериментальных и теоретических исследований особенностей гидратации нуклеиновых кислот в различных условиях, в том числе в конденсированном состоянии (система нуклеиновая кислота - вода - ионы) с переменным содержанием воды [2].

В настоящей работе приводятся результаты исследования влияния воды на структуру и стабильность НК, полученные на основе разработанного нами методического подхода к изучению особенностей гидратации нуклеиновых кислот в системе НК - вода с переменным содержанием воды [6]. Подход основан на использовании инфракрасной спектроскопии, микрокалориметрии,

пьезогравиметрии и расчетных методов, что позволило получить данные о механизме заполнения гидратно-активных центров в процессе формирования канонических структур НК и их гидратных оболочек, а также найти экспериментальные значения энергии связывания молекул воды с НК при различном содержании воды в системе, т.е. определить энергетический «спектр» связанной воды. Проведенный анализ вкладов различных типов взаимодействий в общую энтальпийную составляющую свободной энергии позволил по-новому взглянуть на влияние стэкинг-взаимодействия на стабилизацию НК и его роль в формировании динамических и вместе с тем устойчивых гидратных структур ДНК. Предварительные результаты сообщались ранее в [6-11].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе поставленная задача решалась с использованием ряда методик (ИК-спектроскопия, пьезогравиметрия, микрокалориметрия, теоретические расчеты), которые ранее [2] применялись для изучения особенностей формирования гидратных оболочек и двойных спиралей стандартной ДНК из тимуса телят в условиях влажной пленки.

Комплексы натриевых солей poly(rA)-poly(rU) и poly(rG)-poly(rC) получали по методике Томаса [7,8]. Использовали препараты фирм «Serva» (ФРГ) и «Reanal» (Венгрия). В готовом виде применялся двухспиральный комплекс poly(dA)-poly(dT) фирмы «Pharmacia» (США).

В качестве образцов дезоксирибонуклеиновой кислоты были взяты натриевые соли ДНК из тимуса телят, *Micrococcus lysodeikticus* и *Clostridium perfringens* (фирма «Sigma», США), имеющих АТ/ГЦ - состав 0,58/0,42, 0,28/0,72 и 0,69/0,31 соответственно. Количество ионов натрия и калия определяли с помощью пламенного фотометра. В исследуемых образцах по отношению к сухому весу ДНК содержалось 9-10% ионов  $\text{Na}^+$  и 1-2%  $\text{K}^+$ . Методика приготовления пленок и получение их ИК-спектров описаны ранее [7].

Изотермы гидратации нуклеиновых кислот, представляющие зависимости числа сорбированных молекул на один нуклеотид ( $n$ ) от относительной влажности (ОВ), были получены с помощью пьезогравиметрической установки, описанной в работе [12]. Подробный анализ спектров в областях поглощения внутри- и внекольцевых колебаний азотистых оснований ( $1800-1300 \text{ см}^{-1}$ ) и сахарофосфатной цепи ( $1300-900 \text{ см}^{-1}$ ) проводили путем построения зависимостей от  $n$  частот  $\nu$  и интенсивностей (в относительных единицах  $R$ ) для достаточно надежно интерпретированных полос поглощения. Интенсивность определяли как  $R = D_i/D_0$ , где  $D_i$  и  $D_0$  - оптические плотности в максимуме полосы поглощения при  $i$ -той и нулевой влажностях соответственно. Для контроля состояния воды в образцах нуклеиновых кислот определяли сдвиг максимума полосы поглощения валентных колебаний ОН-групп молекул сорбированной воды при изменении влажности образца.

Калориметрическое определение энтальпии испарения воды с влажных образцов нуклеиновых кислот проводили в изотермическом режиме на микрокалориметре ДСК-101 (фирма «Setaram», Франция). Предварительно увлажненные образцы при 92% ОВ помещали сначала в калориметрическую ячейку, затем - в камеру калориметра с атмосферой сухого гелия. В процессе испарения контролируемого количества воды с образца дискретно измеряли энтальпию дегидратации [13]. Калориметрическое определение энтальпии перехода спираль - клубок нуклеиновых

кислот проводили на микрокалориметре ДАСМ-5 для 0,05-0,1% растворов ДНК и двухспиральных полинуклеотидов в 0,05 М - 0,1М растворах NaCl.

## ДВУХСПИРАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

### ИК-спектры, гидратация и структурные переходы

В этом разделе приведены результаты исследования полинуклеотидных комплексов poly(dA)-poly(dT), poly(rA)-poly(rU) и poly(rG)-poly(rC) в пленках при различных значениях ОВ, полученные с помощью ИК-спектроскопии и пьезогравирии. Для определения интервалов изменения  $n$ , в которых происходят структурные переходы, а также степени гидратации и порядка «заполнения» гидратно-активных центров комплексов молекулами воды с определенными значениями энергии рассмотрены зависимости от  $n$  частот  $\nu$  и интенсивностей  $R$  основных полос поглощения, надежно отнесенных к внутри- и внекольцевым колебаниям азотистых оснований и сахарофосфатных цепей. Рассмотрим в качестве примера результаты ИК-спектроскопического исследования гидратно-зависимых процессов образования структур комплекса poly(dA)-poly(dT) в широком интервале значений относительной влажности (0-100%).

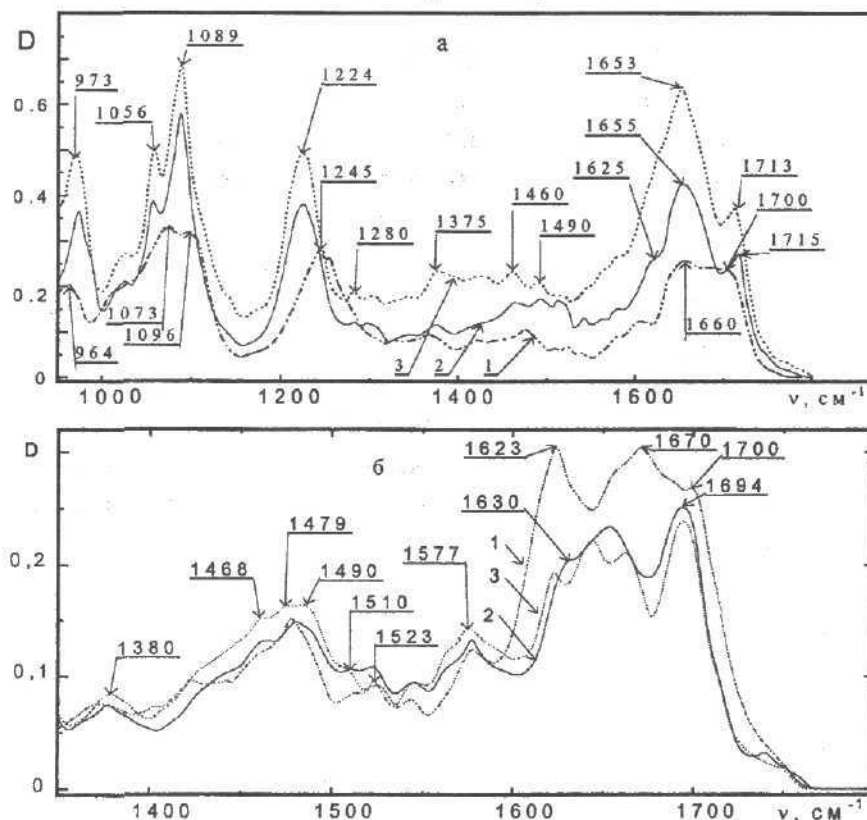


Рис.1. ИК-спектры пленок poly(dA)-poly(dT) в недеитерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 86%; 3 - 92%

На рис.1(а,б) представлены спектры пленок натриевой соли комплекса poly(dA)-poly(dT) при 0%, 86% и 92% ОВ в недеитерированном и дейтерированном состояниях. С увеличением ОВ наблюдаются значительные изменения в спектрах, что связано с формированием структуры комплекса и гидратного окружения. Рассмотрим более подробно зависимости  $\nu$  и  $R$  от  $n$  для трех основных подсистем: азотистых оснований, сахарофосфатной цепи и сорбированной воды.



Область поглощения аденина и тимина. На рис.2 представлены типичные зависимости  $\nu$  и  $R$  от  $n$  для полос поглощения внутрикольцевых колебаний  $C=N$  аденина ( $\nu = 1622 \text{ см}^{-1}$ ) (а) и внекольцевого колебания  $C4O4$  тимина ( $\nu = 1671 \text{ см}^{-1}$ ) (б) для случая дейтерированного комплекса poly(dA)-poly(dT).

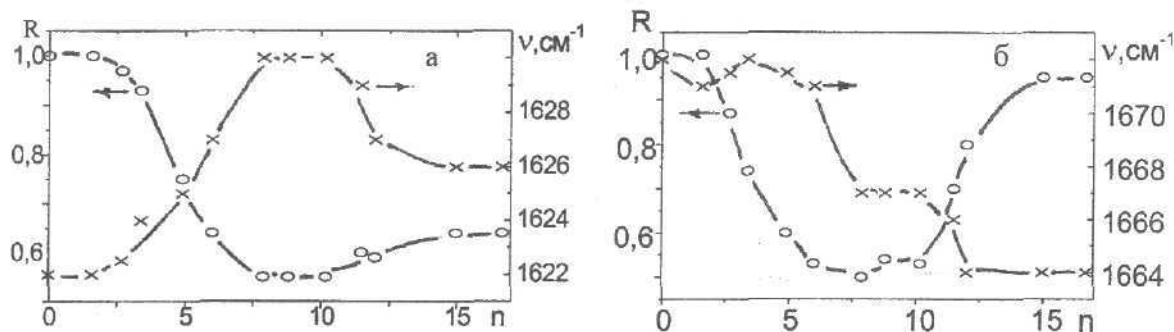


Рис.2. Зависимости частот  $\nu$  и интенсивностей  $R$  от  $n$  комплекса poly(dA)-poly(dT) для полос поглощения аденина  $\nu = 1622 \text{ см}^{-1}$  (колебание  $C=N$ ) (а) и тимина  $\nu = 1671 \text{ см}^{-1}$  (колебание  $C4=O4$ ) (б).

На этих зависимостях, а также на зависимостях от  $n$  параметров других полос поглощения ( $\nu = 1578 \text{ см}^{-1}$ ,  $1699 \text{ см}^{-1}$ ) обнаружены особенности в нескольких интервалах изменения  $n$ . В интервале  $0 < n < 2$  спектральные параметры полос практически не изменяются. Резкий высокочастотный сдвиг полосы колебания  $C=N$ -групп атомов ( $\Delta\nu = 8 \text{ см}^{-1}$ ), а также уменьшение ее интенсивности на 45% (гипохромизм) говорит о том, что во втором интервале  $2 < n < 7$  ( $32\% < \text{ОВ} \leq 75\%$ ) poly(dA)-poly(dT) переходит в спиральную конформацию. В этом же интервале изменения  $n$  полоса поглощения при  $\nu = 1695 \text{ см}^{-1}$  недейтерированного комплекса претерпевает «голубой» сдвиг до  $\nu = 1715 \text{ см}^{-1}$  (рис.1,а), что также свидетельствует о переходе комплекса в спиральную конформацию.

На рис.2,б видно, что интенсивность полосы поглощения при  $\nu = 1671 \text{ см}^{-1}$  в этом интервале  $n$  уменьшается на 45%. Однако низкочастотный сдвиг до  $\nu = 1667 \text{ см}^{-1}$  наблюдается только при дальнейшем увлажнении до  $n = 6$  и происходит очень резко в пределах  $6 < n < 7,5$ . Гипохромизм этой полосы также свидетельствует о переходе комплекса в спиральную конформацию.

При увлажнении пленки в интервале  $7 < n < 10,5$  (или ОВ от 70 до 86%) заметных изменений спектральных параметров полос поглощения (рис.2,а,б) не наблюдается. По-видимому, в этом интервале существует стабильная спиральная форма poly(dA)-poly(dT). Из данных рентгеноструктурного анализа [14] известно, что в этом интервале  $n$  комплекс находится в так называемой  $\beta$ -В'-конформации.

Дальнейшее увлажнение пленки в интервале  $10 < n < 11,5$  ( $88\% < \text{ОВ} < 92\%$ ) приводит к значительному изменению в спектрах поглощения внутри- и внекольцевых колебаний (рис.1). Частота полосы поглощения при  $1630 \text{ см}^{-1}$  сдвигается в «красную» область до  $1626 \text{ см}^{-1}$ , а ее относительная интенсивность  $R$  увеличивается на 10% (рис.2,а). Полоса поглощения при  $1667 \text{ см}^{-1}$  (колебание в основном  $C4O4$ -групп атомов) снова претерпевает низкочастотный сдвиг до  $1664 \text{ см}^{-1}$ , а ее интенсивность возрастает на 32% (рис.2,б). Уменьшается также частота полосы поглощения  $\nu = 1715 \text{ см}^{-1}$  (до  $1713 \text{ см}^{-1}$ ) при увлажнении недейтерированной пленки в этом же интервале  $n$ . Уменьшение частот этих полос и рост их интенсивности, а также низкочастотное смещение полосы поглощения при  $\nu = 1715 \text{ см}^{-1}$  до

$\nu = 1643 \text{ см}^{-1}$  (рис.1,б), связанной, по-видимому, с колебанием атома азота в третьем положении тимина, свидетельствует о том, что между А-Т - парами устанавливаются более прочные Н-связи при переходе комплекса в новое структурное состояние в этом интервале  $n$ . Уменьшение частоты полосы поглощения, связанной с колебанием атома азота в третьем положении аденина, с  $1630 \text{ см}^{-1}$  до  $1626 \text{ см}^{-1}$  (рис.2,а) и уменьшение полуширины полосы поглощения при  $\nu = 1697 \text{ см}^{-1}$  внекольцевого колебания  $\text{C2O2}$  атомов тимина (рис1,б), по-видимому, связано с усилением Н-связей в водном мостике  $\text{C2O}\dots\text{H-O-H}\dots\text{N3}$ , что должно привести к более прочному связыванию адениновой и тиминовой цепей в комплексе. Существование таких мостиков подтверждается данными рентгеновской дифракции [15]. Расчет, проведенный в работе [16], показал, что уменьшение расстояния между атомами  $\text{N3}$  аденина и кислородом в связи  $\text{C2O2}$  тимина сопровождается увеличением энергии взаимодействия между противоположными цепями комплекса.

Таким образом, ИК-спектроскопические данные свидетельствуют о том, что в узком интервале  $n$  ( $10 < n < 11,5$ ) двухспиральный комплекс  $\beta\text{-B}'$ -формы  $\text{poly(dA)}\text{-poly(dT)}$  перешел в иное структурное состояние, соответствующее, по-видимому,  $\alpha\text{-B}'$ -конформации, известной из рентгеноструктурного анализа [19].

Дальнейшее увлажнение пленки вплоть до 100% ОВ не приводит к изменению спектральных параметров полос поглощения. Это говорит о том, что  $\alpha\text{-B}'$ -форма  $\text{poly(dA)}\text{-poly(dT)}$  является стабильной по отношению к дальнейшему увлажнению и, очевидно, именно в этой конформации комплекс существует в водном растворе.

Область поглощения сахарофосфатной цепи. На рис.1,а видно, что с ростом ОВ (или  $n$ ) полосы поглощения антисимметричного ( $\nu_{\text{ас}} = 1245 \text{ см}^{-1}$ ) и симметричного ( $\nu_{\text{с}} = 1096 \text{ см}^{-1}$ ) колебаний фосфатов  $\text{PO}_2^-$  и дезоксирибозы ( $\nu = 964 \text{ см}^{-1}$ ) существенным образом изменяются по частоте и интенсивности. Отметим также, что полоса поглощения антисимметричного колебания фосфатов  $\nu_{\text{ас}} = 1245 \text{ см}^{-1}$  не перекрывается другими полосами и форма ее симметрична во всем интервале ОВ. Поскольку, как хорошо известно, это колебание весьма чувствительно к конформационному состоянию дезоксирибоз в цепях нуклеиновых кислот, можно утверждать, что конформации адениновой и тиминовой сахарофосфатных цепей идентичны.

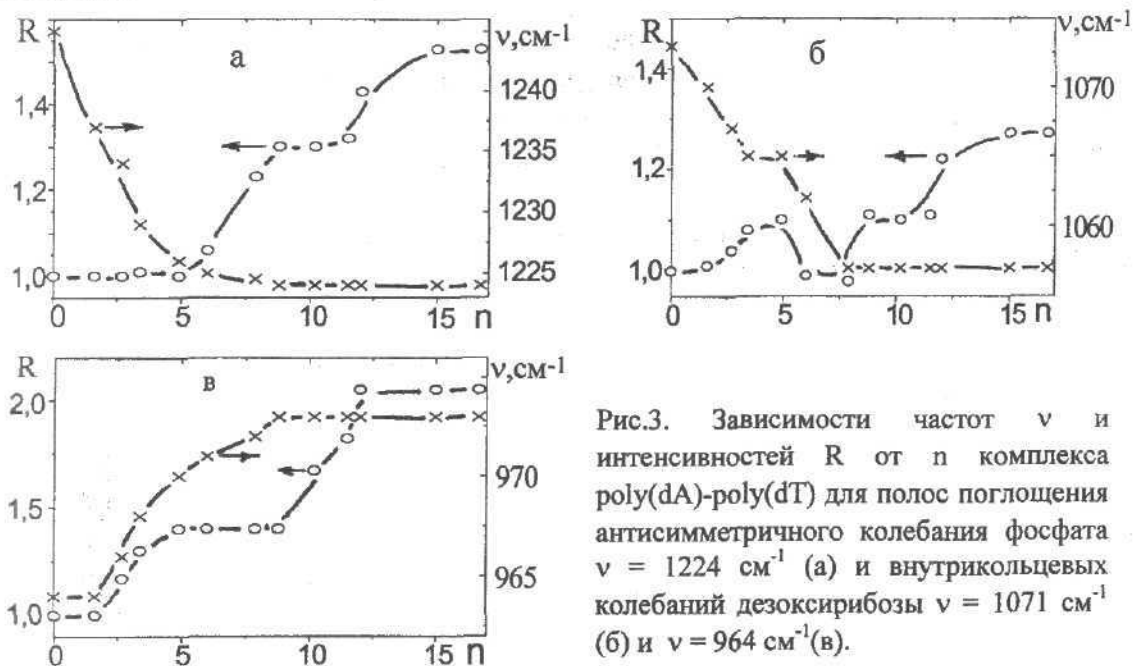


Рис.3. Зависимости частот  $\nu$  и интенсивностей  $R$  от  $n$  комплекса  $\text{poly(dA)}\text{-poly(dT)}$  для полос поглощения антисимметричного колебания фосфата  $\nu = 1224 \text{ см}^{-1}$  (а) и внутрикольцевых колебаний дезоксирибозы  $\nu = 1071 \text{ см}^{-1}$  (б) и  $\nu = 964 \text{ см}^{-1}$  (в).

Зависимости  $\nu$  и  $R$  от  $n$  для указанных полос поглощения представлены на рис.3,а-в. С ростом  $n$  до  $n = 7-8$  частота  $\nu_{as}$  уменьшается с  $1245 \text{ см}^{-1}$  до  $1224 \text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о наличии гидратации фосфатных групп комплекса. Интенсивность  $R$  в начале интервала изменения  $n$  постоянна и возрастает на 30% с середины интервала, что также говорит о гидратации  $\text{PO}_2^-$ -групп. Как и в случае полос поглощения аденина и тимина, в интервале  $7 < n \leq 11$  интенсивность  $R$  без частотного сдвига увеличивается на 20%. Это свидетельствует о том, что переход комплекса из одного структурного состояния в другое сопровождается дополнительным связыванием молекул воды фосфатными группами.

Переход в спиральную  $\beta$ -В'-конформацию в интервале  $2 < n < 8$  можно видеть на зависимости  $\nu$  от  $n$  полосы поглощения дезоксирибозы при  $1073 \text{ см}^{-1}$ . В этом интервале изменения  $n$  частота полосы уменьшается на  $\Delta\nu = 16 \text{ см}^{-1}$ , что связано с изменением конформации дезоксирибозы [17] и, по-видимому, с ее гидратацией, поскольку в этом интервале (вследствие поляризации соответствующей связи дезоксирибозного кольца) увеличивается интенсивность  $R$  на 10% (рис.3,б). Как и в случае с  $\nu_{as}$  в интервале  $7 < n \leq 11$  параметры  $\nu$  и  $R$  этой полосы не изменяются, и только при  $n > 11$  интенсивность  $R$  без частотного сдвига увеличивается на 15%, что, по всей видимости, связано с гидратацией дезоксирибозы.

Высокочастотный сдвиг другой полосы дезоксирибозы при  $\nu = 964 \text{ см}^{-1}$  в интервале  $2 < n < 8$  (рис.3,в), вероятно, также связан с переходом дезоксирибозы в другое конформационное состояние. Характер возрастания  $R$  отражает увеличение поляризации соответствующей связи при взаимодействии молекул воды с дезоксирибозой.

По «насыщению» спектральных параметров  $\nu$  и  $R$  (рис.2, рис.3) можно отметить, что степень гидратации второго структурного состояния комплекса (по-видимому,  $\beta$ -В'-конформации) находится в пределах 7-8 молекул воды на нуклеотид. Полная гидратация комплекса в структурном состоянии  $\alpha$ -В'-формы наступает при связывании 12-13 молекул воды на нуклеотид.

Таким образом, особенности, обнаруженные на зависимостях спектральных параметров полос поглощения аденина, тимина и сахарофосфатной цепи от  $n$  или ОВ, объясняются тем, что в интервалах ОВ 0-32% ( $0 < n < 2,5$ ), 32-76% ( $2,5 < n \leq 7,5$ ) и 88-100% ( $11,5 < n < 16$ ) комплекс существует в трех структурных состояниях: неупорядоченное состояние и две спиральные формы комплекса, которые на основании рентгеноструктурных исследований могут быть отнесены, соответственно, к  $\beta$ -В'-[18] и  $\alpha$ -В'-[19] спиральным формам комплекса.

Таблица 1. Резонансные частоты колебаний  $\text{C}=\text{O}$  тимина и  $\text{C6N1}$  аденина и углы наклона этих связей к оси спирали для  $\beta$ -В'- и  $\alpha$ -В'-комплексов poly(dA)-poly(dT)

| РС модель            | Связь                 | ИКС ( $\text{см}^{-1}$ ) |       | СКР ( $\text{см}^{-1}$ ) |       | Угол наклона (град) |        |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|---------------------|--------|
|                      |                       | эксп.                    | расч. | эксп.                    | расч. | рентген             | расчет |
| $\beta$ -В'<br>[18]  | $\text{C2}=\text{O}$  | 1694                     | 1693  | -                        | 1696  | 94,8                | 99,0   |
|                      | $\text{C4}=\text{O}$  | 1667                     | 1667  | -                        | 1670  | 90,0                | 86,0   |
|                      | $\text{C6}=\text{N1}$ | 1630                     | 1631  | -                        | 1634  | 91,8                | 91,8   |
| $\alpha$ -В'<br>[19] | $\text{C2}=\text{O}$  | 1697                     | 1697  | 1700                     | 1700  | 78,0                | 83,0   |
|                      | $\text{C4}=\text{O}$  | 1664                     | 1661  | 1660                     | 1660  | 75,0                | 76,0   |
|                      | $\text{C6}=\text{N1}$ | 1627                     | 1627  | 1626                     | 1625  | 97,8                | 97,8   |



Для подтверждения такого отнесения в рамках элементарной теории молекулярных экситонов [7,20] нами были рассчитаны резонансные частоты некоторых вне- и внутрикольцевых колебаний для этих спиральных структур комплекса. В табл.1 представлены результаты расчетов резонансных частот и данные ИКС и СКР, а также дано сравнение рассчитанных углов наклона соответствующих связей к оси спирали с данными рентгеноструктурных моделей.

Видно вполне удовлетворительное согласие рассчитанных резонансных частот и экспериментально наблюдаемых в ИКС и СКР. Получено также хорошее согласие рассчитанных углов наклона связей  $C2=O$ ,  $C4=O$  тимина и  $C6=N1$  аденина с соответствующими углами, полученными в рентгеноструктурных моделях. Небольшие различия объясняются тем, что фактически рассчитывался не угол наклона связи, а угол наклона соответствующего данной связи дипольного момента перехода. Таким образом, эти данные свидетельствуют о справедливости нашего отнесения обнаруженных структурных состояний изучаемого комплекса.

**ИК-спектры сорбированной воды.** Спектры воды, сорбированной на комплексе poly(dA)-poly(dT) сняты в области  $3800-2900\text{ см}^{-1}$ , где находится сложная полоса поглощения ОН-групп. Обнаружено, что максимум этой полосы поглощения с ростом  $n$  сдвигается в высокочастотную область с  $3370\text{ см}^{-1}$  до  $3410\text{ см}^{-1}$ , т.е. до максимума аналогичной полосы жидкой воды. На этом основании с использованием соотношения  $\Delta\nu \sim \Delta H$  была рассчитана избыточная энергия ( $\Delta H$ ) Н-связи вода - комплекс относительно Н-связи вода - вода. Ошибка определения  $\Delta H$  составляла не более 10%. Зависимость  $\Delta H(n)$  приведена ниже.

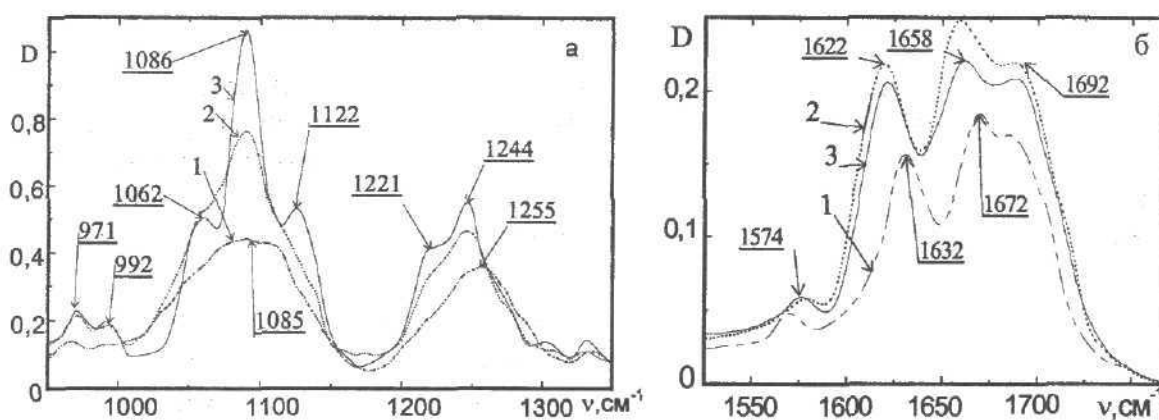


Рис.4. ИК-спектры пленок poly(rA)-poly(rU) в недеутерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 44%; 3 - 80%

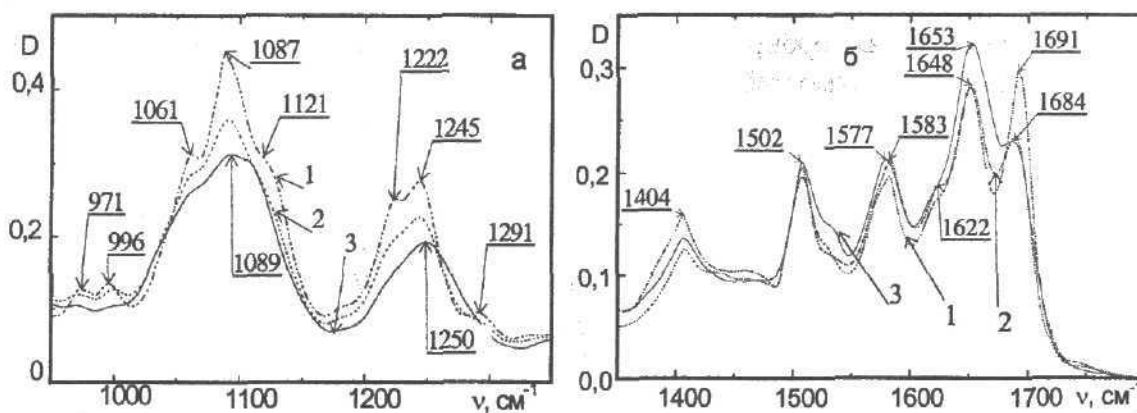


Рис.5. ИК-спектры пленок poly(rG)-poly(rC) в недеутерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 32%; 3 - 76%

На рис.4 и 5 приведены спектры полинуклеотидов poly(rA)-poly(rU) и poly(rG)-poly(rC) при различных ОВ в дейтерированном и недейтерированном состоянии. С увеличением ОВ наблюдаются значительные изменения в спектральных областях поглощения азотистых оснований ( $1800-1300\text{ см}^{-1}$ ) и сахарофосфатной цепи ( $1300-900\text{ см}^{-1}$ ). Подробный анализ зависимостей  $\nu$  и  $R$  полос поглощения от  $n$  [7,8], как и в случае рассмотренного комплекса poly(dA)-poly(dT), позволил найти интервалы  $n$  моноводяного состояния, существования А-формы РНК, а также степени их гидратации. В табл.2 приведены результаты по трем изученным комплексам.

Таблица 2. Интервалы  $n$ , соответствующие разным структурным состояниям комплексов полинуклеотидов, и степени гидратации этих комплексов

| Вещество          | Интервал $n$<br>моноводяного<br>состояния | Интервал $n$<br>А-формы РНК | Интервал $n$<br>В-формы ДНК | Степень<br>гидратации ( $n$ ) |
|-------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| poly(dA)-poly(dT) | $0 < n \leq 2$                            | -                           | $2 < n \leq 12$             | 12-13                         |
| poly(rA)-poly(rU) | $0 < n \leq 3$                            | $3 < n \leq 12$             | -                           | 12-14                         |
| poly(rG)-poly(rC) | $0 < n \leq 1,5$                          | $1,5 < n \leq 8$            | -                           | 8                             |

Видно, что связывание 2-3 молекул воды (моноводяный слой) не приводит к структурным перестройкам и только при сорбции воды  $n > 3$  полинуклеотиды претерпевают структурные переходы. Отметим также, что степень гидратации комплекса зависит от нуклеотидного состава.

#### Энергия гидратации и стабильность двухспиральных комплексов

Для определения вклада воды, Н-связей в уотсон-криковских парах и других типов взаимодействий в общую энергию стабилизации исследуемых полинуклеотидов были получены значения энергии связывания молекул воды с комплексами на различных ступенях формирования спиральных структур. Для определения избыточной энергии гидратации:

$$\Delta E_{\text{гидр}} = E_i - E_0, \quad (1)$$

где  $E_i$  - энергия связывания  $i$ -й молекулы воды с соответствующим гидратно-активным центром, а  $E_0$  - средняя энергия взаимодействия вода - вода в жидкой фазе, равная  $40,5\text{ кДж/моль}$  в пересчете на водородные связи [21] использовались три метода.

Первый из них основан на подробном анализе частотных сдвигов полосы валентного колебания сорбированной воды, другой - на анализе полученных изотерм гидратации (т.е. зависимостей  $n(p/p_0)$ ) в интервале температур  $10-40^\circ\text{C}$  (подробно см. в работах [22,23]) и нахождении теплот гидратации  $Q_e$ :

$$-Q_e/R = (\partial \ln p/p_0) / (\partial (1/T)), \quad (2)$$

Здесь  $p_0$  - давление насыщенного пара воды при соответствующей температуре,  $p$  - равновесное давление пара воды при разных температурах,  $R$  - универсальная газовая постоянная. «Чистую» теплоту гидратации  $\Delta H/\partial n$ , которая соответствует избыточной энергии гидратации  $\Delta E_{\text{гидр}}$ , определяли по формуле:

$$\Delta E_{\text{гидр}} = \Delta H/\partial n = Q_e - L, \quad (3)$$

где  $L$  - теплота испарения воды.

В третьем методе непосредственно калориметрически определяли энтальпию испарения воды из комплексов при различных влажностях образцов и находили

число испарившихся молекул воды. Из этих данных получали зависимость от  $n$  избыточной энтальпии испарения  $\Delta H(n)$  молекул воды.

Имеется удовлетворительное согласие найденных значений энергии связывания молекул воды, определенных этими тремя независимыми методами.

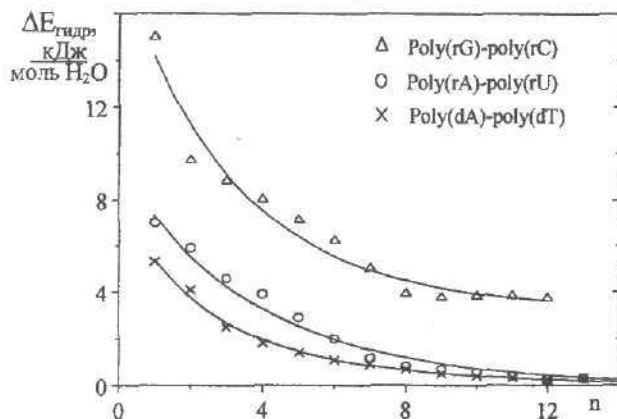


Рис.6. Зависимости избыточной энергии гидратации  $\Delta E_{\text{гидр}}$  от  $n$  для комплексов poly(rG)-poly(rC), poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT).

На рис.6 представлены усредненные зависимости от  $n$  избыточных энергий гидратации  $\Delta E_{\text{гидр}}$  для всех трех исследованных комплексов. Отметим следующие особенности на этих кривых: (1) все функции  $\Delta E_{\text{гидр}}(n)$  являются монотонно убывающими, т.е. по мере сорбции молекул воды их энергии связывания с гидратно-активными центрами уменьшаются; (2) если для первых двух комплексов зависимости  $\Delta E_{\text{гидр}}(n)$  во всем интервале изменения  $n$  почти совпадают, то для комплекса poly(rG)-poly(rC)  $\Delta E_{\text{гидр}}(n)$  проходит значительно выше, т.е. с гидратно-активными центрами этого комплекса молекулы воды образуют более прочные H-связи; (3) избыточная энергия гидратации  $\Delta E_{\text{гидр}}$  на заключительной стадии формирования гидратных оболочек у комплексов poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) стремится к нулю, в то время как для комплекса poly(rG)-poly(rC)  $\Delta E_{\text{гидр}}$  в этих условиях имеет значительную величину (3,3-3,5 кДж/моль).

На основании данных рис.6 и интервалов значений  $n$ , в которых формируется моногидратный слой воды и спиральные структуры полинуклеотидов для каждого комплекса (табл.2), найдена полная энергия гидратации, энергия гидратации моногидратного слоя и энергия гидратации молекул воды А- и В - формирующих слоев (табл.3).

Расчеты выполнены по формуле:

$$\Delta E_{\text{гидр}} = \sum_i^N n_i \Delta E_i, \quad (4)$$

где  $n_i$  - число молекул воды в гидратной оболочке с энергией связывания  $\Delta E_i$ ,  $N$  - число молекул воды в слое.

Из таблицы видно, что при переходе из неупорядоченного состояния в спиральную конформацию poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT) энтальпийные затраты на гидратацию почти одинаковы, в то время как для poly(rG)-poly(rC) соответствующая величина почти в два раза больше. Этим, по-видимому, и объясняется более высокая термостойкость комплекса poly(rG)-poly(rC) по сравнению с комплексами poly(rA)-poly(rU) и poly(dA)-poly(dT).

Таблица 3. Распределение энергий молекул воды по слоям в комплексах poly(rA)-poly(rU), poly(dA)-poly(dT) и poly(rG)-poly(rC)

| Тип гидратного слоя                   | Энергия $\Delta E_{\text{гидр}}$ на пару нуклеотидов, кДж/моль $\text{H}_2\text{O}$ |                   |                   |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                       | poly(rA)-poly(rU)                                                                   | poly(dA)-poly(dT) | poly(rG)-poly(rC) |
| Моногидратный слой                    | 34,8                                                                                | 19,2              | 32,8              |
| Гидратная вода А-формы РНК            | 25,0                                                                                | -                 | 39,2              |
| Гидратная вода $\alpha$ -В'-формы ДНК | -                                                                                   | 26,6              | -                 |
| Полная энергия гидратации             | 59,8                                                                                | 45,8              | 72,0              |

Для количественной оценки вклада гидратации в общую энергию стабилизации структуры исследуемых комплексов воспользуемся подходом, предложенным нами в [22,25] и основанном на калориметрическом определении энтальпийной составляющей свободной энергии перехода нуклеиновой кислоты  $\Delta H_{\text{перех}}$  из спирального в неупорядоченное состояние в процессе тепловой денатурации. Поскольку этот процесс сопровождается разрушением гидратного окружения, стабилизирующего вторичную структуру комплекса, разрывом водородных связей между парами оснований, а также нарушением остальных типов взаимодействий,  $\Delta H_{\text{перех}}$  может быть представлена в виде суммы трех составляющих:

$$\Delta H_{\text{перех}} = \Delta E_{\text{гидр}}^{A,B} + \Delta E_{\text{H-св}} + \Delta E_{\text{ост}}, \quad (5)$$

где  $\Delta E_{\text{гидр}}^{A,B} = \sum_{i=n_1}^{n_2} n_i \Delta E_i$  - избыточная по отношению к энергии взаимодействия «вода - вода» энергия гидратации комплекса при образовании спиральной А- или В-форм в интервале  $n$  от  $n_1$  до  $n_2$ ,  $\Delta E_{\text{H-св}} = \sum_{j=1}^{2,3} \Delta E_{\text{H-св},j}$  - избыточная энергия водородных связей в парах оснований ( $j = 2$  для А-У или А-Т пар и  $j = 3$  для G-С пар) относительно энергии водородной связи в системе «вода - вода»,  $\Delta E_{\text{ост}} = \sum_{k=1}^l \Delta E_k$  - энергия остальных типов взаимодействия.

Таблица 4. Типы энергий взаимодействия в комплексах poly(rA)-poly(rU), poly(dA)-poly(dT) и poly(rG)-poly(rC)

| Тип энергии                                                                        | Энергия на пару нуклеотидов, кДж |                   |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                                                    | poly(rA)-poly(rU)                | poly(dA)-poly(dT) | poly(rG)-poly(rC) |
| Энергия перехода спираль-клубок $\Delta H_{\text{перех}}$ (по данным калориметрии) | 34,3 [26]                        | 30,9 [27,9]       | 53,1 [28]         |
| Энергия гидратации А-формы РНК $\Delta E_{\text{гидр}}^A$                          | 25                               | -                 | 39,2              |
| Энергия гидратации В-формы ДНК $\Delta E_{\text{гидр}}^B$                          | -                                | 26,6              | -                 |
| Энергия Н-связей в парах азотистых оснований                                       | 9,3                              | 8,3               | 13,9              |

В табл.4 приведены калориметрически определенные энергии перехода спираль-клубок  $\Delta H_{\text{перех}}$  [26-28] и энергии гидратации А-формы РНК  $\Delta E_{\text{гидр}}^A$  и В-формы ДНК  $\Delta E_{\text{гидр}}^B$  (данные табл.3). Используя эти данные и энергии Н-связей в парах, ранее определенные нами и другими авторами [1, 22], из уравнения (5) находим, что



суммарная энергия других типов взаимодействий  $\Delta E_{\text{ост}}$  близка к нулю. Отметим также, что в общую энергию стабилизации спиральной структуры комплексов вклад молекул воды составляет 70-75%, а вклад Н-связей в уотсон-криковских парах - 25-30%.

### ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ РАЗЛИЧНОГО НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА

В отличие от синтетических двухспиральных комплексов природные дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) отличаются АТ/ГЦ - составом и различной нуклеотидной последовательностью, что определяет полиморфизм их двойных спиралей. Это должно отразиться на особенностях гидратного окружения и энергетике гидратации. В этом разделе статьи приводятся результаты исследования гидратации и влияние ее на стабильность природных ДНК из тимуса телят, из *Micrococcus lysodeikticus* и из *Clostridium perfringens*. Предварительные результаты сообщались ранее [10,11].

#### Ик-спектры, гидратация и структурные переходы ДНК

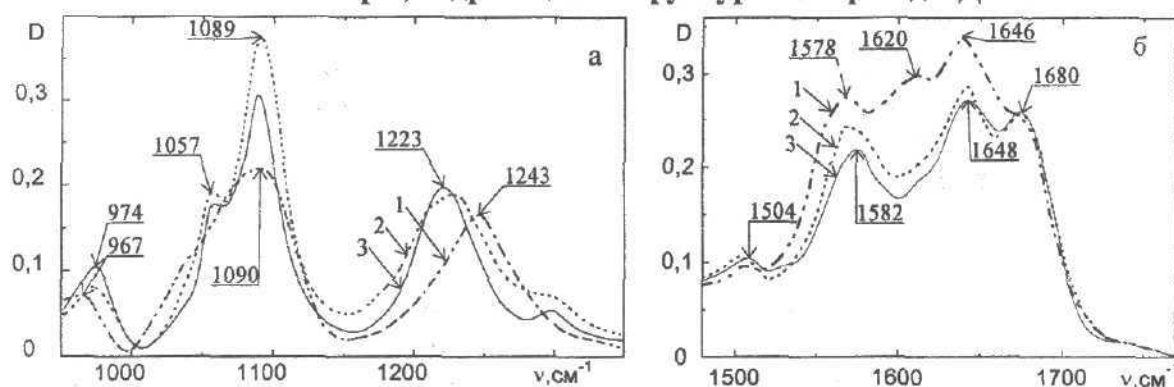


Рис.7. ИК-спектры пленок ДНК из *M. lysodeikticus* в недейтерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 0%; 2 - 80%; 3 - 90%

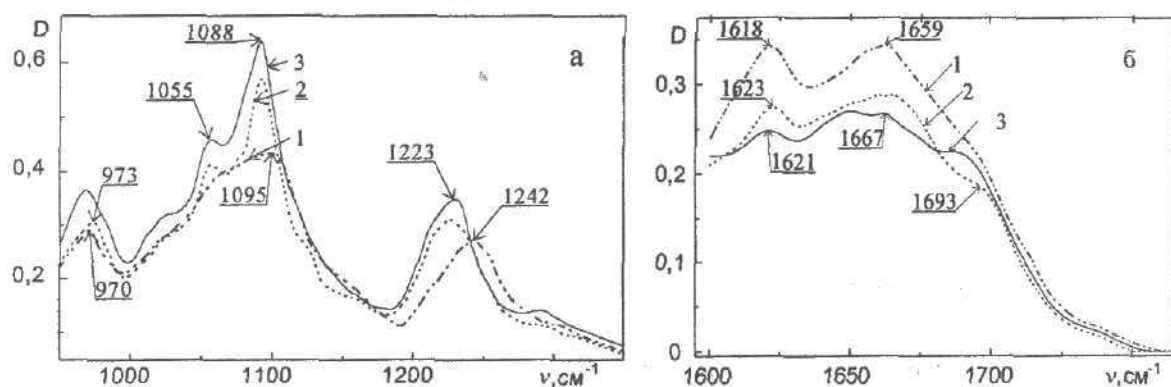


Рис.8. ИК-спектры пленок ДНК из *Cl. perfringens* в недейтерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1 - 15%; 2 - 76%; 3 - 96%

На рис.7(а,б) и 8(а,б) представлены спектры пленок ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens* при трех значениях ОВ в недейтерированном и дейтерированном состояниях. Как и в случае полинуклеотидов с ростом ОВ наблюдаются значительные изменения спектральных параметров полос поглощения азотистых оснований ( $1800-1300 \text{ см}^{-1}$ ) и сахарофосфатных цепей ( $1300-900 \text{ см}^{-1}$ ), что связано со структурными изменениями ДНК и ее гидратного окружения в процессе увлажнения пленок. Подробный анализ зависимостей  $\nu$  и  $R$  от  $p$  позволил определить области



существования моногидратного состояния, канонических А- и В-форм изученных ДНК и степени их гидратации. Соответствующие данные приведены в табл.5.

Таблица 5. Интервалы  $n$  структурного состояния различных типов ДНК и степени их гидратации

| ДНК                        | Интервал $n$<br>моногидратного<br>состояния | Интервал $n$<br>А-формы ДНК | Интервал $n$<br>В-формы ДНК | Степень<br>гидратации ( $n$ ) |
|----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| из <i>Cl. perfringens</i>  | $0 < n \leq 5$                              | $5 < n \leq 11$             | $11 < n \leq 14$            | 13-15                         |
| из тимуса телянка          | $0 < n \leq 5$                              | $5 < n \leq 13$             | $13 < n \leq 20$            | 20                            |
| из <i>M. lysodeikticus</i> | $0 < n \leq 8$                              | $8 < n \leq 13$             | $13 < n \leq 16$            | 15-17                         |

Из таблицы видно, что интервалы моногидратного состояния ДНК в 2-3 раза больше, чем у полинуклеотидов (см.табл.2), переход ДНК из А- в В-форму независимо от нуклеотидного состава осуществляется при связывании  $n > 12$  молекул воды с ДНК.

#### Энергия гидратации, энтальпия структурных переходов и стабильность ДНК различного нуклеотидного состава

Энтальпия перехода спираль - клубок ДНК в пленках и в концентрированных растворах. Ранее в работе Клумпа и Аккермана [29] и др. исследованиях [27] при низких ионных силах и нейтральных значениях pH в растворах методом микрокалориметрии обнаружена слабая зависимость энтальпии перехода ( $\Delta H_{\text{перех}}$ ) от G-C - состава ДНК. Найдено также, что энтальпия  $\Delta H_{\text{перех}}$  зависит от содержания воды в системе ДНК - вода или концентрации нуклеиновой кислоты в растворе [30]. В работе [30] показано, что величины энтальпий перехода спираль - клубок ДНК из различных источников в концентрированном растворе (для тимусной ДНК при ионной силе 0,2 М NaCl) и во влажной пленке (при содержании нуклеиновой кислоты менее 60%) практически не отличаются.

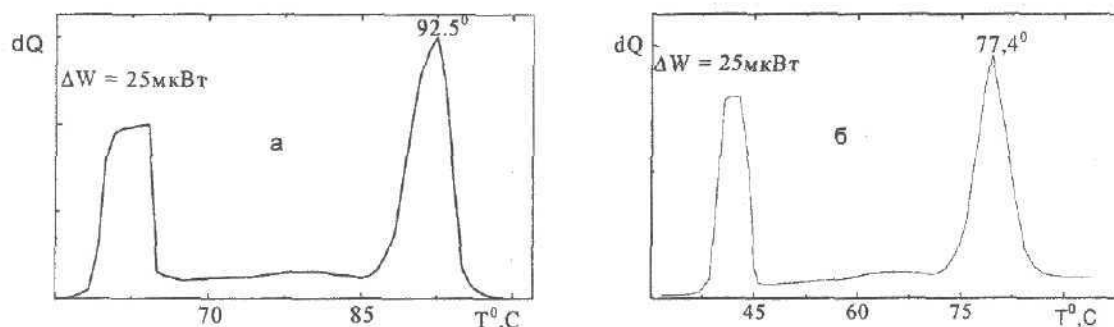


Рис.9. Кривые поглощения ДНК из *M. lysodeikticus* (а) и из *Cl. perfringens* (б) (концентрация - 0,05%, ионная сила - 0,1).

Учитывая эти результаты, мы провели калориметрическое определение энтальпии перехода ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens* в растворе с концентрацией нуклеиновой кислоты 0,05-0,1% в 0,05-0,1М растворах NaCl, т.е. в условиях, приближенных к состоянию ДНК в увлажненных пленках. На рис.9 приведены соответствующие кривые теплопоглощения ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens*. Найдено, что  $\Delta H_{\text{перех}}$  для этих типов ДНК равна 11,1 ккал и 8,7 ккал (46,4 и 36,4 кДж) на моль пар оснований, соответственно. Эти величины оказались на 10-20% больше значений  $\Delta H_{\text{перех}}$  для этих типов ДНК, приведенных в работе [29].

Учитывая, что в этой работе использовались растворы с ионной силой на порядок меньше, чем в наших исследованиях, указанные различия могут быть легко объяснены стабилизирующим действием ионов на ДНК.

Используя литературные данные [28,30] и наши результаты о значениях  $\Delta H_{\text{перех}}$  для двухспиральных комплексов и природных АТ- и GC-обогащенных ДНК в условиях влажной пленки и концентрированных растворов, мы построили зависимость  $\Delta H_{\text{перех}}$  от G-C - состава нуклеиновых кислот (рис.10). Эта зависимость (с хорошей точностью) имеет линейный характер, как и в случае растворов ДНК при низкой ионной силе.

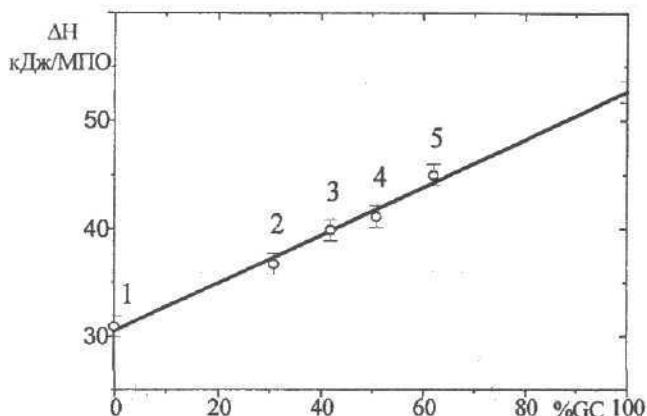


Рис.10. Зависимость энтальпии перехода спираль - клубок нуклеиновых кислот от их GC - состава:

- 1 - poly(dA)-poly(dT)
- 2 - ДНК из Cl. perfringens
- 3 - ДНК из тимуса телянка
- 4 - ДНК из E.coli
- 5 - ДНК из M. lysodeikticus

Энергетика гидратации ДНК с различным нуклеотидным составом. Как и в случае полинуклеотидных комплексов, энергию гидратации или избыточную энтальпию связывания молекул воды с исследованными образцами ДНК (из тимуса телянка [25], из M. lysodeikticus и из Cl. perfringens) определяли тремя способами.

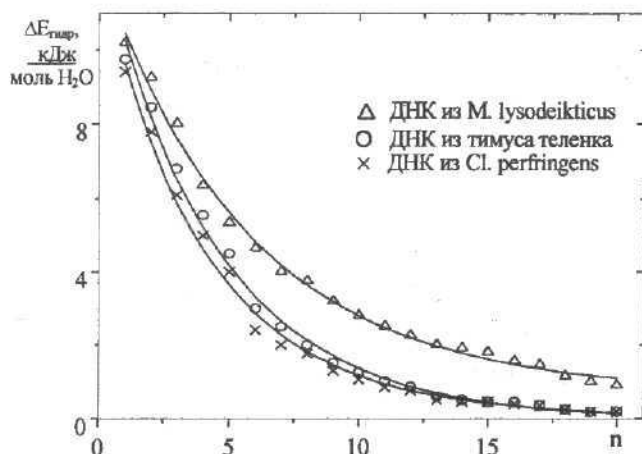


Рис.11. Зависимости избыточной энергии гидратации  $\Delta E_{\text{гидр}}$  от n для ДНК из M. lysodeikticus, из тимуса телянка и из Cl. perfringens

На рис.11 приведены зависимости избыточной энергии гидратации  $\Delta E_{\text{гидр}}$  от n для этих трех ДНК, отличающихся нуклеотидным составом. Видно, что  $\Delta E_{\text{гидр}}$  в случае ДНК из M. lysodeikticus, обогащенной G-C-парами, больше для всех значений n по сравнению с ДНК, обогащенной А-Т-парами (из Cl. perfringens), а также ДНК из тимуса телянка. При этом  $\Delta E_{\text{гидр}}$  не стремится к нулю в полностью заполненной гидратной оболочке В - формы G-C-обогащенной ДНК из M. lysodeikticus в отличие от А-Т-обогащенной ДНК. Подобный эффект обнаружен также на полинуклеотидных комплексах.

С учетом табл.5 в табл.6 приведено суммарное распределение энергий гидратации молекул воды по слоям.

Таблица 6. Распределение энергий молекул воды по гидратным слоям в ДНК с различным нуклеотидным составом

| Тип гидратного слоя        | Энергия $\Delta E_{\text{гидр}}$ на один нуклеотид, кДж/моль $\text{H}_2\text{O}$ |                                |                               |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                            | ДНК из тимуса телят                                                               | ДНК из <i>M. lysodeikticus</i> | ДНК из <i>Cl. perfringens</i> |
| Моногидратный слой         | 35,0±1,5                                                                          | 51,7±2,4                       | 33,0±1,5                      |
| Гидратная вода А-формы ДНК | 12,4±2,4                                                                          | 12,7±1,5                       | 11,4±1,8                      |
| Гидратная вода В-формы ДНК | 2,3±0,9                                                                           | 5,2±5,1                        | 2,0±0,9                       |
| Полная энергия гидратации  | 49,7±4,8                                                                          | 71,0±5,1                       | 46,4±4,2                      |

Видно, что  $\Delta E_{\text{гидр}}$  моногидратного слоя и полная  $\Delta E_{\text{гидр}}$  у G-C - обогащенной ДНК больше, чем у ДНК из тимуса телят и из *Cl. perfringens*. Можно отметить так же, что для перехода ДНК (независимо от G-C - состава) из А- в В-форму требуются незначительные затраты энергии.

Стабильность ДНК в пленках. Для оценки вклада различных стабилизирующих типов взаимодействий в ДНК исходили, как и в случае полинуклеотидных комплексов, из того факта, что при тепловом переходе спираль - неупорядоченное состояние в пленке, сопровождающимся дегидратацией, разрушается гидратная оболочка, стабилизирующая спиральную структуру ДНК [31,32], и Н-связи в уотсон-криковских парах. Что касается Н-связей в парах, то, как показано выше, энергия их неодинакова, поэтому в случае ДНК необходимо учитывать нуклеотидный состав. Это можно сделать, переписав второй член в формуле(5) так:

$$\Delta E_{\text{Н-св}} = \alpha \Delta E_{\text{Н-св}}^{\text{AT}} + (1-\alpha) \Delta E_{\text{Н-св}}^{\text{GC}}, \quad (6)$$

где  $\Delta E_{\text{Н-св}}^{\text{AT}}$  и  $\Delta E_{\text{Н-св}}^{\text{GC}}$  - избыточные энергии Н-связей в АТ- и GC - парах,  $\alpha$  и  $(1-\alpha)$  - относительные вклады АТ- и GC - пар азотистых оснований в молекулу ДНК (для ДНК из тимуса телят  $\alpha = 0,58$ ; для ДНК из *M. lysodeikticus* и из *Cl. perfringens*  $\alpha = 0,28$  и  $0,69$  соответственно).

Таблица 7. Типы энергий взаимодействия в ДНК

| Тип энергии                                                                           | Энергия на пару нуклеотидов, кДж |                               |                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                                                                                       | ДНК из тимуса телят              | ДНК из <i>Cl. perfringens</i> | ДНК из <i>M. lysodeikticus</i> |
| Энергия перехода спираль - клубок, $\Delta H_{\text{перех}}$ (по данным калориметрии) | 40,1 [32]                        | 36,4                          | 46,4                           |
| Энергия гидратации В-формы ДНК $\Delta E_{\text{гидр}}$                               | 29,4±2,4                         | 26,8±1,8                      | 35,8±1,5                       |
| Энергия Н-связей                                                                      | 10,7                             | 10,0                          | 12,3                           |
| Энергия других типов взаимодействия                                                   | 0,0                              | -0,4                          | -1,7                           |

В табл.7 приведены калориметрически определенные значения энтальпии перехода спираль - клубок (рис.10), энергии гидратации В-формы ДНК, состоящие из энергий гидратации А-формы ДНК и В-формы, энергии Н-связей, рассчитанные по формуле (6) на основании данных табл.4, и энергии других типов взаимодействий.

Обращает на себя внимание малое значение энергии других типов взаимодействия (стэкинг-взаимодействия). Возможно, что эти типы взаимодействий, рассмотренные Рейном [1] и другими авторами, не стабилизируют структуру ДНК или входят в третий член уравнения (6) с разными знаками. Из таблицы также видно, что водородные связи в парах, независимо от нуклеотидного состава изучаемых ДНК, вносят вклад до 25% в общую энергию стабилизации спиральной структуры макромолекул. Основным же стабилизирующим фактором структуры ДНК, как и в случае синтетических комплексов, являются молекулы воды гидратных оболочек.

Таким образом, полученные данные об энергетике гидратации полинуклеотидных комплексов и природных ДНК свидетельствуют о реалистичности концепции, согласно которой стабилизация спиральной структуры нуклеиновых кислот обеспечивается в основном их взаимодействием с гидратным окружением.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный нами комплексный подход к изучению особенностей гидратации НК позволил достаточно подробно изучить стадии формирования спиральных структур синтетических полинуклеотидов и природных ДНК различного нуклеотидного состава. Последовательный учет избыточной энергии гидратации при формировании структур НК выявил основные типы взаимодействий в системе НК - вода, стабилизирующие канонические А- и В-формы ДНК. Это прежде всего взаимодействие молекул воды с азотистыми основаниями и сахарофосфатной цепью НК. Суммарная энергия такого взаимодействия (вклад в общую энергию стабилизации спиральной структуры составил около 70%), как оказалось, зависит как от количества молекул воды, формирующих ту или иную структуру, так и от АТ- и GC-состава НК. Последнее нашло подтверждение в рентгеноструктурных исследованиях гидратных дуплексов, в которых установлено, что длины Н-связей в водных мостиках зависят от нуклеотидного состава [8]. Вклад энергий связей в уотсон-криковских парах в общую энергию стабилизации А- и В-формы ДНК независимо от нуклеотидного состава оказался равным 25-30%.

Однако, стэкинг-взаимодействие и другие типы взаимодействий, по нашим оценкам, заметного вклада в общую энергию стабилизации НК не вносят. С другой стороны, стэкинг-взаимодействие, существование которого не вызывает сомнения, появляется от того, что водные мостики, как это следует из рентгеноструктурных данных, сближают азотистые основания, перекрывая электронные облака сопряженных связей, до тех пор, пока силы отталкивания в межплоскостном взаимодействии не уравновесятся суммарными силами Н-связей водных мостиков. В равновесном состоянии эти силы вместе с силами Н-связей в уотсон-криковских парах формируют устойчивую структуру НК и определяют их динамические свойства.

Таким образом, вышеизложенные результаты, полученные нами различными физическими методами, и литературные данные о гидратации, структурных переходах и энергетических свойствах системы НК - переменное количество воды позволяют с определенной уверенностью утверждать, что гидратное окружение играет определяющую роль в формировании стабильных структур НК различного нуклеотидного состава и ответственно за их динамическое поведение.

Авторы выражают благодарность профессору В.Я.Малееву за обсуждение работы и ценные замечания.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rein R. Intermolecular Interactions. From Dynamics to Biopolymers (Pullman B., Ed), New York, Brisbane, Toronto, p.414-488(1978)
2. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А.// Биофизика.1993.Т.38.С.768-790
3. Eisenhaber F., Tumanian V.U. and Abagyan R.A.//Biopolymers.1990.V.30,p.563-578
4. Теплухин А.В., Журкин В.Б., Джерниган Р., Полтев В.И.// Мол.биология.1996. Т.30.С.121-135
5. Данилов В.И., Желтовский Н.В., Слюсарчук О.Н, Альдерфер Дж.Л.// Биополимеры и клетка.1997.Т.13.№1.С.46-54
6. Semenov M.A., Bolbukh T.V. and Maleev V.Ya.//J.Mol.Struct.1997.408/409,p.213-217
7. Семенов М.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я.// Биофизика.1985.Т.30.С.571-577
8. Семенов М.А., Малеев В.Я., Березняк Е.Г., Гасан А.И., Больбух Т.В.// Мол.биология. 1991.Т.25.С.1626-1634
9. Семенов М.А., Матвеев Д.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я.// Биофизика.1994.Т.39.С.628-636
- 10.Семенов М.А., Больбух Т.В., Гасан А.И.,Малеев В.Я.//Биофизика.1996.Т.41.С.1007-1015
- 11.Семенов М.А., Гасан А.И., Больбух Т.В., Малеев В.Я.//Биофизика.1997.Т.42.С.591-598
- 12.Bolbukh T.V., Starikov E.B. and Semenov M.A.// Studia Biophysika.1985.V.108,p.199-207
- 13.Gasan A.I., Maleev V.Ya. and Semenov M.A.// Studia Biophysika.1990.V.130,p.171-178
- 14.Arnott S., Chandrasekaran R., Hall I.H. and Pnigjaner L.C.// Nucleic Res.1983.V.11, p.4141-4155
- 15.Skuratovskii I.Ya. Instituto Jun March de Estudios e Investigaciones, Centro de Reuniones Internacionales Sobre Biologia, Madrid, p.91 (1991)
- 16.Chuprina V.P.// Nucl.As.Res.1987.V.15,p.293-305
- 17.Lu K.C., Prohofsky E.W. and Zandt V.// Biopolymers.1977.V.16,p.2491-2505
- 18.Alexeev D.G., Lipanov A.A. and Skuratovskii I.Ya.// Nature.1987.V.325,p.821-823
- 19.Park H., Arnott S., Chandrasekaran R. and Millane R.P.//J.Mol.Biol.1987.V.325,p.513-523
- 20.Semenov M.A. and Bolbukh T.V.// Studia Biophysika.1984.V.102,p.215-220
- 21.Иогансен А.В., Розенберг М.Ш.//Опт.спектрос.1978.Т.44.С.87-92
- 22.Семенов М.А. Дисс.докт.физ.-мат.наук, М. МГУ, 1990
- 23.Bolbukh T.V., Semenov M.A., Starikov E.B. and Maleev V.Ya. Proc.Third European Conference on Spectr.Biol.Mol., Boogna, Italy, p.185-188(1989)
- 24.Saenger W., Hunter W.N. and Kennard O.// Nature.1986.V.324,p.385-388
- 25.Семенов М.А., Малеев В.Я.// Биофизика.1986.Т.31.С.764-767
- 26.Neumann E. and Ackermann Th.// J.Phys.Chem.1969.V.73,p.2170-2172
- 27.Хинц Г.И. Биохимическая термодинамика, под ред.М.Джоунс. М. Мир, 1982. 440 с.
- 28.Зайцев М.А., Филимонов В.В.//Биофизика.1990.Т.35.С.53-57
- 29.Klump H. and Ackermann T.//Biopolymers.1971.V.10,p.513-522
- 30.Андроникашвили А.Л., Мгеладзе Г.Н., Меноселидзе Д.Р. 6-я Всесоюзная конференция по калориметрии. Тбилиси.1973.С.496-500
- 31.Сухоруков Б.И., Семенов М.А., Малеев В.Я., Шабарчина Л.И.// Биофизика.1979. Т.24. С.611-619
- 32.Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Шабарчина Л.И.// Биофизика.1979:Т24. С.210-216



## ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ СПИРАЛЬ-КЛУБОК В ДУПЛЕКСНЫХ И ТРИПЛЕКСНЫХ КОМПЛЕКСАХ ОЛИГОАДЕНИЛАТА С ОЛИГОТИМИДИЛАТОМ. ВЛИЯНИЕ КОВАЛЕНТНО ПРИСОЕДИНЕННОГО КРАСИТЕЛЯ

Ю.П. Благой, В.Н. Зозуля, А.С. Щербакова

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

Поступила в редакцию 21 мая 1998 г.

Проведен термодинамический анализ переходов спираль-клубок комплексов олигонуклеотидов  $(dA)_{15}$  с  $(dT)_{10}$  и  $(dT)_{12}$ , а также с олиготимидилатом, модифицированным интеркалирующим красителем феназином. При соотношениях нитей 1:1 и 1:2 и значениях  $\mu = 0.11$  и 1 с помощью модели «двух состояний» и модифицированной модели «застежка-молния» рассчитаны термодинамические параметры переходов  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta G$  и константы равновесия для дуплексных и триплексных структур. Обнаружено отклонение экспериментальных зависимостей от модели «двух состояний» для дуплексов с ковалентно присоединенным феназином. Этот эффект интерпретируется как результат влияния примесного триплексного состояния. С помощью расчетов по модели «застежка-молния» установлено, что концевые группы комплексов находятся в частично разупорядоченном состоянии, степень которого возрастает с повышением температуры. Показано, что укрепление обоих типов комплексов за счет присоединения красителя может быть учтено путем умножения константы связывания комплекса на константу присоединения красителя к комплементарной структуре.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** дуплексные и триплексные комплексы олигонуклеотидов, переход спираль-клубок, стабилизация комплексов красителем, модельные теории переходов.

В последнее время большое внимание привлекают исследования дуплексов и триплексов олигонуклеотидов в связи с их важными биологическими функциями [1,2]. Обычно исследуются комплексы, образованные комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми олигонуклеотидами за счет уотсон-криковских и хугстиновских связей. Наиболее простыми структурами такого рода являются гомоолигонуклеотидные дуплексы и триплексы, например,  $(dA)_n \cdot (dT)_n$ . Такие комплексы с  $n=10$  и  $n=19$  исследовались в работах [3-6] при различных условиях, обеспечивающих термическую устойчивость этих структур и моделирующих условия в живой клетке. Стабилизация таких комплексов может осуществляться, в частности, с помощью ковалентного присоединения к одному или двум концам олигов интеркалирующих красителей [7-9].

Обычно присоединение осуществляется с помощью полиметиленового линкера к терминальным фосфатным группам олигонуклеотидов. Однако возможны и другие способы присоединения. В предыдущей работе [10] было исследовано укрепление дуплексов и триплексов, образованных олиго $(dA)_{15}$  и олиго $(dT)_{10}$  за счет

присоединения к 3'-концу олиго(dT)<sub>10</sub> нуклеозидного производного интеркалирующего красителя имидазофеназина (Ph). Методом термической денатурации с использованием УФ-спектроскопии и флуоресценции показано повышение температуры перехода в разупорядоченное состояние для дуплексов на ~10<sup>0</sup> С и для триплексов на (15-20)<sup>0</sup> С при  $\mu=0,1$  и 1. Таким образом, установлено существенное увеличение стабильности этих структур при условиях, близких к физиологическим.

В связи с этим было интересно провести термодинамический анализ процесса образования изученных структур на основе существующих модельных представлений и выявить факторы, обеспечивающие их стабильность. В настоящей работе такой анализ выполнен на основе простой модели «двух состояний» («все или ничего»), а также с использованием так называемой модели «застежка- молния» [11, 12]. В рамках этой модели были получены модифицированные уравнения для описания дуплексов и триплексов, укрепленных «скрепкой» и без нее. Проведено сравнение экспериментальных и расчетных данных. Следует отметить, что, несмотря на кажущуюся простоту изученных комплексов, процесс их образования усложнен возможностью относительного сдвига (проскальзывания) олигонуклеотидов, а также тем, что при распаде комплексов нити олиго(dA)<sub>15</sub> находятся в частично упорядоченном состоянии, причем степень упорядочения зависит от температуры. Эти эффекты учитываются в проведенном анализе.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез немодифицированных и модифицированных олигонуклеотидов был выполнен в институте Биоорганической химии и Нефтехимии НАН Украины [10].

Во всех экспериментах в качестве растворителя использовали 10 mM Na-какодилатный буфер, pH 7, содержащий 0.5 mM EDTA, приготовленный на деионизованной дистиллированной воде. Исследования проводили при ионной силе раствора  $\mu = 0.1$  и/или  $\mu = 1$  (для создания ионной силы добавляли NaCl). Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты молярной экстинкции (M<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>): 9800 при  $\lambda=257$  нм для олиго(dA)<sub>15</sub>, 8600 при  $\lambda=266$  нм для олиго(dT)<sub>10</sub> и олиго(dT)<sub>12</sub> (при 21-23<sup>0</sup>С) [10]. Концентрацию олиго(dT)<sub>10</sub>Ph рассчитывали по поглощению феназинового остатка в видимой области спектров поглощения [10].

Профили термической денатурации получены путем регистрации температурных зависимостей УФ-поглощения нуклеотидов. Абсорбционные кривые плавления были определены на спектрофотометре SPECORD UV VIS (Jena, ФРГ), подключенном к персональному компьютеру для сбора данных. Поглощение измеряли в специальной кварцевой кювете (объем 60 микролитров, длина оптического пути 0.2 см). Кювета вставлялась в медный держатель, температура которого изменялась с помощью элемента Пелтье, управляемого компьютером. Измерения выполняли в основном при скорости нагрева 0.5<sup>0</sup>С/мин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование (dA)<sub>15</sub> с (dT)<sub>10</sub> и (dT)<sub>10</sub>Ph было исследовано в растворах с молярным соотношением нитей 1:1 и 1:2 при двух значениях  $\mu = 0.1$  и 1. Также изучено образование комплексов между (dA)<sub>15</sub> и (dT)<sub>12</sub> с молярным соотношением нитей 1:1. Концентрация нитей (dA)<sub>15</sub> во всех случаях составляла 7 мМ. Кривые плавления вышеуказанных комплексов были получены по изменению

поглощения при  $\lambda=260$  нм и  $\lambda=284$  нм [10]. Температурная зависимость доли разупорядоченных АТ-пар,  $1-\theta$ , для комплексов  $(dA)_{15}(dT)_{10}$  и  $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$  представлена на Рис.1. Значения,  $1-\theta$ , были рассчитаны из кривых плавления при  $\lambda=260$  нм по стандартной методике, используя линейные базовые линии.

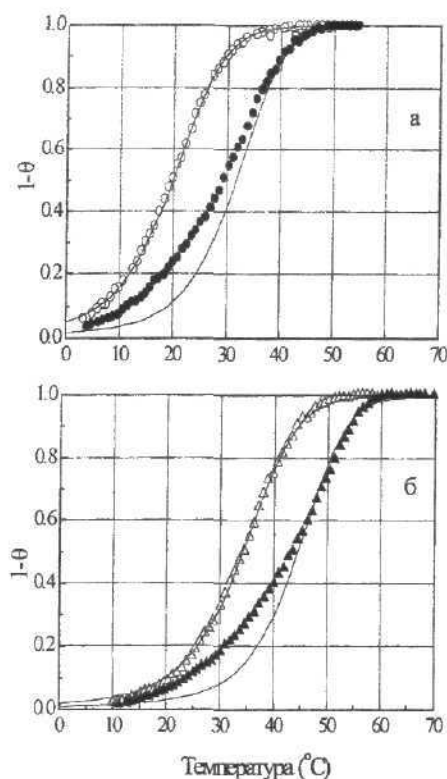


Рис.1 Температурная зависимость доли разупорядоченных АТ-пар в комплексах  $(dA)_{15}(dT)_{10}$  (○, Δ) и  $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$  (●, ▲); (а)  $\mu=0.1$ , (б)  $\mu=1$ . Плавление проводилось при  $\lambda=260$  нм. Здесь и далее точки-экспериментальные данные, сплошные кривые- расчет по модели «застежка-молния»

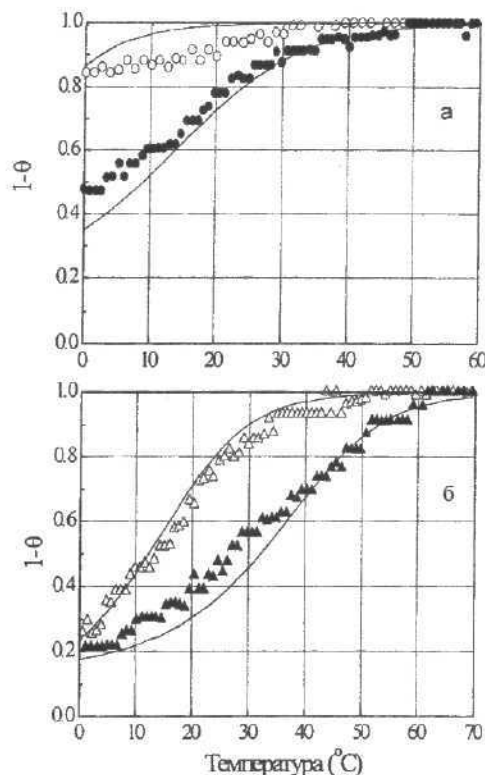


Рис.2 Температурная зависимость доли разупорядоченных хугстинговских пар в комплексах  $(dA)_{15}2(dT)_{10}$  (○, Δ) и  $(dA)_{15}2(dT)_{10}Ph$  (●, ▲), (а)  $\mu=0.1$ , (б)  $\mu=1$ . Плавление проводилось при  $\lambda=284$  нм.

С целью выявления триплексных формирований в комплексах  $(dA)_{15}2(dT)_{10}$  и  $(dA)_{15}2(dT)_{10}Ph$  плавление проводилось при  $\lambda=284$  нм. Результаты приведены на Рис.2 в виде температурной зависимости доли разупорядоченных тройных цепей. Данные, приведенные на Рис.2, отчетливо показывают формирование триплексов, в особенности для систем  $(dA)_{15}2(dT)_{10}Ph$ . Однако и при молярном соотношении нитей 1:1 наблюдается небольшое содержание триплексов для системы с феназином (данные приведены в [10]). Как видно из Рис.1 и 2, ковалентно присоединенный к олиготимидилату, Ph повышает температуру плавления дуплексных и триплексных комплексов с  $(dA)_{15}$  как при  $\mu = 0.1$ , так и при  $\mu = 1$ . Увеличение длины цепи олиготимидилата на 2 нуклеотида приводит к повышению температуры перехода на  $\sim 17$  °C (Рис.3).

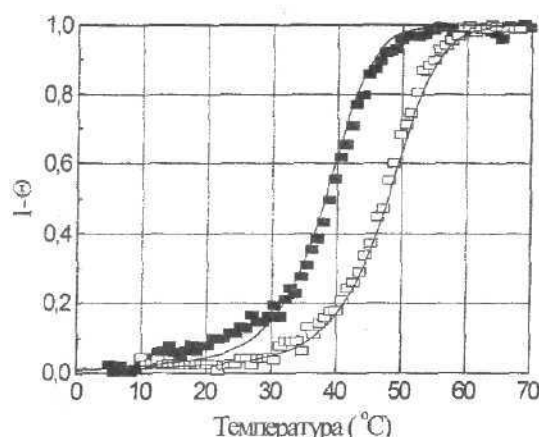


Рис.3 Кривые переходов спираль-клубок в комплексах  $(dA)_{15}(dT)_{12}$  при  $\mu=0.1$  (■) и при  $\mu=1$  (□) (из данных по плавлению при  $\lambda=260$  нм).

Модель «двух состояний» («все или ничего») позволяет наиболее просто выполнить термодинамический анализ равновесий в данных системах. В растворе изучаемые олигонуклеотиды могут находиться в трех состояниях: 1) одиночные нити двух типов в разупорядоченной форме; 2) в виде дуплексов; 3) в триплексной форме. В приближении данной модели равновесие между ними можно описать двумя уравнениями:

$$K_{1-2} \cdot c = f_d / \left[ (1 - f_d - f_t) \cdot (n - f_d - 2f_t) \right] \quad (1)$$

$$K_{2-3} \cdot c = f_t / \left[ f_d \cdot (n - f_d - 2f_t) \right] \quad (2)$$

где  $c$  - полная концентрация олигов;  $f_d$  и  $f_t$  - доли дуплексов и триплексов, соответственно.

При незначительном вкладе триплексов уравнение (1) позволяет легко определить константу  $K_{1-2}$  по измеренной доле дуплексных состояний:

$K_{1-2} = f_d / [(1 - f_d)^2 c]$  и построить кривую перехода  $1 - \Theta = f(T)$ . Термодинамические параметры связывания  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  могут быть рассчитаны по известным формулам

$$\Delta G = R \cdot T_m \cdot \ln(2 / c) \quad (3)$$

$$\Delta H = 6 \cdot R \cdot T_m^2 \cdot (\partial \Theta / \partial T)_{T_m} \quad (4)$$

$$\Delta S = (\Delta G - \Delta H) / T_m \quad (5)$$

где  $c$  - полная концентрация нитей,  $T_m$  - температура средней точки перехода

При этом обычно величины  $\Delta H$  и  $\Delta S$  предполагаются постоянными, не зависящими от температуры. Энтальпия перехода  $\Delta H$  может быть вычислена также из зависимости Вант-Гоффа  $\ln K_{1-2} = f(1000/T)$ . Отклонения от линейного характера этой зависимости свидетельствуют о появлении третьей структуры (фазы) и/или о зависимости  $\Delta H$  и  $\Delta S$  от температуры.

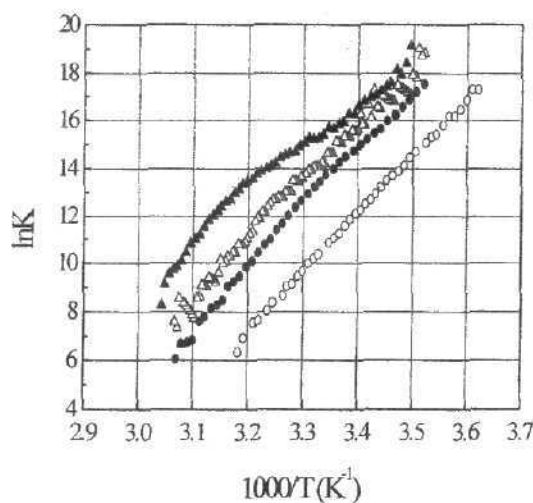


Рис.4 Зависимость Вант-Гоффа для комплексов  $(dA)_{15}(dT)_{10}$  и  $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$ . Использовали данные и обозначения Рис. 1.

Представленные на Рис. 1 и 3 кривые перехода для систем  $(dA)_{15}(dT)_{10}$  и  $(dA)_{15}(dT)_{12}$  имеют правильную S-образную форму, характерную для чисто дуплексных структур. Но для систем с феназином (рис. 1) это правило не выполняется - кривые плавления, имеют более пологие низкотемпературные участки. Для них также наблюдается отклонения от линейности зависимостей Вант-Гоффа (Рис. 4). Эти особенности могут быть обусловлены наличием триплексных состояний.

При известных константах связывания  $K_{1-2}$  и  $K_{2-3}$  можно рассчитать доли дуплексов ( $f_d$ ) и триплексов ( $f_t$ ) для комплексов с молярным соотношением нитей 1:1. Приближенную оценку  $f_t/f_d$  можно сделать также, разделив почленно уравнение (2) на (1).

При этом получим

$$f_t / f_d = (K_{2-3} / K_{1-2}) \cdot [f_d / (1 - f_d - f_t)] \quad (6)$$

При высокой температуре, когда  $f_d \ll 1$ , отношение  $f_t / f_d \rightarrow 0$ , то есть вклад триплексов невелик. Легко показать, что для эквимольных растворов олигонуклеотидов величина  $1 - f_d - f_t \rightarrow f_t$  при низкой температуре и, так как при этом отношение констант резко уменьшается, происходит также значительное снижение  $f_t / f_d$ . Таким образом, только в области перехода, соответствующей нижней части кривых плавления, доля триплексных структур может быть существенной. Оценки вклада триплексов в общую долю упорядоченных структур дали величины в пределах 10-12%, что сравнимо с наблюдаемой величиной отклонений от кривых переходов, характерных для дуплексов.

В таблице 1. приведены рассчитанные по формулам (3-5) с использованием данных, приведенных на Рис.(1-3), значения термодинамических параметров  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  для переходов в изученных комплексах. При этом для триплексов предполагалось, что дуплексы вполне сформированы.

Очевидно, что при использовании модели «двух состояний» не учитываются частично разупорядоченные состояния, а рассчитанные термодинамические величины усреднены и являются в значительной мере эффективными величинами, не отражая истинного вклада различных составляющих взаимодействий и структуры



комплекса. Для сравнения в Таблице 1. приведены (в скобках) значения термодинамических величин, рассчитанные по линейным участкам зависимостей Вант-Гоффа. Полученные при этом данные незначительно отличаются от рассчитанных по средней точке кривых перехода.

Таблица 1. Термодинамические характеристики комплексов, рассчитанные по модели «двух состояний»

| Система                       | Тип комплекса, соотношение олигонуклеотидов | $\mu$ | $t_m$ , °C   | $-\Delta H$ , ккал/моль нитей | $-\Delta S$ , кал/моль нитей К | $-\Delta G_{T_m}$ , ккал/моль нитей |
|-------------------------------|---------------------------------------------|-------|--------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}$   | дуплексы, 1:1                               | 0.1   | 19.7         | 49 (48.5)                     | 142 (141)                      | 7.4                                 |
|                               |                                             | 1.0   | 34.8         | 60 (60.2)                     | 169 (164)                      | 7.85                                |
|                               | триплексы, 1:2                              | 0.1   | -            | -                             | -                              | -                                   |
|                               |                                             | 1.0   | $\approx 14$ | 21                            | -                              | -                                   |
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{12}$   | дуплексы, 1:1                               | 0.1   | 38           | 79                            | 229                            | 7.8                                 |
|                               |                                             | 1.0   | 47.5         | 92                            | 265                            | 8.05                                |
| $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}Ph$ | дуплексы, 1:1                               | 0.1   | 29           | 56 (56.3)                     | 160 (160)                      | 7.7                                 |
|                               |                                             | 1.0   | 44           | 65 (69.1)                     | 180 (193)                      | 8.1                                 |
|                               | триплексы, 1:2                              | 0.1   | $\approx 12$ | 20                            | -                              | -                                   |
|                               |                                             | 1.0   | $\approx 33$ | 26                            | -                              | -                                   |

Анализ данных, приведенных в Таблице 1., показывает, что энтальпия переходов возрастает при увеличении ионной силы, числа мономеров в цепи, а также при присоединении красителя. Изменения  $\Delta S$  и  $\Delta G$  не столь значительны. Кроме того, эти значения удовлетворительно согласуются с данными работ [4,6], полученными для  $n=10$  и 19.

Более полную информацию о свойствах и структуре комплексов можно получить применяя модель «застежка-молния». Эта модель была разработана еще в шестидесятых годах Эпплквином и Дамлом [11,12]. С использованием модели Изинга, предложенной для нуклеиновых кислот Зиммом [13], были получены уравнения для перехода спираль-клубок в дуплексах олигонуклеотидов в двух приближениях: 1) с возможностью относительного смещения цепочек в дуплексе («staggering zipper») и 2) без смещения («nonstaggering zipper»).

Применение теории для описания дуплексов, образованных самокомплементарными полупротонированными олигоаденилатами, дало удовлетворительные результаты и позволило установить зависимость параметров перехода от термодинамических характеристик оснований [12].

На основе предложенной модели можно получить модифицированные уравнения для переходов спираль-клубок в дуплексных и триплексных комплексах олигонуклеотидов с присоединенным лигандом («скрепкой») и без него.

При образовании дуплексов с числом мономеров в цепях  $N_1$  и  $N_2$  (Рис. 5) число различных микросостояний с  $n$  связанными парами равно  $(N_1 - n + 1)(N_2 - n + 1)$ , а константа  $K_{1-2}$  определяется в соответствии с моделью выражениями (7, 8)

$$K_{1-2} = \beta \cdot \sum_{n=1}^{N_1} (N_1 - n + 1) \cdot (N_2 - n + 1) \cdot s^n = \beta L(s) \quad (7)$$

где параметр  $\beta$  - так называемый «фактор ассоциации», а  $s$  - константа присоединения новой пары к упорядоченному участку дуплекса [12,13].

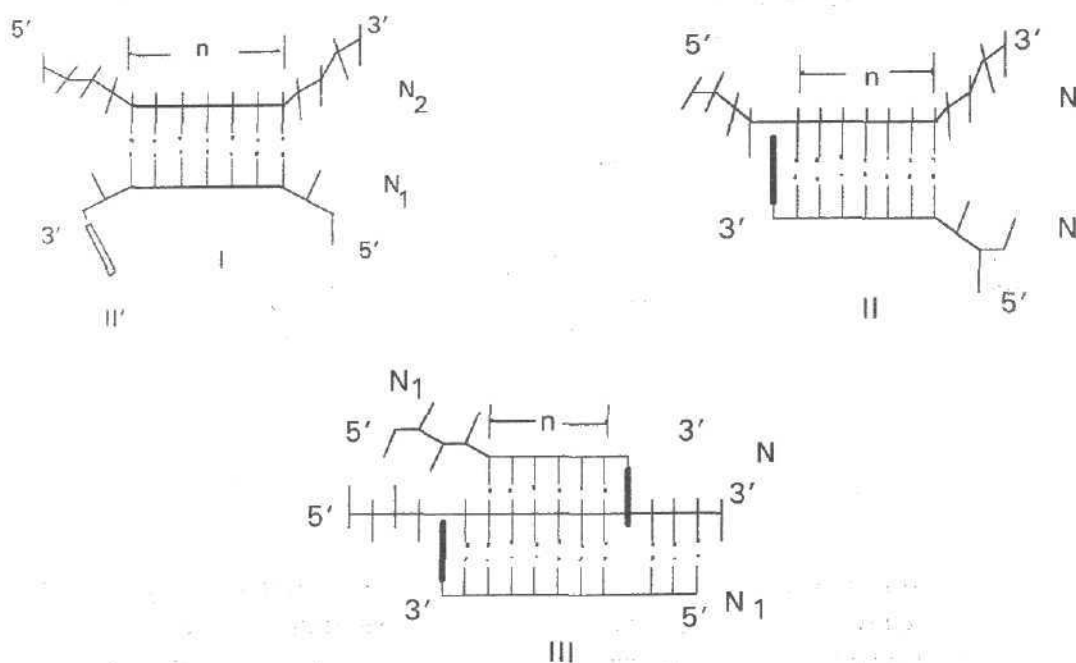


Рис.5 Схема дуплексных (I, II и II') и триплексных комплексов (III), образованных олиго(dA)<sub>15</sub> с олиго(dT)<sub>10</sub> (I) и олиго(dT)<sub>10</sub>Ph (II, II', III). Число мономеров в цепях N<sub>1</sub>=10, N<sub>2</sub>=15; число связанных пар - n. Уотсон-криковские (:), Хугстинговские (•) пары оснований.

$$\ln s = (\Delta S_s / R) - (\Delta H_s / RT) \quad (8)$$

где  $\Delta H_s$  и  $\Delta S_s$  - изменения энтальпии и энтропии в данном процессе, то есть разности этих величин для упорядоченного и разупорядоченного состояний. Доля спаренных нуклеотидов ( $\theta$ ) в соответствии с [12] может быть записана в виде

$$\theta = \left\{ s \left( 1 + 4\gamma L(s) - \left[ 1 + 8\gamma L(s)^{1/2} \right] \right) L'(s) \right\} / (4\gamma N_1 L(s)) \quad (9)$$

где параметр  $\gamma = \beta c$ , а  $c$  - полная концентрация нитей в растворе. Модель позволяет рассчитать также долю полностью разделенных нитей ( $n=0$ )

$$\theta_0 = \left\{ (1 + 8\gamma L(s))^{1/2} - 1 \right\} / (4\gamma L(s)) \quad (10)$$

и распределение дуплексов по длинам упорядоченных участков.

$$\theta_n = 2\gamma\theta_0^2 (N_1 - n + 1)(N_2 - n + 1)s^n \quad (11)$$

С помощью этих выражений можно оценить вклад разупорядочения концевых участков (так называемое «растрепывание концов») в общую долю разделенных пар.

Ковалентное присоединение красителя к одному из концов олигонуклеотида повышает константу  $K_{1-2}$ , что может быть учтено введением константы стабильности ( $s_{ph}$ ) для красителя

$$s_{ph} = \exp \left\{ \left( -\Delta H_{ph} + T\Delta S_{ph} \right) / RT \right\} \quad (12)$$

где  $\Delta H_{ph}$  и  $\Delta S_{ph}$  - изменения энтальпии и энтропии при интеркалировании красителя между основаниями противоположной цепи. Как следует из Рис. 5, это дает дополнительные связи олигонуклеотидов, учет числа микросостояний которых приводит к выражению для констант связывания  $K_{1-2}$ .

$$K'_{1-2} = \beta \sum_{n=1}^{N_1} \left\{ s_{ph} (N_2 - n) + (N_1 - n + 1)(N_2 - n + 1) \right\} s^n \quad (13)$$

В этой формуле учитываются микросостояния двух типов: 1) дуплексы со связанным красителем (II) и 2) дуплексы, в которых краситель не интеркалирован (II'). В последнем случае, очевидно, заселенность состояний такова же, как и для олигов без красителя (см. формулу (7)). Число микросостояний первого типа, как видно из формулы (13), меньше, однако при  $s_{ph} \gg s$  они могут давать основной вклад в величину  $K_{1-2}$ .

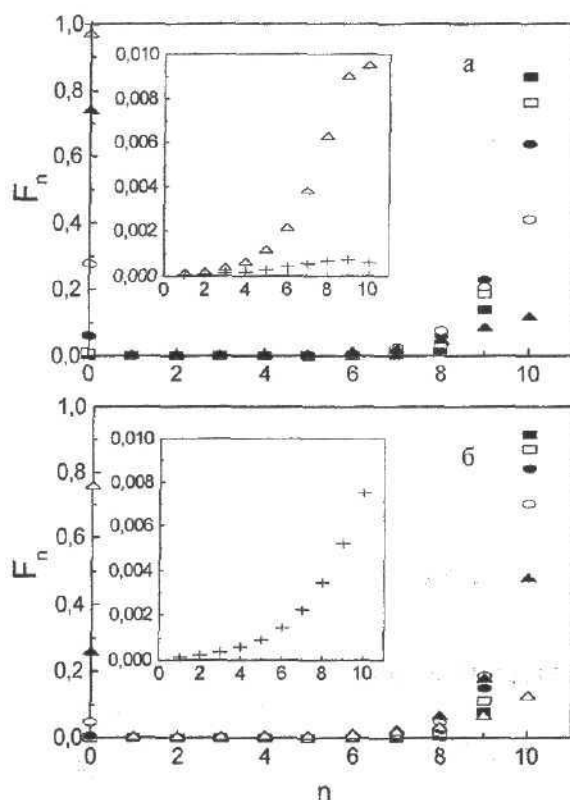


Рис.6 Популяционный анализ для модели «застежка-молния» для дуплексных систем (а)  $(dA)_{15}(dT)_{10}$  и (б)  $(dA)_{15}(dT)_{10}Ph$  при  $\mu=1$ . Распределение (■) соответствует  $0^\circ C$ , (□) -  $10^\circ C$ , (●) -  $20^\circ C$ , (○) -  $30^\circ C$ , (▲) -  $40^\circ C$ , (Δ) -  $50^\circ C$ , (+) -  $60^\circ C$

Модель «застежка-молния» может быть использована также для описания образования триплексов, если рассматривать этот процесс как реакцию присоединения третьей нити к уже сформированному дуплексу. Для олигов без красителя такой подход позволяет использовать для расчетов  $K_{2-3}$  формулу, аналогичную (7), но при  $N_2 = N_1$ , так как длины дуплексов и триплексов одинаковы. В этом случае  $K_{2-3}$  является константой равновесия для присоединения мономера третьей цепи к дуплексу. В данном случае это присоединение тимина к аденину дуплекса с образованием хугстиновской структуры.

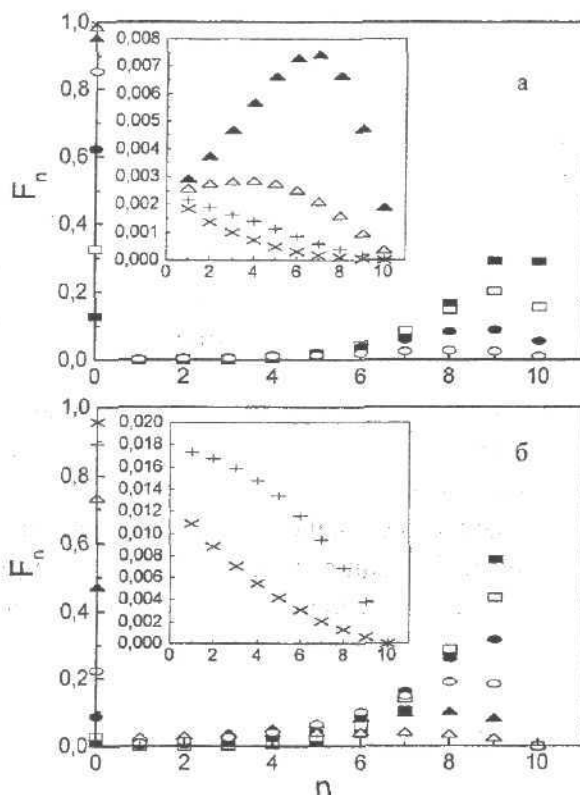


Рис. 7 Популяционный анализ для модели «застежка-молния» для триплексных систем (а)  $(dA)_{15} 2(dT)_{10}$  и (б)  $(dA)_{15} 2(dT)_{10} Ph$  при  $\mu=1$ . Распределение (■) соответствует 0 °C, (□) - 10 °C, (●) - 20 °C, (○) - 30 °C, (▲) - 40 °C, (Δ) - 50 °C, (+) - 60 °C, x - 70 °C

Для олиго $(dT)_{10}$  с присоединенными к 3'-концу «скрепками» (красителями) возможная структура триплекса показана на Рис. 5. При этом учитывается, что нить, образующая хугстиновские связи, присоединена параллельно олиго $(dA)_{15}$ , в отличие от уотсон-криковского антипараллельного расположения, и, кроме того, предполагается, что дуплекс полностью сформирован, краситель в дуплексе интеркалирует между аденинами, а краситель третьей (хугстиновской) нити встраивается между уотсон-криковскими парами. Очевидно, возможны состояния, в которых краситель третьей нити свободен (не интеркалирован), но их вклад в общую термодинамику комплексов незначителен. С учетом сделанных предположений выражение для константы связывания триплекса имеет вид

$$K'_{2-3} = \beta \sum_{n=1}^{N_1} \left\{ s_{ph} (N_1 - n) + (N_1 - n + 1)^2 \right\} s^n \quad (14)$$

Как видно, во всех случаях в расчетные формулы входит ряд неизвестных величин, которые при сравнении с опытом могут быть подгоночными параметрами ( $\gamma$ ,  $\Delta H_s$ ,  $\Delta S_s$ ), что может снижать значимость экспериментальной проверки теории. В связи с этим для ограничения произвола в выборе параметров и большей однозначности при расчетах использовались дополнительные условия, следующие из физического смысла рассматриваемых величин. Параметр ассоциации  $\beta$  ( $\gamma = \beta s$ ) фактически определяется проигрышем в энтропии при объединении двух цепей. Поэтому его величина должна зависеть от длины цепи, что было установлено в [12]. Кроме того, очевидно, что проигрыш в энтропии будет меньше в случае, когда одна нить упорядочена. С учетом этого для дуплексов при расчетах использовалось значение  $\gamma = 10^{-7}$ , близкое к полученному в [12], а при описании триплексов -  $\gamma = 10^{-5}$ , полученное из условий наилучшей подгонки. В соответствии с предпосылками модели Изинга на величины  $\Delta H_s$  и  $\Delta S_s$  налагалось условие  $\Delta H_s / \Delta S_s = T_p$  (где  $T_p$  - температура перехода в полимерной молекуле), что исключало один подгоночный параметр ( $\Delta S_s$ ). Величины  $T_p$  были заимствованы из работ [14-16]. Таким образом, в случае отсутствия «скрепки» остается два подгоночных параметра ( $\Delta H_s$  и  $\gamma$ ), и можно использовать две экспериментальные величины для однозначности подгонки: температуру средней точки перехода и наклон кривой перехода в этой точке. Фактически в работе варьировался только один параметр  $\Delta H_s$ , величину которого можно сравнить с экспериментальными данными.

Для  $s_{ph}$  использовали экспериментально определенные ранее [17] величины констант связывания свободного феназина с поли(dA) и поли(dA)поли(dT). Для удобства расчетов и учета температурной зависимости этих констант выражение (12) преобразовалось к виду

$$s_{ph} = s_{ph}^0 \exp\{-\alpha(T - 273)\} \quad (15)$$

где  $\alpha = \Delta H_{ph} / RT_0 T_m$ , а  $s_{ph}^0$  - значение константы  $s_{ph}$  при  $0^\circ\text{C}$ ,  $T_0 = 273\text{ K}$ .

Рассчитанные по формулам (7)-(9) кривые перехода для дуплексов представлены на Рис. 1 и 2 сплошными линиями. Использованные при этом параметры приведены в Таблице 2.

Интересно сопоставить полученные значения  $\Delta H_s$  с величиной  $\Delta H$  для перехода спираль-клубок в полимерных молекулах. К сожалению, в известной нам литературе отсутствуют данные о температурной зависимости энтальпии плавления поли(dA)поли(dT). В работе [16] методом ДСК получили значения  $\Delta H = 8.3$  ккал/моль, не зависящее от концентрации  $\text{Na}^+$ , что является удивительным. Это значение можно считать верхним пределом для  $\Delta H_s$  при высоких концентрациях  $\text{Na}^+$ . Можно сравнить изменение  $\Delta H_s$  с температурной зависимостью энтальпии для систем поли(А)поли(У). В интервале температур 300-330 К величина  $\Delta H$  для этой системы изменяется от 6.7 ккал/моль до  $\approx 8$  ккал/моль [18], что близко к значениям, полученным в настоящей работе. Еще более близкие к нашим данным значения  $\Delta H = 6.4-7.6$  ккал/моль для системы поли(А)поли(У) приведены в работе [19]. Таким образом, можно считать, что подгоночные значения  $\Delta H_s$  близки к истинным значениям энтальпии для модели Изинга.



## Термодинамика переходов спираль-клубок...

Таблица 2. Термодинамические характеристики, использованные при расчете по модели «застежка-молния»

| Система                                   | Тип комплекса, соотношение олигонуклеотидов | $\mu$ | $t_m$ , °C | $-\Delta H_s$ , ккал/моль пар осн. | $-\Delta S_s$ , кал/моль пар осн. К | $\gamma$         | $S_{ph}^0$ | $\alpha$ , К <sup>-1</sup> |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-------|------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------|----------------------------|
| (dA) <sub>15</sub> •(dT) <sub>10</sub>    | дуплексы, 1:1                               | 0.1   | 19.7       | 5.8                                | 17.04                               | 10 <sup>-7</sup> |            |                            |
|                                           |                                             | 1.0   | 34.8       | 6.1                                | 17.09                               | 10 <sup>-7</sup> |            |                            |
|                                           | триплексы, 1:2                              | 0.1   | -          | 3.5                                | 11.38                               | 10 <sup>-5</sup> |            |                            |
|                                           |                                             | 1.0   | ≈14        | 3.85                               | 11.38                               | 10 <sup>-5</sup> |            |                            |
| (dA) <sub>15</sub> •(dT) <sub>12</sub>    | дуплексы, 1:1                               | 0.1   | 38         | 7.4                                | 21.45                               | 10 <sup>-7</sup> |            |                            |
|                                           |                                             | 1.0   | 47.5       | 7.4                                | 20.73                               | 10 <sup>-7</sup> |            |                            |
| (dA) <sub>15</sub> •(dT) <sub>10</sub> Ph | дуплексы, 1:1                               | 0.1   | 29         | 5.8                                | 17.04                               | 10 <sup>-7</sup> | 300        | 0.05                       |
|                                           |                                             | 1.0   | 44         | 6.1                                | 17.09                               | 10 <sup>-7</sup> | 300        | 0.05                       |
|                                           | триплексы, 1:2                              | 0.1   | ≈12        | 3.5                                | 11.38                               | 10 <sup>-5</sup> | 2000       | 0.05                       |
|                                           |                                             | 1.0   | ≈33        | 3.85                               | 11.38                               | 10 <sup>-5</sup> | 2000       | 0.05                       |

Как видно из Рис.1 и 2, расчетные кривые хорошо описывают экспериментальные зависимости для комплексов без феназина, отражая их форму во всей области перехода. В то же время для систем с феназином, как и в случае модели двух состояний, наблюдаются отличия зависимостей в нижних частях кривых. Как указывалось выше, это различие может быть обусловлено образованием, наряду с дуплексными, триплексных форм, что может быть объяснено значительно более сильной стабилизацией красителем триплексов по сравнению с дуплексами, что следует из сравнения величин  $S_{ph}$  для этих структур (Таблица 2).

При анализе структуры дуплексов важным вопросом является степень их упорядоченности, которая может нарушаться за счет разупорядочения концевых участков, так называемого «растрепывания концов» [12] (Рис. 5). Модель «застежки-молнии» позволяет оценить величину этого эффекта. На Рис. 6 показано распределение дуплексов по длинам упорядоченных участков, рассчитанное по уравнению (11) для систем (dA)<sub>15</sub>•(dT)<sub>10</sub> и (dA)<sub>15</sub>•(dT)<sub>10</sub>Ph. Как видно из рисунка, в обоих случаях даже в начале перехода доля дуплексов с разупорядоченными концами составляет 20-30%, и она возрастает с повышением температуры. Разупорядочение концов дуплексов может быть причиной заниженного значения энтальпии перехода, определенной по модели двух состояний (см. Таблицу 1). Следует отметить, что эффект «растрепывания концов» дуплексов и триплексов возрастает с длиной дуплекса и уменьшением параметра  $s$ . Это может быть одной из причин неадекватности модели двух состояний, установленной в [4].

Расчеты по модели «застежки-молнии» для триплексов дают в целом удовлетворительное согласие с экспериментом, особенно если учесть более высокие погрешности опыта и разброс точек (Рис. 2). Используемые при этих расчетах термодинамические данные  $\Delta H_s$  и  $\Delta S_s$  (Таблица 2), а следовательно, и параметр  $s$  существенно меньше, чем для дуплексов, поскольку они определяются присоединением только одного тимина к хугстиновской цепи. Это обуславливает меньшую стабильность триплексов, весьма широкие интервалы переходов и большее разупорядочивание концов триплексов (Рис. 7). Однако, как отмечалось выше, присоединение красителя к тимину сильнее повышает стабильность триплекса по сравнению с дуплексом, что связано с большим значением параметра  $s_{ph}$ . Величина этого параметра определяется константой связывания красителя с

двунитевой молекулой поли(dA)поли(dT) и превышает соответствующую константу для однунитевой поли(dA) примерно на порядок [17].

### ВЫВОДЫ

Анализ полученных в работе данных и сравнение их с результатами других работ показывает, что присоединение красителя в виде нуклеозидного производного может обеспечивать более энергетически выгодное укрепление как дуплексов, так и триплексов, чем присоединение на линкере. Это обусловлено тем, что короткий линкер (2-3 звена) может не обеспечивать стерически правильного встраивания красителя между основаниями олигонуклеотида, а длинный линкер дает проигрыш в энтропии. Модель «двух состояний» позволяет оценивать усредненные термодинамические характеристики комплексов. Модифицированная модель «застежка-молния» адекватно описывает переходы спираль-клубок как в дуплексах, так и в триплексах, в том числе для олигонуклеотидов с присоединенным красителем, с учетом реальной структуры комплексов.

Авторы выражают благодарность И.Я. Дубею и Д.М. Федоряку за предоставление олигонуклеотидов, и С.А. Егупову за помощь в математической обработке результатов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенкова М.А., Карпова Г.Г. // Успехи химии. 1993. Т.62. № 4. С.414-434
2. Frank-Kamenetskii M.D., Mirkin S.M. // Annu. Rev. Biochem. 1997. V.64. P.65-95
3. Pilch D.S., Levenson C., Shafer R.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990. V.87. P.1942-1946
4. Hopkins H.P., Hamilton D.D., Wilson W.D., Zon G. // J. Phys. Chem. 1993. V.97. P.6555-6563
5. Kibler-Herzog L., Kell B., Zon G., Shinozuka K., Mizan Sh., Wilson W.D. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3545
6. Pilch D., Brousseau R., Shafer R.H. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 5743-5750
7. Goodchild J. // Bioconjugate Chem. 1990. V.1. P. 165-187
8. Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montenay-Garestier T., Helene C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984. V.81. P.3297-3301
9. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.P. // Biocojugate Chem. 1992. V.3. P. 414-419
10. Зозуля В.М., Благой Ю.П., Дубей И.Я., Федоряк О.Д., Щербакова А.С., Федоряк Д.М. // Биополимеры и клетка. 1998. Т.14. С. 1-8
11. Applequist J. // J. Phys. Chem. 1963. V.38. P. 934
12. Applequist J., Damle V. // J. Am. Chem. Soc. 1965. V.87. P. 1450
13. Zimm B.H. // J. Phys. Chem. 1960. V.33. P. 1349
14. Riley M., Maling B., Chamberlin M. // J. Mol. Biol. 1966. V. 20. P. 359-389
15. Klump H.H. // Can. J. Chem. 1988. V. 66. P. 804-811
16. Hopkins H.P., Hamilton D.D., Wilson W.D., Campbell J., Fumero J. // J. Chem. Thermodynamics. 1993. V.25. P.111-126
17. Zozulya V., Blagoy Yu., Lober G., Voloshin I., Winter S., Makitruk V., Shalamay A. // Biophysical Chem. 1997. V. 65. P. 55-63
18. Krakauer H., Sturtevant J.M. // Biopolymers. 1968. V.6. P. 491
19. Martin F.H., Uhlenbeck O.C., Doty P. // J. Mol. Biol. 1971. V. 57. P. 201

УДК 577.32

## РАСПРЕДЕЛЕННАЯ МОДЕЛЬ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЕМ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВЛАЖНОСТИ В ОБРАЗЦАХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

М.Е. Толсторуков, С.В. Гаташ, В.Я. Малеев

*Кафедра молекулярной и прикладной биофизики, Харьковский государственный университет*

Поступила в редакцию 15 мая 1998 г.

В работе представлена модель с пространственно распределенными параметрами, описывающая конформационные переходы нуклеиновых кислот, индуцированные изменением относительной влажности образца. Модель предполагает наличие трех основных конформационных состояний нуклеиновой кислоты. Проведено численное моделирование эволюции возмущений, наложенных на первоначально однородное конформационное состояние молекулы биополимера.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** динамические модели, бистабильность, бегущие фронты, нуклеиновые кислоты, конформационные переходы, гидратация

К настоящему моменту несомненным представляется тот факт, что нуклеиновые кислоты (НК) являются не просто хранилищем генетической информации – их конформационная динамика важна для функционирования живых организмов [1]. Одним из подходов к изучению конформационной динамики НК является ее математическое моделирование. Данному направлению исследований посвящено большое количество работ (для обзора см. [2, 3]).

Конформация НК определяется ее первичной структурой и условиями среды, в которой находится биополимер, такими как pH, полярность, ионная сила раствора, содержание воды и т.д. Различают семейства В-, А-, Z-конформаций, а также неупорядоченную форму, которая наблюдается для дегидратированных НК [4, 5]. В настоящей статье мы ограничиваем рассмотрение взаимодействием НК со своим гидратным окружением.

Гидратное окружение НК играет важную роль в определении ее конформации. Сорбированные на поверхности биополимера молекулы воды формируют многослойную гидратную оболочку с регулярной структурой водородных связей. Такие водные мостики вносят значительный вклад (до 70% энтальпии плавления В-ДНК в увлажненных пленках и гелях [5]) в стабилизацию двойных спиралей НК (упорядоченных конформаций). Связанные молекулы воды можно разделить на несколько групп, расположенных вблизи оснований, фосфатных групп и гликозидных связей остатков сахаров остова НК. Гидратные оболочки различных конформаций НК существенно различаются. В то же время, различные группы связанных молекул воды играют разную роль в стабилизации той или иной конформации [5]. Поэтому при моделировании конформационной динамики НК необходим прямой учет ее гидратной оболочки. Гидратная оболочка НК

формируется с ростом относительной влажности (ОВ) образца. При этом НК, такие как ДНК, совершают конформационные переходы от неупорядоченного состояния к А- или, при определенных экспериментальных условиях, к С-конформации (68-73% ОВ), а затем к В-конформации (92-96% ОВ) [4].

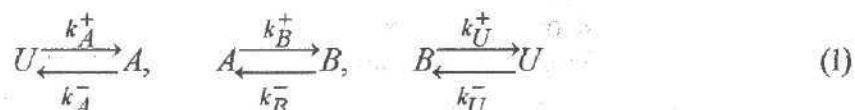
В работе [6] была предложена модель с пространственно сосредоточенными параметрами для описания конформационных переходов с гистерезисом, вызванных изменением ОВ образца НК. Однако, учет гетерогенности и возникновения пространственных неоднородностей конформационного состояния образцов НК необходим для более детального описания структурных перестроек биополимера. Кроме того, сорбированные молекулы воды могут диффундировать по матрице биополимера. Такая диффузия также несомненно оказывает влияние на конформационную динамику НК.

В данной работе предлагается математическая модель с пространственно распределенными параметрами, описывающая конформационные переходы, имеющие место в цикле гидратация – дегидратация и, в явном виде, учитывающая их взаимосвязь с изменением гидратного окружения НК.

## МОДЕЛЬ

### Конформационные переходы

Рассмотрим ограниченный объем, который содержит образец НК. В этом объеме поддерживается определенная ОВ, значение которой, однако, может быть произвольно изменено. Такая схема соответствует реальным экспериментам по увлажнению НК. Молекула НК моделируется последовательностью  $N$  мономерных звеньев, общей длиной  $L$ . Каждое звено соответствует паре нуклеотидов. Звенья цепи могут находиться в одном из трех конформационных состояний: неупорядоченной форме, А- или В-конформации. Между этими конформациями возможны обратимые кооперативные (за счет невыгодности образования границ раздела “фаз”) переходы. Таким образом, представленная модель является “моделью трех состояний”. Предполагается, что цепи не расходятся в процессе конформационных переходов в увлажненных образцах нуклеиновых кислот [7], поэтому мы моделируем конформационные переходы как одномолекулярные реакции.



здесь  $U$  – представляет неупорядоченную форму,  $A$ , и  $B$  – соответствующие конформации,  $k_i^\pm$  – кинетические константы соответствующих процессов, т.е. вероятность того, что данный процесс произойдет в единицу времени.

Введем безразмерные переменные  $U$ ,  $A$ , и  $B$ , обозначающие вероятности обнаружить произвольное мономерное звено в соответствующей конформации. Между этими переменными существует простая зависимость:

$$U + A + B = 1 \quad (2)$$

С учетом (2) схеме (1) соответствует следующая система дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{\partial A}{\partial t} &= k_A^+ \left[ 1 - \left( 1 + \frac{k_A^-}{k_A^+} \right) A - B \right] \\ \frac{\partial B}{\partial t} &= k_B^+ \left[ A - B \frac{k_B^-}{k_B^+} \right] \end{aligned} \quad (3)$$



Учитывая взаимодействия только между ближайшими в цепи парами оснований, соотношения между кинетическими константами, которые характеризуют состояние конформационного равновесия в системе, могут быть представлены в виде:

$$\frac{k_A^-}{k_A^+} = \exp \{ \Delta F_{UA}^p(r) + \sigma_{UA}(r) [2(1 - A(r-a) - A(r+a)) - (B(r-a) + B(r+a))] + (\sigma_{AB}(r) - \sigma_{BU}(r))(B(r-a) + B(r+a)) + \Delta F_{UA}^w(r) \}$$

$$\frac{k_B^-}{k_B^+} = \exp \{ \Delta F_{AB}^p(r) + 2\sigma_{AB}(r)(A(r-a) - B(r-a) + A(r+a) - B(r+a)) + (\sigma_{BU}(r) - \sigma_{UA}(r))(U(r-a) + U(r+a)) + \Delta F_{AB}^w(r) \} \quad (4)$$

где,  $\Delta F_{UA}^p$ ,  $\Delta F_{AB}^p$  – изменение свободной энергии моля звеньев полимерной цепи при конформационном переходе из неупорядоченной в А– форму и из А– в В–форму соответственно;  $\Delta F_{UA}^w$ ,  $\Delta F_{AB}^w$  – изменение свободной энергии гидратной оболочки при конформационных переходах;  $\sigma_U$  – свободная энергия за счет возникновения границы раздела между конформациями. Для упрощения модели при численном моделировании значения  $\sigma_U$  брались равными для всех конформационных переходов ( $\sigma_{UA} = \sigma_{AB} = \sigma_{BU} = \sigma$ ).  $r$  – пространственная координата, вдоль цепи мономеров. Зависимость параметров от пространственной переменной предполагается дискретной, т.е. значения всех параметров не могут изменить свое значение в

пределах пары оснований  $a \cong 6.5$  Å, что соответствует среднему расстоянию вдоль цепи НК между фосфатами в А– и В–формах. Такая зависимость параметров от пространственной переменной определяет естественную пространственную дискретизацию при проведении численного моделирования.

Профиль изменения свободной энергии мономерных звеньев при конформационных переходах схематически изображен на рис. 1

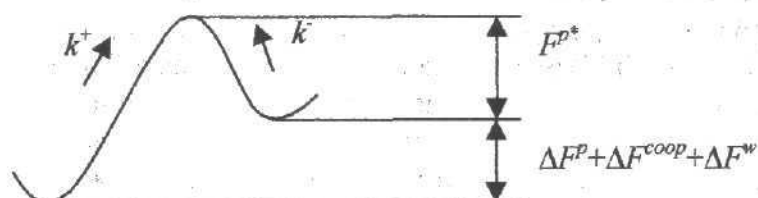


Рисунок 1. Энергетический профиль конформационного перехода  $F^{p*}$  – свободная энергия активации конформационного перехода,  $\Delta F^{coop}$  – изменение свободной энергии за счет кооперативности конформационных переходов (члены пропорциональные  $\sigma$  в (4)).

На рис. 1 представлен случай, когда прямой конформационный переход невыгоден. Однако, рост ОВ приводит к увеличению (по модулю) члена  $\Delta F^w$ , за счет увеличения числа сорбированных молекул воды, что изменяет соотношение минимумов и делает переход энергетически выгодным.

### Сорбция воды

На мономерных звеньях НК расположены центры связывания молекул воды. Сорбция воды, в рамках представленной модели, происходит на центрах связывания лангмюровского и генриевского типов. Также возможна мультислойная сорбция, т.е. сорбция воды на уже занятые центры связывания за счет образования водородных связей с сорбированными молекулами воды.



В работе [6] для описания сорбции воды молекулой НК в рамках сосредоточенной модели использовалось уравнение изотермы сорбции, полученное на основе хорошо известного уравнения Гаскойна – Пэттига для случая сорбции различными типами центров связывания [8]:

$$X(X_e) = X_L + X_H + X_{ML}$$

$$X_L = \frac{v_L^m a_L X_e}{1 + a_L X_L}; \quad X_H = a_H X_H; \quad X_{ML} = (X_L + X_H) \frac{b X_e}{1 - b X_e} \quad (5)$$

Где  $X$  – общее число сорбировавшихся на одном мономерном звене молекул воды при относительной влажности  $X_e$ ;  $X_L$ ,  $X_H$ ,  $X_{ML}$  – число связанных молекул на центрах ленгмюровского, генриевского типов и за счет мультислойной сорбции соответственно, в расчете на одну пару оснований. Данное выражение может быть получено из изотермы Гаскойна – Пэттига путем соответствующего выбора статистических функций распределения для центров связывания воды и с учетом того факта, что мультислойная сорбция происходит только на уже занятых первичных центрах связывания [6, 9].

Для учета взаимосвязи процессов сорбции и конформационных переходов вводится зависимость констант сорбции от конформационных переменных модели:

$$\begin{aligned} a_L &= a_L^0 \exp(\lambda^A A + \lambda^B B) \\ a_H &= a_H^0 \exp(\gamma^A A + \gamma^B B) \\ b(r) &= b^0 \exp(\beta^A A + \beta^B B) \end{aligned} \quad (6)$$

где  $\lambda^{AB}$ ,  $\gamma^{AB}$ ,  $\beta^{AB}$  – разности между свободными энергиями ленгмюровской, генриевской и мультислойной гидратных оболочек неупорядоченной и соответствующей упорядоченной конформации НК.

Введение такой зависимости позволяет учесть образование специфических для каждой упорядоченной конформации регулярных сеток водородных связей, образованных сорбированными молекулами воды.

Для описания сорбции в распределенной модели необходимо ввести зависимость параметров уравнений (5) от пространственной переменной и, для учета диффузии молекул воды, перейти от системы алгебраических уравнений к системе дифференциальных уравнений. При этом уравнения (5) должны являться стационарными решениями для искомой системы. Таким требованиям отвечает система дифференциальных уравнений следующего вида:

$$\begin{aligned} \frac{\partial X_L(t, r)}{\partial t} &= k_L^+(r) X_e (V_L^m - X_L) - k_L^-(r) X_L + D_X \frac{\partial^2 X_L}{\partial r^2} \\ \frac{\partial X_H(t, r)}{\partial t} &= k_H^+(r) X_e V_H^m(r) - k_H^-(r) X_H + D_X \frac{\partial^2 X_H}{\partial r^2} \\ \frac{\partial X_{ML}(t, r)}{\partial t} &= k_{ML}^+(r) X_e (X_L + X_H + X_{ML}) - k_{ML}^-(r) X_{ML} + D_X \frac{\partial^2 X_{ML}}{\partial r^2} \end{aligned} \quad (7)$$

При этом соотношения между константами скоростей сорбции  $k_X^+$  и десорбции  $k_X^-$  равны:

$$\frac{k_L^+(r)}{k_L^-(r)} = a_L(r), \quad \frac{k_H^+(r)}{k_H^-(r)} = \frac{a_H(r)}{V_H^m(r)}, \quad \frac{k_{ML}^+(r)}{k_{ML}^-(r)} = b(r) \quad (8)$$

В уравнениях (7) фигурирует член, описывающий диффузию связанных молекул воды по матрице биополимера с коэффициентом диффузии  $D_X$ . Учет такой

диффузии необходим для описания конформационной динамики нуклеиновых кислот. В работе [10] был проведен расчет значений коэффициентов диффузии для различных конформаций НК. Эти данные, которые согласуются с экспериментальными [11], были использованы при численном моделировании.

Теперь мы можем в явном виде записать изменения свободной энергии гидратной оболочки при конформационных переходах НК, которые фигурируют в (4):

$$\begin{aligned}\Delta F_{UA}^w(r) &= \lambda^A(r)X_L(r) + \gamma^A(r)X_H(r) + \beta^A(r)X_{ML}(r) \\ \Delta F_{AB}^w(r) &= (\lambda^B(r) - \lambda^A(r))X_L(r) + (\gamma^B(r) - \gamma^A(r))X_H(r) + (\beta^B(r) - \beta^A(r))X_{ML}(r)\end{aligned}\quad (9)$$

Уравнения (3) и (9) образуют систему дифференциальных уравнений, которая описывает процессы сорбции молекул воды и связанные с ними конформационные переходы НК. Данная система уравнений позволяет не только получать стационарные значения конформационных и сорбционных переменных, но и описывать пути достижения такого стационарного состояния, а также поведение неоднородных образцов нуклеиновых кислот.

### Разделение переменных на "быстрые" и "медленные"

Большое различие характерных времен процессов в системе НК – вода (время релаксации сорбированных молекул воды составляет  $10^{-11}$ - $10^{-9}$  с., при времени конформационных переходов порядка часов [5]) позволяет разделить их на "быстрые" и "медленные". В рамках теории переходного состояния [12] можно оценить константу скорости сорбционных процессов:  $k_X^+ = 7.71 \cdot 10^9 \gg 1$ . Значение энергии активации бралось равным 22.5 кДж/моль, как для активации трансляционного движения молекулы воды в жидкой фазе [13] (данное значение энергии активации соответствует разрыву двух водородных связей). Таким образом, для описания медленных процессов (конформационных переходов), следуя стандартной процедуре [14], и отбрасывая член  $(1/k_X^+) \partial X / \partial t$ , систему уравнений (7) можно свести к системе граничных задач:

$$\begin{aligned}0 &= X_e \left( \psi_L^m - X_L \right) - \frac{1}{a_L(r)} X_L + D_X \Delta X_L \\ 0 &= X_e - \frac{1}{a_H(r)} X_H + D_X \Delta X_H \\ 0 &= X_e (X_L + X_H + X_{ML}) - \frac{1}{b(r)} X_{ML} + D_X \Delta X_{ML} \\ \frac{\partial X_L}{\partial r} &= \frac{\partial X_H}{\partial r} = \frac{\partial X_{ML}}{\partial r} = 0, \text{ при } r = 0, L\end{aligned}\quad (10)$$

Сведение дифференциальных уравнений в частных производных к граничным задачам, хотя и несколько усложняет алгоритм численного моделирования, позволяет заметно уменьшить машинное время счета.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стационарные решения сосредоточенной модели, соответствующей системе уравнений (3), (8) были найдены ранее [6]. Было показано, что в рамках такой модели могут быть объяснены конформационные и сорбционные гистерезисные явления, экспериментально наблюдаемые в цикле гидратация-дегидратация НК [15]. Эти решения являются однородными, устойчивыми по отношению к малым флуктуациям, стационарными решениями системы (3), (8). Их зависимость от управляющего параметра  $X_e$  представлена на рис. 2. Из этого рисунка видно, что

имеются интервалы значений  $X_e$ , в которых одновременно существуют два устойчивых решения системы (интервалы гистерезиса). Моделирование возможных автоволновых процессов, соответствующих конформационным переходам НК, наиболее интересно в этих интервалах. В данной работе для моделирования был выбран интервал  $0.80 < X_e < 0.94$ , т.е. интервал значений ОВ, в котором происходит биологически важный  $A \leftrightarrow B$  переход.

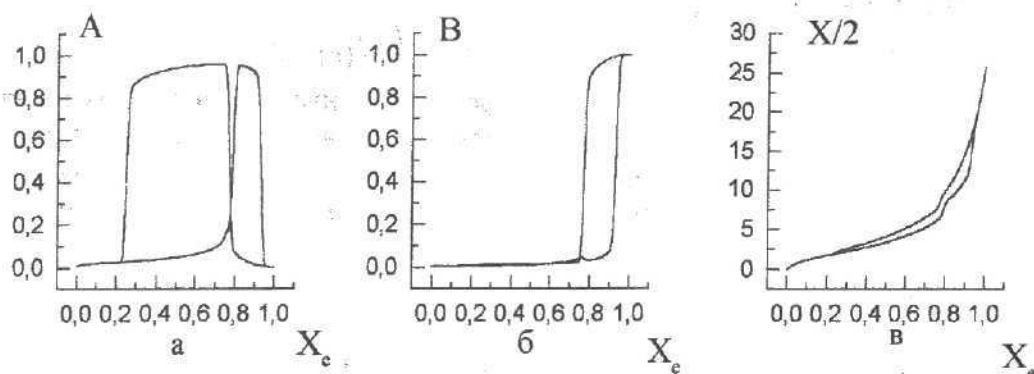


Рисунок 2. Зависимость однородных стационарных решений системы (3), (8) от управляющего параметра модели  $X_e$ .

- а – для вероятности обнаружить произвольный мономер в А-форме
- б – для вероятности обнаружить произвольный мономер в В-форме
- в – для полной сорбции

Понятно, что бистабильное поведение системы соответствует двухмному потенциалу (рис. 1). Причем, как было показано выше, соотношение между минимумами потенциального рельефа зависит от значения управляющего параметра  $X_e$ . Переходы между устойчивыми конформациями НК в пределах интервала бистабильности осуществляются за счет возникающих флуктуаций или возмущений, вызванных внешними факторами. Эти выводы согласуются с результатами численного моделирования. Действительно, при задании однородных начальных условий, которые соответствуют стационарным значениям переменных, система находится в таком состоянии сколь угодно долго, т.к. процедура численного моделирования не включает случайного возникновения неоднородностей.

Для исследования поведения возмущения, возникающего в первоначально однородной системе, было получено численное решение системы (3), (10) с заданием неоднородных начальных условий для конформационных переменных. Численное моделирование было проведено для последовательности из 200 однотипных мономерных звеньев, 140 из которых находились в А-форме и по середине размещалось 60 мономеров в В-форме (значения конформационных переменных соответствовали стационарным значениям). Начальные условия для сорбционных переменных задавались однородными и соответствовали А-форме НК. Граничные условия выбирались из условия отсутствия потоков на границе. На рис. 3, 4 представлены результаты численного моделирования при значениях параметра  $X_e$  равных соответственно 0.805 и 0.915.

Из результатов численного моделирования видно, как изменяется относительная стабильность А- и В-форм при изменении ОВ образца. Если А-форма более стабильна, т.е. ей соответствует более глубокий минимум потенциального рельефа, то фронты первоначального возмущения движутся по направлению друг к другу и возмущение исчезает за конечное время ( $X_e = 0.805$ , рис. 3). В случае более стабильной В-формы, фронты движутся в противоположных направлениях и, в

результате, вся молекула нуклеиновой кислоты переходит в В-форму ( $X_e = 0.915$ , рис. 4).

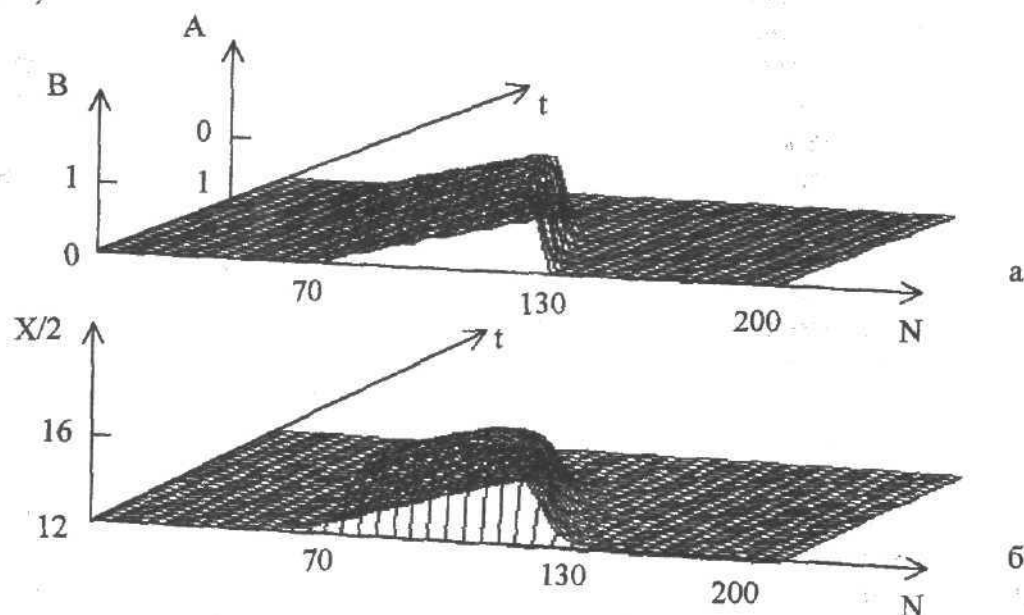


Рисунок 3. Результаты численного моделирования для случая  $X_e = 0.805$   
 а – временная и пространственная зависимость конформационных переменных  
 б – временная и пространственная зависимость полной сорбции

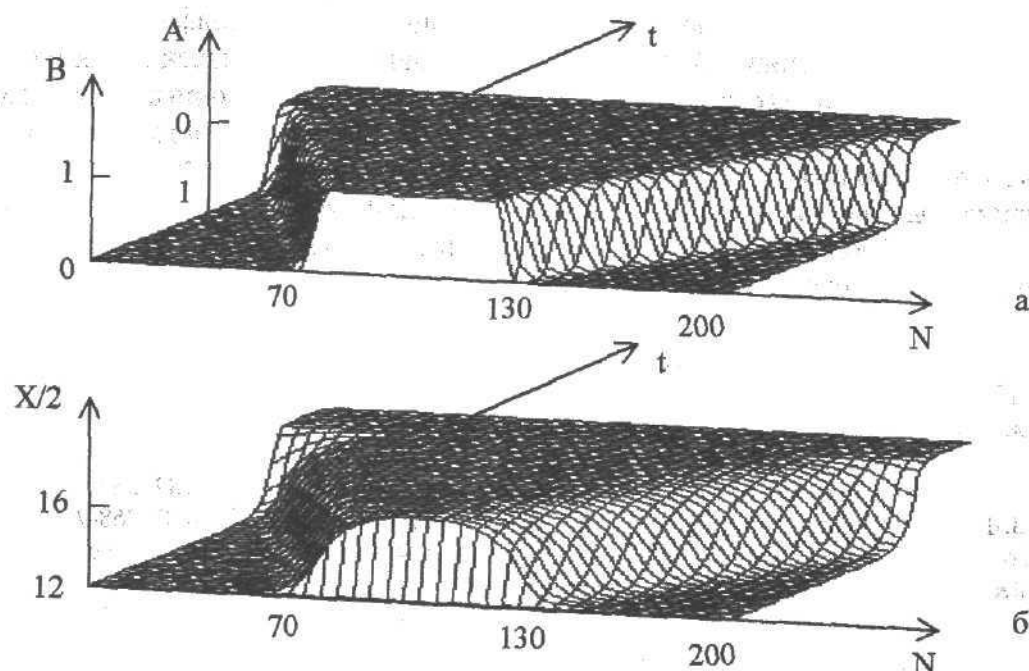


Рисунок 4. Результаты численного моделирования для случая  $X_e = 0.915$   
 а – временная и пространственная зависимость конформационных переменных  
 б – временная и пространственная зависимость полной сорбции

Аналогичные результаты были получены для интервала бистабильности  $0.25 < X_e < 0.78$ , где одновременно могут существовать неупорядоченная и А-форма. Для численного моделирования использовались такие же значения параметров, как и в работе [6].

Математически данные решения являются бегущими фронтами и типичны для триггерных моделей такого типа [16], к которым относится рассматриваемая мо-



**Результат.** Скорость распространения таких фронтов в пределах интервала бистабильности имеет единственное значение (триггерные волны), которое увеличивается по модулю при приближении значения  $X_c$  к концам интервала, и континуум значений больше некоего критического при значениях  $X_c$  равных концам интервала бистабильности (фазовые волны). Полученное описание конформационных переходов согласуется с так называемой моделью "застежки-молнии" [4].

Существует такое значение  $X_c$ , при котором в модели реализуется неподвижная доменная стенка, разделяющая различные конформации. При этом значения ОВ энергетические минимумы, соответствующие этим конформациям, имеют одинаковую глубину. Однако, такое решение является неустойчивым по отношению к малым возмущениям и, вероятно, не реализуется в реальной системе НК – вода. Однако, ситуация может измениться для гетерогенных образцов НК.

Диффузия связанных молекул воды по матрице биополимера в значительной степени определяет ширину бегущего фронта сорбционных переменных. Для данного набора значений параметров она составляет  $\approx 60$  мономерных звеньев. (при ширине бегущего фронта конформационных переменных  $\approx 20$  мономеров). Кроме того, согласно результатам численного моделирования, значение коэффициента диффузии влияет на скорость распространения конформационных фронтов. Таким образом, диффузионные эффекты могут быть ответственны за дальное действие в системе НК – вода.

## ВЫВОДЫ

В работе предложена математическая модель, описывающая конформационную динамику НК при изменении ОВ образца. Модель пригодна для описания как однородных, так и гетерогенных образцов НК. Процессы конформационных переходов моделируются как бегущие конформационные фронты. Поведение системы при возникновении конформационного возмущения зависит от относительной стабильности конформационных состояний, определяемой ОВ. Диффузия связанных молекул воды по матрице биополимера вносит вклад в определение таких параметров, как ширина и скорость распространения бегущего фронта.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miyazawa T. // J. Mol. Struct. 1985. V. 126. P. 493-508
2. Christiansen P.L., Muto V. // Physica D. 1993. V. 68. PP. 93-96
3. Стариков Е.Б. // Молекулярная биология. 1990. Т. 24 С. 1504-1524
4. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М: Мир, 1987. 584 с.
5. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // Биофизика. 1993. Т. 38. С. 768-790
6. Tolstorukov M.Ye., Virnik K.M in Lecture notes in computational physics and engineering: Algorithms for macromolecule modelling, Springer-Verlag, Berlin, in press
7. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Minyat E.E., Schyolkina A.K. // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1983. V. 47. P. 243-250
8. Gascoyne P.R.C., Pethig R. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1977. V. 1. P. 171-180
9. Стариков Е.Б., Большух Т.В., Семенов М.А. // Препринт № 359, Харьков: Изд. ИРЭ АН УССР, 1987. 19 с.
10. Virnik K.M., Tolstorukov M.Ye. // Proc. 17<sup>th</sup> Discussion Conf. "Surface and Interfacial Phenomena in Macromolecular Systems", Prague, 1997. P5
11. Lahajnar G., Zupancic I., Rupprecht A. in Biophysics of water, New York, Wiley, 1982. P. 231-234
12. Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981. 360 с.
13. Гордеев Г.П., Хайдаров Т. в книге Вода в биологических системах и их компонентах. Изд-во ЛГУ, 1983. С. 3-9
14. Васильев В.А., Романовский Ю.М., Яхно В.Г. Автоволновые процессы. М.: Наука, 1987. 240 с.
15. Волков В.В., Гасан А.И., Малеев В.Я. Препринт № 386, Харьков: Изд. ИРЭ АН УССР, 1989, 16 с.
16. M.Ye. Tolstorukov, S.V. Gatash // Int. J. Bif. and Chaos in press



УДК 577.32

## ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДЫ В ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКЕ ДНК

К.М. Вирник, А.И. Гасан, А. В. Шестопалова, В.Я. Малеев

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

Поступила в редакцию 5 мая 1998 г.

В настоящей работе предложен принципиально новый подход к изучению динамических свойств молекул воды, связанных на матрицах биополимеров (нуклеиновых кислот). Он основан на калориметрических измерениях энергии дегидратации систем биополимер-вода при различных уровнях относительной влажности. Обнаружена корреляция между энергией дегидратации и нуклеотидным составом природной ДНК. Из экспериментальных данных были рассчитаны некоторые динамические характеристики молекул воды в гидратных оболочках изученных биополимеров. Кроме того, методом Монте-Карло были изучены системы, содержащие динуклеотиды АрА, ТрТ, УрУ и водные кластеры различных размеров (20, 40 и 200 молекул воды). Результаты монтекарловского моделирования коррелируют с соответствующими данными калориметрических исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДНК, калориметрия, моделирование Монте-Карло, энергетика, динамические свойства

Вода является неотъемлемым элементом структуры ДНК, принимающим участие в формировании и стабилизации ее упорядоченных форм [1-3]. Количественное изменение содержания воды в ДНК вызывает обратимые структурные переходы типа порядок-порядок, порядок-беспорядок [2-5]. Такие структурные перестройки ДНК естественным образом приводят к изменению физических свойств данного биополимера [4]. Кроме того, степень и наблюдаемая картина гидратации ДНК в значительной степени зависят от ее первичной структуры [6-8].

Из всех структурных элементов ДНК вода выделяется своей высокой подвижностью, и такое поведение молекул воды может играть важную роль в инициировании локальных конформационных переходов ДНК [9-11]. В связи с этим возникает большой интерес к изучению энергетических и динамических свойств воды, связанной на матрице ДНК. К настоящему моменту было проведено немало исследований, касающихся проблемы энергетики и динамики системы ДНК-вода [12-24]. В области изучения динамики связанной воды были получены прямые данные о подвижности молекул воды в гидратной оболочке ДНК (время корреляции ядерных спинов протонов, времени диэлектрической релаксации диполей воды) [12-16]. Однако большинство работ в области изучения энергетики системы ДНК-вода в

основном посвящено изучению температурных переходов в этой системе, ее интегральных энергетических характеристик, а также оценке энергетического вклада гидратации в стабилизацию структуры ДНК [17-22], в то время как прямых данных об энергетических характеристиках связанной воды очень мало [4, 23, 24].

Для получения более полной картины, отображающей физико-химические принципы взаимодействия гидратной воды с нуклеиновыми кислотами, очевидно, необходимы дополнительные данные об энергетических и динамических характеристиках молекул связанной воды при различной степени гидратации ДНК. В настоящей работе предлагается новый подход к изучению динамических свойств молекул воды, связанных на матрицах биополимеров. Этот подход основан на калориметрических измерениях энергии гидратации-дегидратации систем нуклеиновая кислота-вода при различных относительных влажностях окружающей среды (ОВ). Параллельно методом Монте-Карло были выполнены предварительные расчеты взаимодействия модельных соединений нуклеиновой природы с водным окружением, результаты которых также представлены в данной работе.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения энергии дегидратации систем нуклеиновая кислота-вода были проведены методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии в изотермическом режиме ( $T=303\text{K}$ ). Объектами исследований служили модельные биспиральные полирибонуклеотидные комплексы полиА-полиУ, полиГ-полиС и природная НаДНК тимуса телят (42% GC) (препараты фирмы "Serva", ФРГ). Образцы представляли собой неориентированные волокна. Каждый образец подвергался лиофильной сушке, взвешивался (масса бралась в пределах 10 мг) и увлажнялся до определенного уровня путем выдерживания в течение нескольких суток в атмосфере паров насыщенных водных растворов различных солей, создающих вокруг себя определенную ОВ [25]. Затем образец снова взвешивался и помещался в кювету открытого типа (с отверстием для испарения), после чего кювета с образцом и эталонная кювета (пустая кювета) устанавливались в измерительной камере прибора. Измерения проводились на автоматическом калориметре DSC-101 (фирма "Setaram", Франция).

Были использованы два варианта измерения энергии дегидратации. В первом – образец с заданным содержанием воды помещается в калориметр и в течение определенного времени при заданной температуре регистрируется энергия испарения воды. После этого образец взвешивается и определяется число испарившихся молекул воды, а соответственно и энергия дегидратации в расчете на один моль гидратной воды. Во втором случае – образец, помещенный в калориметрическую систему, подключается к системе с заданной упругостью водяных паров. Такой путь исключает процесс взвешивания образца, тем самым, облегчая эксперимент, поскольку по ранее полученной кривой сорбции можно определить содержание воды в образце. Этим способом в основном и были выполнены экспериментальные исследования. Среднеквадратичное отклонение результатов измерения энергий дегидратации образцов находится в пределах 5%.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены зависимости энергий дегидратации  $E(n)$  ( $n$  – содержание воды в образце – количество молекул воды на основание, т.е.  $\text{MnH}_2\text{O/MO}$ ) или так называемые "энергетические спектры" воды, связанной на матрицах полиА-полиУ, полиГ-полиС и НаДНК. Как видно из рисунка, зависимости  $E(n)$  для различных

биологических матриц имеют сходное качественное поведение, а именно, с увеличением содержания воды в системах наблюдается монотонное уменьшение энергии дегидратации. Однако при этом наблюдаются количественные различия. Так, кривая зависимости энергии дегидратации  $E(n)$  для биспирального полирибонуклеотидного GC-комплекса проходит заметно выше аналогичных кривых в случаях спирали AU-типа и NaДНК. Наблюдаемое отличие показывает, что вода в гидратной оболочке биспирального комплекса полиG-полиC связана более прочными водородными связями, что может быть причиной высокой термостабильности данного комплекса.

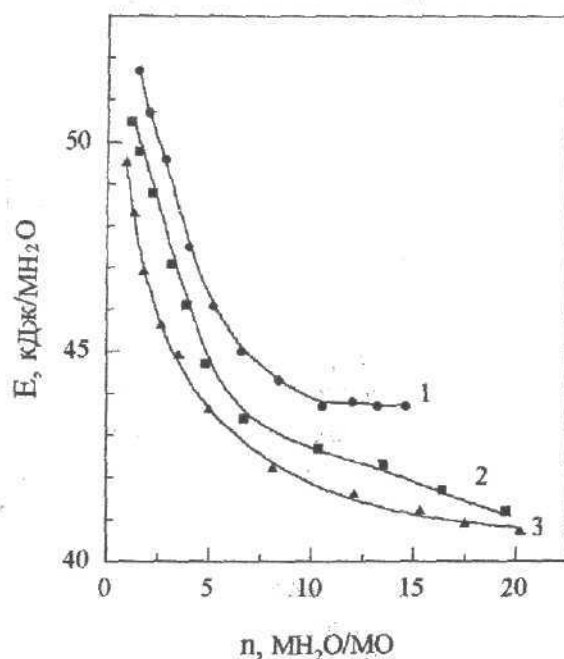


Рисунок 1. Зависимости энергии дегидратации полиG-полиC (1), NaДНК (2) и полиА-полиУ (3) от содержания воды в образце.

Кривая зависимости энергии дегидратации от содержания воды для NaДНК проходит между энергетическими кривыми, полученными для чистых AU- и GC-нуклеиновых кислот (рис.1). В связи с этим возникает вопрос о возможной корреляции между энергией дегидратации и нуклеотидным составом нуклеиновых кислот.

В ходе анализа полученных результатов была обнаружена линейная зависимость энергии дегидратации ДНК от нуклеотидного состава, которую можно представить в виде:

$$E^{\text{ДНК}} = X E^{\text{AT}} + (1-X) E^{\text{GC}}, \quad (1)$$

где  $X$  – относительное содержание AT-пар в структуре ДНК;  $E^{\text{AT}}$ ,  $E^{\text{GC}}$  – энергии дегидратации нуклеиновых кислот, состоящих только либо из AT-, либо из GC-пар соответственно. Параметр  $X$  легко определяется по данным “энергетических спектров”, полученным в ходе эксперимента:

$$X = (E^{\text{GC}} - E^{\text{ДНК}}) / (E^{\text{GC}} - E^{\text{AT}}) \quad (2)$$

Как известно, для тимусной ДНК  $A+T/G+C=1,37$ , что соответствует содержанию ~58% АТ-пар ( $X=0,58$ ) и ~42% GC-пар. В таб.1 приводятся выборочно взятые из рис.1 значения  $E^{ДНК}$ ,  $E^{АТ}$ ,  $E^{GC}$  и параметр  $X$ , рассчитанный из уравнения (2), при различном содержании воды ( $n$ ).

Таблица 1. Значения энергий дегидратации для НаДНК и биспиральных комплексов при различных уровнях гидратации. Относительное содержание АТ-пар в составе НаДНК ( $X$ ,  $X_{ср}$ ), полученное из уравнения (2).

| $n$ ,<br>МН <sub>2</sub> О/МО | $E^{ДНК}$ ,<br>кДж/МН <sub>2</sub> О | $E^{АТ}$ ,<br>кДж/МН <sub>2</sub> О | $E^{GC}$ ,<br>кДж/МН <sub>2</sub> О | $X$ ,<br>% | $X_{ср}$ ,<br>% |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------|
| 2                             | 49,1                                 | 47,8                                | 50,7                                | 55,1       |                 |
| 5                             | 44,7                                 | 43,6                                | 46,3                                | 59,3       |                 |
| 7                             | 43,5                                 | 42,5                                | 44,8                                | 56,5       |                 |
| 8                             | 43,2                                 | 42,3                                | 44,4                                | 57,1       | 57,4            |
| 10                            | 42,8                                 | 41,9                                | 44,0                                | 57,1       |                 |
| 12                            | 42,6                                 | 41,7                                | 43,9                                | 59,1       |                 |
| 14                            | 42,2                                 | 41,1                                | 43,7                                | 57,7       |                 |

Найденное по "энергетическим спектрам" среднее значение содержания АТ-пар в структуре природной ДНК ( $X_{ср}$ ) с достаточно высокой точностью совпадает со справочными данными. Здесь необходимо отметить, что в качестве "калибровочных" образцов были использованы полирибонуклеотиды, в то время как в природных ДНК в качестве мономерных звеньев выступают дезоксирибонуклеотиды. Однако этот факт, очевидно, если и повлиял на результаты, то незначительно. Таким образом, чтобы рассчитать нуклеотидный состав данной природной ДНК, достаточно иметь энергетическую изотерму гидратации  $E(n)$  интересующей нас ДНК и подобные зависимости для полиА-полиU и полиG-полиC. И наоборот, зная нуклеотидный состав природной ДНК и энергетические изотермы гидратации полинуклеотидов можно рассчитать "энергетический спектр" интересующей нас ДНК.

С использованием полученных зависимостей энергий дегидратации  $E(n)$  были получены некоторые характеристики динамической подвижности связанной воды на матрицах ДНК и модельных полирибонуклеотидов. Одним из таких параметров, характеризующим подвижность молекул связанной воды, является время дипольной релаксации молекул связанной воды  $\tau_d$ , а вторым – "свободный объем"  $V_f$ , занимаемый молекулами воды в гидратной оболочке.

Информация о зависимости  $\tau_d$  от содержания воды в образце  $n$  была получена из уравнения, связывающего время дипольной релаксации с избыточной энергией гидратации  $\Delta E(n)$ :

$$\tau_d = \tau_d^0 \exp(\Delta E(n)/RT), \quad (3)$$

где  $\tau_d^0$  – значение время дипольной релаксации для чистой воды при комнатной температуре равно  $0,9 \cdot 10^{-11}$ с;  $T$  – температура в Кельвинах;  $R$  – газовая постоянная;  $\Delta E(n) = E(n) - E_0$ ,  $E_0 = 40,5$  кДж/МН<sub>2</sub>О – средняя энергия взаимодействия вода-вода в объемной фазе.

На рис.2 представлены кривые, отвечающие зависимостям  $\tau_d(n)$  для данных образцов. Эти кривые так же, как и кривые  $E(n)$  имеют качественно похожий вид, но количественно различаются. Из рисунка видно, что на начальных стадиях гидратации ( $n < 6$ ) значения  $\tau_d$  быстро убывают (уменьшаются приблизительно на порядок), а при дальнейшем увеличении  $n$  постепенно приближаются к значению  $\tau_d^0$  для чистой воды. Этот результат согласуется с данными, которые показывают неразличимость физических свойств периферийной воды от свойств объемной воды [2, 4]. В пределах рассматриваемого интервала ОВ (5-95% ОВ) время релаксации изменяется примерно на 2 порядка. Также как и по "энергетическим спектрам", из рис.2 видно, что молекулы воды во всем интервале ОВ наиболее сильно связаны с матрицей полиГ-полиС и слабее всего с матрицей полиА-полиУ.

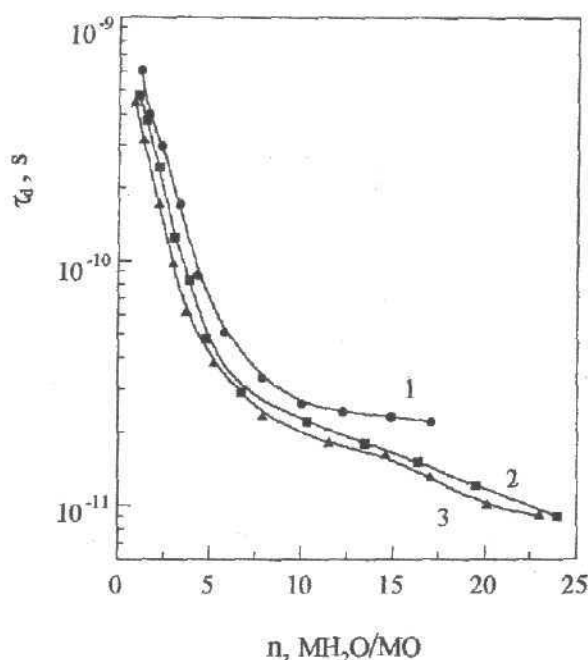


Рисунок 2. Зависимости времени диэлектрической релаксации диполей воды  $\tau_d$  от содержания воды  $n$  для полиГ-полиС (1), НаДНК (2) и полиА-полиУ (3)

Другим физическим параметром, который был рассчитан из полученных зависимостей  $E(n)$ , является свободный объем  $V_f$ . Понятие "свободного объема" появляется в связи с рассмотрением эффектов внутреннего структурного устройства жидкости (молекулы которой имеют способность участвовать в водородном связывании), так как реорганизация структуры такой жидкости прямо не отражается в изменениях общего объема [26].

Общий удельный объем воды можно представить в виде суммы "занятого" ( $V_s$ ) и "свободного объемов" [27]. "Занятый объем" состоит из кластеров связанных молекул воды, которые участвуют в водородном связывании, образуя от одной до четырех водородных связей, оставляя несвязанные молекулы воды в качестве "свободного объема". Необходимо подчеркнуть, что объем несвязанных молекул воды, интерпретируемый как "свободный", не является тем же самым, что и



истинный свободный объем, т.е. пустое пространство, связанное с каждой молекулой.

Таким образом, в случае рассматриваемой системы нуклеиновая кислота-вода такой параметр, как "свободный объем" определяет характер молекулярных сил связывания молекул воды с адсорбционными центрами донорного и акцепторного типов, а также возникновение на биополимерных матрицах регулярно упорядоченных структур молекул воды. Чем сильнее связывание или стабильнее кооперативно-организованная структура гидратной оболочки, тем меньше "свободный объем", занимаемый молекулами воды.

"Свободный объем"  $V_f$  определяется как разность между общим объемом, занимаемым гидратной оболочкой, и запрещенным объемом  $B$ , зависящим от температуры  $T$ , общего объема  $V$  и числа молекул  $N$ , т.е.  $V_f = V - B$ . Полная теплота испарения (дегидратации)  $E$  в расчете на моль может быть представлена в виде [28]:

$$E = RT \ln(V_n - B_n / V_f - B_f) + P(V_n - V_f), \quad (4)$$

где  $E$  – мольная энергия испарения воды с поверхности биополимера;  $P$  – давление насыщенного пара;  $V_n, V_f$  – мольный общий объем насыщенного пара и гидратной воды соответственно;  $B_n, B_f$  – запрещенный объем для воды в состоянии пара и в гидратной оболочке соответственно.

В области низких давлений водяных паров выполняются условия  $V_n \gg B_n$  и  $V_f \gg B_f$ , тогда справедливо соотношение газовых законов. В настоящее время принято описывать состояние реального газа (пара) общим уравнением в виде ряда:

$$PV_n = RT + B/V_n + C/V_n^2 + \dots \quad (5)$$

Мы воспользуемся первыми двумя членами этого ряда для расчета "свободного объема"  $V_f = V - B_f$ , тогда получим:

$$\ln V_f = \ln \left[ \left( RT + \sqrt{4PB + (RT)^2} \right) / 2P \right] + \left( RT + \sqrt{4PB + (RT)^2} \right) / 2RT - E/RT \quad (6)$$

В этом уравнении имеются две величины, которые измеряются или рассчитываются. Это давление водяных паров в камере ( $P$ ) и, измеряемая калориметрически, энергия дегидратации полинуклеотидных матриц или ДНК ( $E$ ). Давление  $P$  в калориметрической камере рассчитывается из соотношения  $P = \phi P_0$ , где  $P$  – парциальное давление водяного пара в камере при заданной температуре  $T$ ;  $P_0$  – упругость насыщенных паров воды при той же температуре. В нашем случае при  $T = 303\text{K}$  величина  $P_0 = 0,0419\text{атм.}$ , а  $\phi$  – задаваемая ОВ образцов. Параметр  $B$  определяется расчетным путем с использованием значения "свободного объема" для чистой воды, который при  $303\text{K}$  составляет  $\sim 5,4\text{см}^3/\text{МН}_2\text{О}$  [26], а энергия испарения при этом равна  $40,5\text{ кДж}/\text{МН}_2\text{О}$ .

На рис.3 приведены зависимости "свободного объема"  $V_f$ , занимаемого молекулами связанной воды в гидратной оболочке природной  $\text{NaДНК}$ , полиА-полиУ и полиГ-полиС от содержания воды, которые были рассчитаны из уравнения (6).

Сравнивая полученные результаты, можно обнаружить существенное отличие в состояниях гидратной воды в различных образцах. "Свободный объем" воды в

гидратной оболочке полиГ-полиС оказывается наименьшим во всем интервале ОВ, в то время как для полиА-полиУ этот параметр имеет наибольшее значение. Таким образом, можно сделать вывод, что вода в гидратной оболочке полиГ-полиС находится в более "стесненном" состоянии, чем в гидратных оболочках НаДНК и полиА-полиУ. Данные об объеме, занимаемом парами оснований, и их подвижности в НаДНК, согласно которым подвижность пар оснований увеличивается с увеличением степени гидратации [5, 29], коррелируют с нашими результатами по подвижности связанных молекул воды.

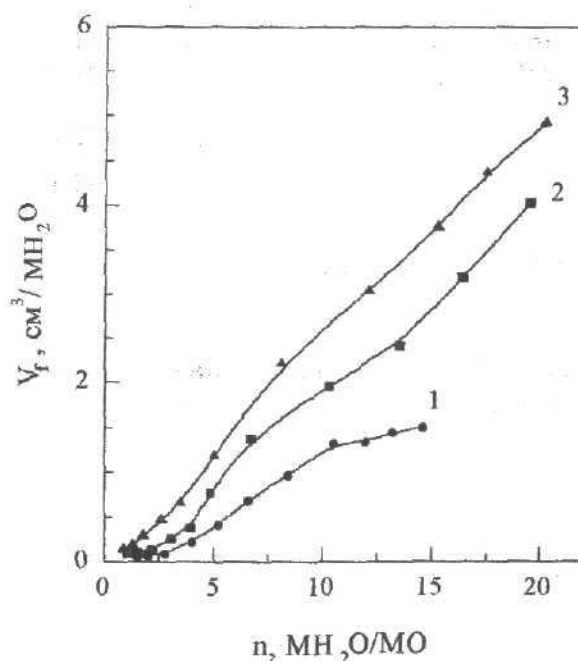


Рисунок 3. Зависимости "свободного объема"  $V_f$  в гидратной оболочке полиГ-полиС (1), НаДНК (2) и полиА-полиУ (3) от содержания воды  $n$

Предварительные расчеты взаимодействия модельных соединений нуклеиновой природы с водным окружением были выполнены методом Монте-Карло. Изученные системы представляют собой водные кластеры различных размеров (20, 40 и 200 молекул воды), содержащие динуклеотиды АрА, УрУ и ТрТ. Такие системы воспроизводят взаимодействие компонентов нуклеиновых кислот с водой при различных уровнях ОВ.

В результате проведенных расчетов были получены энергетические характеристики рассмотренных систем, а именно, полные средние энергии взаимодействия  $E_{\text{tot}}$ , средние энергии взаимодействия вода-вода  $E_{\text{ww}}$ , средние энергии взаимодействия динуклеотид-вода  $E_{\text{dw}}$ , а также удельные средние энергии взаимодействия в системах, приходящиеся на молекулу воды ( $E_{\text{ww}/1}$ ,  $E_{\text{dw}/1}$ ). На основе этих данных в системах с различным содержанием воды были рассчитаны избыточная энергия гидратации  $\Delta E = E_{\text{sum}/1} - E_{\text{ww}/1}$  (где  $E_{\text{sum}/1} = (E_{\text{ww}/1} + E_{\text{dw}/1})$ ,  $E_{\text{ww}/1}$  — средняя удельная энергия взаимодействия вода-вода в чистом водном кластере) и времена дипольной релаксации молекул воды в связанном состоянии  $\tau_d$  (уравнение (3)). Полученные данные приведены в таб.2.

Таблица 2. Энергетические характеристики систем АрА, УрУ, ТрТ в водных кластерах различных размеров и чистых водных кластерах соответствующих размеров

| n,<br>МН <sub>2</sub> О/<br>МО | систе-<br>ма     | E <sub>tot</sub> ,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | E <sub>ww</sub> ,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | E <sub>dw</sub> ,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | E <sub>ww/1</sub> ,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | E <sub>dw/1</sub> ,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | E <sub>sum/1</sub> ,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | ΔE,<br>кДж/<br>МН <sub>2</sub> О | τ <sub>d</sub> ·10 <sup>11</sup> ,<br>с |
|--------------------------------|------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|
| 20 Н <sub>2</sub> О            | АрА              | -925,5                                          | -270,0                                         | -433,9                                         | -13,4                                            | -21,7                                            | -35,1                                             | 10,45                            | 61,1                                    |
|                                | УрУ              | -1112,3                                         | -364,9                                         | -264,6                                         | -18,4                                            | -13,4                                            | -31,4                                             | 6,7                              | 13,5                                    |
|                                | ТрТ              | -979,0                                          | -341,5                                         | -252,5                                         | -17,1                                            | -12,5                                            | -29,7                                             | 5,0                              | 6,8                                     |
|                                | Н <sub>2</sub> О |                                                 | -439,7                                         |                                                | -24,7                                            |                                                  |                                                   |                                  |                                         |
| 40 Н <sub>2</sub> О            | АрА              | -1582,6                                         | -780,0                                         | -587,7                                         | -19,7                                            | -14,6                                            | -34,3                                             | 8,8                              | 31,3                                    |
|                                | УрУ              | -1836,3                                         | -863,6                                         | -397,9                                         | -21,7                                            | -10,0                                            | -31,4                                             | 6,3                              | 10,7                                    |
|                                | ТрТ              | -1453,0                                         | -728,6                                         | -329,0                                         | -18,4                                            | -8,4                                             | -26,3                                             | 1,3                              | 1,7                                     |
|                                | Н <sub>2</sub> О |                                                 | -1046,3                                        |                                                | -25,5                                            |                                                  |                                                   |                                  |                                         |
| 200<br>Н <sub>2</sub> О        | АрА              | -7227,6                                         | -5989,1                                        | -1030,8                                        | -30,1                                            | -5,0                                             | -35,1                                             | 2,1                              | 1,9                                     |
|                                | УрУ              | -7315,0                                         | -6081,5                                        | -609,0                                         | -30,5                                            | -2,9                                             | -33,4                                             | 0,4                              | 1,0                                     |
|                                | ТрТ              | -7160,8                                         | -6138,8                                        | -641,2                                         | -30,9                                            | -3,3                                             | -33,9                                             | 0,8                              | 1,2                                     |
|                                | Н <sub>2</sub> О |                                                 | -6653,7                                        |                                                | -33,0                                            |                                                  |                                                   |                                  |                                         |

Сопоставление результатов расчетов, выполненных методом Монте-Карло и данных калориметрического исследования динамических свойств связанной воды на матрицах полиА-полиУ при различных уровнях ОВ (рис.2) указывает на корреляцию результатов экспериментального и численного методов, состоящую в достаточно хорошем согласовании значений времени диэлектрической релаксации молекул воды, полученных разными методами.

### ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в настоящей работе, показали, что энергия дегидратации нуклеиновых кислот (независимо от нуклеотидного состава) уменьшается с ростом содержания воды в образце. Это означает, что энергии связывания молекул воды с матрицей биополимера уменьшаются по мере удаления от гидратно-активных центров. С увеличением содержания GC-пар в составе ДНК энергия дегидратации, а значит и энергия связывания молекул воды, увеличиваются, что проявляется в уменьшении подвижности молекул воды в гидратной оболочке ДНК (параметры τ<sub>d</sub>, V<sub>f</sub>). Также было установлено, что энергию дегидратации природной ДНК можно представить в виде суммы молярных вкладов энергий дегидратации полинуклеотидов АТ(АУ)- и GC-типа.

Таким образом, процесс формирования гидратного окружения биополимеров и его динамические свойства могут быть достаточно полно описаны на основе экспериментального (метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии в изотермическом режиме) и расчетного (метод Монте-Карло) подходов. Это представляет собой реальную перспективу для дальнейшего изучения роли водного окружения в процессе стабилизации и осуществлении конформационных переходов в системах ДНК-вода.

Авторы выражают благодарность Государственному фонду фундаментальных исследований за частичную финансовую поддержку данной работы (грант 2.4/759).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Edelhoch H., Osborne J.C. Jr. // *Adv. Protein Chem.* 1976. V.30. P.183-250.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М. Мир, 1987. 584с.
3. Saenger W. // *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1987. V.16. P.93-114.
4. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // *Биофизика.* 1993. Т.38. С.768-790.
5. Lindsay S.M., Lee S.A., Powell J.M., Weidlich T., DeMarko C., Lewen G.D., Tao N.J., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1988. V.27. P.1015-1043.
6. Мревлишвили Г.М. // *ДАН СССР.* 1981. Т.260. С.761-764.
7. Vovelle F., Goodfellow J.M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1990. V.12. P.369-373.
8. Schneider B., Cohen D., Berman H.M. // *Biopolymers.* 1992. V.32. P.725-750.
9. Andreasson B., Nordenskiöld L., Eriksson D.-O., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1994. V.34. P.1605-1614.
10. Lahajnar G., Zupancic I., Rupprecht A. In *Biophysics of Water* (Franks, F. & Mathias, S., eds). Wiley, New York, 1982. P.231-234.
11. Kim U.-S., Fujimoto B.S., Furlong C.E., Sundstrom J.A., Humbert R., Teller D.C., Schurr J.M. // *Biopolymers.* 1993. V.33. P.1725-1745.
12. Sprinz H., Döllstödt R., Hübner G. // *Biopolymers.* 1969. V.7 P.447-452.
13. Dahlborg U., Rupprecht A. // *Biopolymers.* 1971. V.10. P.849-863.
14. Liepinsh E., Otting G., Wüthrich K. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V.20. P.6549-6553.
15. Langan P., Forsyth V.T., Mahendrasingam A., Pigram W.J., Mason S.A., Fuller W. // *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 1992. V.10. P.489-503.
16. Jacobson A., Leupin W., Liepinsh E., Otting G. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V.24. P.2911-2918.
17. Семенов М.А., Малеев В.Я., Сухоруков Б.И. // *Биофизика.* 1978. Т.23. С.1097-1098.
18. Семенов М.А., Больбух Т.В. // *Биофизика.* 1984. Т.29. С.377-382.
19. Семенов М.А., Малеев В.Я. // *Биофизика.* 1986. Т.31. С.764-767.
20. Semenov M.A., Starikov E.B., Bolbukh T.V. // *Stud. Biophys.* 1988. V.123. P.217-224.
21. Gasan A.I., Maleev V.Ya., Semenov M.A. // *Studia Biophys.* 1990. V.130. P.171-178.
22. Wu J.Q., Macgregor R.B. Jr. // *Biopolymers.* 1995. V.35. P.369-376.
23. Семенов М.А., Гасан А.И., Больбух Т.В., Малеев В.Я. // *Биофизика.* 1996. Т.41. С.1007-1015.
24. Marlowe R.L., Lukan A.M., Lee S.A., Anthony L., Chandrasekaran R., Rupprecht A. // *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 1996. V.14. P.373-379.
25. Воронец Д., Козич Д. Влажный воздух: термодинамические свойства и применение. М. Энергоатомиздат, 1984. 135с.
26. Miller A.A. // *J. Chem. Phys.* 1963. V.38. P.1568-1571.
27. Némethy G., Scheraga H.A. // *J. Chem. Phys.* 1962. V.36. P.3382-3387.
28. Мэлвин-Хьюз Э.А. Физическая химия. Т.2. М.Изд-во Иностран. лит., 1962. 266с.
29. Brandes R., Vold R.R., Kearns D.R., Rupprecht A. // *J. Mol. Biol.* 1988. V.202. P.321-332.

УДК 577.3

## КВАНТОВОМЕХАНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КАТИОНОВ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Рубин Ю.В.<sup>1)</sup>, Рубина А.Ю.<sup>2)</sup>, Сорокин В.А.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Физико-технический институт низких температур им Б.И. Веркина, Харьков, 310164, пр.Ленина 47 (e-mail rubin@ilt.kharkov.ua)

<sup>2)</sup> Харьковский государственный университет, Харьков, 310077

Статья поступила 15 мая 1998г.

С целью изучения спектроскопических свойств катионов оснований нуклеиновых кислот с помощью двух вариантов метода CNDO/S проведен расчет энергий электронно-возбужденных состояний (ЭВС) четырех катионов гуанина, трех катионов и дикатиона аденина, а также двух катионов цитозина. Результаты расчетов сопоставлены с экспериментальными результатами для изученных ранее катионных форм этих оснований. Наблюдается достаточно хорошее согласие между экспериментальными и рассчитанными энергиями ЭВС. Расчеты предсказывают положение первых полос УФ поглощения для катионных форм аденина, гуанина и цитозина, для которых в настоящее время отсутствуют экспериментальные данные. В частности, предсказывается синий сдвиг спектра УФ поглощения О7Н катиона цитозина относительно спектра нейтральной формы, а также красный сдвиг спектра УФ поглощения N3H-, O10H-, енола N7H катиона гуанина, а также N3H и N7H катионов аденина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** квантовомеханические расчеты, основания нуклеиновых кислот, катионы, спектры УФ-поглощения

Квантовомеханические расчеты электронно-возбужденных состояний компонентов нуклеиновых кислот необходимы для понимания их спектров УФ поглощения и люминесценции, для объяснения явлений миграции энергии и гипохромизма ДНК. Катионы оснований нуклеиновых кислот рассматриваются, в частности, как модели металлокомплексов азотистых оснований [ 1, 2 ].

К настоящему времени несколькими авторами выполнены расчеты электронно-возбужденных состояний ( ЭВС ) канонических и минорных оснований нуклеиновых кислот [3-9]. Расчеты были выполнены с помощью полуэмпирических методов CNDO/S, в которых учитываются валентные электроны. Хотя некоторые авторы проводили расчеты ЭВС ионных и таутомерных форм канонических оснований, число таких расчетов весьма ограничено. Это связано, по-видимому, с отсутствием надежных данных о геометрии ионных форм оснований. В работах [10,11] приведены результаты расчетов геометрии и полной энергии нескольких наиболее стабильных таутомеров катионных форм гуанина и цитозина, выполненных ab initio методом MP2/6-31G\*. Это позволяет провести расчеты ЭВС этих катионов.

Целью нашей работы является теоретический расчет энергий ЭВС катионов гуанина, цитозина и аденина методом CNDO/S, а также сравнение полученных результатов с результатами расчетов нейтральных форм и с



экспериментальными данными. Полученные результаты значений энергии возбужденных состояний и сил осцилляторов позволяют прогнозировать положение полос поглощения тех катионных форм, для которых в настоящее время еще отсутствуют экспериментальные данные, а также объяснить спектры УФ-поглощения металлокомплексов компонентов нуклеиновых кислот.

## МЕТОДЫ РАСЧЕТА И ОБЪЕКТЫ

Как известно, для изучения электронных спектров поглощения молекул, содержащих системы сопряженных  $\pi$ -связей, наиболее широко используются полуэмпирические методы - в частности метод CNDO/S с учетом конфигурационного взаимодействия. В этом методе учитываются все валентные электроны, а в базисе - все атомные орбитали, соответствующие валентным оболочкам входящих в молекулу атомов [12,13].

В нашей работе мы использовали пакет программ расчета ЭВС, разработанный Барановым В.И., Савиным Ф.А., Грибовым Л.А. [14].

Для расчета электронно-возбужденных состояний использовали программу CNDO/S(A), которая является вариантом метода, предложенного Дель-Бене и Джаффе [15], с расчетом двухцентровых интегралов межэлектронного отталкивания с помощью модели заряженных сфер, а также программу CNDO/S(B) с расчетом двухцентровых интегралов межэлектронного отталкивания по формуле Матага-Нишимото [12,14]. Эти программы позволяют в частности производить расчет полной энергии, геометрии, зарядов на атомах, порядков связей основного состояния, а также энергий электронно-возбужденных состояний, сил осцилляторов, зарядов на атомах, порядков связей в электронно-возбужденных состояниях.

Программы позволяют провести расчет 10 синглетных, и триплетных  $\pi\pi^*$ -состояний, а также  $\pi\pi^*$ -состояний. Для анализа использовали по два-три состояния различной природы.

В расчетах мы использовали геометрию молекул гуанина, цитозина и их катионов, рассчитанную неэмпирическим методом MP2/6-31G\* с учетом корреляции электронов [10,11]. Данные по геометрии нейтральной формы аденина и его N1H-N7H-дикатиона были взяты из работ [1,16] по рентгеноструктурным исследованиям кристаллов аденина и бромида аденина. Геометрия N1H, N3H и N7H-катионов аденина была получена путем синтеза рентгеноструктурных данных, представленных в работах [1,16].

В расчетах нейтральных форм мы использовали кето-амино форму гуанина с протоном в 9 положении, аминокформу аденина с протоном в 9 положении и кето-амино форму цитозина с протоном в положении 1. Обозначения рассчитанных катионов следующие: для гуанина: N7H-катион - катион с протонированием по N7, N3H-катион - катион с протонированием по N3; O10H-катион - катион с протонированием по O10, N7H-O10H - катион - катион с протонированием по N7, в котором H из положения N1 перенесен в положение O10 (т.е. енольная форма N7H-катиона); для аденина: N1H-катион - катион с протонированием по N1, N3H-катион - катион с протонированием по N3, N7H-катион - катион с протонированием по N7, N1H-N7H- дикатион - дикатион с протонированием по N1 и N7; для цитозина: N3H- катион - катион с протонированием по N3, O7H- катион - катион с протонированием по O7.

Таблица 1. Теоретические и экспериментальные значения энергий электронных переходов (эВ) и сил осцилляторов (отн.ед., в скобках) нейтральной формы цитозина и его N3H и O7H-катионов.

| Форма          | Сост.            | Эксп.      | CNDO/S(A)  | CNDO/S(B)  |
|----------------|------------------|------------|------------|------------|
| Цитозин        | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.63(0.27) | 4.79(0.15) | 4.77(0.18) |
|                | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 5.55(0.39) | 5.93(0.10) | 5.98(0.05) |
|                | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.24(0.81) | 6.50(0.96) | 6.33(1.01) |
|                | $n-\pi^*$        |            | 4.70(0.00) | 4.39(0.00) |
|                | $T^1_{\pi\pi^*}$ | 3.46       | 3.25       | 2.72       |
| N3H-<br>катион | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.50(0.38) | 4.65(0.33) | 4.66(0.33) |
|                | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 5.85(0.49) | 6.25(0.10) | 6.52(0.16) |
|                | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.27(0.11) | 6.66(0.65) | 6.66(0.56) |
|                | $n-\pi^*$        |            | 5.60(0.00) | 5.21(0.00) |
|                | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.26       | 3.06       |
| O7H-<br>катион | $S^1_{\pi\pi^*}$ |            | 5.17(0.18) | 5.23(0.24) |
|                | $S^2_{\pi\pi^*}$ |            | 5.57(0.15) | 5.67(0.21) |
|                | $S^3_{\pi\pi^*}$ |            | 6.51(0.69) | 6.38(0.61) |
|                | $n-\pi^*$        |            | 5.71(0.00) | 5.51(0.00) |
|                | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.57       | 3.19       |

Полученные результаты расчета энергий ЭВС мы сравнивали с экспериментальными данными, приведенными в работах [6,17].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных расчетов приведены в таблицах 1-3, где также приведены экспериментальные результаты по определению энергий ЭВС из работ [6,17].

Рассмотрим вначале результаты расчетов нейтральных и катионных форм цитозина (Cyt). Как видно из табл.1, расчетные значения энергий синглетных состояний нейтральной формы Cyt несколько завышены по сравнению с экспериментальными значениями. В то же время расчетная энергия первого триплетного состояния ниже экспериментальной энергии этого состояния. В среднем различия экспериментальных и теоретических результатов для рассмотренных полос лежат в пределах 0,3 эв. Расчет показывает наличие  $\pi\pi^*$  состояния вблизи  $S^1_{\pi\pi^*}$  состояния. Однако экспериментально не обнаружено существование  $\pi\pi^*$  состояния меньшей энергии, чем  $S^1_{\pi\pi^*}$  состояние.

Таблица 2. Теоретические и экспериментальные значения энергий электронных переходов (эВ) и сил осцилляторов (отн.ед., в скобках) нейтральной формы гуанина и его N3H, N7H, O10H и N7H-O10H-катионов.

| Форма                   | Сост.            | Эксп.      | CNDO/S (A) | CNDO/S (B) |
|-------------------------|------------------|------------|------------|------------|
| Гуанин                  | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.52(0.34) | 4.70(0.33) | 4.67(0.39) |
|                         | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 5.09(0.41) | 5.45(0.32) | 5.21(0.42) |
|                         | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.06(0.61) | 6.32(0.05) | 6.21(0.02) |
|                         | $n-\pi^*$        |            | 5.22(0.01) | 4.78(0.00) |
|                         | $T^1_{\pi\pi^*}$ | 3.37       | 3.44       | 2.90       |
| N3H-<br>катион          | $S^1_{\pi\pi^*}$ |            | 4.62(0.28) | 4.43(0.27) |
|                         | $S^2_{\pi\pi^*}$ |            | 5.40(0.17) | 5.20(0.24) |
|                         | $S^3_{\pi\pi^*}$ |            | 6.21(0.00) | 6.32(0.02) |
|                         | $n-\pi^*$        |            | 5.08(0.00) | 4.74(0.00) |
|                         | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.56       | 2.10       |
| N7H-<br>катион          | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.51(0.31) | 4.74(0.29) | 4.50(0.43) |
|                         | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 5.03(0.37) | 4.79(0.37) | 4.66(0.31) |
|                         | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.07(0.53) | 6.26(0.12) | 6.02(0.18) |
|                         | $n-\pi^*$        |            | 5.15(0.00) | 4.71(0.00) |
|                         | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.27       | 2.73       |
| O10H-<br>катион         | $S^1_{\pi\pi^*}$ |            | 4.39(0.22) | 4.34(0.26) |
|                         | $S^2_{\pi\pi^*}$ |            | 5.06(0.26) | 5.11(0.36) |
|                         | $S^3_{\pi\pi^*}$ |            | 6.23(0.65) | 6.09(0.68) |
|                         | $n-\pi^*$        |            | 5.48(0.00) | 5.28(0.00) |
|                         | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.14       | 2.75       |
| N7H-<br>O10H-<br>катион | $S^1_{\pi\pi^*}$ |            | 4.60(0.32) | 4.44(0.36) |
|                         | $S^2_{\pi\pi^*}$ |            | 5.05(0.10) | 5.06(0.07) |
|                         | $S^3_{\pi\pi^*}$ |            | 5.89(0.00) | 5.96(0.09) |
|                         | $n-\pi^*$        |            | 5.04(0.00) | 4.75(0.00) |
|                         | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.40       | 3.04       |

Сопоставление значений экспериментальных и теоретически рассчитанных энергий трех синглетных состояний N3H катиона показывает их достаточно хорошее согласие (различие 0,15; 0,4 и 0,39 эВ). Расчеты и эксперимент показывают, что при

переходе от нейтральной формы к N3H катиону наблюдается красный сдвиг первой полосы УФ поглощения. Положение триплетного уровня не должно особенно изменяться. Расчет показывает значительное увеличение энергии  $\pi\pi^*$  состояния.

Сравнение рассчитанных энергий синглетных и триплетных  $\pi\pi^*$  состояний для ОН катиона Суt и нейтральной формы показывает увеличение энергии первой полосы и  $T^1_{\pi\pi^*}$  полосы, что предполагает синий сдвиг спектра УФ поглощения первой полосы и синий сдвиг спектра фосфоресценции ОН катиона цитозина. Следует отметить, что расчет методом CNDO/S(B) также дал красный сдвиг для N3H катиона и синий сдвиг для О7Н катиона для первой полосы УФ поглощения этих катионов относительно нейтральной формы.

В таблице 2 представлены результаты расчетов, выполненных методами CNDO/S(A) и CNDO/S(B) для нейтральной и катионных форм гуанина,

Сопоставление экспериментальных и теоретических результатов для синглетных и триплетных  $\pi\pi^*$  состояний нейтральной формы гуанина показывает, что рассчитанные энергии немного завышены (в среднем на 0,3 эв) по сравнению с экспериментально наблюдаемыми энергиями. Результаты расчета, выполненного методом CNDO/S(B), лучше согласуются с экспериментальными результатами.

Анализ теоретически рассчитанных экспериментальных энергий синглетных  $\pi\pi^*$  состояний N7H катиона показывает, что расчетные значения энергий, полученные с помощью метода CNDO/S(B), лучше согласуются с экспериментальными результатами для первой и третьей полос. Расчет этим методом предсказывает красный сдвиг первой полосы УФ поглощения N7H катиона гуанина.

Несмотря на то, что имеются различия в энергиях синглетных  $\pi\pi^*$  состояний для N7H катиона, рассчитанных методами CNDO/S(A) и CNDO/S(B), больших различий в расчете энергий этих же состояний для N3H, O10H и N7H - O10H катионов нет. Расчет предсказывает для этих трех катионов красный сдвиг первой полосы УФ поглощения. Следует отметить что, хотя кето форма N7H катиона является наиболее стабильной, енольная форма этого катиона также весьма стабильна - разность в стабильности этих форм 2-3 ккал/моль [10]

Сравнение экспериментальных данных и результатов расчета ЭВС методами CNDO/S(A) и CNDO/S(B) для нейтральной формы аденина (табл 3) показывает, что расчеты энергии первого, третьего и  $T^1_{\pi\pi^*}$  состояния завышены по сравнению с экспериментально наблюдаемыми. При переходе к N1H катиону расчет и эксперимент показывают красный сдвиг первой полосы УФ поглощения. Расчет предсказывает небольшой красный сдвиг для третьей полосы, что не согласуется с экспериментом. Сравнение теоретических расчетов ЭВС дикатиона аденина с экспериментальными результатами показывает завышение расчетных энергий ЭВС для первой и второй полос, а для третьей полосы энергия ЭВС занижена. Для дикатиона теоретический расчет и эксперимент показывают уменьшение энергии (красный сдвиг) первой синглетной полосы по сравнению с нейтральной молекулой.

Для нейтральной молекулы аденина, N1H катиона и дикатиона расчет показывает наличие синглетного  $\pi\pi^*$  состояния с энергией равной или меньшей, чем энергия  $S^1_{\pi\pi^*}$  состояния. Однако нет убедительных экспериментальных результатов, подтверждающих, что  $\pi\pi^*$  состояние у аденина в полярном растворителе является нижним по энергии синглетным состоянием. Анализ спектров люминесценции нейтральной формы аденина в полярном растворителе показывает [17], что вероятно

Таблица 3. Теоретические и экспериментальные значения энергий электронных переходов (эВ) и сил осцилляторов (отн.ед., в скобках) нейтральной кристаллической формы аденина, его N1H, N3H, N7H -катионов и N1H-N7H-дicationa.

| Форма                | Сост.            | Эксп.      | CNDO/S (A) | CNDO/S (B) |
|----------------------|------------------|------------|------------|------------|
| Аденин               | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.75(0.49) | 5.03(0.22) | 5.03(0.02) |
|                      | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 5.26(0.06) | 5.07(0.07) | 5.18(0.43) |
|                      | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.06(1.04) | 6.35(0.36) | 6.30(0.78) |
|                      | $n-\pi^*$        |            | 5.03(0.00) | 4.82(0.00) |
|                      | $T^1_{\pi\pi^*}$ | 3.31       | 3.55       | 2.95       |
| N1H-<br>катион       | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.72(0.54) | 4.58(0.20) | 4.58(0.27) |
|                      | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 5.26(0.08) | 4.99(0.17) | 5.06(0.23) |
|                      | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.13(0.83) | 6.17(0.38) | 6.09(0.48) |
|                      | $n-\pi^*$        |            | 5.63(0.00) | 5.49(0.00) |
|                      | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.34       | 3.01       |
| N3H-<br>катион       | $S^1_{\pi\pi^*}$ |            | 4.93(0.34) | 4.80(0.41) |
|                      | $S^2_{\pi\pi^*}$ |            | 5.20(0.03) | 5.36(0.00) |
|                      | $S^3_{\pi\pi^*}$ |            | 6.49(0.16) | 6.23(0.36) |
|                      | $n-\pi^*$        |            | 5.30(0.01) | 5.26(0.01) |
|                      | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.55       | 3.24       |
| N7H-<br>катион       | $S^1_{\pi\pi^*}$ |            | 4.75(0.28) | 4.61(0.30) |
|                      | $S^2_{\pi\pi^*}$ |            | 5.04(0.03) | 5.03(0.00) |
|                      | $S^3_{\pi\pi^*}$ |            | 5.86(0.31) | 5.83(0.62) |
|                      | $n-\pi^*$        |            | 4.97(0.00) | 4.77(0.00) |
|                      | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.37       | 2.91       |
| N1H-N7H-<br>дication | $S^1_{\pi\pi^*}$ | 4.56(0.25) | 4.69(0.24) | 4.65(0.33) |
|                      | $S^2_{\pi\pi^*}$ | 4.90(0.31) | 5.28(0.24) | 5.33(0.29) |
|                      | $S^3_{\pi\pi^*}$ | 6.52(1.36) | 6.29(0.15) | 6.28(0.09) |
|                      | $n-\pi^*$        |            | 6.02(0.01) | 5.92(0.01) |
|                      | $T^1_{\pi\pi^*}$ |            | 3.39       | 3.13       |

нижним по энергии синглетным состоянием является состояние  $S^1_{\pi\pi^*}$  типа.



Анализ расчетов N3H катиона показывает уменьшение энергии ЭВС первой полосы по сравнению с энергиями ЭВС нейтральной формы, в то же время энергии второй и третьей полос возрастают. В случае N7H катиона наблюдается уменьшение энергий ЭВС трех синглетных полос катиона по сравнению с нейтральной формой. Таким образом, расчет предсказывает красный сдвиг первой полосы в спектрах УФ поглощения N7H и N3H катионов аденина по сравнению с нейтральной формой.

## ВЫВОДЫ

С помощью двух вариантов метода CNDO/S проведены расчеты энергий возбужденных состояний 4 катионов гуанина, 3 катионов и дикатиона аденина и двух катионов цитозина, а также нейтральных форм этих оснований.

Расчеты энергий ЭВС нейтральных и катионных форм оснований нуклеиновых кислот достаточно хорошо согласуются с энергиями ЭВС, полученными из эксперимента (в тех случаях, когда имеются экспериментальные данные для рассматриваемых катионных форм).

Расчеты энергий ЭВС катионных форм исследованных оснований предсказывают синий сдвиг первой полосы УФ поглощения у O7H-катиона цитозина, красный сдвиг первой полосы у N3H, O10H и енола N7H катиона гуанина и у N3H и N7H катионов аденина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зенгер В.. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. Москва: Мир, 1987. 584с.
2. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наук.думка, 1991. 272с.
3. Hug W., Tinoco I. // JACS. 1973. v.95. p.2803-2819.
4. Желтовский Н.В., Данилов В.И. // Биофизика. 1974. Т.19. с. 784-792.
5. Maranon J., Sortagraín O. M. // Z.Naturforsch. 1977. v.32c, N7-8. p.657-669
6. Бородавкин А.В., Будовский Э.И., Морозов Ю.В., Савин Ф.А., Симукова Н.А. Молекулярная биология. Москва: Итоги науки и техники, 1977. Т.14. 228с.
7. Куприевич В.А., Шрамко О.В. // Успехи квантовой химии и квантовой биологии. ч.1. Киев: 1980. с.205-210.
8. Тулуб А.А., Семенов С.Г., Рапопорт А.Л. // Хим. физика. 1985. Т.4, N1. с. 25-29.
9. Petke J. D., Maggiore G. M., Christoffersen R. E. // J. Amer. Chem. Soc. - 1990. v.112, N14. p.5452-5460.
10. Colominas C., Luque F. J., and Orozco M. // JACS. 1996. v.118. p.6811-6821.
11. Florian J., Baumruk V., Leszczynski J. // J.Phys.Chem. 1996. v.100, N13. p. 5578-5589.
12. Полуэмпирические методы расчета электронной структуры. Т.2./ под ред. Дж. Сигала - М.: Мир, 1980. 371с.
13. Щембелов Г.А., Устынюк Н.А. Квантовохимические методы расчета молекул - М.: Химия, 1980. 255с.
14. Баранов В.И., Савин Ф.А., Грибов Л.А. Программа расчета электронно-колебательных спектров многоатомных молекул. М.: Наука, 1983. 192с.
15. Del Bene J., Jaffe H.H. // J.Chem. Phys. 1968. v.48, N4. p.1807-1813.
16. Brayan R. F., Tomita Ken-Ichi. // Acta Cryst. 1962. v.15. p.1180-1182.
17. Gueron M., Eisinger J., Shulman R. // J.Chem.Phys. 1967. v.47. p.4077-4091.

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ  
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В УЗНАЮЩЕМ  
КОМПЛЕКСЕ МЕТИЛУРАЦИЛА С АКРИЛАМИДОМ.****И.К. Галетич, С.Г. Степаньян, В.С. Шелковский,  
М.В. Косевич, Ю.П. Благой, Л. Адамович\****Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,  
проспект Ленина, 47, 310164, Харьков, Украина.**\* Университет Аризоны, Химический факультет, Тусон, Аризона, 85721 AZ, США.*

Статья поступила 17 мая 1998г.

Определены структурные и энергетические параметры межмолекулярных взаимодействий в модельном узнающем комплексе нуклеинового основания 1-метилурацил с боковыми радикалами аминокислот аспарагина и глутамина. Величина энтальпии образования комплекса  $\Delta H$ , измеренная посредством метода температурно-зависимой ионизационно-полевой масс-спектрометрии, составляет  $(-40,6 \pm 4,2)$  кДж/моль и находится в хорошем согласии со значениями энергии взаимодействия в двух наиболее выгодных конфигурациях димеров, рассчитанных методами MP2 и DFT.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** белково-нуклеиновое узнавание, масс-спектрометрия, ab initio расчеты.

Белково-нуклеиновое узнавание, являющееся важным этапом во многих процессах биорегуляции, активно изучается разнообразными молекулярно-биологическими и биофизическими методами [1,2]. Однако, большинство из этих методов дают информацию преимущественно о структуре узнающих комплексов. Определяемые энергетические параметры относятся, в основном, к суммарному взаимодействию на уровне макромолекул, что не позволяет выделить вклад специфических взаимодействий в узнающих центрах. Для решения последней задачи используется подход экспериментального и теоретического моделирования узнающих центров, включающих небольшое число связанных посредством водородных связей функциональных атомных групп биополимеров [3].

Эффективным методом определения термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий в комплексах мономеров биополимеров является метод температурно-зависимой масс-спектрометрии с полевой ионизацией (ПИ), разработанный во ФТИНТ НАН Украины [4]. Среди теоретических квантово-химических методов моделирования межмолекулярных комплексов наибольшей точностью отличаются неэмпирические методы DFT (Density Functional Theory, Теория Функционала плотности) и теория возмущений MP2 (Moller-Plesset). Целью настоящей работы, продолжающей серию модельных исследований узнающих центров в белково-нуклеиновых комплексах [5-7], явилось изучение структурных и энергетических

параметров комплексов 1-метилурацила ( $m^1\text{Ura}$ ) с акриламидом ( $\text{Acr}$ ), моделирующим боковые радикалы аминокислот аспарагина и глутамина. Для определения энтальпий взаимодействия использовали экспериментальный метод температурно-зависимой ПИ масс-спектрометрии и теоретические методы **MP2** и **DFT**; эти же теоретические методы использовали для установления оптимальной структуры ассоциатов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Экспериментальное определение энтальпии взаимодействия в комплексе  $m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}$  проводили с помощью метода температурно-зависимой ПИ масс-спектрометрии. Подробное описание метода можно найти в работах [4,8,9]. Метод основан на построении Вант-Гоффовских графиков, представляющих собой зависимость константы ассоциации  $K_{\text{асс}}$  молекул в газовой фазе от температуры и содержащих исходные данные для расчета энтальпий образования комплексов по формуле:

$$\ln K_{\text{асс}} = -(\Delta H/RT) + \text{const} \quad (1)$$

Ранее было установлено, что ионные токи компонентов реакционной системы (мономеров и продуктов их ассоциации) в ПИ масс-спектрах прямо пропорциональны концентрациям этих компонентов в газовой фазе [10], что позволяет использовать интенсивности соответствующих пиков в масс-спектрах для расчетов  $K_{\text{асс}}$ .

Температура реакционной зоны регулировалась посредством изменения температуры ПИ эмиттера [9]. Анализ условий термодинамического равновесия в используемых экспериментальных условиях проведен в [4,8].

Измерения проводили при помощи секторного магнитного масс-спектрометра МИ 1201 (ПО «Электрон», Сумы, Украина), снабженного лабораторным ПИ источником ионов [4,11]. В работе использовали препараты 1-метилурацила и акриламида производства фирмы «Reanal», Венгрия.

Теоретические квантово-химические расчеты структурных и энергетических параметров димеров проводили методами **DFT / B3LYP** и **MP2** [12-16] с использованием программы **GAUSSIAN-94** [17]. На первом этапе проводилась полная оптимизация геометрии димеров на уровне **DFT / B3LYP/ 6-31++G\*\***. Для найденной по этой процедуре геометрии определяли гармонические частоты для расчета поправок к энергии нулевых колебаний (**ZPVE** - zero-point vibration energy). Затем геометрия найденных димеров реоптимизировалась методом **MP2/6-31+G\***. При расчете энергий взаимодействия использовали **BSSE** (basic set superposition error) поправку.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полевые масс-спектры газовой фазной системы ( $m^1\text{Ura} + \text{Acr}$ ) содержали пики, соответствующие молекулярным ионам мономеров а также ионам гомо- и гетероассоциатов. Соотношение интенсивностей ( $I$ ) этих пиков изменялось при постепенном (ступенчатом) изменении температуры реакционной зоны. Константа ассоциации  $K_{\text{асс}}$  рассчитывалась как

$$K_{\text{асс}} = I_{[m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}]} / (I_{[m^1\text{Ura}]} \cdot I_{[\text{Acr}]}) \quad (2)$$

Зависимость  $K_{\text{асс}}$  от температуры (Вант-Гоффовская зависимость) приведена на Рис 1.

Величина энтальпии образования водородно-связанного ассоциата  $m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , рассчитанная по формуле (1), оказалась равной  $40,6 \pm 4,2$  кДж/моль.

Квантово-химические расчеты, проведенные по методам, описанным выше, дали две равновесные структуры (А и В) димера  $m^1\text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , приведенные на Рис 2 (а,б).

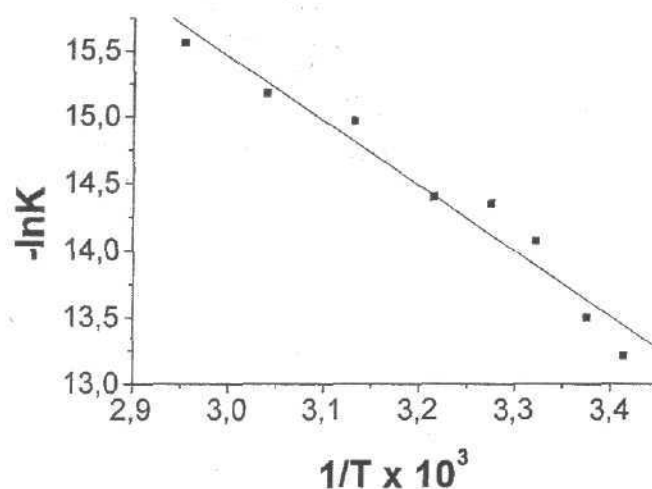


Рисунок 1. Температурная зависимость константы ассоциации  $K_{\text{асс}}$  для водородно-связанных димеров  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , определенная на основании данных ПИ масс спектров газофазной реакционной системы ( $m^1 \text{Ura} + \text{Acr}$ ).

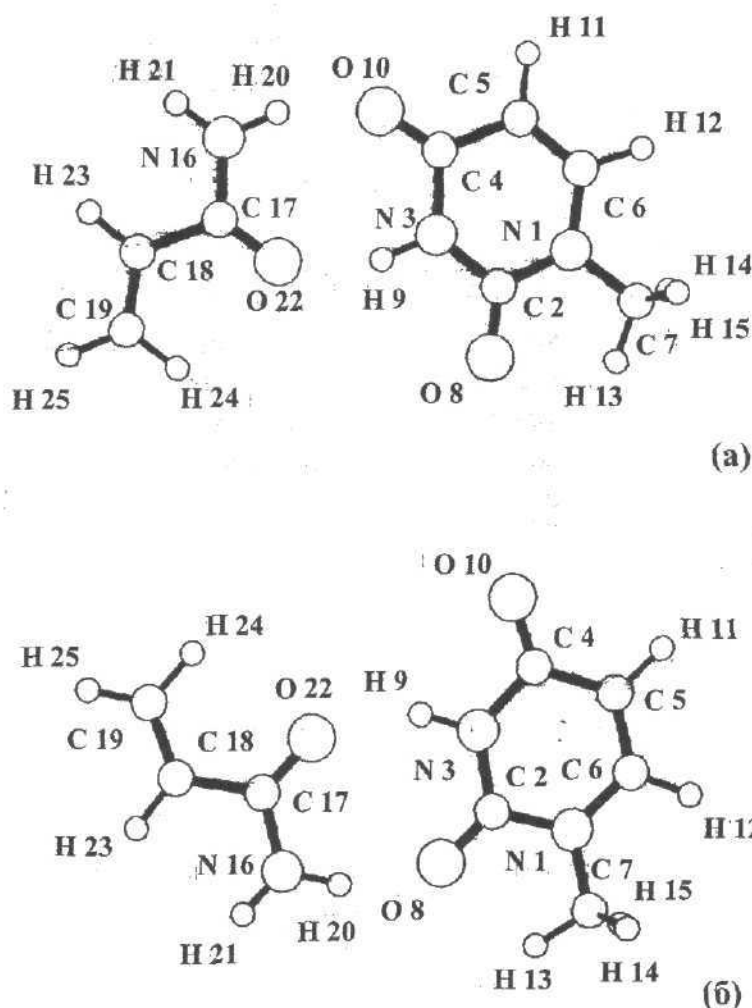
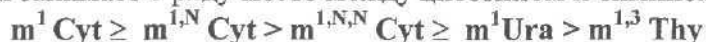


Рисунок 2. Равновесные структуры А и В для димера  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Acr}$ , рассчитанные на уровне  $\text{MP2/6-31+G}^*$  (Геометрические параметры комплексов могут быть получены у авторов. (E-mail: stepanian@ilt.kharkov.ua))

Оба димера имеют планарную структуру и стабилизированы N-H...O водородными связями. Энергия взаимодействия для двух структур имеет близкие значения: (- 52.70) кДж/моль для структуры (а) и (- 47.36) кДж/моль для структуры (б), рассчитанные методом **DFT / B3LYP/ 6-31++G\*\*** и (-51.43) кДж/моль для структуры (а) и (- 47.84) кДж/моль для структуры (б), рассчитанные методом **MP2/6-31+G\***. Наблюдается хорошее согласие рассчитанных энергий с экспериментально определенной величиной  $\Delta H$ . Сравнение величины  $\Delta H$ , определенной в данной работе для комплекса  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Asr}$  со значениями  $\Delta H$ , измеренными в ряде предшествующих работ для других оснований [6,7], показывает, что урацил по прочности связывания с амидной группой занимает в ряду место между цитозином и тиминном:



В работе [18] с использованием модельного подхода при изучении ДНК - белковых взаимодействий показано дестабилизирующее влияние акриламида и глутаминна на ДНК, связанное с образованием водородных связей между амидной группой и основаниями ДНК в односпиральных участках. В работе [19] методом ЯМР также было обнаружено взаимодействие амидной группы с основаниями посредством водородной связи в растворителе хлороформе. Это указывает на важное значение амидной группы как элемента белковой структуры и возможность ее непосредственного участия в функционировании белков, расплетающих двойную спираль нуклеиновых кислот. Контакты посредством водородных связей между нуклеиновыми основаниями и амидной группой реализуются в кристаллической структуре специфического комплекса репрессор-оператор бактериофага 434 изученного рентгеноструктурным методом [20].

## ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований показывают, что димер  $m^1 \text{Ura} \cdot \text{Asr}$  имеет планарную структуру; связывание азотистого основания и акриламида (моделирующего боковые радикалы аминокислот аспарагина и глутаминна) осуществляется посредством N-H...O водородных связей. Наблюдается хорошее согласие между экспериментально измеренной энтальпией образования комплекса  $\Delta H = (-40,6 \pm 4,2)$  кДж/моль и теоретически определенными энергиями взаимодействия в двух оптимальных конформациях димеров (-51.43) кДж/моль и (- 47.84) кДж/моль (по данным метода **MP2/6-31+G\***). Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях белково-нуклеиновых комплексов в рамках модели точечных контактов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Methods in Enzymology. Protein-DNA interactions. San Diego. Academic Press. 1998. V 208. p. 528.
2. G.G.Kneale. Methods in Molecular Biology. DNA-protein interaction. Ed.Totowa, NJ. The Humana Press. 1994. 148 p.
3. Saenger W., Jeffrey J. Hydrogen bonding in biological structures. Berlin. Springer. 1991.347p.
4. Веркин Б.И., Янсон И.К., Суходуб Л.Ф., Теплицкий А.Б. Взаимодействия биомолекул. Новые экспериментальные подходы и методы. Киев. Наукова Думка. 1985. 164 с.
5. Теплицкий А.Б., Галетич И.К., Суходуб Л.Ф. // Молекулярная биология. 1990.Т.35, N 5. с. 709 - 710.
6. Poltev V.I., Shulyupina N.V., Bruskov V.I. et al. // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 1991. V. 9, N1. P. 101-111.
7. Галетич И.К., Шелковский В.С., Косевич М.В., Благоев Ю.П. // Сборник «Проблемы биологии и медицины». Харьков-Полтава. 1998. с. 75-88.



8. Sukhodub L.F. // Chem. Rev. 1987. V. 87, N3. P. 589-606.
9. Шелковский В.С. // Дис. Канд. физ. - мат. наук. 1985. Харьков. 172 с.
10. Король Э.Н., Лобанов В.В., Назаренко В.А., Покровский В.А. Физические основы полевой масс-спектрометрии. Киев. Наукова Думка. 1978. 195с.
11. Sukhodub L.F., Shelkovsky V.S., Wierzchowski K.L. // Biophys Chem. 1984. V. 19. P. 191-200
12. Binkley J.S., Pople J.A. // Int. J. Quantum Chem. 1975. V. 9. P. 229.
13. Pople J.A., Binkley J.S., Seeger R. // Int. J. Quantum Chem. Quantum Chem. Symp. 1976. V10. P. 1
14. Becke A.D. // Phys. Rev. B 1988. V 38. P. 3098.
15. Lee C., Yang W., Parr R.G. // Phys. Rev. B 1988. V. 37. P. 785.
16. Vosko S.H., Wilk L., Nusair M. // Can. J. Phys. 1980. V. 58. P. 553.
17. Frish M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et. al. *Gaussian 94, Revision E.2*; Gaussian Inc. Pittsburgh. PA. 1994.
18. Смолянинова Т.И., Брусков В.И., Кашпарова Е.В. // Молекулярная биология. 1985. Т. 19, N4. с. 992-1000.
19. Helene C., Lancelot G. // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1982. 39. P. 1- 68.
20. Anderson J.E., Ptashne M., Harrison S.C. // Nature. - 1987. - V. 326. - P. 846-852.

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ  $\text{Cu}^{2+}$  НА ДНК В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ 1,2-ПРОПАНДИОЛ И ГЛИЦЕРИН, МЕТОДОМ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ****Е.В. Хакл, С.В. Корнилова, Ю.П. Благой**

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

Статья поступила 20 мая 1998 г.

В настоящей работе методом ИК спектроскопии изучено взаимодействие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с ДНК в водных растворах, содержащих малые (до 20 об %) добавки глицерина и 1,2-пропандиола, при 29 и 45<sup>0</sup>С. Показано, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  вызывают переход ДНК в компактную форму в водном и водно-глицериновом (пропандиоловом) растворах как при 29, так и при 45<sup>0</sup>С. Этот процесс носит кооперативный характер. Добавление 1,2-пропандиола к водному раствору ДНК увеличивает кооперативность перехода ДНК в компактную форму и уменьшает концентрацию ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , необходимую для индуцирования этого процесса. Эффект 1,2-пропандиола монотонно увеличивается с ростом его объемной концентрации (в интервале концентраций 0-20 об %) при 29 и 45<sup>0</sup>С. Влияние глицерина на компактизацию ДНК носит немонотонный характер: малые (4 об %) добавки глицерина к водному раствору ДНК уменьшают кооперативность перехода ДНК в компактное состояние при 29<sup>0</sup>С. Сравнение влияния малых добавок 1,2-пропандиола и глицерина, для которых изменение диэлектрической проницаемости раствора практически одинаково, на  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированную конденсацию ДНК позволяет сделать вывод о том, что конденсация ДНК под влиянием ионов  $\text{Cu}^{2+}$  зависит не только от диэлектрической проницаемости, но и от структуры образующегося раствора.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДНК, ИК-спектроскопия, ионы меди, 1,2-пропандиол, глицерин, конденсация ДНК.

В нашей предыдущей работе [1] мы показали, что под действием ионов двухвалентных металлов, в том числе ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , ДНК может переходить в компактное состояние. Используя в этой работе метод ИК спектроскопии, позволяет исследовать взаимодействие ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с ДНК в растворе с высокой концентрацией биополимера, достаточно близкой к локальной концентрации ДНК *in vivo* [2]. Дальнейшим приближением к условиям, в которых функционирует ДНК в живой клетке, является изучение взаимодействия ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с ДНК в растворе с пониженной активностью воды, поскольку в клетке ДНК находится в условиях частичной дегидратации [3]. *In vitro* понижение активности воды эквивалентно добавлению менее полярных, чем вода, растворителей к водному раствору ДНК. В

настоящей работе мы исследовали взаимодействие ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водных растворах, содержащих малые (до 20 об. %) добавки 1,2-пропандиола и глицерина.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась нативная ДНК тимуса теленка с молекулярным весом  $1.9 \cdot 10^7$  Da, содержанием белка менее 0.3 %, РНК менее 0.2 % и гипохромным эффектом 36 %. Количество элементов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , определенное с помощью пламенного фотометра ФПЛ-1, в препаратах ДНК по отношению к их сухому весу составляло соответственно  $7.0 \pm 0.2\%$  и  $0.6 \pm 0.2\%$ . ДНК была получена в лаборатории проф. Д. Ландо (Институт биоорганической химии АН Республики Беларусь). Подробно методы определения и очистки препарата ДНК описаны в [4]. Препараты ДНК растворяли в какодилатном буфере, концентрация ионов  $\text{Na}^+$  составляла  $5 \times 10^{-3}$  М,  $\text{pH} = 7.0$ . Концентрация ДНК в растворе определялась с помощью УФ-спектроскопии [5] и была в пределах  $(3 \div 5) \times 10^{-2}$  М фосфора.

Активность воды изменялась путем добавления 1,2-пропандиола или глицерина к водному раствору ДНК. В работе использовались спектрально чистые препараты глицерина и пропандиола («Sigma»), а также  $\text{CuCl}_2$  (х.ч.). Концентрация неэлектролитов выражалась в объемных процентах.

Инфракрасные спектры комплексов ДНК с ионами меди регистрировали с помощью двухлучевого инфракрасного спектрофотометра UR-20 (Karl Zeiss, Германия). Оптимальная ширина щели соответствовала щелевой программе N 4, скорость регистрации спектра -  $10 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$ . Для записи спектров использовались флюоритовые разборные кюветы с толщиной рабочего слоя 50  $\mu\text{м}$ , сделанные по модели, предложенной Фишманом [6]. Подробно конструкция кювет описана в работах [7, 8]. Кюветы термостатировались при температуре 29 или  $45^\circ\text{C}$  с помощью термостата, температура в кювете измерялась термопарой медь-константан с точностью  $\pm 0.05^\circ\text{C}$ .

Оптическую плотность  $D$  (с точностью 2 %) определяли методом базовой линии [9], за которую принимали значение  $D$  при построении общего спектра поглощения на частоте  $\nu = 1400 \text{ см}^{-1}$ , где отсутствовали полосы поглощения.

Поскольку в области поглощения фосфатных групп ДНК ( $1000\text{--}1400 \text{ см}^{-1}$ ) присутствуют полосы поглощения С-О групп использовавшихся в работе спиртов, проводилась компенсация растворителей путем помещения в канал сравнения спектрофотометра кюветы переменной толщины с растворителем. Подробно принцип компенсации применительно к используемым кюветам описан в [8].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были получены ИК-спектры комплексов ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водном и смешанных растворах, содержащих 4 и 9 % глицерина, 4, 9 или 20 % пропандиола, при температуре 29 и  $45^\circ\text{C}$ . Спектры регистрировались в области поглощения фосфатных групп ДНК ( $1000\text{--}1400 \text{ см}^{-1}$ ). Поскольку изменения, происходящие в ИК спектрах ДНК при ее связывании с ионами меди в водных и смешанных растворах, содержащих добавки 1,2-пропандиола и глицерина, имеют сходный характер, рассмотрим общие особенности ИК спектров комплексов ДНК- $\text{Cu}^{2+}$  на примере ИК спектров комплексов ДНК -  $\text{Cu}^{2+}$  в 4%-ном водном растворе 1,2-пропандиола, полученных при  $45^\circ\text{C}$  (рис.1):

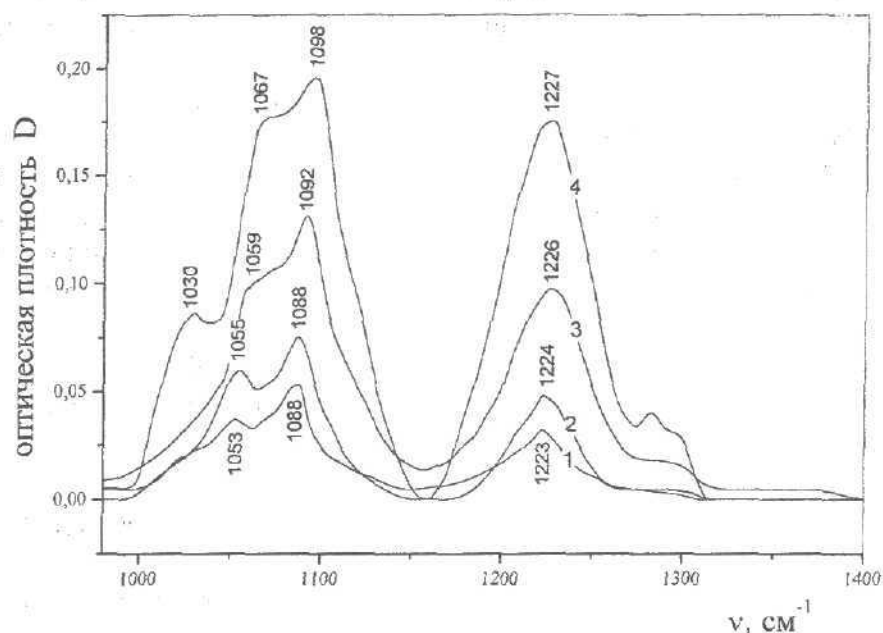


Рисунок 1. ИК спектры ДНК (1) и комплексов ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водном растворе, содержащем 4 об % пропандиола; концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$ : 2 -  $3.87 \times 10^{-3}$  М, 3 -  $5.57 \times 10^{-3}$  М, 4 -  $1 \times 10^{-2}$  М; концентрация ДНК - 0.047 М фосфора, температура -  $45^\circ\text{C}$ .

- при взаимодействии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с ДНК (кроме комплексов с высокой концентрацией меди, см. далее) наблюдается смещение полос при 1089-90 (симметричные колебания фосфатных групп) и  $1223 \text{ см}^{-1}$  (асимметричные колебания фосфатных групп) к  $1095 - 1097 \text{ см}^{-1}$  и  $1225 - 1227 \text{ см}^{-1}$ , соответственно. Подобные изменения в ИК спектрах ДНК говорят о связывании ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с фосфатными группами ДНК во всех исследованных растворах.
- в спектрах комплексов ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (кроме комплексов с высокой концентрацией меди) присутствует маркерная полоса В-формы ДНК при  $1223 \text{ см}^{-1}$ , а также полоса при  $1053 \text{ см}^{-1}$  (колебания С-О-Р групп сахарофосфатного остова), показывающая, что ДНК находится в двуспиральном состоянии [10]. Присутствие этих полос в спектрах наряду с отсутствием значительных смещений этих полос свидетельствует о том, что ДНК в комплексе с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  остается в пределах В-конформации.
- при увеличении концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  до  $[\text{Cu}^{2+}] / [\text{P}] \sim 0.5 \div 0.7$  происходят сдвиги полос поглощения при  $1090 \rightarrow 1100$  и  $1223 \rightarrow 1230 \text{ см}^{-1}$ , при этом полоса  $1053 \text{ см}^{-1}$  сдвигается к  $1060-1065 \text{ см}^{-1}$ , превращается в плечо или полностью исчезает. Все эти изменения в спектре свидетельствуют о частичном разупорядочении ДНК в комплексах с высокой концентрацией меди. Сдвиг полосы  $1223 \rightarrow 1230-31 \text{ см}^{-1}$  может свидетельствовать о частичном переходе ДНК в А-форму в комплексе с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (следует отметить, что подобный сдвиг полосы при  $1223 \text{ см}^{-1}$  не сопровождался появлением других маркерных полос А-формы, например, при  $1188 \text{ см}^{-1}$  [10]). Аналогичный сдвиг полосы  $1223 \text{ см}^{-1}$  при связывании ДНК с ионами  $\text{Al}^{3+}$  наблюдался в работе [11], где также предполагался частичный переход ДНК в А-форму.

- из рис. 1 видно, что в результате связывания ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водном и смешанных растворах, содержащих малые добавки пропандиола и глицерина, интенсивность полос поглощения фосфатных групп ДНК резко возрастает.

В наших предыдущих работах мы связывали подобное увеличение интенсивности с переходом ДНК в компактную форму в результате связывания с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  [1, 12]. В литературе отмечается, что для индуцирования конденсации ДНК в водном растворе при комнатной температуре необходимы ионы металлов с валентностью  $\geq 3$  [13 - 15], однако имеются работы, в которых конденсация ДНК вызывалась и двухвалентными ионами в растворах, не содержащих добавки спиртов [16, 17]. В работе [18] мы показали, что при взаимодействии ДНК с ионами  $\text{Tb}^{3+}$  происходит увеличение интенсивности полос поглощения, аналогичное наблюдаемому в настоящей работе. Сравнивая концентрации ионов  $\text{Tb}^{3+}$ , необходимые для конденсации ДНК в растворе [19], с концентрациями, при которых мы регистрировали резкое возрастание интенсивности ИК полос в спектрах комплексов ДНК- $\text{Tb}^{3+}$ , мы показали, что при переходе ДНК в компактную форму (но не просто при связывании ионов металлов с фосфатными группами ДНК) интенсивность ИК полос фосфатных групп ДНК действительно возрастает [18]. То, что увеличение интенсивности полос поглощения происходит именно в результате компактизации ДНК, а не в результате связывания с ионами металлов, подтверждается и тем, что при взаимодействии ДНК с ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  вплоть до  $\text{Met}^+/\text{P} \sim 80$  и с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  до  $\text{Ca}^{2+}/\text{P} \sim 2$  изменения интенсивности ИК полос не наблюдалось, хотя связывание с ДНК, согласно [5], должно иметь место.

Таким образом мы можем сказать, что, взаимодействуя с ДНК, ионы  $\text{Cu}^{2+}$  вызывают переход ДНК в компактную форму как в водном, так и в смешанных растворах, содержащих 4 ÷ 20 об % 1,2-пропандиола или глицерина. Основанием для такого предположения может быть возможность образования координационных соединений с реализацией связей между нитями через ион металла:



В этом случае происходит сильная поляризация связей и значительное усиление поглощения в ИК-спектрах, поскольку интенсивность ИК полос поглощения пропорциональна квадрату производной от дипольного момента по нормальной координате [20 и ссылки этой работы].

Хотелось бы отметить, что переход ДНК в компактное состояние возможен без значительного нарушения В-конформации ДНК и макромолекула в конденсированном состоянии может оставаться в пределах В-формы [21]. Это становится понятным, если учесть, что подобный переход в макромолекуле ДНК возможен в процессе ее функционирования *in vivo* [2].

В спектрах комплексов ДНК -  $\text{Cu}^{2+}$  с высокой концентрацией ионов меди ( $> 8.5 \times 10^{-3}$  М для ДНК в водно-пропандиоловом и  $> 2.3 \times 10^{-2}$  М в водно-глицериновом растворах (4 об %)), образованных при  $45^\circ\text{C}$ , наблюдается резкое уменьшение интенсивности полос поглощения при  $1090$  и  $1223 \text{ см}^{-1}$  и сдвиги этих полос к  $1100$  и  $1231 \text{ см}^{-1}$ , соответственно. Поскольку данное уменьшение интенсивности сопровождалось значительным (в 2-4 раза) уширением этих полос, возрастанием фонового рассеяния на всех частотах и сильным искажением общего вида спектра,



наблюдаемое уменьшение интенсивности можно объяснить частичной денатурацией и агрегацией ДНК в комплексе с высокой концентрацией меди. То, что подобное уменьшение интенсивности не наблюдается при  $29^{\circ}\text{C}$ , можно объяснить наличием расплавленных участков на ДНК при  $45^{\circ}\text{C}$ , увеличением константы связывания ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с этими участками и образованием межмолекулярных сшивок, приводящих к агрегации ДНК (подобный механизм на основе теории Shibata-Schurt [22] предложен авторами [23]). Подробное исследование таких комплексов ДНК -  $\text{Cu}^{2+}$  с высокой концентрацией ионов меди выходило за рамки настоящей работы. Поскольку столь значительное уширение полос поглощения наблюдалось лишь при высокой концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , мы считаем, что использование зависимостей для «пиковой» интенсивности вместо интегральной возможно для характеристики конформационного перехода в ДНК [24].

На рис. 2 и 3 приведены зависимости относительного увеличения оптической плотности полос поглощения фосфатных групп ДНК ( $R = D_i/D_0$ , где  $D_i$  - оптическая плотность в максимуме полосы поглощения комплекса ДНК с  $i$ -той концентрацией двухвалентного металла,  $D_0$  - та же величина для ДНК без ионов двухвалентных металлов) от полной концентрации ионов меди в растворе, полученные при 29 и  $45^{\circ}\text{C}$  для комплексов ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водных и смешанных растворах, содержащих малые (до 20 об %) добавки пропандиола и глицерина. Из рис. видно, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  вызывают увеличение интенсивности полос поглощения фосфатных

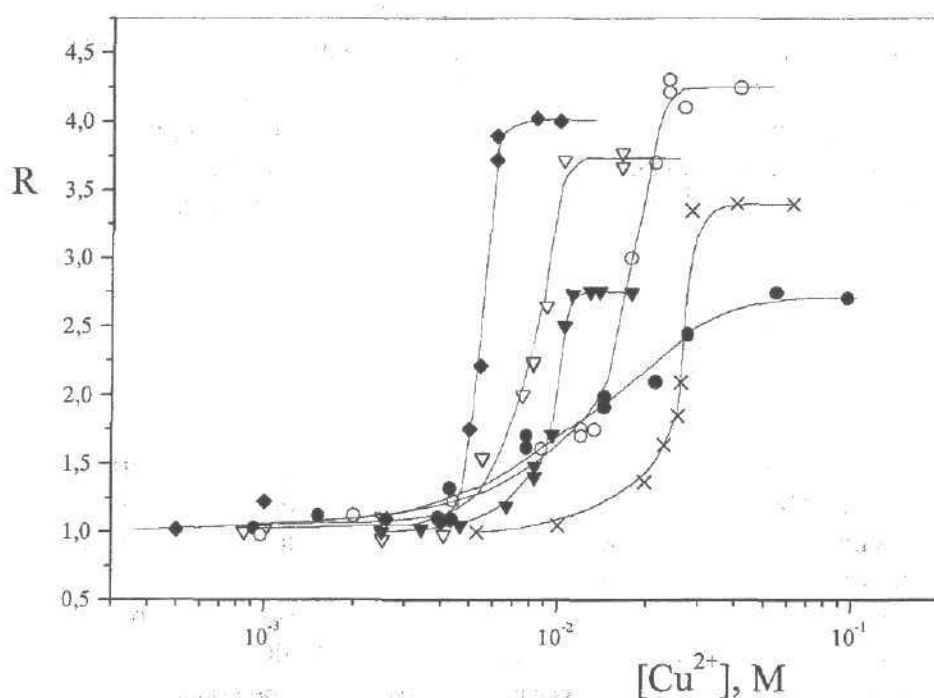


Рисунок 2. Зависимости относительного изменения оптической плотности  $R$  от полной концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе для полосы поглощения при  $1090\text{ см}^{-1}$  (симметричные колебания фосфатных групп) для комплексов ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водном (X) и водно-спиртовых растворах, содержащих 4 (●), 9 (○) об % глицерина, 4 (▼), 9 (▽), 20 (◆) об % пропандиола. Концентрация ионов  $\text{Na}^+$  -  $5 \times 10^{-3}\text{ М}$ , ДНК -  $(3.5 \pm 5) \times 10^{-2}\text{ М}$ , температура -  $29^{\circ}\text{C}$ .

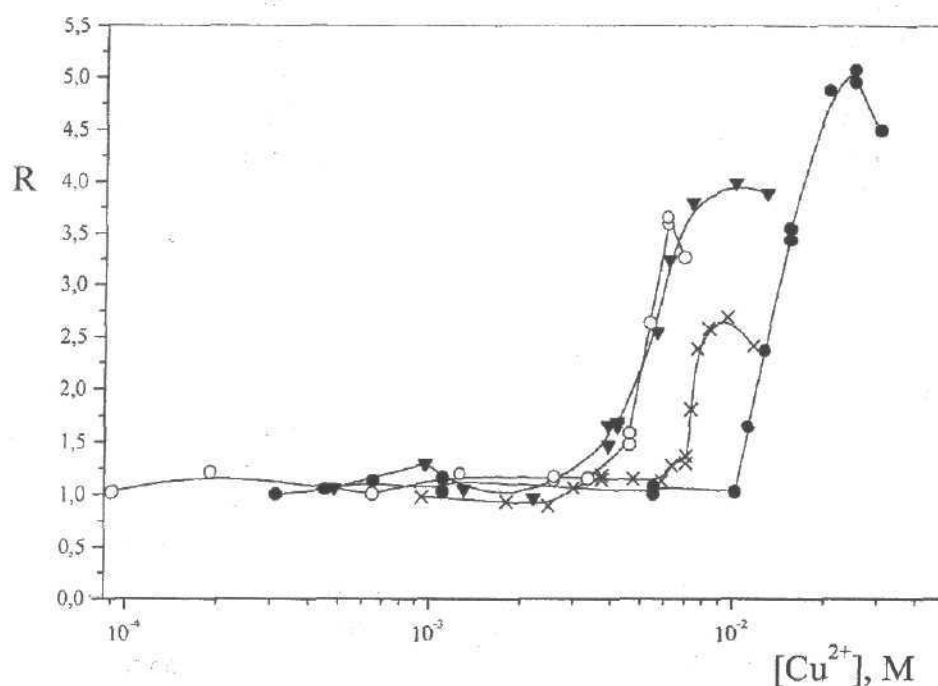


Рисунок 3. Зависимости относительного изменения оптической плотности  $R$  от полной концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в растворе для полосы поглощения при  $1090 \text{ см}^{-1}$  (симметричные колебания фосфатных групп) для комплексов ДНК с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в водном (X) и водно-спиртовых растворах, содержащих 4 (●), 9 (○) об % глицерина, 4 (▼) об % пропандиола. Концентрация ионов  $\text{Na}^+$  -  $5 \times 10^{-3}$  М, ДНК -  $(3.5 \pm 5) \times 10^{-2}$  М, температура -  $45^\circ\text{C}$ .

групп во всех исследованных растворах как при  $29^\circ\text{C}$ , так и при  $45^\circ\text{C}$ . Увеличение интенсивности происходит в достаточно узком интервале концентраций ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , что говорит о высокой кооперативности процесса компактизации макромолекулы ДНК [1].

В водном растворе для индуцирования компактизации ДНК при  $45^\circ\text{C}$  требуется значительно меньшая концентрация ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , чем при  $29^\circ\text{C}$ . Известно, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  понижают температуру плавления ДНК [5 и ссылки этой работы], поэтому при  $45^\circ\text{C}$  вероятно появление расплавленных сайтов на ДНК, особенно на участках, богатых А-Т парами (А-Т пары составляют 58% исследуемой ДНК [4]). Так как константа связывания ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с денатурированной ДНК намного выше, чем с нативной [25], понижение необходимой для индуцирования компактизации ДНК концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$  при  $45^\circ\text{C}$  может происходить за счет увеличения сродства ионов меди к ДНК, т.е. за счет увеличения «эффективной» концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$ .

Данные рис. 2 и 3 свидетельствуют о том, что для перевода ДНК в компактное состояние в водном растворе, содержащем малые добавки пропандиола, требуется меньшая концентрация  $\text{Cu}^{2+}$ , чем для ДНК в водном растворе, как при  $29^\circ\text{C}$ , так и при  $45^\circ\text{C}$ . Эти результаты согласуются с теорией конденсации полиэлектролитов Меннинга [26]. Действительно, авторы [27], используя теорию Меннинга, показали, что, так как одним из основных барьеров, препятствующих

конденсации ДНК, является электростатическое отталкивание отрицательно заряженных фосфатных групп, то для перевода ДНК в компактное состояние необходимо нейтрализовать 89-90% всех зарядов на фосфатах за счет связывания с противоионами. Эта величина была подтверждена в экспериментах по гель-электрофорезу ДНК [13], причем она оказалась одинаковой для водного и водно-этанольного растворов [27], а также для фаговой ДНК с отличной от ДНК тимуса теленка плотностью заряда [17]. Согласно [26], доля заряда, нейтрализованного при связывании полиэлектролита с противоионами валентности  $Z$ , равна

$$r = 1 - \frac{1}{Z\xi},$$

где  $\xi \sim 1/\epsilon \times T$  ( $\epsilon$  - диэлектрическая постоянная,  $T$  - температура в кельвинах). При уменьшении  $\epsilon$  за счет добавки менее полярного пропандиола к водному раствору ДНК величина  $r$  будет увеличиваться, таким образом одно и то же количество ионов меди сможет нейтрализовать больший заряд на ДНК и нейтрализация 90% всех зарядов на фосфатах ДНК может быть достигнута при меньшей концентрации ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Кроме того, понижение  $\epsilon$  за счет добавления неэлектролита может уменьшать эффективный заряд на фосфатах также за счет усиления конденсации противоионов, так как с уменьшением  $\epsilon$  кулоновское взаимодействие возрастает.

В случае взаимодействия ионов  $\text{Cu}^{2+}$  с ДНК в водно-глицериновых растворах наблюдается немонотонность влияния добавок глицерина на компактизацию ДНК (см. рис. 2). В растворах с низким объемным содержанием глицерина (4 об %) резко уменьшается кооперативность перехода ДНК в компактное состояние. При повышении объемной концентрации глицерина до 9 об % зависимость  $R(C)$  распадается на два участка: до концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  порядка  $1.3 \times 10^{-2}$  М она идет почти параллельно зависимости  $R(C)$  для ДНК в 4 об %-водном растворе глицерина, после этой концентрации кооперативность резко возрастает (рис.2). При более высокой температуре ( $45^\circ\text{C}$ ) кооперативность перехода ДНК в компактное состояние в водно-глицериновых и водно-пропандиоловых растворах увеличивается, однако для индуцирования такого перехода в 4 об % водном растворе глицерина требуется большая концентрация ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , чем для ДНК в водном растворе (рис. 3).

Таким образом мы можем заключить, что влияние добавок пропандиола на переход ДНК в компактное состояние под действием ионов меди носит монотонный характер: по мере увеличения объемной концентрации пропандиола уменьшается концентрация ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , необходимая для индуцирования компактизации ДНК, и кооперативность этого процесса увеличивается. Этот результат вполне согласуется теорией конденсации Меннинга. В отличие от пропандиола, влияние глицерина на индуцированную ионами  $\text{Cu}^{2+}$  компактизацию ДНК носит немонотонный характер как при  $29^\circ\text{C}$ , так и при  $45^\circ\text{C}$ .

Особенно интересным представляется различие во влиянии на компактизацию ДНК маленьких добавок пропандиола и глицерина (4 об %) к водному раствору ДНК. При такой низкой объемной концентрации неэлектролитов в растворе разница в диэлектрических проницаемостях смесей буфер - пропандиол и буфер - глицерин и в подвижностях молекул воды в этих смесях очень мала [28]. Таким образом, различие в  $\epsilon$  и, следовательно, в активностях воды, не может играть решающую роль в различном влиянии пропандиола и глицерина на конденсацию ДНК под влиянием ионов  $\text{Cu}^{2+}$  при малых (4 об %) концентрациях этих неэлектролитов в растворе. В работе [13] было показано, что конденсация ДНК

зависит только от  $\epsilon$  среды и не зависит от вида неэлектролита. Однако результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что влияние добавок неэлектролитов к раствору ДНК может носить не только неспецифический характер за счет понижения активности воды, но также может зависеть от структуры образующегося водного раствора неэлектролита. Возможно, что сильнее влияние структуры раствора сказывается в случае добавок многоатомных спиртов, так как добавки одноатомных спиртов (до определенной критической концентрации спирта), встраиваясь в пустоты решетки воды, значительно меньше искажают пространственную структуру воды и сетку водородных связей (в работе [13] исследовалось влияние именно одноатомных спиртов на  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -индуцированную компактизацию ДНК).

Авторы выражают благодарность проф. Д.Ландо (Институт биоорганической химии АН Беларуси, Минск) за любезно предоставленные препараты ДНК. Работа частично финансировалась за счет гранта Международного фонда «Відродження» № PSU072091 Хакл Е.В.

### ВЫВОДЫ

Ионы  $\text{Cu}^{2+}$  вызывают переход ДНК в компактную форму в водном и водно-глицериновом (пропандиоловом) растворах как при 29, так и при 45°C. Этот процесс носит кооперативный характер. Добавление 1,2-пропандиола к водному раствору ДНК увеличивает кооперативность перехода ДНК в компактную форму и уменьшает концентрацию ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , необходимую для индуцирования этого процесса. Эффект 1,2-пропандиола монотонно увеличивается с ростом его объемной концентрации (в интервале концентраций 0-20 об %) при 29 и 45°C. Влияние глицерина на компактизацию ДНК носит немонотонный характер: малые (4 об %) добавки глицерина к водному раствору ДНК уменьшают кооперативность перехода ДНК в компактное состояние при 29°C. Сравнение влияния малых добавок 1,2-пропандиола и глицерина, для которых изменение диэлектрической проницаемости раствора практически одинаково, на  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированную конденсацию ДНК позволяет сделать вывод о том, что конденсацию ДНК под влиянием ионов  $\text{Cu}^{2+}$  зависит не только от диэлектрической проницаемости, но и от структуры образующегося раствора.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hackl E., Kornilova S., Kapinos L. et al. // J. Mol. Struct. 1997. V. 408/409. P.229-232.
2. Murphy L.D., Zimmerman S.B. // Biophys Chem. 1995. V. 57 (1). P. 71-92.
3. Веселков А.Н. Влияние внешних факторов на конформацию молекулы нуклеиновой кислоты в растворе. Дис.-д-р физ.-мат. наук. Севастополь. 1988. 463 с.
4. Ахрем А.А., Егорова В.П., Егоров А.С. и др. // Биополимеры и клетка 1989. вып.5. N 5. С. 44-48.
5. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О. и др. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наукова думка. 1991. - 272 с.
6. Fischman E. // Appl. Opt. 1962. N. 1. 493.
7. Малеев В.Я., Семенов М.А. // Биофизика 1971. Т. 16. вып. 3. С. 389-397.
8. Кальвин Н.Н., Вельяминов С.Ю. // ЖПС. 1987. N 4. С.592-597.
9. Бабушкин А.А., Бажулин П.А., Королев Ф.В. и др. Методы спектрального анализа. М., МГУ. 1962. 273 с.
10. Taillandier E., Liquier J. // Methods in enzymol. 1990. V. 211. P. 307-335.

11. Ahmad R., Naoui M., Neault J.F. et.al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1996. 13(5). P. 795-802.
12. Kornilova S., Hackl E., Kapinos L., et.al. // Acta Biochim. Polon. 1998. V. 45. N 1. P. 107-117.
13. Arscott P., Ma Ch., Wenner J., Bloomfield V. // Biopolymers 1995. V. 36. P. 345-364.
14. Pelta J., Livolant F., Sikorav J.-L. // J of Biological Chem. V. 271. N. 10. P. 5656-5662.
15. Bloomfield V. // Curr. Struct. Biol. 1996. V.6. P. 334-341.
16. Ma C., Bloomfield V. // Biophys. J. 1994. V.67. P. 1678-1681.
17. Benbasat J.A. // Biochemistry 1984. V. 23. P. 3609-3619.
18. Хакл Е.В., Корнилова С.В., Благой Ю.П. // Вестник проблем биологии и медицины 1998. N 8. С. 41-51.
19. Tajmir-Riahi H.A., Ahmad R., Naoui M. // J Biomol Struct Dyn. 1993. V. 10 (5). P. 865-877.
20. Zundel G. Proton polarizability of hydrogen bonds. Series of lectures, Zalzburg. 1997. 250 p.
21. Maniatis T., Venable J. Jr, Lerman L. // J Mol Biol. 1974. V. 84(1). P. 37-64.
22. Shibata J., Schurr J. // Biopolymers. 1981. V.20. P. 525-549.
23. Duguid J.G., Bloomfield V.A. // Biophys. J. 1995. V. 69. P. 2642-2648.
24. Семенов М.А. Гидратация и структурные переходы нуклеиновых кислот в конденсированном состоянии. Дис... доктора физ.-мат. наук. Харьков. 1988. 416 с.
25. Sorokin V., Blagoi Yu., Valeev V., et.al. // J. Inorg. Biochem. 1987, V. 30(2). P. 87-99.
26. Manning G. // Q Rev. Biophys. 1978, V. 11(2). P. 179-246.
27. Wilson R.W., Bloomfield V.A. // Biochemistry 1979. V. 18(11). P. 2192-2196.
28. Хакл Е.В., Корнилова С.В., Соловьева А.С. и др. // Проблемы криобиологии 1998., в печати.



## ТЕРМОТРОПНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ ФИБРИНОГЕНА

В.П. Берест, С.В. Гаташ, Т.Ф. Морозова\*

*Харьковский государственный университет, пл. Свободы, 4, 310077; \* Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015*

Поступила в редакцию 15 мая 1998 г.

Помимо конформационного перехода II (около 10°C), в физиологических условиях при помощи методов УФ-спектрофотометрии и СВЧ-диэлектрометрии показано существование конформационного перехода фибриногена при 18-22°C, связанного, вероятно, с изменением структуры Д-домена белка и увеличением доступности для растворителя части триптофанилов. Предполагается, что данный конформационный переход определяет характер температурной зависимости агрегации тромбоцитов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фибриноген, УФ-спектрофотометрия, СВЧ-диэлектрометрия, температура, конформационные изменения

При изменении температуры от 2 до 56°C, помимо денатурационного перехода I (около 49°C) в растворах фибриногена и его фрагмента Д, происходит конформационный переход II (11-16°C) [1]. Переход II обратим и чувствителен к изменению ионной силы раствора. При температуре 11°C отмечен резкий переход от ускоряющего к тормозящему действию фибриногена на самосборку фибрина [2]. Наблюдаемые конформационные изменения фибриногена получены в специфических условиях (кислые или щелочные pH, большие ионные силы). С точки зрения участия фибриногена в системе гемостаза, представляет интерес исследование конформационной динамики его молекулы в физиологических условиях.

Фибриноген является обязательным кофактором агрегации тромбоцитов [3]. Предложен общий фибриноген зависимый механизм агрегации тромбоцитов, контролируемый занятием фибриногенового рецептора. Молекулы фибриногена, подобно мостикам, соединяют соседние клетки, вызывая тем самым их агрегацию. Максимальная агрегация тромбоцитов наблюдается при комнатной температуре и ослабевает при ее увеличении или уменьшении [4,5]. Для выяснения механизма зависимости агрегации тромбоцитов от температуры необходимо исследовать состояние молекулы фибриногена при разных температурах.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибриноген выделяли из донорской крови по методу [6]. Использовали растворы фибриногена в 0,15 М NaCl концентрации 0,5–1,2 мг/мл.

Регистрировались спектры поглощения раствора фибриногена на ультрафиолетовом регистрирующем спектрофотометре "PYE UNICAM SP 8000" (Англия) в диапазоне 250-350 нм. Запись спектров проводилась через 2°C

при нагревании раствора белка от 4 до 52°C. По спектрам поглощения определялись мутность раствора, интенсивность поглощения и интенсивность максимумов первой производной спектров поглощения (1ПСП).

Измерение действительной ( $\epsilon'$ ) и мнимой ( $\epsilon''$ ) частей комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$  растворов фибриногена проведено с помощью СВЧ-диэлектromетра резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц [7]. Измеряли величину сдвига резонансной частоты  $\Delta f$  и затухание  $\text{tg}\delta$  при внесении исследуемого образца в резонатор. Погрешность определения величин  $\Delta f$  и  $\text{tg}\delta$  составляла 0,5%. Температура образца измерялась термопарой медь-константан с точностью  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первых производных спектров поглощения раствора фибриногена регистрируются отрицательные максимумы 286-287 нм, 292-294 нм, менее интенсивные 284 нм, 298 нм и слабо разрешенные пики 281 нм, 288 нм. Положение максимумов при изменении температуры в пределах точности измерений не изменяется, но интенсивность их зависит от температуры образца. Пики 284 и 288 нм дополняют друг друга, синхронно появляясь и исчезая в 1ПСП. В частности при температурах 10-20°C становится лучше разрешен пик 288 нм, но плохо разрешен пик 284 нм, то же и в диапазоне температур 38-44°C. Обратная ситуация наблюдается при температурах 6-12°C и 24-36°C. Практически не изменяется с температурой положение максимумов 298 нм и 286-287 нм. Положение основного максимума 292-294 нм довольно стабильно до 20°C. При повышении температуры появляется и становится хорошо разрешен пик 295-296 нм.

При нагревании раствора фибриногена наблюдается уменьшение интенсивности максимума 292-294 нм первой производной спектра поглощения в области температур 16-22°C (рис.1.а) и мутности в интервале 16-18°C (рис.1.б). Интенсивность максимума 1ПСП 298 нм не изменяется во всем диапазоне температур от 4 до 50°C.

Интенсивности пиков 284 нм и 288 нм, по-видимому, меняются синхронно, но противоположно друг другу: при температурах 10-20°C интенсивность максимума 284 нм уменьшается, интенсивность максимума 288 нм растет, а при температуре выше 35°C увеличение интенсивности максимума 284 нм сопровождается уменьшением интенсивности максимума 288 нм (рис.2).

С ростом температуры интенсивность максимума 1ПСП 281 нм уменьшается в интервале 8-14°C и затем растет при температуре выше 35°C (рис.3). Максимум 1ПСП 281 нм, по-видимому, отражает состояние центров полимеризации [8], а изменение его интенсивности при температурах около 10 и 35°C говорит об изменении в структуре Д-домена белка.

Сопоставляя мутность и интенсивность 1ПСП, можно предположить, что при температурах 18-22°C происходят изменения размеров и расположения внутренних участков молекулы фибриногена, содержащих остатки триптофана, часть которых становится более доступной растворителю. Описанные изменения, по-видимому, связаны с изменением структуры Д-домена фибриногена, так как в Е-доме все триптофаны доступны растворителю [1]. Изменения на поверхности молекулы, по нашим данным, происходят при температурах около 10°C и выше 35°C.

При температурах 8-10°C и 20-22°C, а также в области температур выше 35°C зависимости действительной  $\epsilon'$  и мнимой  $\epsilon''$  частей комплексной

## Термотропные изменения конформации фибриногена

диэлектрической проницаемости растворов фибриногена от температуры имеют особенности, выражающиеся в отклонении от монотонности изменения этих параметров при увеличении температуры. Таких отклонений не наблюдается для температурной зависимости диэлектрических параметров раствора 0,15 M NaCl (рис.4). Это свидетельствует об изменении состояния связанной и свободной воды в растворе фибриногена при данных температурах, которое обусловлено, по-видимому, изменением "плотности" упаковки участков молекулы при изменении конформации белка.

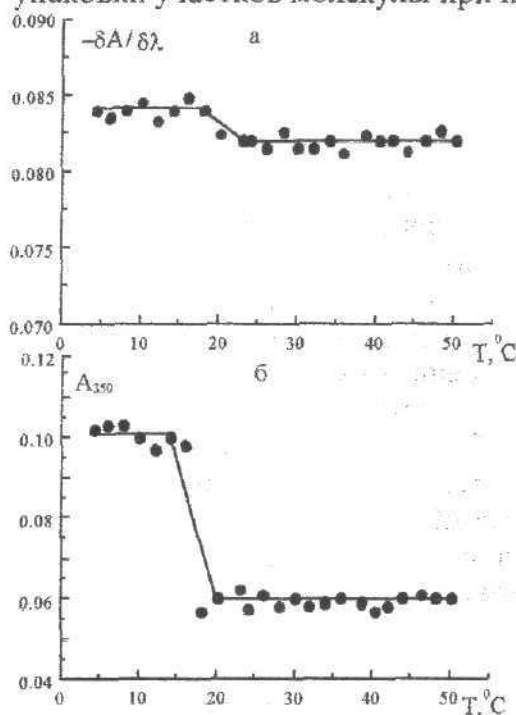


Рис. 1. Зависимость интенсивности максимума 1 ПСП 292-294 нм (а), мутности (б) раствора фибриногена от температуры

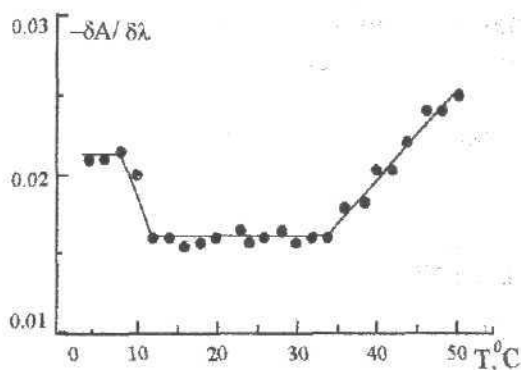


Рис. 3. Зависимость интенсивности максимума 1 ПСП 281 нм раствора фибриногена от температуры

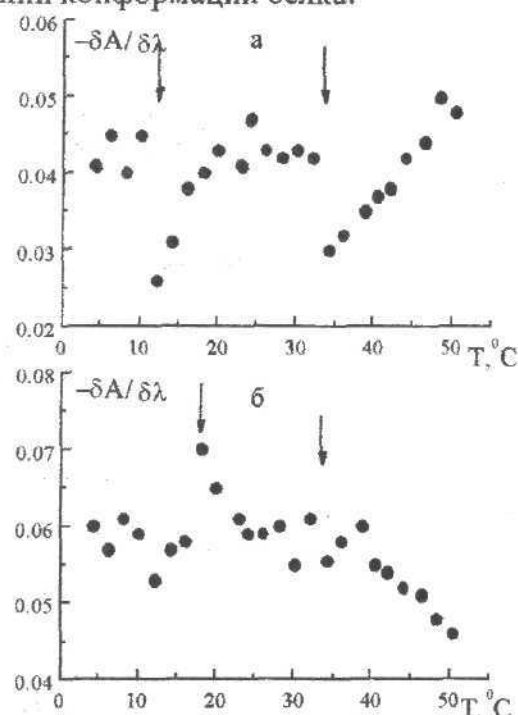


Рис. 2. Зависимость интенсивности максимумов 1 ПСП 284 нм (а) и 288 нм (б) раствора фибриногена от температуры

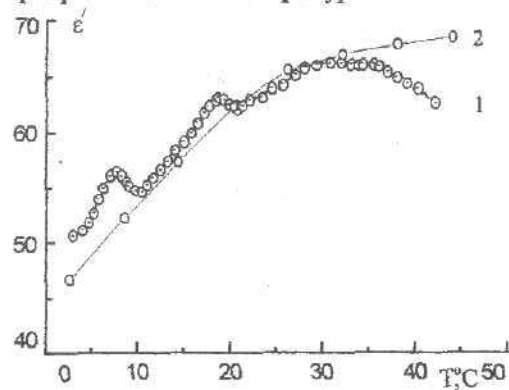


Рис. 4. Зависимость  $\epsilon'$  раствора фибриногена (1) и физиологического раствора (2) от температуры

Полученные методом УФ-спектрофотометрии данные, свидетельствующие об изменении состояния группировок, расположенных преимущественно на поверхности молекулы фибриногена в диапазонах температур 8-12°C и выше 35°C, совпадают с результатами, полученными при помощи метода СВЧ-диэлектронетрии, указывающими на изменение состояния воды в растворе фибриногена при этих температурах. Известно, что структурные изменения при 10-16°C связывают с конформационным переходом II (11-16°C), для которого методом фотон-корреляционной спектроскопии зарегистрирована

компактизация Д-домена, вызывающая разрыхление структуры белка [9]. При этом изменяется способность фибриногена тормозить самосборку фибрина [2]. По нашим данным, изменение интенсивности максимума ИСП 281 нм, относящегося к центрам полимеризации фибриногена, происходит при 8-14°C. При температурах 8-10°C отмечено изменение состояния свободной воды в системе белок-вода. По-видимому, наблюдаемые изменения отражают существование в фибриногене при физиологических условиях конформационного перехода II, зарегистрированного ранее при pH 6,5.

Наблюдаемые изменения спектральных характеристик и диэлектрических параметров раствора фибриногена при температуре выше 35°C носят плавный, не скачкообразный характер. Они, вероятно, связаны с описанным в [1] фактом предденатурационного повышения параметра флюоресценции А для фибриногена в зоне 25-38°C, которое свидетельствует об увеличении подвижности определенных сегментов молекулы фибриногена, благодаря чему часть триптофанилов переходит в более гидрофобное окружение.

Для температурного интервала 18-22°C также получено совпадение результатов, отражающих изменение состояния воды в системе белок-вода и изменения в молекуле белка, затрагивающие внутренние гидрофобные участки и геометрию молекулы. Возможно, при этих температурах происходит изменение конформации молекулы фибриногена. По-видимому, конформационный переход в молекуле фибриногена около 20°C приводит к изменению константы связывания его с тромбоцитарным рецептором, ослаблению связи между клетками и уменьшению степени агрегации тромбоцитов при дальнейшем повышении температуры.

### ВЫВОДЫ

В области температур 4-50°C, помимо конформационного перехода II, происходящего при 8-12°C, в физиологических условиях обнаружен конформационный переход при 18-20°C. Этот переход связан с изменением расположения внутренних участков молекулы фибриногена, принадлежащих, по-видимому, Д-домену. В результате перехода часть триптофанилов становится более доступной растворителю. Предполагается, что изменение конформации белка при 20°C определяет экстремальный характер температурной зависимости агрегации тромбоцитов, необходимым кофактором которой является фибриноген.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зима В.Л., Медвідь Л.В., Варешка Т.В., Коваль В.Г. // ДАН УРСР, Сер. Б. 1979. N 5. С. 378-381.
2. Зима В.Л., Варешка Т.В., Свистальская Л.А., Демченко А.П. // Укр. биохим. журн. 1978. Т. 50. N 4. С.459-464.
3. Позднякова Т.М., Белицер Н.В. // Усп. совр. биол. 1990. Т. 110, вып. 2. С. 267-283.
4. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. Минск. Университетское, 1990. 104 с.
5. Trenchard P.M., Jeffery D.M. // Clin. Phys. Physiol. Meas. 1989. Vol. 10, N 1. P. 65-74.
6. Методы исследования фибринолитической системы крови. М. Изд. МГУ, 1981. 132 с.
7. Николов О.Т., Жилякова Т.А. // Журн. физ. хим. 1991. Т.65. 5. С. 1312-1316.
8. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев. Наукова думка, 1981. 208 с.
9. Левчук Ю.М. Фотон-кореляційна спектроскопія рідких біологічних систем. Автореф. дис... док. ф.-м. наук. Харьков. ХГУ. 1995. 38 с.



УДК 57.043

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

## ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФЛУКТУАЦИЙ КОНФИГУРАЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛЫ В ВЯЗКОЙ СРЕДЕ.

**А.И. Осецкий**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины*

*Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015*

Поступила в редакцию 19 мая 1998 г.

В данной работе сформулирована физико-математическая модель, позволяющая вычислить вероятность флуктуационного изменения конфигурации длинной линейной макромолекулы и учитывающая влияние вязкости среды, в которой взвешены макромолекулы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** макромолекула, конфигурация, флуктуация, вязкость.

Как известно, классическая статистическая физика изучает те явления и закономерности, которые определяются движением частиц как целого, то есть частицы рассматриваются как бесструктурные. Поэтому классическая статистическая физика непригодна для описания броуновского движения, например, длинных линейных макромолекул, обладающих внутренней структурой (конфигурацией) с бесконечным числом степеней свободы.

Для того, чтобы изучить особенности броуновского движения малых подсистем с внутренней структурой в конденсированных средах, рассмотрим простую модель: броуновское движение линейной макромолекулы, взвешенной в окружающем ее вязком растворе. В качестве модели такой макромолекулы рассмотрим взвешенную в растворителе однородную длинную упругую нить с круговым поперечным сечением. Ради простоты форму этой нити в отсутствие деформации будем считать прямолинейной. Тепловое движение упругой нити сопровождается изменением ее формы, и, следовательно, деформацией. Предположим, что эта деформация происходит в плоскости  $(x, y)$ , ось  $x$  совпадает с линией недеформированной нити, один из ее концов расположен в начале координат  $x = 0, y = 0$ , а второй конец недеформированной нити - в точке  $x = L, y = 0$ . Пренебрегая движением упругой нити как целого, будем считать, что при ее тепловом движении она подвергается лишь слабому изгибанию.

Поперечные колебания упругой нити в приближении слабого изгибания описываются функцией только двух переменных  $(x \text{ и } t)$ :

$$y = y(x, t), \quad 0 \leq x \leq L.$$

Будем далее рассматривать взвешенную в растворе упругую нить как броуновскую частицу с внутренней структурой  $y = y(x, t)$ . В соответствии с общим подходом, принятым при теоретическом описании броуновского движения [1,2], считаем, что на колеблющуюся упругую нить действует, во-первых, стоковая сила трения со стороны окружающего раствора  $F_{\text{тр}} = -\mu \gamma \frac{\partial y}{\partial t}$ , ( $\gamma$  - так называемый коэффициент трения) и, во-вторых, случайная сила Ланжевена  $\mu F_{\text{Л}}(x, t)$ . Коэффициент трения, отнесенный к единице длины прямолинейной нити, движущейся перпендикулярно



своей оси, в случае малых чисел Рейнольдса, то есть при больших значениях вязкости, определяется равенством [3]:

$$\gamma = \frac{8\pi\eta}{\mu[\ln(L/r) + 0,5]} \quad (1)$$

где  $\eta$  - динамическая вязкость раствора, в котором взвешена броуновская частица.

Уравнение поперечных колебаний упругой прямолинейной нити с учетом указанных сил, очевидно, имеет вид:

$$\mu \frac{d^2 y}{dt^2} + EI \frac{d^4 y}{dx^4} + \mu \gamma \frac{dy}{dt} = \mu F_L(x, t). \quad (2)$$

Если среда, окружающая макромолекулу, сама по себе находится в состоянии термодинамического равновесия, то генерируемый ею случайный ланжевеновский источник имеет гауссову плотность распределения вероятностей

$$P_F[F(x, t)] = \exp \left[ - \frac{1}{2DL} \int_0^L \int_0^t [F_L(x, t)]^2 dx dt \right] \quad (3)$$

где  $DL$  представляет собой второй момент силы Ланжевена как случайной функции координаты  $x$  и времени  $\langle F_L(x, t)^2 \rangle$ . При этом среднее значение случайной силы равно нулю.

Рассмотрим, как это сделал Фейнман [4], вероятность того, что в момент времени  $t$  конфигурация упругой нити есть  $y = y(x, t)$ . Эта вероятность в отличие от случая классической статистики является не функцией, а функционалом  $P[y(x, t)]$ , который определен на отрезке  $0 \leq x \leq L$ . Вероятность того, что конфигурация упругой нити описывается совокупностью функций класса  $A$  определяется интегралом по траекториям

$$W[y(x, t) | A] = \int_A P[y(x, t)] Dy(x, t) \quad (4)$$

где интегрирование выполняется по всем функциям класса  $A$ . Уравнение движения (2) связывает конфигурацию упругой нити  $y(x, t)$  и силу Ланжевена  $\mu F_L(x, t)$ , то есть для каждой функции  $F_L(x, t)$  существует однозначно связанная с нею функция  $y(x, t)$ . Следовательно, вероятность обнаружить упругую нить с заданной конфигурацией  $y(x, t)$  такова же, как и вероятность соответствующей функции  $F_L(x, t)$ , то есть [4]:

$$W = P[y(x, t)] Dy(x, t) = P_F[F_L(x, t)] DF_L(x, t) \quad (5)$$

Якобиан преобразования от  $Dy(x, t)$  к  $DF_L(x, t)$  считаем равным единице. Подставляя в (5) вместо  $F_L(x, t)$  величину, которая располагается в левой части уравнения движения (2), имеем

$$P[y(x, t)] = \text{const } P_F \left( \frac{d^2 y}{dt^2} + \frac{EI}{\mu} \frac{d^4 y}{dx^4} + \gamma \frac{dy}{dt} \right) \quad (6)$$

При больших значениях вязкости, когда преимущественный вклад в показатель экспоненты вносят члены, которые содержат в качестве сомножителя коэффициент трения  $\gamma$ , получаем после несложных преобразований

$$P[y(x,t)] = \exp \left\{ - \frac{\gamma}{2DL} \int_0^L \left( \frac{dy}{dx} \right)^2 dx - \frac{EI}{2} \int_0^L \left( \frac{d^2y}{dx^2} \right)^2 dx + \int_0^t \int_0^L \left[ \gamma \left( \frac{dy}{dx} \right)^2 + \frac{2DL}{d} \left( \frac{d^3y}{dx^3} \frac{dy}{dx} - \frac{d^2y}{dx^2} \frac{d^2}{dx dt} \right) y \right] dt dx \right\} \quad (7)$$

Интеграл

$$\int_0^L \int_0^t \left( \frac{d^3y}{dx^3} \frac{dy}{dx} - \frac{d^2y}{dx^2} \frac{d^2}{dx dt} \right) y dt dx$$

равен нулю, так как на концах свободно плавающей нити изгибающий момент и

поперечная сила, пропорциональные соответственно  $\frac{d^2y}{dx^2}$  и  $\frac{d^3y}{dx^3}$ , равны нулю в каждый момент времени.

Допустим, что макромолекула в целом (то есть центр ее массы) движется так, что выполняется соотношение Эйнштейна [5], связывающее интенсивность ланжевенского источника  $D$  с абсолютной температурой  $T$  и диссипативным фактором

$$\frac{\gamma}{D} = \frac{\mu L}{kT} \quad \text{и} \quad \mu L \langle v_c^2 \rangle = kT$$

где  $\langle v_c^2 \rangle$  - скорость движения центра массы макромолекулы. Тогда

$$P[y(x,t)] = \exp \left\{ - \frac{1}{2kT} \int_0^L \mu v^2 dx - \frac{EI}{2} \int_0^L \left( \frac{d^2y}{dx^2} \right)^2 dx - \frac{\mu \gamma}{2kT} \int_0^t \int_0^L v^2 dt dx \right\} \quad (8)$$

где учтено, что  $\frac{d^2y}{dx^2} = H(x,t)$  - кривизна упругой нити в точке  $x$  в момент времени

$t$ . Величина

$$\frac{EI}{2} \int_0^L \left( \frac{d^2y}{dx^2} \right)^2 dx$$

представляет собой свободную энергию деформации слабо изогнутой упругой нити. Если в начальный момент времени упругая нить находилась в недеформированном неподвижном состоянии, то вероятность флуктуационного изменения ее конфигурации, очевидно, определяется выражением

$$P[y(x,t)] = \exp \left\{ - \int_0^L \frac{\mu v^2}{2kT} dx - \frac{EI}{2kT} \int_0^L \left( \frac{d^2y}{dx^2} \right)^2 dx - \frac{1}{2kT} \int_0^t \int_0^L \mu \gamma \left( \frac{dy}{dx} \right)^2 dt dx \right\} \quad (9)$$

Первые два слагаемых под экспонентой по абсолютной величине представляют собой, как известно, минимальную работу, которую требуется произвести, чтобы перевести упругую нить в данное микроскопическое состояние с заданной конфигурацией и скоростями движения составляющих ее частиц в единицах  $kT$ . Следовательно, формулу (9) можно представить в виде

$$P[y(x,t)] = \exp \left[ - \frac{R_{\min}}{2kT} - \frac{1}{2kT} \int_0^t \int_0^L \mu \gamma v^2 dt dx \right] \quad (10)$$

Функционал под знаком экспоненты состоит из двух слагаемых, первое из которых не зависит от "траекторий" процесса, а зависит лишь от его конечных точек, а второе зависит от траектории. Вынося за знак интегрирования по траекториям в (5) не зависящий от траектории сомножитель, получаем

$$W = \exp \left\{ - \frac{1}{2kT} \int_0^L \mu v^2 dx \right\} - \frac{EI}{2kT} \int_0^L H^2 dx \left\} \times \int_0^t \left[ \frac{\mu \gamma}{2kT} \int_0^L v^2 dt dx \right] Dy(x,t) \quad (11)$$

Следуя алгоритму, разработанному Р.Фейнманом [1], преобразуем интеграл

$$\int_0^t \left[ \frac{\mu \gamma}{2kT} \int_0^L v^2 dt dx \right] Dy(x,t)$$

таким образом, чтобы выделить в нем часть, не зависящую от траектории, а зависящую только от конечных точек, и другую часть, зависящую от траектории, но не зависящую от конечных точек функционала, стоящего под знаком экспоненты в (8). Таким образом находим

$$W = C \exp \left\{ - \frac{1}{2kT} \int_0^L \mu v^2 dx \right\} - \frac{EI}{2kT} \int_0^L H^2 dx \left\} + \left[ \frac{\mu \gamma}{2kTt} \int_0^t \int_0^L (\Delta y)^2 dx \right] \quad (12)$$

где

$$C = \int \exp \left[ - \frac{\mu \gamma}{2kT} \int_0^t \int_0^L (\Delta y)^2 dt dx \right] Dy(x,t)$$

Наличие "диссипативной" добавки в выражении (12) приводит к тому, что зависимость частоты перехода малой подсистемы через потенциальный барьер в области больших значений вязкости окружающей линейные макромолекулы среды в определенных ситуациях отклоняется от закона Аррениуса и начинает экспоненциально сильно зависеть от вязкости среды  $\eta$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Климонтович Ю.Л. Статистическая физика. М. Наука, 1982. 608с.
2. Куни Ф.М. Статистическая физика и термодинамика. М. Наука, 1981. 352с.
3. Халпел Дж., Бреннер Г. Гидродинамика при малых числах Рейнольда. М. Мир, 1976. 630с.
4. Фейнман Р., Хибс А. Квантовая механика и интегралы по траекториям. М. Мир, 1968. 382с.
5. Эйнштейн А. Новое определение размеров молекул. Сб. научн. трудов. М. Наука, 1965. Т.3. С.75-91.

## ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. I. ЭТАП НАБУХАНИЯ.

Е.А.Гордиенко, Ю.Е.Панина

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

Поступила в редакцию 19 мая 1998 г.

В данной работе построена физико-математическая модель гипотонического гемолиза эритроцитов человека, которая количественно описывает кинетику этого явления при погружении клеток в гипертонический водный раствор проникающего в них электрически нейтрального вещества на этапе набухания до критического объема.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эритроцит человека, физико-математическая модель, гипотонический гемолиз, набухание.

В существующих физико-математических моделях явления гипотонического лизиса эритроцитов человека в водном растворе проникающего в клетки неэлектролита предполагается, что гемолиз наступает сразу же, когда клеточный объем достигает определенного фиксированного значения и что выброс гемоглобина из клеток наружу происходит практически мгновенно [1,2]. Уравнения трансмембранного переноса веществ, используемые для количественного описания этого процесса, не имеют аналитического решения и поэтому решаются численно [3,4]. В отличие от существующих разработанная нами модель не предполагает существования определенного фиксированного значения объема, при котором возникает гемолиз, учитывает, что гемоглобин покидает клетки за конечный промежуток времени, и сформулирована на основе приближенного аналитического решения уравнений трансмембранного переноса веществ.

### МОДЕЛЬ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА

Изменение объема клетки и внутриклеточной концентрации проникающего в клетку вещества со временем в гипертоническом водном растворе проникающего через клеточную мембрану вещества описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений [4]:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dt} &= \frac{1}{\tau_0} \left[ \sigma (\pi - \pi') + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \frac{\Delta p}{\pi_0} \right] \\ \frac{d\pi}{dt} &= - \frac{1}{\tau_1} \left[ \frac{1}{\pi} (\pi - \pi') + \sigma \pi \frac{dy}{dt} \frac{1}{y - \alpha} \right] \end{aligned} \quad (1)$$

где  $t$  - время,  $y \equiv V/V_0$  - относительный объем клетки,  $V$  и  $V_0$  - текущее и начальное значения объема клетки,  $\sigma$  - коэффициент отражения клеточной мембраны для проникающего в клетку вещества,  $\pi$  и  $\pi'$  - осмотическое давление проникающего через клеточную мембрану вещества внутри и вне клетки соответственно,  $\alpha$  - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ,  $\Delta p$  - перепад давления на мембране,  $\pi_0$  - осмотическое давление не проникающих через клеточную мембрану внутриклеточных веществ в начальный момент времени, которое в норме равно 8 Па,

$$\pi = \pi' / \pi_0, \quad \pi' = \pi'' / \pi_0, \quad 1/\tau_0 \equiv \gamma L_p \pi_0, \quad 1/\tau_1 \equiv \gamma K,$$

$\gamma$  - отношение площади поверхности клеточной мембраны к объему клетки в исходном состоянии,  $L_p$  - коэффициент фильтрации клеточной мембраны,  $K$  - коэффициент проницаемости клеточной мембраны для растворенного во внеклеточной среде вещества. При пассивном переносе молекул воды через клеточную мембрану коэффициент отражения связан с коэффициентами фильтрации и проницаемости клеточной мембраны следующим образом [5]:

$$1 - \sigma = \varepsilon n_0 \vartheta \quad (2)$$

где  $\varepsilon = \tau_0/\tau_1$ ,  $n_0 = \pi_0/RT$ ,  $R$  - универсальная газовая постоянная,  $T$  - абсолютная температура,  $\vartheta$  - молярный объем проникающего через клеточную мембрану вещества. Из (2) следует, что коэффициент отражения становится равным единице, когда  $K = 0$ , то есть когда растворенное вещество не проникает через клеточную мембрану.

Если исходное значение объема клетки  $V_0 \leq (S_0)^{3/2}/6\sqrt{\pi}$  то до тех пор, пока относительный объем клетки будет заключен в интервале

$$1 \leq y \leq y_s = (S_0)^{3/2}/6\sqrt{\pi} \quad (3)$$

перепадом давления на клеточной мембране  $\Delta p$  можно пренебречь, так как клеточная мембрана при этом не подвергается изотропному растяжению. Когда же форма клетки становится сферической и относительный объем клетки превышает значение  $y_s$ , клеточная мембрана растягивается и внутри клетки создается избыточное давление, которое равно [4]

$$\frac{\Delta p}{\pi} = C[(y/y_s)^{3/2} - 1] \quad (4)$$

где  $C = 4\Gamma\sqrt{\pi}/(\sqrt{S_0}\pi_0)$ ,  $\Gamma$  - коэффициент изотермического растяжения клеточной мембраны. В среднем для эритроцита человека (в растворе Рингера)  $S_0 = 136,9 \times 10^{-12} \text{ м}^2$  и  $V_0 = 104,2 \times 10^{-18} \text{ м}^3$  [6], так что  $y_s = 1,4458$ .

Как известно [7], разрыв мембраны эритроцита возникает при небольшом относительном изменении площади поверхности его мембраны и, следовательно, при небольшом изменении его относительного объема. Поэтому, описывая изменение объема клетки в пределах  $y_s < y < y_p$ , где  $y_p$  - значение относительного объема клетки, при котором в ее изотропно растягиваемой мембране возникает макроскопическая пора, можно считать, что

$$(y - y_s)/y_s \ll 1 \quad \text{и} \quad \Delta p/\pi_0 = 2C(y/y_s - 1)/3\pi_0 \quad (5)$$



Если отношение суммарного объема клеток в клеточной суспензии к объему внеклеточной жидкости значительно меньше единицы, что и предполагается в дальнейшем, то можно считать величину  $\pi'$  неизменной, так как в процессе перераспределения веществ между клетками и окружающей их средой в этом случае практически не изменяется концентрация растворенного вещества во внеклеточном растворе.

Величины  $\tau_0$  и  $\tau_1$  имеют размерность времени и соответственно представляют собой характерное время установления химического равновесия на мембране клетки для молекул растворителя (воды) и растворенного вещества. Как правило,  $\varepsilon \ll 1$  и соответственно  $\sigma \sim 1$  [8].

Точное аналитическое решение системы нелинейных уравнений (1) отсутствует, поэтому она решается, как правило, численно на ЭВМ. Это затрудняет как анализ результатов соответствующих численных экспериментов, так и сопоставление численных экспериментов с эмпирическими данными. Можно, однако, получить более эффективное, удобное для анализа и более наглядное решение системы уравнений (1) с помощью асимптотических методов решения сингулярно возмущенных систем [9]. Для этого с учетом приведенных выше соотношений и определений представим систему уравнений (1) в следующем виде

$$\varepsilon \frac{dy}{dt} = \sigma(\pi - \pi') + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \frac{2 C(y - y_s)}{y_s^3} \quad (6)$$

$$\frac{dz'}{dt} = z' \frac{d}{dy} + \pi' + \varepsilon \vartheta \pi_0 \frac{dy}{dt}$$

где введено безразмерное "медленное" время  $t = t/\tau_1$  и новая переменная  $z' =$

$=(y - \alpha) \pi$ . Поскольку в качестве сомножителя при производной  $dy/dt$  фигурирует малый параметр  $\varepsilon$ , можно получить асимптотическое решение системы уравнений (1) на временах  $\tau_0 \ll t \sim 1$  с помощью упомянутого выше метода сингулярных возмущений. Полагая в (6)  $\varepsilon = 0$ , после несложных преобразований получаем так называемую систему порождающих уравнений, порядок которой понижен на единицу по сравнению с исходной

$$\sigma z + 1 - \alpha = (y - \alpha) \left[ \sigma \pi' + \frac{2 C(y - y_s)}{3 y_s^3} \right] \quad (7)$$

$$\frac{dz}{dt} = \frac{(1 - \alpha) \pi'}{\sigma z + 1 - \alpha}$$

где  $z = z'/RT$ . Решение (7), то есть решение (6) в несингулярной области, при начальном условии  $z(0) = 0$  есть

$$\begin{aligned}
 t - t_s = & 2(y - y_s) - \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma n'}{4C'} \times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1-\alpha)} [(y-\alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y-\alpha)] \right\} + \\
 & + \frac{[2C'(y-\alpha)^2 + 3\sigma n'(y_s - \alpha) + 12(1-\alpha)]}{4\sqrt{C'} \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)}} \times \\
 & \times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} + 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2) \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} - \sqrt{C'(y_s - \alpha)}}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} - 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2) \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1-\alpha)} + \sqrt{C'(y_s - \alpha)}} \right\}
 \end{aligned} \quad (8)$$

где  $C' = C/y_s$  и

$$t_s = \frac{[(\sigma n')^2 (y_s - \alpha)^2 - (1-\alpha)^2]}{2\gamma K(1-\alpha)\sigma n'}$$

Заметим, что для эритроцитов периферической крови человека при указанных выше средних значениях площади поверхности мембраны и объема клетки  $\gamma = S_0/V_0 = 1,3138 \cdot 10^6 \text{ м}^{-1}$ . Кроме того для этих клеток  $\alpha = 0,42$ .

Решение (8) описывает изменение относительного объема клетки со временем после помещения в гипертонический водный раствор проникающего в клетки вещества. В несингулярной области, то есть на временах, превышающих  $\tau_0$ , эти решения с точностью до членов порядка  $O(\varepsilon)$  аппроксимируют точное решение исходной системы уравнений (1).

Когда  $y > y_s$ , клеточная мембрана растягивается. Как известно [3], при этом энергетически выгодным становится образование в ней макроскопической поры. Среднее время образования такой поры в изотропно растянутой мембране в стационарном случае равно [4]

$$\langle t_p \rangle = A s^{-1/2} \exp \left( -\frac{\pi \gamma_0^2}{kTs} \right) \quad (9)$$

где  $s$  - изотропное натяжение мембраны,  $k$  - постоянная Больцмана,  $\gamma_0$  - коэффициент линейного натяжения границы поры. Предэкспоненциальный множитель  $A$  не зависит от натяжения мембраны  $s$  и равен 0,01. С учетом закона Гука и (5)

$$s = \frac{2}{3} \Gamma (y/y_s - 1) \quad (10)$$

Поэтому (9) можно представить в виде

$$\langle t_p \rangle = A' C' (y - y_s)^{-1/2} \exp \left( -\frac{3\pi \gamma_0^2}{kTR_s \pi_0 C' (y - y_s)} \right) \quad (11)$$

Сопоставление экспериментальных данных о времени гемолиза эритроцитов донорской крови человека в зависимости от изотропного натяжения их мембраны, полученных методом частичного втягивания одиночных эритроцитов в микропипетку с калиброванным диаметром при фиксированном перепаде давления [10], с (11) приводит к следующим значениям коэффициентов в этой формуле:  $A' = 0,01$ ,  $3\gamma_0^2/kTR_s \pi_0 = 0,08676$ , что при температуре  $25^\circ\text{C}$  соответствует значению  $g_0 = 10^{-11}$  Н (это значение совпадает с линейным натяжением границы поры в липидных бислоях).

Непосредственно использовать формулу (11) для описания гипотонического гемолиза эритроцитов нельзя, так как объем клетки и вместе с ним изотропное натяжение мембраны (при  $y > y_s$ ) в рассматриваемом нами случае непрерывно увеличиваются со временем, а не остаются постоянными. Можно, однако, считать, что макроскопическая пора образуется в мембране, если время, в течение которого относительный объем клетки находится в интервале значений  $Dy$ , равно среднему времени образования макроскопической поры, соответствующему некоторому значению  $y$ , лежащему в этом интервале по формуле (11). В аналитическом виде это утверждение можно представить следующим образом

$$\int_{y^*}^{y_p} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{y_p - y^*} \int_{y^*}^{y_p} \langle t_p \rangle dy \quad (12)$$

где  $y_s$  - относительный объем клетки, при котором в мембране образуется пора,  $y^*$  - относительный объем клетки, который соответствует равенству  $t(y) - t_s = \langle t_p \rangle(y)$ . Пусть  $t(y) = \langle t_p \rangle(y) = t^*$  и  $t_p$  - момент времени, в который образуется мембранная пора. Тогда несложные вычисления приводят к следующему учитывающему (12) алгоритму определения полного времени, за которое в мембране клетки, помещенной в гипертонический водный раствор проникающего в нее вещества, возникает макроскопическая пора. Определяем относительный объем клетки  $y^*$  и соответствующий ему момент времени  $t^*$ , при которых правая сторона равенства (8), деленная на  $\gamma K$  становится равной правой стороне равенства (11). Далее, время, за которое в мембране образуется макроскопическая пора, определяется по формуле

$$t_p = \frac{[(\sigma n')^2 (y_s - \alpha)^2 - (1 - \alpha)^2]}{2\gamma K(1 - \alpha)\sigma n'} + \frac{2(y^* - y_s)}{\gamma K} + \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma n'}{4\gamma K C'} \times$$

$$\times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1 - \alpha)} [(y^* - \alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y^* - \alpha)] \right\} + \frac{[2C'(y - \alpha)^2 + 3\sigma n'(y_s - \alpha) + 12(1 - \alpha)]}{4\gamma K \sqrt{C'} \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)}} \times$$

$$\times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} + 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} - 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2)} \times \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} - \sqrt{C'(y_s - \alpha)}}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + (1 - \alpha)} + \sqrt{C'(y_s - \alpha)}} \right\} +$$

$$+ \frac{1}{1 + \frac{\langle t_p \rangle^* \gamma K}{2}} \frac{3\pi\gamma_0^2 [3(1-\alpha) - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)]}{kTR_s \pi_0 C'(y^* - y_s)^2 (y^* - \alpha) [3\sigma\pi' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]}$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

На рис. 1-3 представлены графики функции (13) при некоторых значениях параметров, фигурирующих в построенной нами модели. Как следует из полученных соотношений, время образования макроскопической поры в мембране растет прямо пропорционально концентрации растворенного во внеклеточной среде вещества (рис.1). Обратим внимание, что, поскольку параметр  $\pi'$  задается самим экспериментатором, справедливость этого результата легко проверить экспериментально. Проведенные нами эксперименты по определению времени  $t_p$  методом малоуглового рассеяния света [11] подтверждают этот теоретический прогноз для области значений  $\pi' < 8$ . При более высоких значениях концентрации внеклеточного раствора отклонение от предсказываемой моделью зависимости, по-видимому, объясняется прямым химическим взаимодействием высококонцентрированных растворов с мембраной. Очевидно, изменение концентрации проникающего в клетки растворенного вещества сказывается, главным образом, на времени сферификации клеток  $t_s$ , тогда как продолжительность стадии, на которой мембрана эритроцитов испытывает деформацию растяжения, изменяется незначительно. Предсказываемый моделью эффект уменьшения объема эритроцита, при котором в его мембране образуется макроскопическая пора, с ростом внеклеточной концентрации является кинетическим.

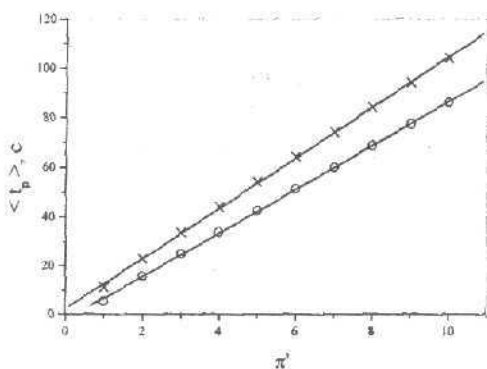


Рис.1 Зависимость времени сферификации (ooo), времени при котором в мембране эритроцита образуется макроскопическая пора (xxx), от приведенного осмотического давления внеклеточного раствора.

$\alpha=0,4$ ;  $\sigma=0,95$ ;  $C'=0,25$ ;  $T=298$  K;  $\gamma K = 0,1$ .

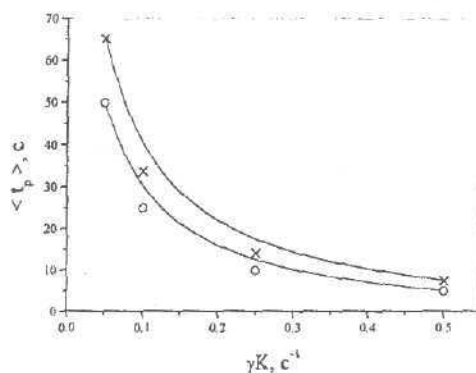


Рис.2 Зависимость времени сферификации (ooo), времени при котором в мембране эритроцита образуется макроскопическая пора (xxx), от параметра  $\gamma K$ .

$\alpha=0,4$ ;  $\sigma=0,95$ ;  $C'=0,25$ ;  $T=298$  K;  $\pi'=3$ .

Он обусловлен тем, что повышение перепада осмотического давления на мембране приводит к увеличению скорости изменения клеточного объема, и это, в свою очередь, влечет за собой "проскакивание" клетки до значений  $y - y_s > y_s$ , при которых время образования макроскопической поры становится сравнительно

небольшим. Рост  $t_p$  с уменьшением параметра  $\gamma K$  (рис.2), в основном, вызван увеличением времени достижения клеткой сферической формы с уменьшением

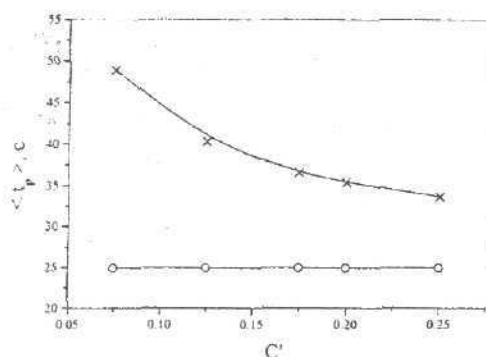


Рис.3 Зависимость времени сферификации (ooo), времени при котором в мембране эритроцита образуется макроскопическая пора (xxx), от параметра  $C'$ .

$\alpha=0,4$ ;  $\sigma=0,95$ ;  $\gamma K=0,1$ ;  $T=298$  K;  $\pi' = 3$ .

коэффициента проницаемости эритроцитов для проникающего в клетки растворенного вещества. Повышение же значения относительного объема эритроцита, при котором в его мембране образуется макроскопическая пора, с увеличением этого параметров также обусловлен упомянутым выше эффектом проскальзывания", ибо скорость изменения объема клетки обратно пропорциональна произведению  $\gamma K$ . Уменьшение  $t_p$  в более жесткой мембране, то есть при более высоких значениях параметра  $C'$ , объясняется тем, что изотропное натяжение мембраны, необходимое для образования в ней поры, в более жесткой мембране возникает при меньшем растяжении, и, следовательно, мембранная пора при этом образуется за более короткий промежуток времени (рис.3).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wessels J.M.C., Pals D.T.F., Veer Kamp J.H.//BBA.1973.V.291.P.165-177.
2. Mazur P., Leibo S.P., Miller R.H.//J.Membrane Biol.1974.V.15.P.107-136.
3. Козлов М.М., Маркин В.С.//Биол. мембраны.1984.Т.1, N1.С.74-78.
4. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.К.Наук.думка,1994.143с.
5. Levin R.L., Miller T.W.//Cryobiology.1981.V.18.P.32-48.
6. Canham P.B., Parkinson D.R.//Can. J. Physiol. Pharmacol.1970.V.48.P.369-376.
7. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М.Мир,1982.304с.
8. Levitt D.G., Mlekoday H.J.//J. Gen. Physiol.1983.V.81.P.239-254.
9. Марри Дж. Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии. Лекции о моделях.М.Мир,1983.397с.
10. Rand R.P.//Biophys.J.1964.V.4.P.303-316.
11. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф.//Проблемы криобиологии.1994.С.24-32.



УДК 577.352.335+577.336

**ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛИЗА НЕОДНОРОДНОГО УШИРЕНИЯ  
СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДСМ  
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ  
МОДЕЛЬНЫХ И ПРИРОДНЫХ МЕМБРАН**

**Г.П.Горбенко\*, О.А.Нардид, Т.С.Дюбко**

*\* Харьковский государственный университет им. А.М.Горького, 310077, Харьков,  
пл. Свободы. 4; Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
310015, Харьков, ул. Переяславская, 23.*

*E-mail: cryo@online.kharkov.ua or tdyubko@lincom.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 15 мая 1998 г

Разработана модификация метода анализа параметров неоднородного уширения спектров применительно к флуоресцентному зонду ДСМ. Изучены возможности использования разработанного подхода к изучению изменений структуры модельных и биологических мембран индуцированных белками, ионизирующей радиацией, низкими температурами. Показано, что анализ спектров флуоресценции ДСМ позволяет получать информацию о характере изменений полярности микроокружения зонда при разнообразных воздействиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биофизика, флуоресцентный зонд, анализ спектров, структура мембран, облучение, низкие температуры, белок-липидные взаимодействия

Среди физических методов исследования структуры и динамических свойств биологических мембран важная роль принадлежит методу флуоресцентных зондов [1,2]. Использование различных модификаций этого метода позволяет получить ценную информацию о таких характеристиках мембранных систем, как поверхностный заряд, полярность, микровязкость, толщина липидного бислоя, взаимное расположение белков и липидов и т.д. [1-3]. Высокая чувствительность спектральных параметров флуоресцентных зондов к физико-химическим свойствам их микроокружения создает предпосылки для выяснения факторов, лежащих в основе изменений структурной организации мембран при разнообразных воздействиях. Основной проблемой в такого рода исследованиях является установление корреляции между наблюдаемыми спектральными эффектами и характером изменений полярности и динамического состояния области локализации зонда в мембране. К настоящему времени предложено множество теорий влияния растворителей на спектры флуоресценции [3]. Большинство из них основано на рассмотрении взаимосвязи между сдвигом максимума флуоресценции и физическими параметрами среды

- диэлектрической постоянной и показателем преломления. Вместе с тем, влияние среды может проявляться не только в сдвиге максимума флуоресценции, но также в изменении квантового выхода и формы спектра. В этом аспекте представляет несомненный интерес предложенный в работах [4-6] подход, позволяющий описать форму и изменения интенсивности спектров на основе выделения в спектрах флуоресценции двух частей - однородной составляющей, зависящей от внутримолекулярных свойств зонда и распределения неоднородного уширения, параметры которого определяются физико-химическими характеристиками окружения молекул флуорофора. Применение этого подхода к анализу спектров флуоресценции 1,8-анилино-нафталин-сульфоната (АНС) и N-фенил-1-нафтиламина (ФНА) продемонстрировало его высокую чувствительность и информативность в исследовании структуры белков и биомембран [6]. Мы предприняли попытку расширить границы использования модели неоднородного уширения и оценить степень ее применимости для описания параметров флуоресценции других зондов. Был проведен анализ спектров флуоресценции ряда соединений: 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний N-толуолсульфоната (ДСМ), его производных ДСП-6 и ДСП-12, 4-диметиламинохалкона (ДМХ) и 6-метоксибензантрона (МБА). Среди изученных зондов наибольшая чувствительность спектральных характеристик к изменению свойств микроокружения была выявлена для ДСМ. Оказалось, что анализ параметров неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ может быть использован при изучении механизмов структурных изменений мембран, вызванных взаимодействием с белками, облучением, воздействием низких температур. Результаты проведенных исследований обобщены в настоящей работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ДСМ ("Zonde", Латвия), фосфатидилхолин (ФХ), дифосфатидилглицерин (ДФГ) (Концерн "Биолек", Харьков). Липосомы формировали из смеси ФХ и ДФГ в соотношениях 9:1 или 4:1 путем инъекции этанольного раствора липидов в избыток 10 мМ трис-HCl буфера, pH 7.4 с последующим удалением этанола диализом. Мембраны эритроцитов выделяли из крови крыс или доноров по методу [7] и суспендировали в 5 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.4. Концентрацию белка в препаратах мембран определяли по методу Лоури [8].

Исследуемые образцы облучали на линейном ускорителе электронов в дозе 1000 Гр. Концентрация белка в исследованных образцах составляла 0,1 мг/мл, а концентрация тиомочевины - 80 мМ. Быстрое замораживание образцов производили путем погружения в жидкий азот (-196 °C), отогрев - на водяной бане (40 °C). Анализ спектров флуоресценции ДСМ проводили непосредственно после замораживания и через 24 ч после радиационного воздействия.

Спектры флуоресценции ДСМ регистрировали на спектрофлуориметрах Signe-4M и Hitachi F-4010 при длине волны возбуждения 460 нм и ширине щелей возбуждения и испускания 5 нм.

## ТЕОРИЯ МЕТОДА

В рамках модели формирования электронно-колебательных спектров многоатомных молекул, предложенной в работах [4-6], спектры флуоресценции ДСМ в различных растворителях описывали уравнением:

$$S(\nu, C, \nu^c, \sigma) = \int \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s)^2 + \Gamma^2(\nu_s)} \frac{\mu^2(\nu_s)C}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\nu^c - \nu_s}{\sigma}\right)^2\right\} d\nu_s \quad (1)$$

где  $\nu^c$  и  $\sigma$  - центр и дисперсия распределения неоднородного уширения спектра,  $\nu_s$  - частота перехода системы,  $\nu$  - частота излучаемого света,  $\Gamma(\nu_s)$  - полуширина однородной лоренцевой линии перехода,  $\mu^2(\nu_s)$  - вероятность распада возбужденного электронного состояния с излучением,  $C$  - нормировочный коэффициент. Параметры  $C$ ,  $\nu^c$  и  $\sigma$  определяли методом наименьших квадратов, минимизируя функцию:

$$F = \sum_{i=1}^N \{I(\nu_i) - S(\nu_i)\}^2 \quad (2)$$

где  $I(\nu_i)$  - интенсивность нормированного экспериментального спектра,  $N$  - число экспериментальных точек. По аналогии с [6], зависимости  $\Gamma$  и  $\mu^2$  от частоты представляли в виде:

$$\Gamma(\nu_s) = a_0 + a_1 \nu_s + a_2 \nu_s^2 \quad (3)$$

$$\lg\{\mu^2(\nu_s)\} = b_0 + b_1 \nu_s + b_2 \nu_s^2 \quad (4)$$

Коэффициенты  $a_0, a_1, a_2$  и  $b_0, b_1, b_2$  подбирали так, чтобы в минимуме функции  $F$  выполнялось соотношение:

$$f = \sqrt{F/N} \frac{1}{I_{\max}} \leq \delta \quad (5)$$

где  $\delta$  - погрешность измерения, не превышающая в наших экспериментах 3 %. Функции  $\Gamma$  и  $\mu^2$  были найдены при описании спектров флуоресценции ДСМ в воде, апетоне и смесях воды с этанолом и глицерином уравнением (1). Общее число модельных спектров составляло 11, а количество используемых в расчетах экспериментальных точек для каждого спектра равнялось 160. Значения коэффициентов составили

$$a_0 = 5.184 \cdot 10^3, a_1 = -0.526, a_2 = 1.375 \cdot 10^{-5}, \\ b_0 = -11.383, b_1 = 1.081 \cdot 10^{-3}, b_2 = -2.827 \cdot 10^{-8}.$$

Решение данной оптимизационной задачи не является единственным, но оно достаточно устойчиво, что достигалось использованием избыточной информации - на-

бора спектров, число точек в которых намного превышало число параметров. Значения коэффициентов  $a_0, a_1, a_2, b_0, b_1, b_2$  и  $C$ , найденные для модельных спектров, использовались в дальнейшем при описании спектров флуоресценции ДСМ в суспензии липосом или мембран эритроцитов уравнением:

$$S(\nu, \{C_i, \nu_i^c, \sigma_i\}_n) = \sum_{i=1}^n \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s)^2 + \Gamma^2(\nu_s)} \frac{\mu^2(\nu_s) K_i C}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{1}{2} \left\{ \frac{\nu_i^c - \nu_s}{\sigma_i} \right\}^2\right) d\nu_s \quad (6)$$

где  $n$  - число спектральных компонент, соответствующих различным формам зонда,  $\nu_i^c$  и  $\sigma_i$  - параметры неоднородного уширения  $i$ -й компоненты,  $K_i$  - вклад  $i$ -й формы зонда в суммарный спектр. Первоначально полагали, что  $n = 1$ , и в минимуме функции  $F$  по уравнению (5) рассчитывали параметр  $f$ . Если при  $n = 1$  величина  $f$  превышала погрешность измерения, значение  $n$  последовательно увеличивали до тех пор, пока не выполнялось условие  $f \leq 0.03$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно имеющимся в литературе и полученным в настоящей работе данным, участки связывания ДСМ с модельными и природными мембранами гетерогенны, что приводит к наличию нескольких компонент в спектрах флуоресценции зонда [2]. Обнаружено, что спектр флуоресценции ДСМ в суспензии липосом может быть описан суммой двух компонент (Рис. 1), соответствующих различающимся по физико-химическим свойствам центрам связывания зонда. Как показал анализ спектров флуоресценции ДСМ в различных растворителях, уменьшение полярности среды сопровождается возрастанием параметров неоднородного уширения  $\nu^c$  и  $\sigma$ , а изменение вязкости не оказывает существенного влияния на эти величины. В таблице 1 представлены значения  $\nu^c$  и  $\sigma$  для длинноволновой ( $\nu_1^c$  и  $\sigma$ ) и коротковолновой ( $\nu_2^c$  и  $\sigma$ ) спектральных компонент. Незначительные различия между  $\nu_1^c$  и значением  $\nu^c$  для спектров флуоресценции ДСМ в буфере позволяют предположить, что первая спектральная компонента соответствует поверхностной локализации зонда. Поскольку молекула ДСМ имеет единичный положительный заряд, весьма вероятно, что в состав центров связывания первого типа входят отрицательно заряженные полярные головки ДФГ. Существование участков связывания второго типа, характеризующихся меньшей полярностью, по-видимому, обусловлено проникновением анилинового кольца ДСМ в область глицириновых остатков.

Как следует из приведенных в табл. 1 данных, физико-химические свойства липосомальных центров сорбции ДСМ претерпевают изменения при модификации структуры липидного бислоя в результате облучения (см. рис. 1) или образования белок-липидных комплексов. Радиационное воздействие приводило к повышению полярности центров первого типа, снижению полярности центров второго типа и возрастанию вклада участков связывания второго типа в суммарный спектр. Наблюдаемые эффекты, по-видимому, являются следствием нарушения структуры липосомальных мембран, сопровождающегося изменением числа и природы контактов зонда с молекулами фосфолипидов и воды, а также перераспределением ДСМ между

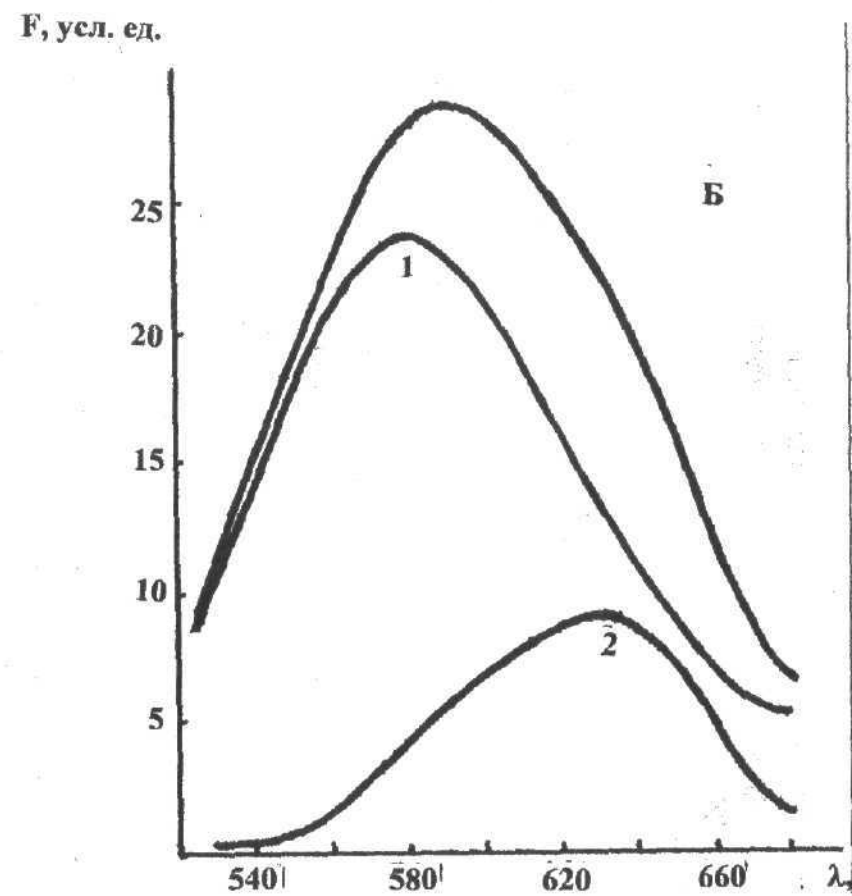
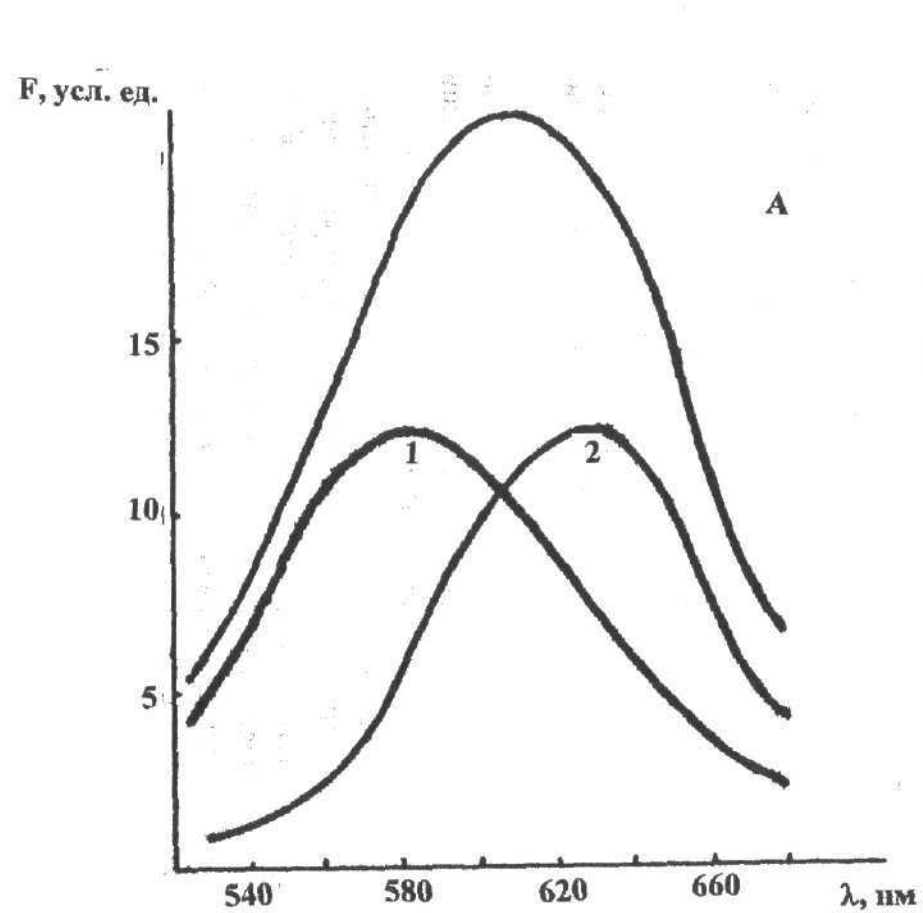


Рис. 1. Спектры флуоресценции ДСМ в суспензии липосом, состоящих из ФХ и ДФГ (9:1). 1 и 2 - спектральные составляющие, рассчитанные по уравнениям (3)-(6). Концентрация зонда - 4 мкМ. Концентрация липида - 0.3 мМ.  
А - нативные липосомы; Б - липосомы, облученные в дозе 1000 Гр. Время пострadiационной инкубации - 24 ч.



Таблица 1

**Параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ**

| Параметры неоднородного<br>уширения компонент<br>спектра | 10 mM<br>трис-HCl<br>буфер,<br>pH 7.4 | ФХ:ДФГ (9:1) |                                |                                |                               | ФХ:ДФГ (4:1)                                  |                      |                                          |                      |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|----------------------|
|                                                          |                                       | контроль     | Облучение<br>в дозе<br>1000 Гр | Контроль<br>+ тиомо-<br>чевина | 1000 Гр<br>+ тиомо-<br>чевина | + рибонуклеаза,<br>соотношение<br>белок:липид |                      | + лизоцим,<br>соотношение<br>белок:липид |                      |
|                                                          |                                       |              |                                |                                |                               | 7.3 10 <sup>-3</sup>                          | 1.8 10 <sup>-3</sup> | 2.9 10 <sup>-3</sup>                     | 8.6 10 <sup>-3</sup> |
| $\nu_1^c, \text{см}^{-1}$                                | 15250                                 | 15450        | 15320                          | 15460                          | 15460                         | 16095                                         | 16116                | 16062                                    | 16264                |
| $\sigma_1, \text{см}^{-1}$                               | 910                                   | 895          | 1070                           | 920                            | 870                           | 1120                                          | 1140                 | 1080                                     | 1008                 |
| $K_l$                                                    | -                                     | 0.53         | 0.36                           | 0.55                           | 0.58                          | 0.65                                          | 0.63                 | 0.63                                     | 0.42                 |
| $\nu_2^c, \text{см}^{-1}$                                | -                                     | 16380        | 16380                          | 16240                          | 16240                         | 16730                                         | 16794                | 16714                                    | 16786                |
| $\sigma_2, \text{см}^{-1}$                               | -                                     | 1410         | 1400                           | 1480                           | 1480                          | 1780                                          | 1818                 | 1794                                     | 1905                 |

Примечание: максимальная погрешность составляла 36 для  $\nu_1^c$  и  $\nu_2^c$ , 44 для  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  и 0.04 для  $K_l$ .

различными центрами связывания. Ингибирующее влияние антиоксиданта - тиомочевина (см. табл. 1) свидетельствует об участии процессов перекисного окисления липидов в формировании наблюдаемых радиационных эффектов. Параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ оказались чувствительными также к структурным изменениям модельных мембран при белок-липидных взаимодействиях. Образование комплексов рибонуклеазы и лизоцима с липосомами сопровождалось уменьшением полярности центров связывания зонда (см. табл.1). В основе этого эффекта могут лежать различные факторы. Проникновение белков во внутреннюю область липосомальных мембран может сопровождаться возникновением структурных дефектов, способствующих более глубокому погружению молекул зонда в бислои. С другой стороны, не исключено, что образование электростатических контактов между заряженными группами белков и фосфолипидов приводит к повышению плотности упаковки липидных молекул и вытеснению воды из полярной области липидного бислоя, в которой локализуются молекулы ДСМ.

Анализ спектров флуоресценции ДСМ в суспензии теней эритроцитов крыс позволил выделить три типа участков связывания зонда, характеризующиеся различными значениями  $\nu^c$  и  $\sigma$  (Рис. 2). Как показывает сопоставление данных, представленных в Табл. 1 и 2, индуцируемые радиацией изменения параметров неоднородного уширения ДСМ, связанного с эритроцитарными и липосомальными мембранами, сходны по характеру. Это позволяет предположить, что зонд локализуется, главным образом, в липидной фазе теней эритроцитов и реагирует на лучевое повреждение липидного компонента мембран. Дополнительным аргументом в пользу этого предположения служит подавление спектральных эффектов в присутствии ингибитора перекисного окисления липидов (см. табл. 2).

В нативных мембранах эритроцитов донора, также как и в случае теней эритроцитов крыс, удалось выявить три типа участков связывания ДСМ, различающихся по характеристикам ближайшего микроокружения зонда и отвечающих за его различную локализацию в мембране (Табл. 3).

После криовоздействия наблюдалось как увеличение количества связанного с мембранами ДСМ, так и его перераспределение между различными типами участков связывания. Обнаружены также более гидрофобные по типу участки связывания, которые характеризуются наибольшей величиной параметра  $\nu^c$ . Сопоставляя полученные результаты с данными литературы [9], можно прийти к заключению, что в основе низкотемпературного нарушения структуры эритроцитарных мембран лежит сложный комплекс взаимосвязанных процессов, затрагивающих как белковую, так и липидную фазы. Обнаруженные после замораживания изменения характеристик центров сорбции ДСМ на эритроцитарных мембранах, по-видимому, отражают эти процессы. Увеличение гидрофобности микроокружения зонда и усиление его связывания с мембранами может, в частности, быть результатом большего встраивания зонда в мембрану вследствие увеличения при вызванной замораживанием агрегации внутримембранных частиц доли свободного липида, ранее контактировавшего с белками. В то же время, учитывая, что ДСМ имеет примерно одинаковое сродство к глицериновым остаткам и к поверхности липидного бислоя [2], мы не исключаем возможности появления дополнительных центров сорбции зонда в области белок-

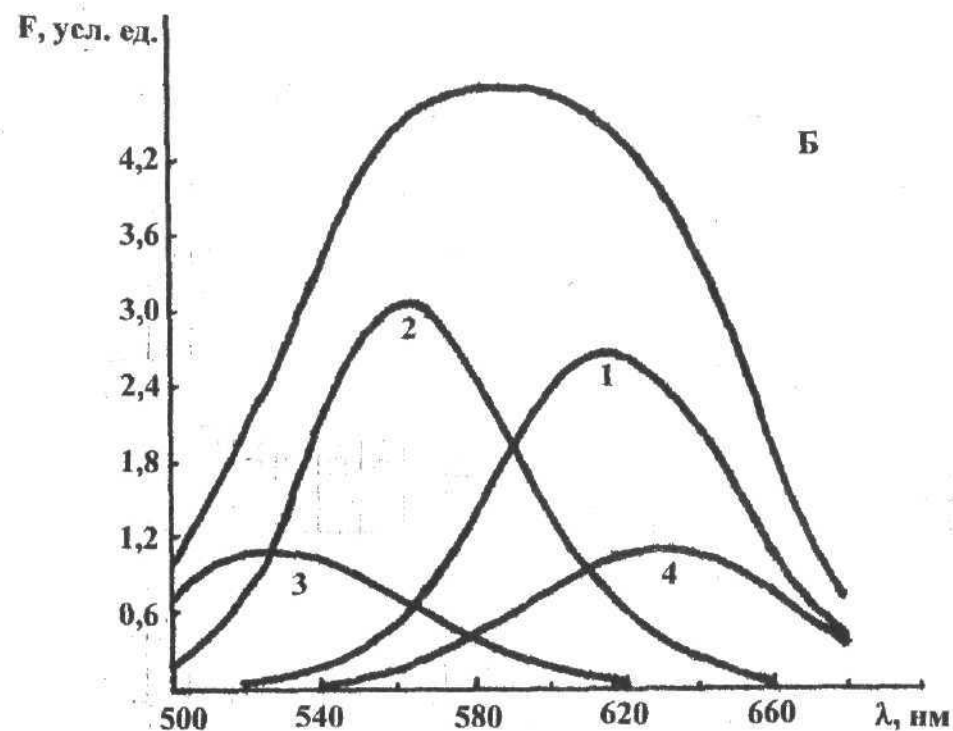
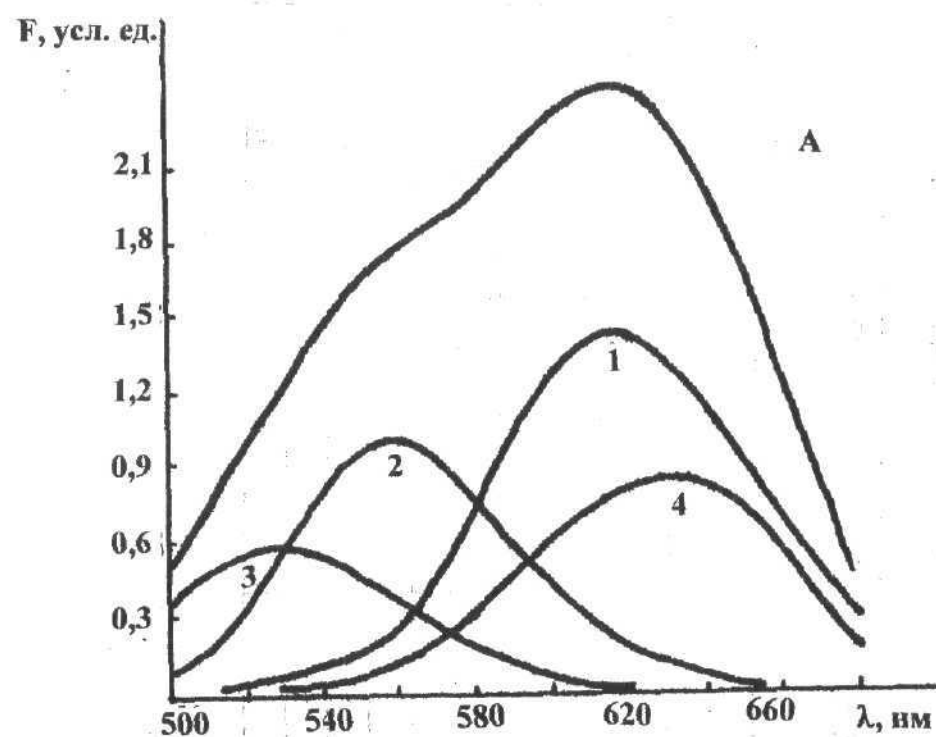


Рис. 2. Спектры флуоресценции ДСМ в суспензии эритроцитарных мембран. 1 - 4 - спектральные составляющие, рассчитанные по уравнениям (3)-(6) для связанного (спектры 1 - 3) и свободного (спектр 4) зонда. Концентрация ДСМ - 8 мкМ, концентрация белка - 0,2 мг/мл.

А - нативные мембраны, Б - мембраны, облученные в дозе 1000 Гр. Время пострadiационной инкубации - 24 часа.

Таблица 2

**Влияние облучения на параметры неоднородного уширения спектров  
флуоресценции ДСМ, связанного с мембранами эритроцитов**

| Параметры неоднородного<br>уширения компонент<br>спектра | Тени эритроцитов |         |                                |                               |
|----------------------------------------------------------|------------------|---------|--------------------------------|-------------------------------|
|                                                          | Контроль         | 1000 Гр | Контроль<br>+ тиомо-<br>чевина | 1000 Гр<br>+ тиомо-<br>чевина |
| $\nu_1^c, \text{см}^{-1}$                                | 15760            | 15820   | 15760                          | 15760                         |
| $\sigma_1, \text{см}^{-1}$                               | 800              | 800     | 800                            | 760                           |
| $K_1$                                                    | 0.42             | 0.42    | 0.45                           | 0.47                          |
| $\nu_2^c, \text{см}^{-1}$                                | 17620            | 17520   | 17560                          | 17520                         |
| $\sigma_2, \text{см}^{-1}$                               | 880              | 840     | 860                            | 700                           |
| $K_2$                                                    | 0.14             | 0.23    | 0.14                           | 0.15                          |
| $\nu_{31}^c, \text{см}^{-1}$                             | 18720            | 18700   | 18700                          | 18700                         |
| $\sigma_3, \text{см}^{-1}$                               | 1150             | 1260    | 11800                          | 1180                          |
| $K_3$                                                    | 0.08             | 0.09    | 0.07                           | 0.08                          |

Таблица 3

**Влияние быстрого замораживания на параметры неоднородного уширения  
спектров флуоресценции ДСМ, связанного с мембранами эритроцитов**

| Параметры неоднородного<br>уширения компонент<br>спектра | Тени эритроцитов |                        |
|----------------------------------------------------------|------------------|------------------------|
|                                                          | Нативные         | После<br>замораживания |
| $\nu_1^c, \text{см}^{-1}$                                | 16130            | 16130                  |
| $\sigma_1, \text{см}^{-1}$                               | 935              | 935                    |
| $K_1$                                                    | 0.40             | 0.44                   |
| $\nu_2^c, \text{см}^{-1}$                                | 17240            | 17240                  |
| $\sigma_2, \text{см}^{-1}$                               | 990              | 990                    |
| $K_2$                                                    | 0.06             | 0.04                   |
| $\nu_{31}^c, \text{см}^{-1}$                             | 17975            | 17975                  |
| $\sigma_3, \text{см}^{-1}$                               | 968              | 968                    |
| $K_3$                                                    | 0.13             | 0.12                   |
| $\nu_4^c, \text{см}^{-1}$                                |                  | 18820                  |
| $\sigma_4, \text{см}^{-1}$                               |                  | 970                    |
| $K_4$                                                    |                  | 0.07                   |

липидных контактов в результате происшедших конформационных изменений мембранных белков.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ характеризуются высокой чувствительностью к различающимся по своей природе структурным изменениям модельных и природных мембран. Проведенные исследования продемонстрировали применимость используемого подхода при исследовании модификации структурного состояния липидного бислоя под влиянием радиации и низких температур, образовании белок-липидных комплексов. Анализ спектров флуоресценции ДСМ позволяет сделать вывод о характере изменений полярности микроокружения зонда при разнообразных воздействиях. Дальнейшее развитие модели неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ может заключаться в поиске параметра, коррелирующего с вязкостью области локализации зонда в мембране.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.- М.: Наука, 1980.- 320 с.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток, мембран и липопротеинов.- М.: Наука, 1983.- 151 с. В
3. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.- М: Мир, 1986, 496 с.
4. Бойцов В.М., Орлов С.Н. // Биофизика. 1982, Т. 27, N 6, С. 1049-1052.
5. Бойцов В.М., Южаков В.И.// Докл. АН СССР. 1985, Т. 281, N 2, С. 358-361.
6. Бойцов В.М. Биол. мембраны.- 1987, Т. 4, N 7, С. 677-695.
7. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. // Arch. Biochem. and Biophys. 1963, V. 100, P.119-130.
8. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951, V. 193, N 1, P. 265-275.
9. Репин Н.В. Электронно-микроскопическое изучение характера кристаллизации при замораживании водных растворов криопротекторов и некоторых клеток: Дис. ... канд. биол. наук.- Харьков, 1984.- 197 с.



## БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 616-006:576.385.5:51-76

**КИНЕТИКА РОСТА МНОГОКЛЕТОЧНЫХ  
ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ.  
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ.****Г.И.Соляник***Институт экспериментальной патологии, онкологии и  
радиобиологии им.Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина*

Поступила в редакцию 14 мая 1998 г.

Влияние кислорода и глюкозы на рост многоклеточных опухолевых сфероидов и гетерогенность их клеточного состава исследовалось с помощью математической модели. В рамках модели кислород и глюкоза рассматривались как неспецифические регуляторные факторы жизнеспособности опухолевых клеток, влияющие как на скорость перехода клеток из пролиферации в состояние покоя, так и на их гибель. Модель была использована для анализа кинетики роста и пролиферативной гетерогенности клеточного состава EMT6/Ro сфероидов. Сопоставление предсказаний модели с данными экспериментальных исследований показало, что скорость потребления кислорода одной клеткой (карциномы молочной железы мышей) по теоретическим оценкам в 4 раза ниже значений, измеренных в эксперименте.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** математическое моделирование, многоклеточные опухолевые сфероиды, кинетика роста, гетерогенность клеточного состава.

Трехмерные агрегаты опухолевых клеток (многоклеточные опухолевые сфероиды) широко используются как экспериментальная (*in vitro*) модель солидных опухолей на протяжении уже более двух десятилетий [1]. Одной из основных причин сходства между ростом многоклеточных сфероидов и небольшими опухолевыми образованиями является уменьшение в процессе роста доли пролиферирующих клеток и увеличение доли покоящихся [2]. Экспериментальные исследования убедительно показали, что существенный вклад в возникновение популяции покоящихся клеток вносит прогрессивное уменьшение концентрации кислорода и глюкозы [3,4]. Градиенты концентраций этих субстратов, обуславливают неоднородное в пространстве распределение клеток, отличающихся пролиферативной активностью [5]. Известно, что соотношение делящихся и покоящихся клеток и их пространственное расположение в значительной степени определяет эффективность противоопухолевой терапии [6,7]. Между тем экспериментальное исследование пролиферативной гетерогенности клеточных популяций, непрерывно изменяющейся в пространстве и во времени, связано с известными трудностями и ограничениями.

В этой связи целью работы является построение математической модели кинетики роста многоклеточных опухолевых сфероидов, учитывающей микроокружение и гетерогенность клеточного состава. 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. Так как большинство параметров модели могут быть определены по данным экспериментальных исследований, модель дает возможность анализировать особенности роста и изменения клеточного состава многоклеточных опухолевых сфероидов.

### МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

При построении математической модели мы исходили из следующих предположений:

- Многоклеточный опухолевый сфероид растет как сферически симметричная колония клеток.
- Биоэнергетика опухолевой клетки обусловлена катаболизмом глюкозы.
- Гетерогенность клеточного состава обусловлена зависимостью скорости переключения клетки из пролиферации в покой от внутриклеточного уровня кислорода и глюкозы.
- Покоящиеся клетки могут быть вовлечены в пролиферации, или могут погибать. Скорость гибели (в отсутствие воздействия повреждающих агентов) не зависит от концентрации кислорода, а полностью определяется внутриклеточным уровнем глюкозы.
- Внутриклеточная концентрация кислорода и глюкозы равна внеклеточной. Последняя определяется балансом между диффузией субстратов из среды инкубации внутрь сфероида и потреблением этих субстратов опухолевыми клетками.
- Так как время диффузии кислорода и глюкозы внутрь сфероида мало по сравнению с характерным временем роста сфероида (эта оценка верна по крайней мере для сфероидов с диаметром менее 1500 микрон), предполагается, что в каждый момент времени внутри сфероида достигается стационарное распределение основных субстратов.

В рамках сделанных предположений кинетика роста популяции делящихся и покоящихся клеток может быть представлена следующей системой дифференциальных уравнений ( $x$  - количество делящихся клеток в единице объема сфероида, а  $y$  - покоящихся):

$$\begin{aligned} dx/dt &= bx(t) - F_p x(t) + F_q y(t) \\ dy/dt &= F_p x(t) - F_q y(t) - F_d y(t) \end{aligned} \quad (1)$$

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

$$D_i (d^2 C_i / dr^2 + (2/r) dC_i / dr) = -P_i \quad (2)$$

Параметр  $b$  в системе (1) является средней скоростью деления клеток.  $D_i$  - эффективный (макроскопический) коэффициент диффузии кислорода ( $i=0$ ) и

глюкозы ( $i=g$ ), которые в рамках сделанных предположений не зависят от уровня этих субстратов в сфероиде.  $P_i$  характеризует скорость потребления кислорода и глюкозы (соответственно) опухолевыми клетками, находящимися в единичном объеме сфероида.

В рамках модели в качестве граничных условий для уравнений (2) рассматривались следующие:

$$\begin{aligned} \text{at } r = 0; \quad dC_i/dr &= 0 \\ \text{at } r = r_{\max} = R; \quad C_g &= G_{\text{ext}} \text{ and } C_o = O_{\text{ext}} \end{aligned} \quad (3)$$

Первое отражает центральную симметрию сфероида; второе - равенство концентрации субстратов на поверхности сфероида их значению в среде инкубации.

Очевидно, что кинетики роста многоклеточного сфероида существенно зависит от вида функций  $F_p$ ,  $F_q$  (первая определяет скорость переключения клетки из пролиферации в покой, вторая - обратно) и функции  $F_d$ , характеризующей скорость гибели клетки.

Известно, что нехватка кислорода приводит к возникновению популяции гипоксических клеток. Исследования, проведенные *in vitro* убедительно показали, что, кроме гипоксии, важную роль в образовании некротической зоны играет также низкий уровень глюкозы в клетке. Такое влияние кислорода и глюкозы на жизнеспособность клеток обусловлено взаимосвязанной ролью этих субстратов в центральном энергетическом процессе клеточного метаболизма - синтезе АТФ. Естественнo предположить, что скорость перехода клеток из пролиферации в покой в значительной степени определяется скоростью производства АТФ (под скоростью здесь подразумевается величина обратная времени, которое необходимо клетке для синтеза АТФ, в количестве, достаточном для поддержания нормального ее функционирования в каждый момент времени). Синтез АТФ представляет собой сложную пространственно не локализованную последовательность сопряженных биохимических реакций (субстратом для первой реакции этой последовательности является глюкоза, а для последней - кислород). Производство АТФ в этом случае определяется функционированием всей последовательности реакций как единой целостной системой, а зависимость скорости синтеза АТФ от концентрации кислорода и глюкозы (и, следовательно, функция  $F_p$ ) может быть адекватно описана функцией Вейбула [8]:

$$F_p = p \cdot \exp(-k_p (C_o^6 C_g^2)^{1/n}) \quad (4)$$

где  $C_o$  и  $C_g$  - нормированные концентрации кислорода и глюкозы,  $p$  - максимальная скорость перехода пролиферирующих клеток в состояние покоя, а  $k_p$  - нормировочный коэффициент. Для нормальных условий, при которых концентрация кислорода в среде инкубации ( $O_{\text{ext}}$ ) порядка 0.2 mM, а глюкозы ( $G_{\text{ext}}$ ) порядка 6.4 mM,  $k_p$  должен быть равен единице. Показатель степени ( $1/n$ ) в формуле (4) отражает многоступенчатый (в пространстве и во времени) характер синтеза АТФ и должен быть меньше 1/10.

Как видно из формулы (4) в рамках модели скорость перехода опухолевой клетки из пролиферации в покой в значительно большей степени зависит от кислорода, чем от глюкозы. Такое предположение модели кажется вполне разумным. Действительно, нормальное функционирование пролиферирующей клетки обеспечивается притоком свободной энергии, источником которой являются процессы катаболизма пищевых молекул, протекающие как в аэробных, так и в анаэробных условиях. При этом следует подчеркнуть, что

сопряженность катаболических и анаболических процессов обеспечивает минимизацию производства энергии в клетке. Истощение кислорода выключает из энергетического производства процессы окисления углеводов, жиров и аминокислот, оставляя клетке только один путь синтеза АТФ гликолитический. Будучи значительно (более чем в 15 раз) менее энергетичным по сравнению с аэробным расщеплением глюкозы, гликолиз не может обеспечить в клетке уровень АТФ, необходимый для поддержания ее митотической активности, что и обуславливает переход клетки в состояние покоя.

Известно, что в отличие от нормальных клеток, в которых механизмы гликолиза, цикла Кребса и окислительного фосфорилирования жестко взаимосвязаны, в раковых клетках регуляция этих трех стадий нарушена: скорость гликолиза значительно выше, чем это требуется для обеспечения пируватом цикла лимонной кислоты. Таким образом в аэробных раковых клетках синтез АТФ обусловлен как аэробным так и анаэробным гликолизом. Этот факт находит свое отражение в показателе степени отнормированной концентрации глюкозы в формуле (4).

Вследствие вышесказанного логически обоснованным выглядит предположение о том, что жизнеспособность покоящейся раковой клетки полностью определяется уровнем глюкозы и скорость ее гибели может быть представлена в виде:

$$F_d = d \cdot \exp(-C_g/k_d) \quad (5)$$

где  $d$  - максимальная скорость гибели клетки. Из (5) видно, что независимо от уровня глюкозы, покоящаяся клетка обречена на гибель - гликолиз не может удовлетворить потребности клетки в АТФ.

Существенно влияя на пролиферативный статус клеток, уровень кислорода и глюкозы в свою очередь зависит от скорости потребления этих субстратов опухолевыми клетками ( $P_i$ ). Следует отметить, что скорости потребления кислорода и глюкозы различными клеточными линиями как функции концентраций этих субстратов в среде инкубации исследовались и измерялись во многих экспериментальных работах [9,10]. Результаты этих исследований могут быть обобщены следующими эмпирическими соотношениями:

$$P_o = q_o C_o (1 + v_o (C_g + w_o)^{-1}) X(t) / (C_o + m_o) \quad (6)$$

$$P_g = q_g C_g (1 + v_g (C_o + w_g)^{-1}) (X(t) + gY(t)) / (C_g + m_g)$$

Где  $q_o$  и  $q_g$  - скорости потребления кислорода и глюкозы одной клеткой (соответственно), измеренные при нормальных условиях инкубации. Параметры  $v_i$ ,  $w_i$ ,  $m_i$  (эмпирические константы) характеризуют зависимость скоростей потребления от концентраций кислорода и глюкозы и могут быть оценены по данным экспериментальных исследований.  $g$  - отражает скорость потребления глюкозы покоящимися клетками в сравнении с потреблением ее делящимися клетками.

Естественно, что кинетика роста многоклеточных опухолевых сфероидов в значительной степени определяется скоростью перехода клеток из покоя в пролиферацию. Между тем понятно, что для сфероидов, клетки которого не обладают выраженной подвижностью, этим влиянием можно пренебречь. Действительно, внеклеточная среда покоящейся клетки, вовлеченной обратно в пролиферацию



(по любому механизму) содержит уровень кислорода и/или глюкозы не выше того, который обусловил ранее переход этой клетки в состояние покоя. Так как  $p > b$ , то после вовлечения в пролиферацию клетка с большей вероятностью опять перейдет в состояние покоя, чем разделится.

Следует отметить, что система (1) с функциями  $F_p$  (4),  $F_q=0$  и  $F_d$  (5) описывает динамику изменения количества делящихся и покоящихся клеток при их плотной упаковке в единице объема сфероиде. Под плотностью клеточной упаковки в свою очередь следует понимать величину, обратную объему отдельной клетки при условии, что этот объем не меняется во времени. Сказанное в полной мере применимо к покоящимся клеткам ( $V_y$  - объем покоящейся клетки). Однако возникает естественный вопрос: что есть объем делящейся клетки ( $V_x$ ), ведь в процессе митотического цикла клетка увеличивается практически вдвое? В рамках модели  $V_x$  - это усредненный по времени наблюдения объем митотической клетки асинхронно делящейся клеточной популяции. Понятно, что  $V_x > V_y$ .

Так как гибель покоящихся клеток происходит преимущественно в центральных областях сфероиде, откуда отток продуктов распада клеток крайне затруднен, для расчета кинетики роста многоклеточного опухолевого сфероиде необходимо определение эффективного объема мертвой клетки. В рамках модели под эффективным объемом мертвой клетки ( $V_z$ ) следует понимать часть некротического пространства, которая приходится на одну погибшую клетку (отметим, что изменение плотности мертвых клеток в модели характеризуется последним членом второго уравнения системы (1)).

Таким образом, построенная модель позволяет определять кинетику роста сфероиде и рассчитывать изменения количества делящихся, покоящихся и мертвых клеток и концентрации кислорода и глюкозы как функций радиуса сфероиде и времени, если известны параметры модели.

Как следует из построения модели, практически все ее параметры являются собственно клеточными характеристиками, для определения которых используются данные экспериментальных исследований клеточных линий в монослое [9-11]. Так параметры  $b, p, d, k_p, k_d, n, q_o, q_g, g$  могут быть определены из результатов кинетических исследований, а оценка  $v_i, w_i, m_i$  может быть проведена по данным исследований влияния концентраций кислорода и глюкозы на скорость их потребления клетками, растущими в монослое. Исключение составляет параметр  $V_z$ , значение которого может быть оценено только по данным кинетики роста многоклеточного сфероиде. Фактически, построенная модель дает возможность исследовать трехмерные агрегаты опухолевых клеток, используя для этого данные, полученные в двумерных экспериментальных моделях их роста.

#### КИНЕТИКА РОСТА ЕМТ6/Ro СФЕРОИДА РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мы использовали модель для анализа кинетики роста и клеточной гетерогенности ЕМТ6/Ro сфероиде (трехмерный агрегат клеток карциномы молочной железы мышей). Такой выбор типа сфероиде обусловлен большим количеством экспериментальных и теоретических исследований (имеющихся в литературе) кинетики роста этих клеток как в монослое, так и в виде многоклеточных сфероидов.

В таблице представлены значения параметров модели, характеризующие рост ЕМТ6/Ro сфероиде. Как видно большинство параметров были взяты из литературных источников или оценивались нами по данным экспериментальных



исследований клеток данного типа в монослое. Определение эффективного объема мертвой клетки  $V_z$ , а также вычисление параметров  $p$  и  $d$  (в виду отсутствия экспериментальных исследований кинетики роста клеток этого типа в монослое при указанных выше концентрациях кислорода и глюкозы) проводилось по данным кинетике роста EMT6/Ro сфероида в среде, содержащей 0.28 mM кислорода и 5.5 mM глюкозы, методом нелинейной регрессии (из наилучшего приближения построенной динамической модели к экспериментальным данным [11]). Единственный параметр, значение которого мы не смогли оценить из-за отсутствия достаточной экспериментальной информации - это параметр  $n$ , значение которого было выбрано нами равным 12.

Таблица.

## Параметры модели для EMT6/Ro сфероида

|                                                                            |                      |                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| $D_o = 3.0 \cdot 10^{-5}$                                                  | см <sup>2</sup> /сек | Thews, Hutten [14]                                                       |
| $D_g = 9.0 \cdot 10^{-6}$                                                  | см <sup>2</sup> /сек | Li [9]                                                                   |
| $b = 0.053$                                                                | час <sup>-1</sup>    | Landry et al. [15]                                                       |
| $p = 0.071$                                                                | час <sup>-1</sup>    | Определялись из наилучшего приближения                                   |
| $d = 0.05$                                                                 | час <sup>-1</sup>    | модели к экспериментальным данным                                        |
| $k_p = 0.86$                                                               | mM                   | Оценивались, используя данные Casciari, Sotirchos, Sutherland [10]       |
| $k_d = 3.3$                                                                | mM                   |                                                                          |
| $q_o = \begin{cases} 8.0 \cdot 10^{-17} \\ 1.7 \cdot 10^{-17} \end{cases}$ | Мол/(сек·клетку)     | Freyer, Sutherland [16]                                                  |
|                                                                            |                      | Определялись из наилучшего приближения модели к экспериментальным данным |
| $q_g = 1.6 \cdot 10^{-16}$                                                 | Мол/(сек·клетку)     | Freyer, Sutherland [16]                                                  |
| $m_o = 4.6 \cdot 10^{-3}$                                                  | mM                   | Casciari et al. [10]                                                     |
| $m_g = 0.15$                                                               | mM                   | Оценивались, используя экспериментальные данные                          |
| $v_o = 0.3$                                                                | mM                   | Freyer, Sutherland [16]                                                  |
| $v_g = 0.01$                                                               | mM                   |                                                                          |
| $w_o = 0.2$                                                                | mM                   | и Casciari et al. [10]                                                   |
| $w_g = 0.005$                                                              | mM                   |                                                                          |
| $g = 0.6$                                                                  |                      |                                                                          |
| $V_x = 5.0 \cdot 10^{-8}$                                                  | см <sup>3</sup>      | Freyer, Sutherland [12,5]                                                |
| $V_y = 3.0 \cdot 10^{-8}$                                                  | см <sup>3</sup>      | Freyer, Sutherland [16]                                                  |
| $V_z = 6.0 \cdot 10^{-8}$                                                  | см <sup>3</sup>      | Определялись из наилучшего приближения модели к экспериментальным данным |

Исследование модели и оценка ее параметров показали, что концентрация кислорода в центре сфероида как функция диаметра сфероида, предсказанная моделью, принципиально отличается от таковой, измеренной экспериментально. Скорость снижения уровня кислорода в центре сфероида в процессе его роста значительно выше по модельным оценкам, чем по экспериментальным

наблюдениям. Это расхождение предсказаний модели с экспериментальными данными в рамках модели полностью обусловлено высокой скоростью потребления кислорода (в расчете на одну клетку), т.е. параметром  $q_0$ , значение которого, равное  $8 \cdot 10^{-17}$  moles/sec, было взято нами из данных экспериментальных измерений [12]. Между тем, проведенный нами анализ показал, что значение этого параметра, обеспечивающее наилучшее приближение модели одновременно как к экспериментальным данным изменения концентрации кислорода в центре сфероидов (Рис.1(а)) так и к кривой роста сфероидов (Рис.1(б)), лежит в диапазоне  $1.4 \cdot 10^{-17} - 1.7 \cdot 10^{-17}$  moles/sec, т.е. более чем в 4 раза ниже экспериментально измеренного. Такая разница между экспериментально измеренными значениями параметра и модельными оценками может быть обусловлена, по крайней мере, двумя причинами. Во-первых, энергетика опухолевой клетки при плотной упаковке в пространственных агрегатах может изменяться, обуславливая снижение потребления кислорода клеткой (возможность такого механизма была экспериментально показана для некоторых линий опухолевых клеток). Во-вторых, высокая скорость потребления кислорода клеткой, измеренная экспериментально, может быть обусловлена увеличением кислотности внеклеточной среды за счет пассивной диффузии и активного транспорта ионов водорода из внутриклеточного пространства во внеклеточное (значительное уменьшение pH регистрировались и в опухолевой ткани и при росте многоклеточных опухолевых сфероидов). Взаимодействие ионов водорода с буферной системой внеклеточного пространства (в которую существенный вклад вносит кислород) с необходимостью должно оказывать влияние на уровень кислорода и на скорость его изменения во внеклеточной среде. Следует отметить, что оценка степени этого влияния требует проведения дополнительных как экспериментальных, так и теоретических исследований. Между тем есть основание считать, что реальная скорость потребления кислорода клеткой ниже тех показателей, которые получают из экспериментальных измерений. Принимая во внимание вышесказанное, для дальнейших исследований мы предположили, что эффективная скорость потребления кислорода одной клеткой равна модельной оценке, т.е.  $q_0 = 1.7 \cdot 10^{-17}$  moles/sec.

Как указывалось ранее, рост многоклеточных опухолевых сфероидов сопровождается возникновением неоднородных в пространстве распределений клеток, отличающихся пролиферативной активностью (возникновение пролиферативных градиентов). На Рис.2 представлено пространственное распределение плотностей делящихся и покоящихся клеток в EMT6/Ro сфероидах с различными диаметрами, полученные с помощью математической модели. Видно, что изменения пролиферативного градиента в процессе роста сфероидов (при нормальных условиях инкубации) носит монотонный характер и находится в четкой взаимосвязи с изменениями градиента концентрации кислорода (Рис.4).

Известно, что условия инкубации сфероидов могут существенным образом влиять на кинетику роста и пролиферативную гетерогенность МОС. Именно этим фактом объясняются многочисленные экспериментальные (и клинические) попытки изменять темпы роста опухоли и/или ее клеточные пролиферативные градиенты модифицируя уровни кислорода и глюкозы в ней. Построенная нами математическая модель является удобным инструментом для таких исследований.

Для иллюстрации этого мы проанализировали кинетику роста и пролиферативную гетерогенность EMT6/Ro сфероидов при инкубации в среде, содержащей 1.7 mM и 16.5 mM глюкозы. На рис.3 видно, что трехкратное (по сравнению с 5.5 mM) уменьшение концентрации глюкозы в среде инкубации

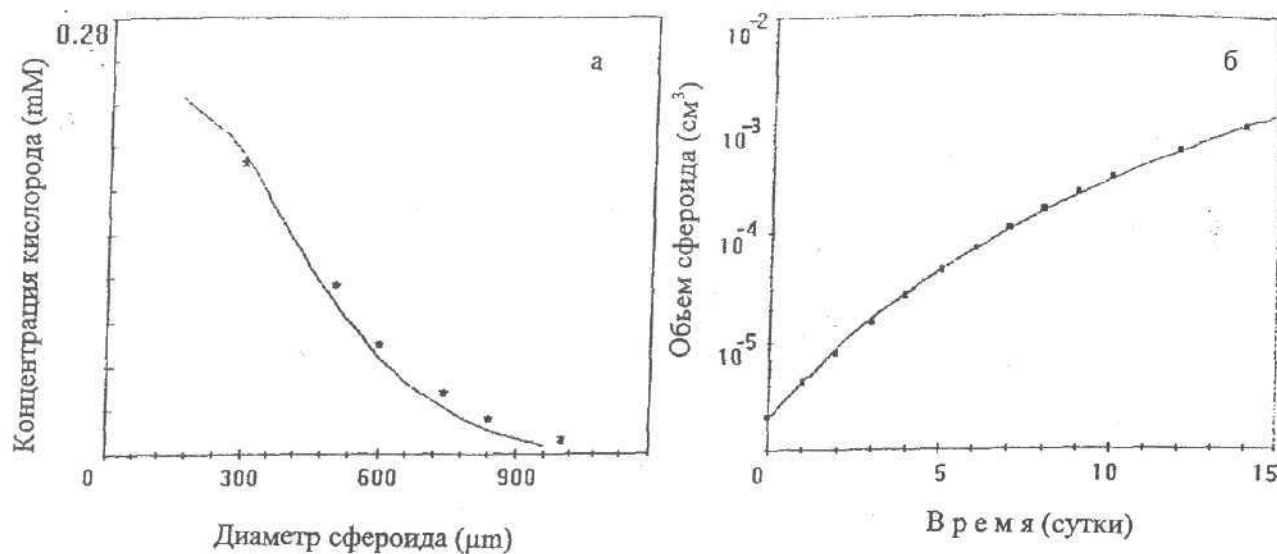


Рис.1. Динамика изменения концентрации кислорода в центре EMT6/Ro сфероида (а) и кинетика его роста (б) в среде, содержащей 0.28 mM кислорода и 5.5 mM глюкозы. Точки – экспериментальные данные, линии – наилучшее приближение математической модели к экспериментальным данным.

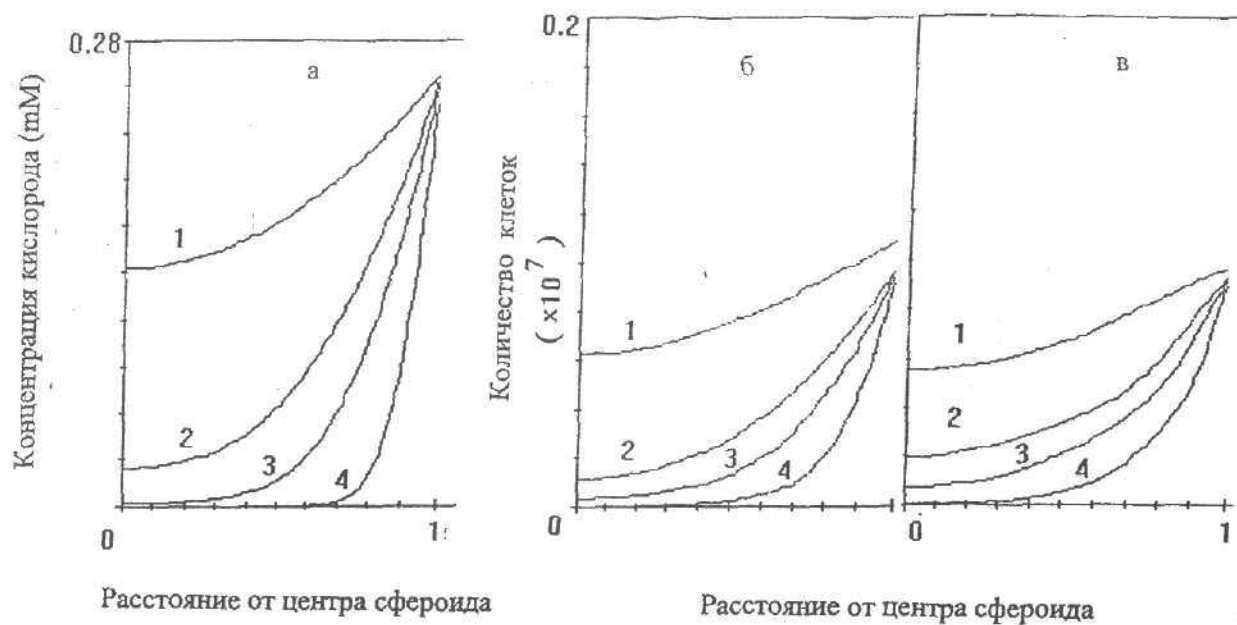


Рис.2. Радиальное распределение кислорода (а) и плотностей делящихся (б) и покоящихся (в) клеток в EMT6/Ro сфероидах с диаметром 300 μm (1), 600 μm (2), 800 μm (3), 1500 μm (4) при уровне глюкозы в среде 5.5 mM (предсказания модели).

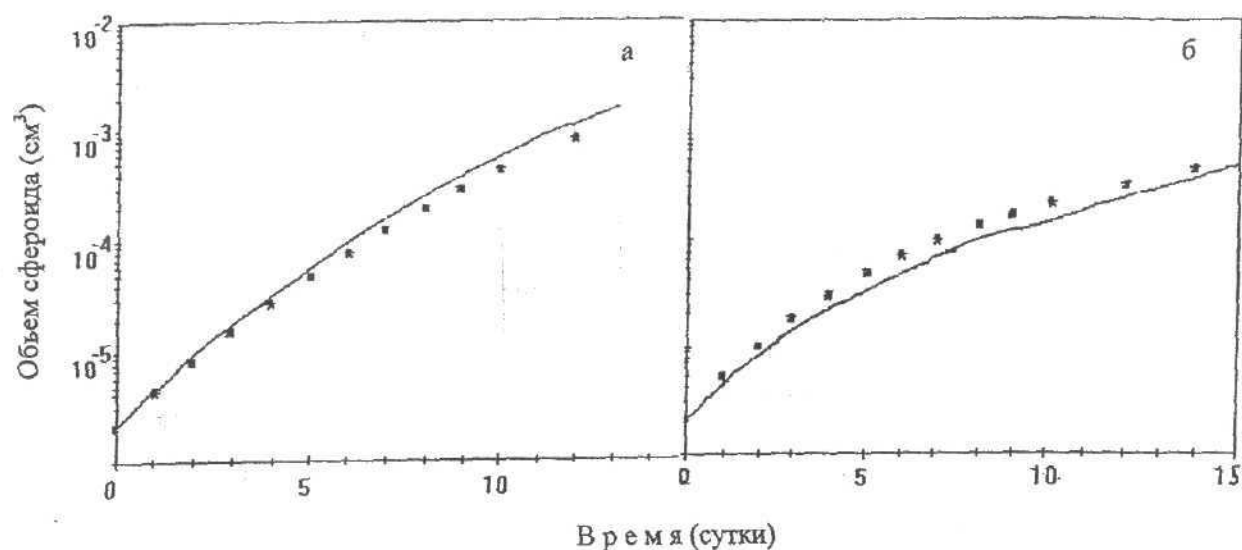


Рис.3. Кинетика роста EMT6/Ro сфероидов в среде, содержащей 16.5 мМ (а) и 1.7 мМ (б) глюкозы. Линии – предсказания модели, точки – экспериментальные данные (в работе использованы экспериментальные данные из [12]).

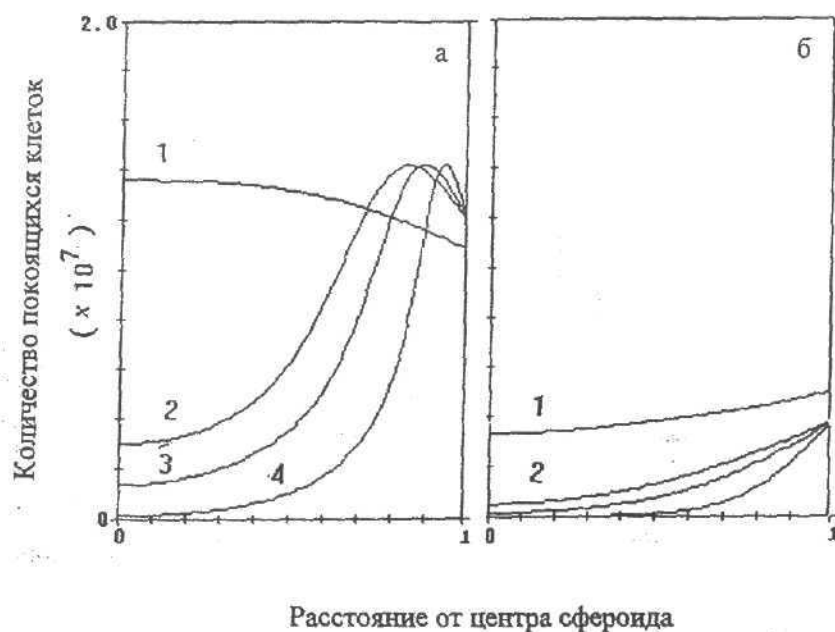


Рис.4. Радиальное распределение количества покоящихся (непролиферирующих) клеток в единице объема EMT6/Ro сфероидов при уровне глюкозы в среде 16.5 мМ (а) и 1.7 мМ (б) (предсказания модели). Диаметр сpheroидов: 300 мкм (1), 600 мкм (2), 800 мкм (3), 1500 мкм (4).

приводит к ожидаемому замедлению роста сфероида, а трехкратное увеличение уровня глюкозы обуславливает их более быстрый рост (отметим, что предсказания модели кинетики роста достаточно хорошо совпадают с данными экспериментальных исследований).

Интересным результатом исследования является предсказанное моделью (рис.4) увеличение пула покоящихся клеток при высоком уровне глюкозы. 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 и порой до сих пор проводится в клиниках). 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 эти выводы модели имеют свое экспериментальное подтверждение [13].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tong J.Z., Sarrazin S., Cassio D., Gauthier F., Alvarez F. // *Biol.of Cell*. 1994. 81. 77 с.
2. Groebe K., Muller-Klieser W. // *Int.J.Radiat.Oncol.,Biol.,Physics*. 1996. V.34. P.395.
3. Gorlach A., Bolling B., Holtermann G., Schwachofer J., Carlsson J., Acker H. // *Int.J.Oncol*. 1995.V.7.P.831.
4. Franko A.J., Koch C.J., Boisvert P.J. // *Cancer Res*. 1992. V.25.P. 3831.
5. Freyer J.P., Sutherland R.M. // *Cancer Res*. 1986. V.46.P. 3513.
6. Steeg P.S., Alley M.C., Grever M.R. // *J.of the Nat.Cancer Inst*. 1994. V.86.P. 953.
7. Freitas I. & Baronzio G.F. // *Anticancer Res*. 1994. V.14.P. 1097-1102.
8. Weibull W., Sweden S. // *J. Appl. Mech*. 1951 .V. 18. P.293-297.
9. Li C.K.N. // *Cancer*. 1982. V.50. P. 2066-2073.
10. Casciari J.J., Sotirchos S.V., Sutherland R.M.// *Cell Prolif*.1992.V.25.P. 1 -22.
11. Solyanik G., Berezetskaya N., Bulkiewicz R., Kulik G. // *Cell Prolif*. 1995. V.28. P. 263 -278.
12. Freyer J.P., Sutherland R.M. // *Cancer Res*. 1986. V.46. P. 3504.
13. Hlatky L., Sachs R.K., Ring C.S. // *Br.J.Cancer* .1989. V.59. P. 375-380.
14. Thews G., Hutten H. Biophysics of respiratory gas transport. In: *Biophysics*. W.Hoppe, H.Lohmann, H.Markl, H.Ziegler, eds. Springer-Verlag, Berlin. 1983.P. 503.
15. Landry J., Freyer J.P., Sutherland R.M. // *Cell Tissue Kin*. 1982.V.15.P. 585.
16. Freyer J.P., Sutherland R.M. // *J.Cell Physiol*. 1985. V.154. P. 516.



## БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 577.3:3.916

**ПРИМЕНЕНИЕ КВАЗИПОЛИНОМОВ В ВЕРОЯТНОСТНЫХ МОДЕЛЯХ ФАРМАКОКИНЕТИКИ.****Е.Б. Радзишевская, В.Г. Книгавко***ХНИИМР, 310024, г.Харьков, ул.Пушкинская, 82  
25 мая 1998г.*

В работе в рамках вероятностного моделирования построена структурно-функциональная фармакокинетическая модель. Предложен новый подход к выбору аналитического выражения для плотности вероятности непрерывных случайных величин, графиком которых является одномодальная кривая, определенная на положительной полуоси, обращающаяся в ноль на бесконечности и в нуле. Рассматривается модель системы, состоящей из нескольких последовательных блоков; входом каждого последующего блока является выход предыдущего.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** математическая модель, вероятностное моделирование, фармакокинетика, плотность вероятности, квазиполиномы.

В зависимости от типа и класса математического аппарата, позволяющего формализовано описать процессы фармакокинетики в изучаемой биофизической системе математические модели разделяются на два основных класса: детерминированные и вероятностные. Среди существующих детерминированных моделей доминируют три основные группы: камерные, циркуляционные и модели с распределенными параметрами [1]. В камерных моделях кинетика транспорта чаще всего описывается системой линейных однородных дифференциальных уравнений первого порядка. Применяемые циркуляционные модели основываются на интегральном уравнении Стефенсона и на уравнении диффузии. Модели, основанные на уравнении неразрывности струи, принадлежат к классу детерминированных моделей с распределенными параметрами.

В последнее время уделяется большое внимание разработке стохастических моделей, в которых транспорт рассматривается как вероятностный процесс [2]. На связь экспериментальных данных с характеристиками распределения времен транзита указывалось еще в работах Zierler [3].

Предлагаемая модель разработана с применением вероятностных подходов. Используются экспериментальные данные транспорта радиоактивного индикатора через изучаемую систему с неинвазивной *in vivo* регистрацией наружным детектором.

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ**

Пусть  $t_b$  - случайная величина «время транзита индикатора от точки введения до входа в тест-камеру (ТК)»;  $t_o$  - случайная величина «время транзита индикатора от точки введения до выхода из ТК»;  $t_i$  - случайная величина «время нахождения индикатора в ТК». Обозначим соответствующие распределения вероятностей через  $F_b$ .

$F_o, F_i$ , а функции плотности вероятности —  $f_b, f_o, f_i$ . Учитывая, что рассматриваемые случайные величины являются независимыми, справедливо следующее равенство:

$$f_o(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f_b(\theta) f_i(t - \theta) d\theta. \quad (1)$$

Т.к.  $f_b(\theta) = 0$  при  $\theta \leq 0$ , и  $f_i(t) = 0$  при  $t \leq 0$ , то

$$f_o(t) = \int_0^t f_b(\theta) f_i(t - \theta) d\theta, \text{ т.е.} \quad (2)$$

$$f_o(t) = f_b(t) * f_i = \int_0^t f_b(\theta) f_i(t - \theta) d\theta \quad (3)$$

Пусть  $R(t)$  — скорость счета потока гамма-излучения, регистрируемая над ТК в момент времени  $t$ , а  $a(t)$  — активность, находящаяся в этот же момент времени в ТК. Очевидно, что  $R(t) \sim a(t)$ . Обозначим коэффициент пропорциональности через  $k$ :

$$R(t) = ka(t). \quad (4)$$

Активность, находящаяся в данный момент времени  $t$  в ТК равна:

$$a(t) = a_b(t) - a_o(t), \quad (5)$$

где  $a_b(t)$  — активность, вошедшая в ТК к моменту времени  $t$ , а  $a_o(t)$  — активность, вышедшая из ТК к этому моменту.

Пусть  $A$  — полная введенная активность. Тогда

$$a_b(t) = AF_b(t), \quad a_o(t) = AF_o(t) \quad (6)$$

и, следовательно,

$$R(t) = kA(F_b(t) - F_o(t)). \quad (7)$$

С учетом взаимосвязи функции распределения и функции плотности вероятности случайной величины имеем:

$$R(t) = kA(F_b(t) - F_o(t)) = kA \left[ \int_0^t f_b(\theta) d\theta - \int_0^t f_o(\theta) d\theta \right] = kA \int_0^t f_b(\theta) g_i(t - \theta) d\theta, \quad (8)$$

где  $g_i$  — импульсная функция тест — камеры:

$$g_i = 1 - F_i(t) = 1 - \int_0^t f_i(\theta) d\theta. \quad (9)$$

Иными словами,

$$R(t) = kA f_b * f_i. \quad (10)$$

Из приведенного равенства (8) следует вывод, что экспериментальные данные, зафиксированные над ТК содержат информацию о самой ТК и обо всем предшествующем пути транспорта. Для извлечения информации непосредственно об ТК необходимо решить уравнение (8). Уравнения такого вида относятся к т.н. уравнениям Вольтерра 1 рода и являются задачей, некорректной по Адамару. В связи с этим применение операции деконволюции не всегда обеспечивает достаточную устойчивость решения. Учитывая вышеизложенное, предлагается метод аналитической аппроксимации функции распределения.

### Квазиполиномиальная аппроксимация плотности вероятности

Примерный внешний вид функции плотности распределения оценивается из физиологических соображений: положительная область определения (т.к. аргумент — время), единственный локальный максимум, обращение в ноль на бесконечности и в нуле. В дальнейшем будем называть класс таких функций *унимодалными функциями*.

ми (УМФ). Большой класс УМФ дают функции вида:

$$f(t) = \Theta(t) \cdot P(t) \cdot \exp(-\lambda t), \quad (11)$$

где  $\lambda > 0$ ,  $P(t)$  - многочлен, обладающий свойствами:  $P(t) \geq 0$ ,  $P(0) = 0$ ,  $\Theta(t)$  - тэта-функция Хевисайда:  $\Theta(t) = 0$ ,  $t < 0$ ;  $\Theta(t) = 1$ ,  $t \geq 0$ .

Функции вида (11) нами выбраны из следующих соображений:

-функции предлагаемого класса экспоненциально быстро убывают при достаточно больших значениях времени;

-любая непрерывная функция по теореме Вейерштрасса может быть приближена многочленом с любой степенью точности.

Введем в рассмотрение  $\lambda$ -квазимногочлен  $P(t)$  степени  $M$ :

$$P(t) = \sum_{k=0}^M p_k t^k \exp(-\lambda t). \quad (12)$$

Назовем  $P(t)$  выделенным  $\lambda$ -квазимногочленом, если

$$p_0 = 0, p_k \geq 0, k = 1 \div M.$$

Сузим класс УМФ и ищем решения среди функций вида:

$$f(t) = \Theta(t) \sum_{k=1}^N p_k t^k \exp(-\lambda t), \quad (13)$$

которые в дальнейшем будем называть базовыми унимодальными функциями, а функцию  $\Theta(t) \cdot P(t)$  - срезанным  $\lambda$ -квазимногочленом (СКМ).

Легко показать, что операция свертки над двумя СКМ оставляет результат в классе СКМ. При этом степень результата равна <сумма степеней СКМ, участвующих в свертке, + 1>

В работе [4] доказано:

-для существования единственного локального максимума функции (13) достаточно выполнение условия:  $P''(t) \cdot P(t) < [P'(t)]^2$ , для всех положительных  $t$ ;

-параметр СКМ  $\lambda$  представляет собой величину, обратную "времени жизни процесса," либо больше в 4-6-8 раз;

-если  $M = 1, 2, 3$  и  $P(t) = p_1(t) + \dots + p_M(t)$ , где  $p_1, \dots, p_M \geq 0$ , то  $f(t) = \Theta(t) \cdot P(t) \cdot \exp(-\lambda t)$  - базовая функция. Если же  $M \geq 4$ , то существуют  $\lambda$ -квазимногочлены с положительными коэффициентами, которые не являются базовыми функциями. В связи с этим будем искать решения среди многочленов степени не выше 3-х.

### Транспорт через последовательную систему камер

Задача решается в рамках построения структурно-функциональной фармакокинетической модели системы, которая удовлетворяет следующим требованиям:

-система распадается на очевидные с точки зрения физиологии структурные подсистемы - ТК<sub>j</sub>, ( $j = 1 \div K$ )- с функцией распределения  $\Phi_j$ , функцией плотности вероятности  $f_j$ ; импульсной функцией  $g_j$ , регистрируемой скоростью счета  $R_j(t)$ ;

-входная функция плотности вероятности ( $\varphi_j$ ) каждой ТК<sub>j</sub> (кроме первой) является выходной функцией распределения предыдущей ТК<sub>j-1</sub>.

-введение индикатора в первую ТК системы считаем импульсным.

С учетом (3) выходная функция плотности вероятности каждой ТК ( $\psi_j$ ) может быть записана в виде:

$$\psi_j = \varphi_j * f_j. \quad (14)$$

Мгновенность ввода в первую ТК означает следующее:

$$\Phi_1(t) = A\delta(t), \quad (15)$$

где  $A$  - величина введенной активности, а  $\delta(t)$  - дельта - функция Дирака:

$$\delta(t) = 0, t \neq 0; \delta(t) = \infty, t = 0; \int_{-\infty}^{\infty} \delta(t) dt = 1.$$

В этом случае выходная функция плотности распределения имеет вид:

$$\Psi_1(t) = A \int_0^{\infty} \delta(t) f_1(t - \tau) d\tau = A f_1(t), \quad (16)$$

где  $\Psi_1(t)$  - выходная функция распределения.

Таким образом, решая для каждой из ТК<sub>i</sub> уравнение (10):

$$R_j(t) = kA \varphi_j * g_j,$$

где  $R_j(t)$  и  $\varphi_j$  - заданные  $\lambda$ -квазимногочлены, мы ищем такую базовую функцию  $f_j$ , что:

$$1 - g_j(t) = \int_0^t f_j(\tau) d\tau.$$

Функция  $g_j(t)$  должна удовлетворять уравнению (10). Как мы отмечали ранее, это уравнение является уравнением Volterra 1 рода и, как правило, не может быть решено точно. В связи с этим мы заменяем условие того, что  $g_j(t)$  удовлетворяет уравнению (10) на условие, что  $g_j(t)$ , при подстановке в уравнение минимизирует возникающую невязку:

$$kA \varphi_j * g_j - R_j(t) \rightarrow \min. \quad (17)$$

Остается решить вопрос, что из себя представляет выходная функция органа  $\psi_j$ ? Приведенные выше рассуждения позволяют считать, (см. (14)), что это -  $\lambda$ -квазимногочлен степени  $3+3+1=7$ . Иными словами, если  $\varphi_j$  и  $f_j$  -  $\lambda$ -квазимногочлены степени 3, то выходная функция ТК<sub>j</sub> - это явно выписываемая функция.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Неустойчивость уравнения (10) на функцию  $g$  проявляется в том, что в случае точного аналитического решения для последовательности ТК степень  $\lambda$ -квазимногочлена стала бы быстро расти от уравнения к уравнению, т.е. вскоре стала бы больше 3 и условие унимодальности уже не было бы очевидно.

2. Аппроксимация функции плотности распределения при помощи  $\lambda$ -квазимногочленов является универсальной для функций, графиком которых является одномодальная кривая, определенная на множестве  $R^+$ , обращающаяся в ноль на бесконечности и в нуле.

3. Представление функции плотности распределения в виде квазимногочленов значительно упрощает процедуру нахождения числовых характеристик распределения.

Практическая апробация предложенного подхода проведена применительно к функциональной радионуклидной диагностике - области медицины, исследующей состояние органов и систем организма путем введения в кровь меченых радионуклидами веществ. В рамках построенной модели доказана возможность применения числовых характеристик распределения в качестве диагностически информативных параметров.

## ВЫВОДЫ

Предложенная математическая модель позволяет методами вероятностного моделирования описать фармакокинетику для системы, состоящей из нескольких последовательных структурных единиц. Предложенное аналитическое выражение для аппроксимации плотности вероятности распределения непрерывной случайной величины может быть использовано безотносительно к предложенной модели.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьев В.Н. и др. Фармакокинетика. М. Медицина, 1980. 423 с.
2. Наркевич Б.Я. Современное состояние и перспективы развития математического моделирования в функциональной радионуклидной диагностике. Тез. докл. научн. конф. М. 1993. С.17-19
3. Zierler K.L. //Circul. Res. 1965. N 4. P.309-321
4. Радзішевська Є.Б. // УРЖ. 1997. Т.5. С.371-374



УДК 577.34

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

## ВЛИЯНИЕ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ИОН-ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКИ ДНК

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

*Институт радиопизики и электроники НАН Украины,  
ул. Академика Проскуры 12, Харьков 310085*

Поступила в редакцию 5 мая 1998 года.

Исследовано влияние  $\gamma$ -облучения на состояние ион-гидратной оболочки ДНК. С помощью дифференциального диэлектromетрического метода (длина волны 7,6 мм) изучены изменения комплексной диэлектрической проницаемости водных растворов ДНК при облучении в дозах 19, 370 и 1650 Гр. Состояние ДНК контролировалось методами кондуктометрии и электрофореза. Найденные заметные изменения гидратации ДНК при дозах радиации 370 и 1650 Гр. Показано, что обнаруженные эффекты можно объяснить нарушениями структуры водного хребта, происходящими при перестройках двойной спирали, которые возникли вследствие радиационных повреждений дезоксирибозила, а так же появлением в составе ДНК радиационно-модифицированных оснований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ДНК, КВЧ-диэлектromетрия, электрофорез, гидратация  $\gamma$ -облучение

За последние годы характер нарушений первичной структуры ДНК, возникших под влиянием  $\gamma$ -радиации выяснен достаточно детально [1,2]. В то же время сведения об изменениях во взаимодействии макромолекулы с водным растворителем отсутствуют, хотя именно такое взаимодействие является важнейшим фактором, стабилизирующим конформацию ДНК [3].

Разрушение гидратного монослоя вокруг функциональных групп фосфатов, оснований и сахаров ДНК может индуцировать изменения структуры макромолекулы. С другой стороны, изменения в степени гидратации влияют на условия возникновения того или иного типа агентов, повреждающих ДНК, а также на подвижность радиационно-индуцированных электронов в связанной воде [4]. Известно, что в слое, состоящем из наиболее прочно связанных молекул воды, образуются заряженные частицы ( $H_2O^+$ ,  $e_{свх}$ ), которые инициируют появление ион-радикалов оснований, а в слое более свободных молекул воды - радикалы  $OH^{\bullet}$ . Обнаружено также, что температура плавления ДНК уменьшается, а ширина термического перехода увеличивается с возрастанием гидратации при одной и той же дозе облучения [5]. Целью данной работы является получение сведений об изменениях в состоянии ион-гидратной оболочки ДНК, возникающих после  $\gamma$ -облучения при разных дозах.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали водные растворы ДНК из тимуса теленка (препарат фирмы "Serva", гиперхромизм 38%). Концентрация составляла 0,75% в случае

микроволновых измерений и 0,2 % в случае кондуктометрических. Ионная сила – 0,01 М NaCl, температура – 20°С. Облучение проводили на установке “Исследователь”  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  при мощности дозы 6 Гр/мин.

Изучали растворы, облученные в дозах 19, 370 и 1650 Гр. Степень радиационного воздействия контролировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 0,089 М трис-боратном буфере pH 8,2 с добавлением 0,003 М ЭДТА [6]. Длины пострadiационных фрагментов оценивали с помощью маркеров: ДНК фага  $\lambda$  (48540 пар оснований (п. о.)) и рестрикта ДНК фага  $\lambda$ -Hind III с фрагментами 23131, 9419, 6559, 4355, 2322, 2023 и 564 п. о.

Из рис. 1 следует, что макромолекулы исходной ДНК содержат 20-50 тыс. п. о., а облученные образцы – в основном фрагменты в интервалах 4-20 тыс. п. о. и 500-6000 п. о. (радиационные дозы 19 и 370 Гр соответственно).

Степень гидратации находили, как и ранее [7], по комплексной диэлектрической проницаемости  $\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon''$  в КВЧ диапазоне (длина волны 7,6 мм) и по электропроводности  $\sigma$  (частота 10 кГц). Так как в области миллиметровых длин волн молекулы свободной воды имеют полосу поглощения, а нуклеиновые кислоты не активны [8], то изменения  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  характеризуют только изменения количества молекул воды, прочно связанной с ДНК и не поглощающей в микроволновом диапазоне. КВЧ измерения выполняли с помощью дифференциального диэлектromетрического метода с использованием в качестве эталона необлученных растворов ДНК. Значения электропроводности определяли мостом переменного тока Р567 в ячейке с платиновыми электродами [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в табл. 1. Величины  $\Delta\epsilon'$  и  $\Delta\epsilon''$  являются разностями соответствующих компонент комплексных диэлектрических проницаемостей изучаемого и контрольного растворов. Значения  $\epsilon'$  и  $\epsilon''$  раствора нативной ДНК соответственно равны 17 и 28, а электропроводность раствора 0,01 М NaCl составляет  $1,01 \cdot 10^{-3} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Радиационное воздействие в 19 Гр практически не влияет на исследуемые параметры, а при 370 и 1650 Гр вызывает небольшие, но четко констатируемые изменения диэлектрических свойств.

Из табл. 1 видно, что лишь при облучении в дозе 1650 Гр наблюдается достоверное увеличение проводимости, которое при расчете гидратации учитывали в виде дополнительного вклада в  $\Delta\epsilon''$  [7]. Рост электропроводности обусловливается переходом части противоионов  $\text{Na}^+$  с макромолекулы в раствор при образовании одиночных разрывов (ОР) в ДНК. Учитывая известные значения коэффициентов электропроводности, можно легко показать, что в условиях данной работы (концентрация ДНК и ионная сила) наблюдаемому значению  $\Delta\sigma$  отвечает увеличение доли диссоциированных ионов натрия с 0,57 до 0,65 на нуклеотид при дозе 1650 Гр. Отсюда также следует, что средняя длина образовавшихся фрагментов равна нескольким сотням п.о. (при предположении, что на один ОР приходится 8,5 диссоциированных ионов [9], а число двойных разрывов есть функция числа одиночных [1]), что близко к данным электрофореза.

Количество молекул связанной воды на нуклеотид  $n$  уменьшается на 4 (~20%) для ДНК, облученной в дозе 370 Гр, по сравнению со степенью гидратации нативной ДНК, определенной диэлектromетрическим методом в 19 молекул воды на нуклеотид [10].

Этот эффект обусловлен, очевидно, нарушениями структуры водного хребта, происходящими вследствие радиационной модификации нативной конформации

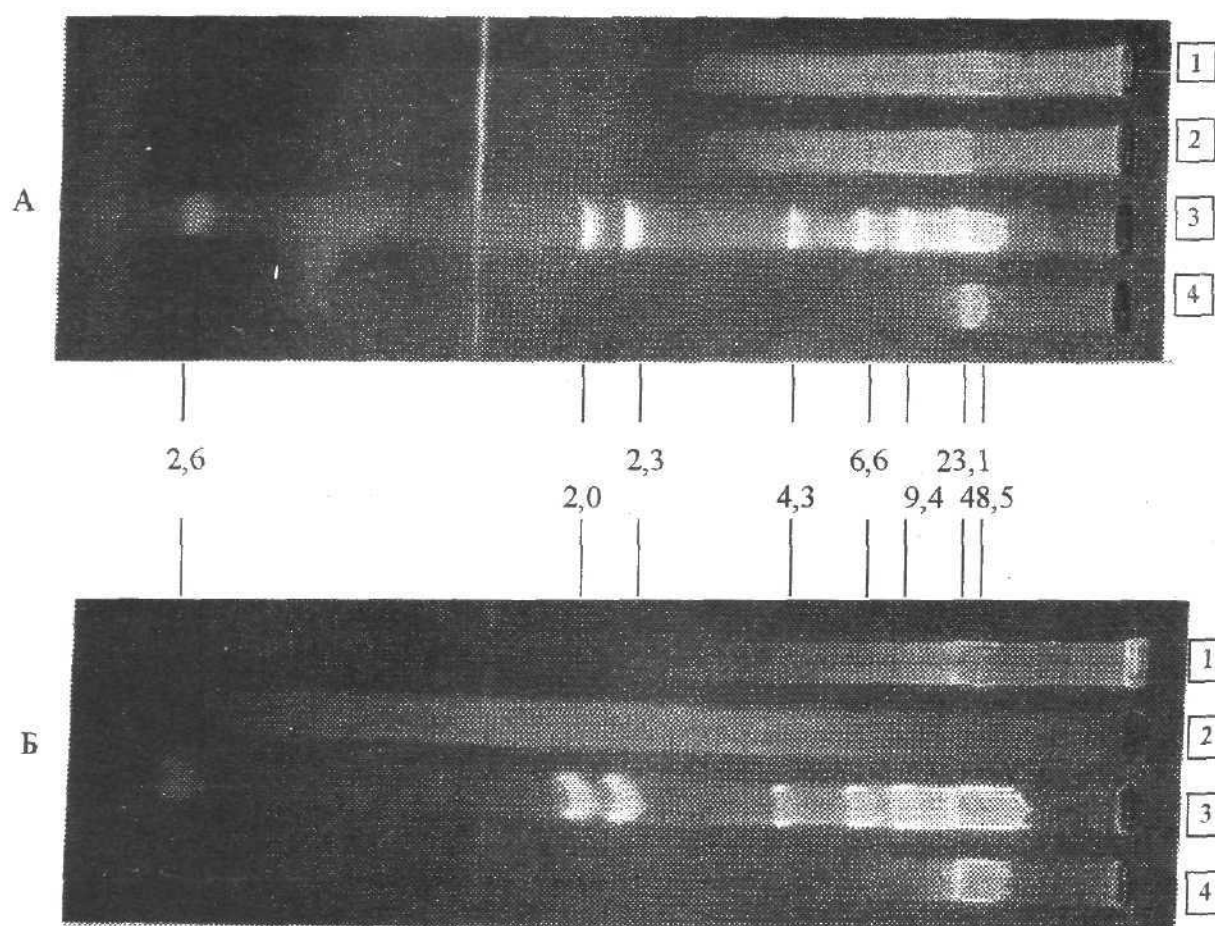


Рисунок 1. Электрофореграммы исследуемых образцов, облученных в дозах 19 Гр (А) и 370 Гр (Б): 1 – контрольный раствор ДНК; 2 – облученный раствор ДНК; 3 – рестрикт ДНК фага  $\lambda$ -Hind III; 4 – ДНК фага  $\lambda$ . Цифрами обозначен размер фрагментов маркерной ДНК в тысячах пар оснований ДНК.

Таблица 1. Диэлектрические и гидратационные свойства  $\gamma$ -облученной ДНК.

| Измеряемые параметры                                          | Контроль-<br>ный<br>раствор<br>ДНК | Растворы ДНК, облученные<br>дозах (Гр) |      |      |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|------|------|
|                                                               |                                    | 19                                     | 370  | 1650 |
| $\Delta\epsilon'(\pm 0,01)$                                   | 0,00                               | 0,01                                   | 0,03 | 0,04 |
| $\Delta\epsilon''(\pm 0,01)$                                  | 0,00                               | 0,00                                   | 0,07 | 0,05 |
| $\sigma(\pm 0,01) \times 10^3, \text{Ом}^{-1} \text{см}^{-3}$ | 1,15                               | 1,15                                   | 1,14 | 1,17 |
| $n(\pm 1)$ , мол. воды/нукл.                                  | 19                                 | 19                                     | 15   | (18) |

ДНК. Особо важную роль играют искажения параметров двойной спирали, возникающие при радиационном поражении дезоксирибозила.

В настоящее время выяснено, что в результате  $\gamma$ -облучения в сахарном фрагменте происходят такие процессы, как расщепление связей  $H-C_n'$ , возникновение радикалов  $\dot{C}_n'$ , появление эпимеров дезоксирибозила, в том числе в конформации подобной  $C_3'$ -эндо в гуаниновом нуклеотиде в Z-ДНК [2, 11]. В случае таких превращений угол между N-гликозидной связью и направлением ее первоначальной ориентации достигает  $80-100^\circ$ , что существенно сказывается на расположении основания в пространстве. Структура гидратной оболочки ДНК [3], очевидно, также должна заметно измениться. В главном желобке нарушатся условия формирования водных мостиков между метильной группой тимина и  $5'$ -фосфатами тех же нуклеотидов, а также мостиков между атомами кислорода фосфатов цепи (на атом кислорода приходится до 5 молекул воды). Кроме того, нарушатся условия образования бидентатных мостиков между атомами азота и кислорода двух соседних пар оснований. В минорном желобке изменение ориентации оснований разрушит водные мостики между  $O_2$ -атомами тимина и  $N_3$ -атомами аденина. Изменится состояние и тех молекул гидратного хребта, которые примыкают к дефектным участкам остова или гидратного хребта.

Таким образом, гидратация ДНК при облучении должна уменьшиться. Следует отметить, что в случае чередующегося сополимера поли(дГ-дЦ)-поли(дГ-дЦ), в котором происходят такого же типа искажения ориентации компонент по сравнению с их ориентациями в В-ДНК (так расстояния между соседними атомами кислорода фосфатов уменьшаются с  $8-9 \text{ \AA}$  до  $4.4-5.2 \text{ \AA}$ ) количество связанной воды уменьшается с 19 молекул на нуклеотид до 9 для сополимера [10].

Об искажении нативной конформации ДНК свидетельствует также появление большого числа радиационных разрывов водородных связей – до 10% при 370 Гр, как это следует из опубликованных данных [1, 12].

При облучении в дозе 1650 Гр положительная величина  $\Delta\varepsilon'$  и  $\Delta\varepsilon''$  также указывает на дегидратацию. Однако в этом случае эффект меньше, что можно объяснить преобладающим влиянием на гидратацию возникновения при больших дозах облучения новых гидратно-активных центров, которые появляются вследствие радиационной модификации канонических оснований. Для дозы 1650 Гр количество гидроксилпроизводных пуриновых и пиримидиновых оснований составляет до 10% от общего числа оснований (согласно результатам работ [13, 14]). Для этих соединений характерно наличие гидроксильных групп ОН и других гидрофильных центров, активно связывающих молекулы воды. Однако точное определение числа  $P$  затруднено в этом случае, так как при большей дозе в растворе появляются низкомолекулярные компоненты ДНК. Так, количество освобожденных оснований для 424 Гр составляет 0,2% от их общего числа, но быстро увеличивается с дозой [15].

## ВЫВОДЫ

Радиационное воздействие вызывает искажение пространственной структуры ДНК, а при больших дозах и модификацию компонент, что обуславливает разрушение водного хребта макромолекулы. Дегидратация может усиливать первичные радиационные дефекты структуры ДНК, особенно в условиях сильного межмолекулярного взаимодействия в клетке (например, способствовать



образованию нековалентных сшивок). Уменьшение величины гидратной оболочки создает также условия для появления дополнительных ОН-радикалов, которые возникают в свободной воде и гораздо сильнее разрушают структуру ДНК, чем частицы, образующиеся в слое связанной воды [4].

Авторы благодарят О. Т. Николова за помощь при облучении ДНК.

Авторы благодарят Государственный фонд фундаментальных исследований Украины за финансовую поддержку этой работы (грант N 2.4/764)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябченко Н.И. Радиация и ДНК. М. Атомиздат, 1979. 192с.
2. Шарпатый В.А. // Радиобиология. 1992. Т.32. С.180-193.
3. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М. Мир, 1987. 584с.
4. Swarts S.G., Sevilla M.D., Becker D., Tokar C.J., Wheeler K.T. // Radiat. Res. 1992. V.129. P.333-344.
5. Pankowski E. // Studia biophys. 1988. V.128. P.27-36.
6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М. Наука, 1981. 286с.
7. Кашпур В.А., Малеев В.Я., Щеголева Т.Ю. // Мол. биол. 1976. Т.10. С.568-575.
8. Maleev V.Ya., Kashpur V.A., Glibitsky G.M., Krasnitskaya A.A., Veretelnik Ye.V. // Biopolymers. 1987. V.26. P.1965-1970.
9. Adinarayana M., Bothe E., Schulte-Frohlinde D. // Int. J. Radiat. Biol. 1988. V.54. P.723-733.
10. Umehara T., Kuwabara S., Mashimo S., Yagihara S. // Biopolymers. 1990. V.30. P.649-656.
11. Trumbore C.N., Myers Y.N., Hyde C.K., Hudson R.D., Rhodes C.N., Masselink J.K. // Int. J. Radiat. Biol. 1994. V. 66. P.479-483.
12. Collins B., Okada S., Scholes G., Weiss J.J., Wheeler C.M. // Radiat. Res. 1965. V. 25. P.526-536.
13. Fuciarelli A.F., Wegher B.J., Blakely W.F., Dizdaroglu M. // Int. J. Radiat. Biol. 1990. V.58. P.397 - 415.
14. Dizdaroglu M. // Int. J. Radiat. Biol. 1992. V. 62. P.175-183.
15. Henle E.S., Roots R., Holley W.R., Chatterjee A. // Radiat. Res. 1995. V.143. P.144-150.



УДК 577.3

## ВПЛИВ $\gamma$ -РАДІАЦІЇ НА СТРУКТУРНИЙ СТАН ДНК, ЩО БУЛА ОПРОМІНЕНА ПРИ РІЗНИХ СТУПЕНЯХ ВОЛОГОСТІ

А.А. Красницька, А.І. Гасан, К.М. Вірник

*Інститут радіофізики і електроніки Національної академії наук України, 310085,*

*Харків-85, вул. акад. Проскури, 12*

*Надійшла до редакції 20 травня 1998 р.*

Методами гель-електрофорезу та УФ-спектрофотометрії виконані дослідження впливу  $\gamma$ -опромінення на НаДНК з тимусу теляти при різних ступенях відносної вологості (В.В.). Показано, що зразки опроміненої ДНК відрізняються від контролю за розподілом молекулярних мас (М.м.) за рахунок часткової фрагментації молекул ДНК. При цьому ступінь фрагментації залежить від В.В. зразка в момент опромінення. Найбільша деградація ДНК спостерігається при мінімальній (0%) та максимальній В.В. (90%), а найменша – в інтервалі В.В. 56-64%. Дані УФ-спектрофотометрії свідчать про те, що із збільшенням В.В. зразків ДНК при опроміненні заданою дозою спостерігається зміщення температури плавлення ДНК у бік її збільшення. Зроблено висновок, що основними центрами впливу  $\gamma$ -радіації на ДНК є дієфірні зв'язки між АТ-парами.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА :**  $\gamma$ -опромінення, ДНК, вологі зразки

Механізми впливу іонізуючої радіації на біополімери, зокрема на ДНК, досліджувалися на протязі багатьох років [1-5], проте ця проблема не тільки не втратила своєї актуальності, але, навпаки, продовжує викликати великий інтерес і в теперешній час [6-10]. Згідно з сучасними уявленнями радіаційні пошкодження ДНК можуть бути викликані як шляхом безпосереднього впливу іонізуючої радіації на макромолекулу, так і непрямо – через продукти радіолізу води (вільні радикали та перекіси). Є дані, що у випадку “сухої” ДНК ефективність  $\gamma$ -радіації, яка визначається за числом одониткових розривів в ділянках ДНК певної довжини, суттєво менша (майже на три порядки) ніж у водному розчині ДНК [1]. Така істотна різниця у радіаційній стійкості між “сухим” препаратом та водним розчином ДНК свідчить про значну роль води в утворенні радіаційних дефектів ДНК. Показано також, що при заморожуванні розчину ДНК до  $-78^{\circ}\text{C}$  ефективність радіаційної деградації зменшується приблизно на два порядки, тобто для виявлення впливу радіації велике значення має стан води, яка оточує молекулу ДНК. З іншого боку, в експериментах *in vivo* спостерігається зниження радіаційної чутливості ДНК до рівня, що відповідає випадку “сухого” препарату ДНК. Дослідження захисної дії “перехоплювачів” вільних радикалів води показали, що основну роль у пошкодженні ДНК непрямым способом грає, видимо, радикал  $\text{OH}^{\bullet}$  [1, 7, 9]. Можна припустити, що *in vivo* існує ефективний механізм перехоплювання вільних радикалів типу  $\text{OH}^{\bullet}$  і “поверхні” ДНК досягають тільки ті вільні радикали, які знаходяться у безпосередній близькості до макромолекули (за приблизною оцінкою довжина вільного пробігу радикалів складає 10-20 Å) [1].

Всі ці експериментальні спостереження свідчать про те, що основним фактором у механізмі утворення радіаційних дефектів ДНК за рахунок вільних радикалів води є стан гідратної оболонки, який визначає конформацію макромолекули. Проте конкретні механізми такої ролі води на різних рівнях гідратації ДНК ще нез'ясовані. Тому представляє інтерес дослідження ефектів впливу  $\gamma$ -радіації на систему ДНК-вода з різним вмістом води в інтервалі вологостей, що забезпечує всі стадії переходу від "сухого" препарату ДНК до стану набухлої плівки або щільного гелю, коли повністю сформована вторинна структура ДНК та її гідратної оболонки (стан є близьким до нативного). Дані про фізичні властивості такої системи (структура, енергетичні, механічні, електричні та інші характеристики) свідчать про наявність своєрідних залежностей цих властивостей від вмісту води в ДНК [11].

В цьому дослідженні були використані зразки ДНК з тимусу теляти (натрієва сіль, фірма "Serva", Німеччина) у вигляді вологих плівок, що зазнали впливу  $\gamma$ -радіації, в залежності від дози опромінення та ступеня їх зволоження. Аналіз стану ДНК після цих дій був виконан за допомогою метода гел-електрофорезу, який дозволяє отримати інформацію про розподіл фрагментів радіаційно деградованої ДНК за молекулярними масами, та метода УФ-термоспектрофотометрії, що дозволяє через знаходження змін у параметрах кривих плавлення ДНК визначити порушення вторинної структури.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для приготування зразків ДНК з різним вмістом води використовували таку методіку. За допомогою розчинів насичених солей в 6-х герметично закритих бюксах створювали атмосферу із заданою відносною вологістю (0, 32, 56, 64, 80 та 90% В.В.) [12]. Після того, як в бюксах була досягнута рівновага, в них розташовували по 1,5 мг ДНК, що досліджувалася. Зразки ДНК зволожувалися при заданій В.В. протягом двох діб при температурі 20°C<sup>0</sup>, що є достатнім для досягнення вагової рівноваги [13]. Потім бюкси з ДНК зазнавали опромінення  $\gamma$ -радіацією протягом 5, 10, 20 та 46 годин (експозиційні дози дорівнюють 270кР, 540кР, 1080кР і 2484кР, відповідно) на установці "Досліджувач" на кафедрі молекулярної та прикладної біофізики Харківського держуніверситету. Дозу поглинання зразками ДНК не визначали. Як контрольні використовували зразки ДНК з тимуса теляти, що не зазнали опромінення.

Електрофорез розчинів досліджених зразків ДНК (концентрація ДНК 0,03%). проводили у 1% агарозному гелі ("Serva", Німеччина) з трис-боратним буфером (0,089М трис-основа, 0,089М борна кислота, 0,003М ЕДТА, рН 8,2 ). Як маркер молекулярної маси використовували рестрикт ДНК фага  $\lambda$ -Hind III з такими позиціями: 23131, 9419, 6559, 4355, 2322, 2023, 564 пар основ (п.о.) та ДНК фага  $\lambda$ , довжина якої відповідає 48540 п.о. Електрофорез проводили при кімнатній температурі протягом 5-6 годин, напруга – 60В, сила струму – 14-17мА. Гель фарбували водним розчином бромистого етидію (с=1мг/мл, "Serva") і фотографували в ультрафіолеті через червоний світлофільтр.

Спектрофотометричні вимірювання в діапазоні довжин хвиль 240-320 нм і в температурному інтервалі 20-100С<sup>0</sup> проводили у кварцевій термостатованій кюветі закритого типу на двохпроменевому спектрофотометрі фірми Hitachi (Японія), модель 356. Для порівняння використовували таку ж кювету з сольовим розчином. Для цих експериментів були відібрані зразки ДНК, які зазнали опромінення з експозиційною дозою 1080кР при трьох В.В.: 0%, 64% і 90%. Зразки ДНК розчиняли у сольовому розчині 0,15М NaCl, рН 7,0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1, 2 у вигляді електрофореграм наведені результати електрофоретичних досліджень зразків ДНК з різною відносною вологістю для крайніх випадків опромінення  $\gamma$ -радіацією, тобто при мінімальній і максимальній дозах опромінення (експозиційні дози дорівнюють 270 і 2484 кР, відповідно). На рис. 1 (270кР) видно,

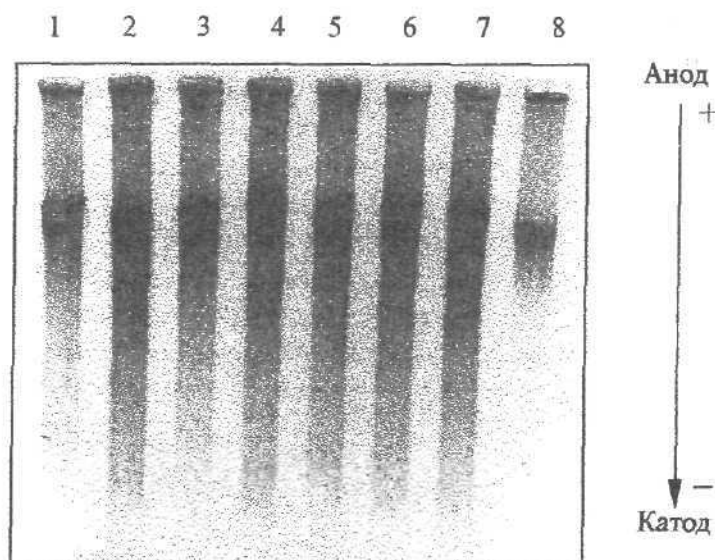


Рисунок 1. Електрофореграми зразків тимусної НаДНК з експозиційною дозою опромінення 270кР при В.В. 0 (2), 32 (3), 56 (4), 64 (5), 81 (6) и 90% (7). Для порівняння приведено електрофореграми зразків нативної тимусної НаДНК при концентраціях 1250нг (1) і 250нг (8):

що є протяжна область міграції зразків ДНК для усіх значень В.В. (0, 32, 56, 64, 80 і 90%). Спостерігаються чітко визначені смуги, які розташовані в області смуги контрольної ДНК. Розподіл молекулярних мас у всіх опромінених ДНК практично однаковий. При збільшенні експозиційної дози опромінення зразків ДНК до 540кР спостерігаються зміни у розподілі М.м. в залежності від вмісту води. Для зразку ДНК, який був опромінений при В.В. 56%, протяжність зони міграції помітно менше ніж для зразків ДНК, які були опромінені при всіх інших значеннях В.В. (0, 32, 64, 80, 90%). Можна припустити, що ці зразки містять низькомолекулярні фрагменти, які мігрують швидше порівняно з випадком ДНК при В.В. 56%, а це є, певно, наслідком більшої радіаційної деградації. У випадку зразків ДНК, що були опромінені з експозиційною дозою 1080кР, зміни у розподілі молекулярних мас в залежності від В.В. виявляються ще чіткіше. Зменшену протяжність зони міграції у порівнянні з іншими мають не тільки зразки ДНК, які були опромінені при В.В. 56%, але і зразки з В.В. 64%. Це, мабуть, пов'язане з підвищеною радіаційною стійкістю цих об'єктів. При максимальній з досліджених доз опромінення (2484кР) на електрофореграмі (рис.2) відсутні смуги для зразків з 0% та 90% В.В., які спостерігалися при менших експозиціях, а для зразків з В.В. 56% та 64%, як і раніше, протяжність зони міграції найменша у порівнянні з іншими.

На рис. 3 наведені електрофореграми зразків ДНК, що були опромінені при 0% В.В. з дозами 270, 540, 1080 та 2484кР, а також ДНК маркерів молекулярної маси. Це дозволяє зробити деякий кількісний аналіз ступеню деструктивних змін в ДНК, що

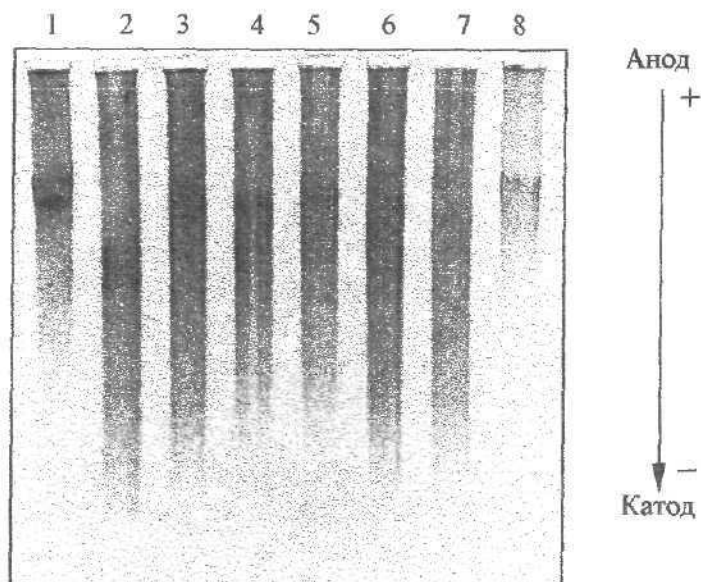
Вплив  $\gamma$ -радіації на структурний стан ДНК...

Рисунок 2. Електрофореграми зразків тимусної НаДНК з експозиційною дозою опромінення 2484кР при В.В. 0 (2), 32 (3), 56 (4), 64 (5), 81 (6) и 90% (7). Для порівняння приведено електрофореграми зразків нативної тимусної НаДНК при концентраціях 1250нг (1) і 250нг (8).

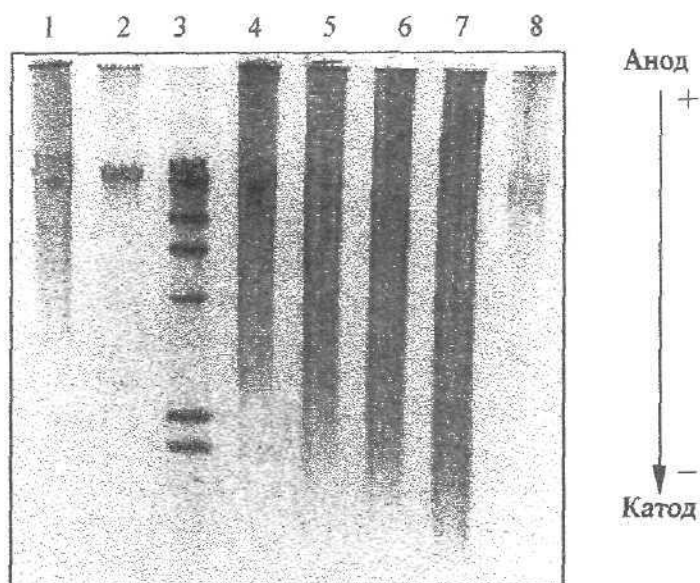


Рисунок 3. Електрофореграми зразків тимусної НаДНК, які були опромінені при 0% В.В. і експозиційних дозах 270 (4), 540 (5), 1080 (6) і 2484кР (7). Для порівняння ступенів деструктивних змін в НаДНК було використано маркери молекулярної маси: ДНК фага  $\lambda$ , довжина якої відповідає 48540 п.о. (2) та рестрикт ДНК фага  $\lambda$ -Hind III з позиціями 23131, 9419, 6559, 4355, 2322, 2023, 564 п.о. (3), а також зразки нативної тимусної НаДНК при концентраціях 1250нг (1) і 250нг (8).

досліджується. Порівнюючи електрофореграми маркерів ДНК та ДНК, яка була опромінена з експозиційною дозою 270кР при 0% В.В., бачимо, що в останній



присутні фракції ДНК в інтервалі довжин 2322-23131 п.о. Максимальне значення молекулярної маси мають фракції ДНК, які займають на електрофореграмі зону смуги, що знаходиться поблизу смуги фрагменту 23131 п.о. маркера ДНК фагу  $\lambda$ -Hind III. Положення смуги контрольної ДНК відносно смуги цього фрагменту дозволяє зробити висновок, що довжини (М.м.) контрольної ДНК знаходяться в досить широкому інтервалі значень: 23131-48540 п.о. При збільшенні дози опромінення на електрофореграмах зразків ДНК, що досліджуються, збільшується протяжність області міграції цих ДНК, спостерігається тенденція до зміщення позиції смуги максимальних молекулярних мас у бік їх зменшення та зниження інтенсивності цієї смуги аж до повного зникнення.

В процесі опромінення деструктивна дія радіації здійснюється в основному двома шляхами: 1) через перенос зарядів, що були створені в результаті прямої іонізації сильно зв'язаних молекул води у первинній гідратній оболонці, на молекулу ДНК (квазі-прямий ефект); 2) через взаємодію молекули ДНК з гідроксильними радикалами, які створюються на зовнішніх, слабо зв'язаних з ДНК молекулами води [14]. При великих дозах опромінення зразків з високим вмістом води може також відбуватися пряма дія радіації на ДНК. В роботах [7, 8, 10, 14] методом ЕПР були виконані дослідження впливу  $\gamma$ -опромінення на зволожені зразки ДНК в широкому інтервалі вмісту води  $n$  (моль води / моль нуклеотидів). Результати досліджень показали, що ефекти за рахунок опромінення виявляються у більш значній мірі для зовнішніх молекул води ( $n < 12$ , В.В. > 70-80%), ніж для внутрішніх, а також, що створення гідроксильних радикалів та іонів основ у зразках із вмістом води  $n < 12$  відбувається у 3,3 менше у порівнянні із зразками з більшим вмістом води. Ці результати підтверджують гіпотезу про те, що вихід реакції створення радикалів для перших найбільш сильно зв'язаних 11-12 молекул води гідратної оболонки ДНК є таким же, як і вихід реакції для ДНК, з якою вони зв'язані [10]. Крім того, було знайдено, що сумарний вихід реакцій створення радикалів збільшується із збільшенням розміру мішені (ДНК+вода) до 76% В.В., при цьому молекули води, що сорбовані на ДНК, мають найбільшу ступінь зв'язування. Тобто за даних умов молекула ДНК разом з її гідратною оболонкою виступають у відношенні до дії радіації у ролі єдиної мішені. При подальшому збільшенні вмісту води у зразку спостерігається різке збільшення створення гідроксильних радикалів. Це дозволяє припустити, що, починаючи з 76% В.В., зразки ДНК-вода розділяються на дві окремі мішені: частково гідратовану ДНК та додатково сорбовану воду [14]. З чотирьох типів нуклеотидів найбільш нестійким до дії радіації є тимін. Тому дані щодо виходу реакцій створення радикалів похідних тиміну дозволяють судити в належній мірі про пошкодження ДНК. В роботі [14] було знайдено, що при 66% В.В. спостерігається зменшення створення радикалів тиміну ТН', тобто відносно зменшується дія радіації на зразки ДНК. Цей результат добре співвідноситься з нашими даними щодо найменшої деструкції ДНК при опроміненні зразків в інтервалі В.В. 56-64%. (рис.2). Таким чином, аналізуючи результати наших експериментів та даних, які були отримані іншими дослідниками, можна зробити такий висновок: в процесі опромінення вологих зразків ДНК, вода в системі, що досліджується, певно, грає подвійну роль. Спочатку, при невеликому вмісту води у зразку (до 66-76% В.В.) молекули зв'язаної води по відношенню до ДНК виступають як стабілізуючі агенти. При подальшому зволоженні зразка, коли збільшується кількість молекул води, що слабо зв'язані з ДНК, та з'являється вільна вода, водне оточення сприяє деструкції ДНК, збільшуючи її чутливість до дії радіації.

Для визначення змін у вторинній структурі опроміненої ДНК (відносна вологість – 0, 64 і 90%, експозиційна доза – 1080кР) були отримані також спектри у



Вплив  $\gamma$ -радіації на структурний стан ДНК...

близькій ультрафіолетовій області в температурному інтервалі 20-100°C<sup>0</sup>. На основі аналізу цих спектрів у порівнянні зі спектрами контрольних зразків ДНК було знайдено зміни (таб.1) у величинах гіперхромних ефектів та параметрів кривих плавлення ДНК (температури  $T_{пл}$  та інтервалу плавлення  $\Delta T$ ).

Таблиця 1. Зміни у параметрах плавлення ДНК, що була опромінена з експозиційною дозою 1080 кР при різних відносних вологостях

| ОВ, %                                       | $T_{пл}$ , °C | $\Delta T$ , °C | Гіперхромізм |
|---------------------------------------------|---------------|-----------------|--------------|
| Опромінена ДНК (експозиційна доза – 1080кР) |               |                 |              |
| 0                                           | 84,0±0,2      | 5,8±0,2         | 38,0±0,5     |
| 64                                          | 86,0±0,2      | 5,5±0,2         | 38,0±0,5     |
| 90                                          | 86,0±0,2      | 5,9±0,2         | 37,0±0,5     |
| Нативна ДНК (контроль)                      |               |                 |              |
|                                             | 82,5±0,2      | 7,0±0,2         | 38,0±0,5     |

З даних цієї таблиці видно, що величини гіперхромного ефекту у опроміненій ДНК при всіх В.В. практично не відрізняються від контролю, але у параметрах плавлення спостерігаються істотні відмінності від цих параметрів для контрольної ДНК. А саме, помітно звужується інтервал плавлення та суттєво підвищується температура плавлення. У випадку “сухої” ДНК (0% В.В.)  $T_{пл}$  зростає майже на 2 градуси, а для зразків ДНК, що були опромінені при 64% та 90% В.В.,  $T_{пл}$  підвищується приблизно на 4С<sup>0</sup>. Звуження інтервалу плавлення на 1,2 -1,5 градусів, що спостерігається в експериментах, свідчить про збільшення ступеню кооперативності переходу спіраль-клубок у опроміненій ДНК у порівнянні з контрольною, а підвищення температури плавлення є показником упорядкування та температурної стійкості ДНК з різним нуклеотидним складом.

Відомо, що існує залежність температури та інтервалу плавлення ДНК від довжини молекули та її нуклеотидного складу [15-19]. Значення параметрів термічної стабільності ДНК та їх зміни визначаються, мабуть, балансом двох вказаних факторів (фрагментація ДНК та відносний вміст GC-пар). При збільшенні фрагментації ДНК кооперативність переходу спіраль-клубок зменшується, в результаті чого знижується температура плавлення та розширюється інтервал плавлення [17-19]. Із зростанням мольного вмісту GC-пар у складі ДНК температура плавлення лінійно зростає [15, 16, 19]. Залежність ширини інтервалу плавлення від вмісту GC-пар має “дзвоноподібний” характер [19], тобто при вмісті GC-пар від 0 до 50% інтервал плавлення розширюється, а при подальшому збільшенні частки GC-пар – звужується. Якщо не брати до уваги впливу фактора фрагментації ДНК, то збільшення  $T_{пл}$ , що спостерігається, відповідає зростанню відносного вмісту GC-пар в опроміненій ДНК на 5-10% (при початковому вмісті 42% для тимусної ДНК). В цьому випадку інтервал плавлення повинен розширятися, але в експерименті  $\Delta T_{пл}$ , навпаки, звужується. Можна припустити, що обчислене із зміни  $T_{пл}$  значення відносного вмісту GC-пар є тільки “позірним”. Насправді, якщо взяти до уваги фактор впливу фрагментації ДНК, який викликає зменшення  $T_{пл}$ , то фактичне збільшення вмісту GC-пар в молекулі ДНК може виявитися вищим за 5-10% (припустимо, 15-20%). Тоді можна чекати звуження інтервалу плавлення у порівнянні з нативною ДНК, що і спостерігається в наших експериментах. Відзначимо ще один можливий фактор впливу на параметри плавлення опроміненої ДНК – створення поперечних зв'язок в молекулах ДНК під впливом радіації. Такі

зшивки підвищують термостабільність ДНК та посилюють її кооперативні властивості при плавленні, що відбувається на підвищенні температури та звуженні інтервалу плавлення ДНК.

Дані електрофорезу свідчать про фрагментацію значної частини зразка ДНК, але довжина більшості фрагментів ДНК тільки трохи менше довжини молекул нативної ДНК (рис.2, 3). На таких довжинах (тисячі п. о.) ефект залежності параметрів плавлення ДНК від довжини молекули ще не виявляється. Крім того, може викликати здивування відносно невеликий ефект фрагментації ДНК при дуже великих дозах опромінення. Але справа в тому, що метод електрофорезу дозволяє розрізнати окремі фрагменти ДНК, які рухаються як єдине ціле. Тобто цей метод може виявити подвійні розриви двох ланцюгів ДНК, або одиночні розриви, якщо точки розриву на двох нитках знаходяться на відстані 10-20 п. о. Але імовірність таких "помітних" для електрофорезу розривів істотно нижче (приблизно в 10 разів) в порівнянні з імовірністю виникнення одиночних розривів. Тому в опромінених зразках насправді є фрагменти ДНК з досить протяглою довжиною (електрофоретично активні), що являють собою сукупність багатьох коротких спіральних ділянок, які можна розглядати як окремі "субфрагменти". Крім того, у підвищенні стабільності протяглих фрагментів ДНК до дії радіації може дати свій внесок створення поперечних зшивок.

Зміни температури та інтервалу плавлення ДНК, що спостерігаються, свідчать про сильну фрагментацію макромолекули та про збільшення відносного вмісту GC-пар. Можна припустити, що при цьому розриваються дієфірні зв'язки між AT-парами, але радіація не впливає безпосередньо на самі AT-пари, бо величина гіперхромного ефекту не відрізняється від контролю (таб.1). Із-за відсутності повних даних нам не вдалося провести кількісне дослідження змін, що відбуваються. Проте, за грубою оцінкою довжини спіральних фрагментів ДНК після опромінення зразка знаходяться в інтервалі від 10 (практично не змінюється величина гіперхромного ефекту) до 400 п. о. (вже помітна залежність параметрів плавлення ДНК від довжини молекули) [17, 18].

### ВИСНОВКИ

Таким чином, результати досліджень зразків ДНК з різним вмістом води, що були опромінені різними дозами  $\gamma$ -радіації, дозволяють зробити такі висновки:

- 1) із збільшенням дози опромінення підвищується ступінь деструктивних змін у ДНК;
- 2) зразки ДНК, що були опромінені при 56% і 64% В.В. демонструють найвищу радіаційну стійкість;
- 3) найбільші зміни у розподілі молекулярних мас спостерігаються для зразків ДНК, що були опромінені при 0% та 90% В.В.;
- 4) в процесі опромінення водне оточення молекули ДНК може грати різну роль у залежності від вмісту води у зразку, виступаючи на першому етапі зволоження (до 66-76% В.В.) як стабілізатор структури ДНК, а при подальшому збільшенні вмісту води у системі – як підсилювач деструктивної дії радіації;
- 5) зростання температури та звуження інтервалу плавлення ДНК, що зазнала опромінення, можуть свідчити про фрагментацію макромолекули та збільшення в ній відносного вмісту GC-пар за рахунок розривів дієфірних зв'язків між AT-парами. Певний вплив на зміни температури та інтервалу плавлення ДНК може мати також процес створення поперечних зшивок, які збільшують стабільність молекули ДНК.

Автори вдячні Харченко Е.В. та Ніколову О.Т. за проведення  $\gamma$ -опромінення

зволожених зразків ДНК на установці "Досліджувач".

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Рябченко Н. И. Радиация и ДНК. М. Атомиздат, 1979. 192с.
2. Тимофеев-Ресовский Н. В., Савич А. В., Шальнов М. И. Введение в молекулярную радиобиологию. М. Медицина, 1981. 320с.
3. Радиационная биофизика ДНП хроматина. М. Атомиздат, 1978. 224с.
4. Первичные радиобиологические процессы. Под ред. Тимофеева-Ресовского. М. Атомиздат, 1972. 336с.
5. Кузин А. Н. Радиационная биохимия. М. Изд-во АН СССР, 1982. 346с.
6. Swarts S.G., Sevilla M.D., Becker D., Tokar C.J., Wheeler K.T. // Radiation Research. 1992. V.129. P.333-344.
7. Becker D., La Vere T., Sevilla M.D. // Radiation Research. 1994. V.140. P.123-129.
8. La Vere T., Becker D., Sevilla M.D. // Radiation Research. 1996. V.145. P.673-680.
9. Ohshima H., Iida Y., Matsuda A., Kuwabara M. // Journal of Radiation Research. 1996. V.37. P.199-207.
10. Swarts S.G., Becker D., Sevilla M., Wheeler K.T. // Radiation Research. 1996. V.145. P.304-314.
11. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // Биофизика. 1993. Т.38. С.768-790.
12. Lindsay S. M., Lee S. A., Powell J. M., Weidlich T., DeMarko C., Lewen G. D., Tao N. J., & Rupprecht A. // Biopolymers. 1989. V.27. P.1015-1043.
13. Воронец Д., Козич Д. Влажный воздух: термодинамические свойства и применение. М. Энергоатомиздат, 1984. 136с.
14. Huttermann J., Rohrig M., Kohnlein W. // International Journal of Radiation Biology. 1992. V.61. P.299-313.
15. Yen W. S., Blake R. D. // Biopolymers. 1980. V.19. P.681-700.
16. Marmur J., Doty P. // J. Mol. Biol. 1962. V.5. P.109-118.
17. Франк-Каменецкий М.Д., Франк-Каменецкий А.Д. // Молекулярная биология. 1968. Т.2. С.778-783.
18. Берестецкая И.В., Косаганов Ю.Н., Лазуркин Ю.С., Трифонов Э.Н. и Франк-Каменецкий М.Д. // Молекулярная биология. 1970. Т.4. С.137-143.
19. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. М. Наука, 1975. 616с.

## ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.391; 611.783

**ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА АКТИВНІСТЬ  $Mg^{2+}$ -АТФази ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ****Г.В.Зима, В.І.Древаль***Харківський державний університет Пл.Свободи, 4, Харків 310077*

Надійшла до редакції 14 травня 1998 р.

Вивчено змінювання активності  $Mg^{2+}$ -АТФази при порівнянні впливу іонізуючого випромінювання у діапазонах малих та великих доз (від  $4 \cdot 10^{-3}$  до  $10^3$  Гр) на суспензію плазматичних мембран еритроцитів. Визначали константу Міхаеліса та максимальну швидкість ферментативної реакції. Встановлено, що різке зростання активності  $Mg^{2+}$ -АТФази при дозах 1 Гр та  $10^3$  Гр пов'язано із змінюванням спорідненості субстрату до активного центра ферменту та швидкості розпаду фермент-субстратного комплексу. Отримані дані дозволяють передбачати, що ефект іонізуючої радіації на  $Mg^{2+}$ -АТФазу при дозі 1 Гр обумовлений дією продуктів радіолізу води, а при дозі  $10^3$  Гр - комбінованим впливом прямої та посередньої дії радіації.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** Іонізуюче випромінювання, плазматична мембрана еритроцита,  $Mg^{2+}$ -АТФаза.

Розширення сфери використання іонізуючих випромінювань, а також необхідність об'єктивних оцінок реальних радіобіологічних досліджень радіаційних уражень робить вивчення молекулярного механізму біологічної дії радіації однією з центральних проблем радіаційної біофізики. У діапазоні малих доз дозозалежною величиною є тільки кількість уражених клітин, а гетерогенність біологічних структур обумовлює формування гетерогенності поглинаємих різними структурами доз, та розподілення енергії внаслідок фізично значущих ефектів стохастичної природи [ 1 ]. При великих дозах радіаційно-індуковані зміни відносяться до нестохастичних. Тому виникає питання про коректність прямої екстраполяції даних про ефекти, які були виявлені після опромінення так званими великими дозами на діапазон малих доз, з метою отримування оцінок радіобіологічних ризиків при такого рода впливах. У ролі загального механізму, який пояснює ефект малих та великих доз радіації, передбачається порушення радіацією функцій плазматичної та внутрішньоклітинної мембрани [ 2 ]. Але в літературі відсутні дані про порівнювальний вплив малих та великих доз радіації на біомембрани. Можна вважати, що у кооперативній системі білок-ліпідного матрикса мембран радіаційно-індуковані порушення структури мембран ведуть до зміни структурно-функційних властивостей інтегральних білків. Деякою мірою оцінити це можна, досліджуючи кінетичні характеристики мембранозв'язаних ферментів. У зв'язку з цим ми провели дослідження дії іонізуючого випромінювання у широкому дозовому інтервалі на активність  $Mg^{2+}$ -АТФази плазматичних мембран еритроцитів.



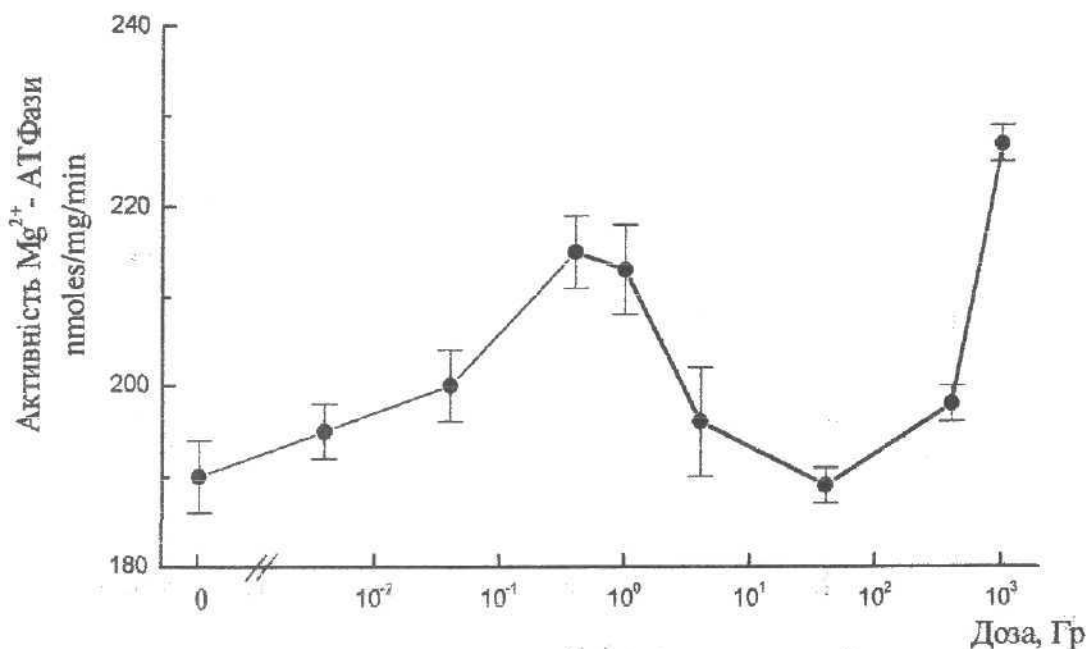
## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.

В роботі використовували плазматичні мембрани еритроцитів донорської крові [ 3 ]. Активність  $Mg^{2+}$ -АТФази визначали, як докладно описано раніше [ 4 ]. Суспензію плазматичних мембран еритроцитів (3,5 мг білка/мл) опромінювали у дозах  $4 \cdot 10^{-3}$  Гр - 0,4 Гр на рентгенівській установці РУМ-17, а в дозах 1 Гр- $10^3$  Гр на гамма-установці "Досліджувач" ( $^{60}Co$ ). Концентрацію білка визначали мікробіуретовим методом [ 5 ]. Статичну обробку результатів проводили за методом [ 6 ].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

Можна бачити (Мал.1), що при дії іонізуючого випромінювання у дозі 1 Гр активність  $Mg^{2+}$ -АТФази зростає у 3,52 рази ( $p < 0,05$ ) порівняно з неопроміненим контролем. При збільшенні дози радіації до 40 Гр активність  $Mg^{2+}$ -АТФази знижується до рівня контролю, а при опроміненні у дозі  $10^3$  Гр зростає у 4,68 рази ( $p < 0,05$ ) порівняно з неопроміненими мембранами.

Разом з тим, як уже відзначалось раніше [ 4 ], визначення активності ферменту само по собі є мало інформативним, тому що активність  $Mg^{2+}$ -АТФази розглядається за сумарною кількістю неорганічного фосфату, який відщепився.



Малюнок 1. Вплив іонізуючого випромінювання на активність  $Mg^{2+}$ -АТФази.

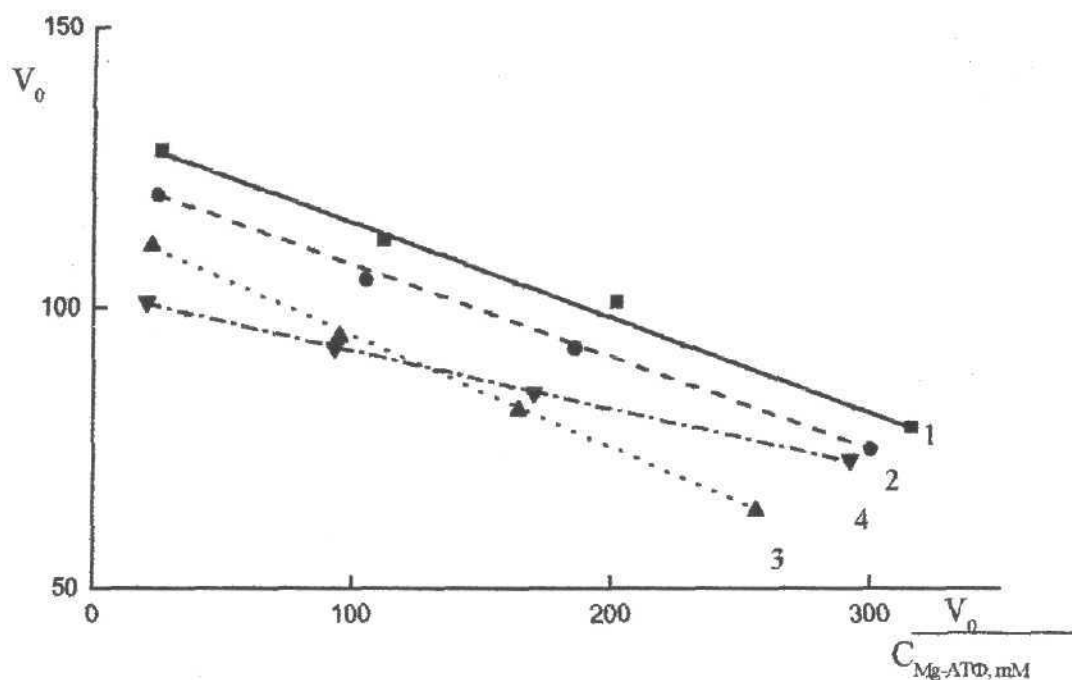
Тому були проведені визначення кінетичних параметрів ферментативної реакції. Визначення кінетичних параметрів  $Mg^{2+}$ -АТФазної реакції проводили за методом Іді-Хофсті [ 7 ] (Мал.2). Результати визначення константи Міхаеліса ( $K_m$ ) та максимальної швидкості ферментативної реакції ( $V_{max}$ ) представлені в Таблиці 1. Можна бачити, що у всьому досліджуваному дозовому інтервалі, при збільшенні дози радіації  $V_{max}$  зменшується, що указує на зменшення константи швидкості розпаду фермент-субстратного комплексу з утворюванням продуктів реакції [ 8 ]. Поряд з цим  $K_m$  при опроміненні у дозі 1 Гр та  $10^3$  Гр зменшується на



6% та 39%, відповідно, а при дозі 40Гр зростає на 14% порівняно з неопроміненим контролем. Отримані дані дозволяють висновувати, що при дозі 40Гр структурні зміни ферменту приводять до зменшення спорідненості субстрату  $Mg\text{-}ATP^{2-}$  до активного центра ферменту, а при дозах 1Гр та  $10^3$  Гр - до збільшення спорідненості субстрату до активного центра  $Mg^{2+}\text{-}ATP$ ази.

Таблиця 1. Змінювання константи Міхаеліса та максимальної швидкості ферментативної реакції при дії іонізуючої радіації

| Доза, Гр | Параметр | $V_{max}$ , нмоль $Ф_n$<br>мг білка <sup>-1</sup><br>min <sup>-1</sup> | $K_m$ ,<br>mM |
|----------|----------|------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 0        |          | 133,2                                                                  | 0,172         |
| 1        |          | 123,6                                                                  | 0,161         |
| 40       |          | 115,7                                                                  | 0,196         |
| $10^3$   |          | 103,1                                                                  | 0,105         |

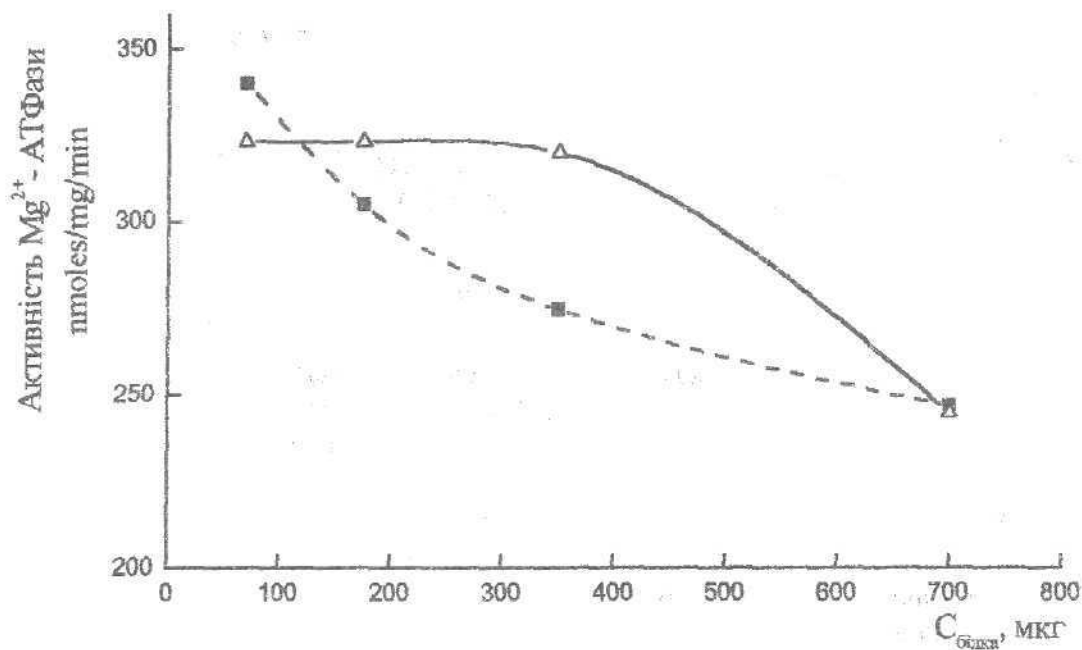


Малюнок 2. Лінеарізація швидкості  $Mg^{2+}\text{-}ATP$ азної реакції в координатах Іді-Хофсті.

Позначення: 1-контроль; 2-1Гр; 3-40Гр; 4- $10^3$ Гр,

$V_0$  - активність  $Mg^{2+}\text{-}ATP$ ази, nmoles/mg/min.

Очевидно зміни, які спостерігаються пов'язані з конформаційними перебудовами молекул  $Mg^{2+}\text{-}ATP$ ази, що може бути обумовлено як прямою дією іонізуючої радіації на молекули білків, так і результатом дії продуктів радіолізу води [ 9 ]. З метою оцінити механізм впливу іонізуючої радіації на  $Mg^{2+}\text{-}ATP$ азу досліджували зміну активності опромінюваного ферменту у залежності від розведення препарату мембран (Мал.3). Можна бачити, що при діянні іонізуючої радіації у дозі 1Гр основний внесок роблять продукти радіолізу води, тоді як при опроміненні у дозі  $10^3$  Гр  $Mg^{2+}\text{-}ATP$ ази має місце сполучений вплив прямої дії іонізуючої радіації та продуктів радіолізу води.



Малюнок 3. Вплив розведення на активність  $Mg^{2+}$ -АТФази при опроміненні у дозі 1Гр(1) та 10<sup>3</sup>Гр(2).

### ВИСНОВКИ

Встановлено, що вплив іонізуючої радіації у дозах 4 10<sup>3</sup> - 10<sup>3</sup> Гр на плазматичні мембрани еритроцитів приводять до статистично значущих збільшень активності  $Mg^{2+}$ -АТФази при дозах 1Гр та 10<sup>3</sup> Гр, які супроводжуються структурними змінами активного центра ферменту. При цьому радіаційно-індуковані зміни активності  $Mg^{2+}$ -АТФази при дозі 1Гр зумовлені продуктами радіолізу води, а при дозі 10<sup>3</sup> Гр - комбіновани впливом прямої та посередньої дії радіації.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.

1. Спитковский Д.М., Зайцев С.Б., Талызина Е.А. // Радиобиология, 1994, Т.34, № 6, С.739-747.
2. Эйдус Л.Х. // Радиобиология, 1994, Т.34, № 6, С.748-758.
3. Dodge J., Mithell C., Hanahan D. // Arch. Biochem. Biophys. 1963, V 100, P.119-130.
4. Древаль В.И., Гирнык С.А. // Биофизика, 1990, Т.35, № 4, С.87-89.
5. Бэйли Дж. Методы химии белков М.:Мир, 1965, 284с.
6. Кокунин В.А. // Укр.биохим. журн., 1975, Т.47, №5, С.776-791
7. Klotz I.M., Hunston D.L. // Biochemistry, 1971, V.10, № 16, P. 3065-3068
8. Диксон М., Уэбб Э, Ферменты, т.1, М.Мир, 1982, с. 99
9. Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Радиационная биофизика М.: Изд-во МГУ, 1979, 240 с.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.391;611.783

## РОЛЬ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ В РАДИАЦИОННОМ ПОРАЖЕНИИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Сичевская Л.В.

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

Дата поступления в редакцию: 29 мая 1998 год

Исследовали интенсивность процессов перекисного окисления липидов, микровязкость свободных и аннулярных липидов, степень поляризации мембранных белков в норме и при  $\gamma$ -облучении в дозе до  $10^3$  Гр. Установлена взаимосвязь между уровнем радиационного поражения липидного компонента мембран и степенью структурной жесткости мембранных белков.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ионизирующее излучение, эритроцитарные мембраны, вязкость аннулярных и свободных липидов, поляризация флуоресценции белков.

Биологические мембраны представляют собой кооперативные структуры, в которых любые структурные изменения отдельных компонентов вызывают нарушение структуры мембраны в целом [1]. Изменение микровязкости, упорядоченности, упаковки, а также состава фосфолипидов влияют на конформационное состояние и взаимодействие мембранных белков [2]. Поэтому представляло интерес проанализировать эффект радиационно-индуцируемых изменений липидной составляющей мембраны на структуру мембранных белков.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазматические мембраны эритроцитов, свободные от гемоглобина, выделяли из донорской крови по методу [3].

Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре «Hitachi-850» (Япония) в термостатируемых при 25°C кварцевых кюветах.

Микровязкость липидов, непосредственно контактирующих с белковыми глобулами интегральных белков (аннулярные липиды) и свободных липидов, удаленных от глобул белка на расстояние более 3нм, определяли с помощью флуоресцентного зонда пирена (конечная концентрация зонда 15мкМ) [4]. При этом относительную вязкость липидов, удаленных от интегральных белков на расстояние

более 3нм, оценивали по соотношению  $\frac{F_M}{F_S}$ , при  $\lambda_{ex}=319\text{нм}$ : где  $F_M$  -

интенсивность флуоресценции мономеров пирена при 373нм;  $F_S$  - интенсивность флуоресценции эксимеров пирена при 493нм.

Относительную вязкость аннулярных липидов, определяли путем возбуждения пирена посредством индуктивно-резонансного переноса энергии с остатков триптофана мембранных белков ( $\lambda_{\text{в}}=285\text{нм}$ ) и изменения степени эксимеризации.

Соотношение  $\frac{F_{\text{м}}}{F_{\text{с}}}$  рассчитывали по формуле:

$$\frac{F_{\text{м}}}{F_{\text{с}}} = \frac{F_{373} - F_{373}^{\text{р}}}{F_{493} - F_{493}^{\text{р}}} \cdot \frac{0,825 - 0,175 \frac{\alpha}{\alpha + 1}}{0,825 - 0,175 \frac{1}{\alpha + 1}}$$

где:  $F_{373}$  - интенсивность флуоресценции при 373нм;

$F_{493}$  - интенсивность флуоресценции при 493нм;

$F_{373}^{\text{р}}$  - интенсивность флуоресценции остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 373нм;

$F_{493}^{\text{р}}$  - интенсивность флуоресценции остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 493нм;

$\alpha$  - степени эксимеризации пирена при  $\lambda_{\text{в}}=319\text{нм}$ .

Флуоресценцию остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 373нм ( $F_{373}^{\text{р}}$ ) и при 493нм ( $F_{493}^{\text{р}}$ ) определяли по следующим зависимостям:

$$F_{373}^{\text{р}} = 0,224 \cdot F_{326}^{\text{р}}$$

$$F_{493}^{\text{р}} = 0,007 \cdot F_{326}^{\text{р}}$$

где:  $F_{326}^{\text{р}}$  - интенсивность флуоресценции остатков триптофана мембранных белков после добавления пирена при 326нм.

Поляризацию флуоресценции триптофановых остатков мембранных белков определяли при  $\lambda_{\text{возб}}=285\text{нм}$ ,  $\lambda_{\text{фл}}=320\text{нм}$ . Степень поляризации флуоресценции рассчитывали по формуле [5]:

$$P = \frac{F - F}{F + F}$$

$F$  - интенсивность флуоресценции, когда поляризатор и анализатор ориентированы параллельно;

$F$  - интенсивность флуоресценции, когда поляризатор и анализатор скрещены под прямым углом.

О динамике процессов перекисного окисления липидов судили по интенсивности накопления малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА определяли в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре СФ-46 при 535 нм ( $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$ ) [6]. Концентрацию белка определяли по методу [7]. Препараты мембран эритроцитов (0,5мг белка в 1мл 5мМ трис-НС1 буфере, рН 6,6) облучали на изотопной установке «Исследователь» ( $^{60}\text{Co}$ ) в дозах 10, 10<sup>2</sup>, 5\*10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> Гр. Вычисление коэффициента корреляции (r) осуществляли, используя программный пакет статистической обработки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Можно видеть (Рис.1), что воздействие ионизирующего излучения на плазматические мембраны эритроцитов стимулирует процессы ПОЛ, что подтверждает имеющиеся данные литературы [8]. Обращает на себя внимание

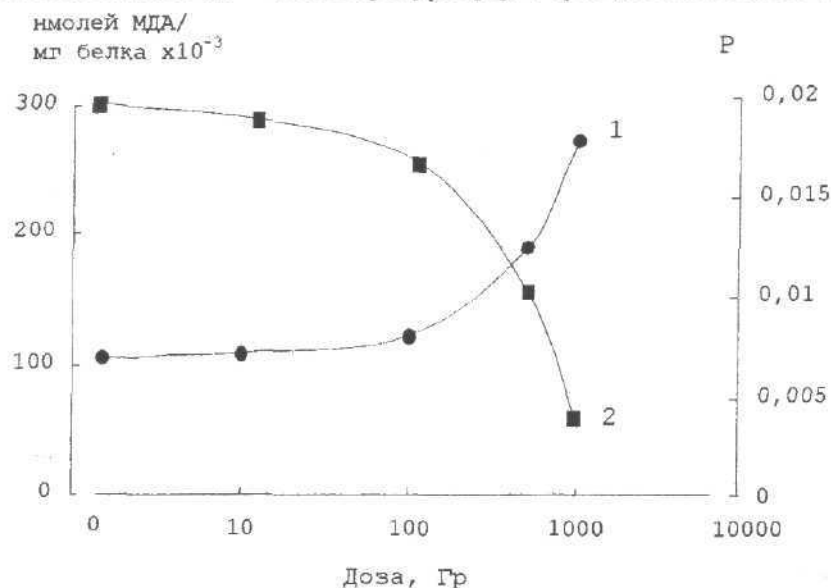


Рис.1. Влияние ионизирующего излучения на содержание МДА (1) и степень поляризации (Р) белков эритроцитарных мембран (2).

двухфазный характер процесса: при облучении в дозе  $10^2$  Гр содержание МДА возрастает на 14%, по сравнению с необлученным контролем, а при увеличении дозы от  $10^2$  до  $10^3$  Гр содержание МДА возрастает на 133% ( $p < 0,05$ ).

Облучение эритроцитарных мембран приводит к изменению микровязкости липидного компонента мембран (Рис.2). При этом характерна более высокая

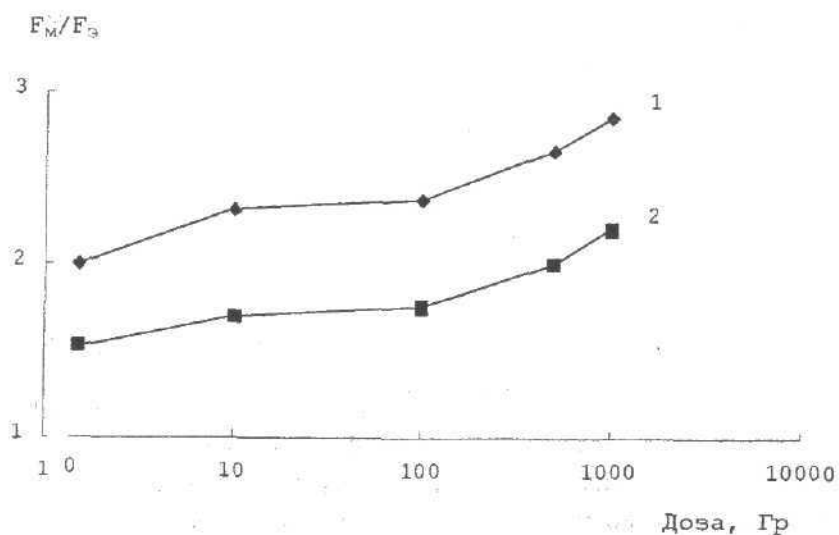


Рис. 2. Изменение микровязкости аннулярных (1) и свободных (2) липидов при воздействии радиации на плазматические мембраны эритроцитов.



микровязкость аннулярных липидов, по сравнению со свободными липидами на расстоянии более 3 нм от интегральных белков, что хорошо согласуется с полученными ранее данными [9]. Облучение мембран в дозе  $10^3$  Гр приводит к возрастанию микровязкости свободных липидов на 42% ( $p < 0,05$ ), а аннулярных липидов на 43% ( $p < 0,05$ ), по сравнению с необлученным контролем. Расчетные величины коэффициента корреляции между содержанием МДА и микровязкостью липидного компонента составляет для аннулярных липидов 0,911, а для свободных липидов  $r = 0,960$ . Это свидетельствует о том, что липопероксидация ненасыщенных мембранных липидов приводит к возрастанию микровязкости аннулярных и свободных липидов [10].

Информативным подходом к исследованию структурной динамики мембранных белков является определение поляризации флуоресценции триптофанилов [11]. Определение поляризации флуоресценции триптофановых остатков белков эритроцитарных мембран показывает (Рис.1), что при облучении в дозе  $10^3$  Гр величина  $P$  уменьшается в 4,4 раза по сравнению с необлученным контролем, что указывает на ограничение подвижности белковых триптофанилов, то есть на повышение структурной жесткости белков эритроцитарных мембран [12]. Определение величины коэффициента корреляции между накоплением МДА и величиной  $P$  (-0,993) позволяет предположить, что характер радиационного поражения белков эритроцитарных мембран в значительной степени определяется радиационно-индуцированными процессами ПОЛ [13].

Известно [14], что перекиси липидов индуцируют образование межмолекулярных сшивок между продуктами ПОЛ и белками, а микровязкость липидного компонента мембран влияет на структурную подвижность белков [15]. На взаимосвязь между изменением микровязкости аннулярных и свободных липидов и величиной поляризации флуоресценции белковых триптофанилов указывают величины коэффициента корреляции: -0,942 и -0,981, соответственно. Очевидно, радиационно-индуцируемые процессы ПОЛ эритроцитарных мембран играют существенную роль в радиационном нарушении структурного состояния мембранных белков эритроцитов.

## ВЫВОДЫ

Радиационное поражение эритроцитарных мембран проявляется в повышении микровязкости аннулярных и свободных липидов, обусловленное радиационно-индуцированными процессами ПОЛ и, как следствие, повышение структурной жесткости мембранных белков.

Можно полагать, что повышение структурной жесткости белков при гамма-облучении плазматической мембраны эритроцитов связано с возрастанием микровязкости аннулярных липидов, обусловленной процессами радиационно-индуцируемой липопероксидации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Конев С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. - Минск: Наука и техника, 1987. - 193с.

2. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию // Издательство Московского университета.- 1990.-207с.
3. Dodge J., Mithell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes// Arch. Biochem. Biophys.-1963.-V.100.-p.119-130
4. Литвинов И.С., Образцов В.В.// Биофизика.-1982.- 27, вып.1.-с.81-86.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.- М.: Наука, 1980.- 320с.
6. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.-М.: Наука, 1972.-252с.
7. Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent// J.Biol.Chem.- 1951.-193, N2.-p.265-279.
8. Древаль В.И. // Электронная обработка материалов.- 1992.- №3.- с.42-44.
9. Lenaz G.// Biosci. Rep.- 1987.- v.7, N11.- p.823-837.
10. Nakazawa T., Nagatsuka S.// Int. j. Radiat. Biol.-1980.-38, N3.-p.537-544.
11. Бурштейн Э.А.// Молекулярная биология.- 1983.- 17, №3.- с.455-467
12. Фоменко Б.С.// Радиобиология.- 1983, т.23, №5.- с.607
13. Фоменко Б.С., Акаев И.Г.// Успех. совр. биол.- 1982, т.93, №2.- с.183-195.
14. Поливода Б.И., Конев В.В, Попов Г.А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.- М.: Энергоатомиздат, 1990.-160с.
15. Бурлакова Е.Б., Шишкина Л.Н.// Инф.бюл.Научн. совета АН СССР по проблемам радиобиологии.- 1989, №35.- с.11-12

## ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 537.868+577.352.868

**О ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИНАХ НАБЛЮДЕНИЯ  
“РЕЗОНАНСНОГО” ДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО  
ИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКИХ ЧАСТОТ НА БИООБЪЕКТЫ****Б.Г.Емец***Харьковский государственный университет, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4*

Поступила в редакцию 11 мая 1998 г.

Предложен механизм появления реакции биологического объекта в ответ на облучение сверхвысокочастотными электромагнитными волнами “нетепловой” интенсивности. Показано, что биообъект, зафиксированный в ближней зоне излучателя, при облучении разными частотами получает разное количество электромагнитной энергии вследствие наличия пространственных нерегулярных осцилляций значений напряженности поля; при перестройке частоты последние смещаются в направлении распространения волны. В связи с этим, полученные в таких условиях зависимости показателя биологического ответа от частоты не рекомендуются называть “резонансными”.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биологические клетки, биологические мембраны, электромагнитное поле, сверхвысокие частоты, миллиметровые волны, рупорная антенна, ближняя зона излучателя.

Известны работы, в которых сообщается о наблюдении биологических ответов, вызванных электромагнитным (ЭМ) облучением миллиметрового диапазона волн нетепловой интенсивности; незначительное перестраивание длины волны излучения ведет к резкому изменению показателя биологического ответа (резонансный эффект). (Принято считать нетепловым уровнем интенсивности ЭМ поля такое ее значение, при котором получасовое облучение образца жидкой воды объемом один миллилитр повышает его температуру не более, чем на 0,1 градуса Цельсия). Достаточно полный обзор работ по этой тематике содержится в [1]. Комментируя эти результаты, авторы [1] утверждают, что “ЭМ излучение – не случайный для живых организмов фактор, подобные сигналы вырабатываются и используются в определенных целях самим организмом, а внешнее облучение лишь имитирует вырабатываемые организмом сигналы”. Поэтому, по мнению авторов, “проникая в организм, монохроматическое излучение миллиметрового диапазона волн нетепловой интенсивности на определенных (резонансных) частотах трансформируется в информационные сигналы, осуществляющие управление и регулирование восстановительными или приспособительными процессами в организме”.

Нам представляется, что рассматриваемые экспериментальные результаты могут быть объяснены без привлечения постулата о выработке организмом сигналов

миллиметрового диапазона, об “информационном” механизме влияния микроволн. Наши утверждения основаны на факте существования физического механизма, реализующего заметный биологический эффект даже при столь низких интенсивностях, которые принято называть нетепловыми.

### МОДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

Литературные источники сообщают, что резонансные эффекты проявления биологического ответа на ЭМ излучение миллиметрового диапазона удобно наблюдать в опытах с микроорганизмами, размещенными в чашке Петри [2,3]. Типичной схемой опыта является используемая в [3], где суспензия спор грибов в физиологическом растворе (толщина слоя 0,5 мм) помещалась под рупором, излучающим микроволны с плотностью потока мощности 0,25 мВт/см<sup>2</sup>. Упростим рассмотрение, предложив смоделировать суспензию микроорганизмов как диэлектрические включения, содержащиеся в жидкой воде. Дополним нашу модель учетом наличия воздушных микропузырьков в воде. (Это дополнение является обоснованным, поскольку в воде всегда, помимо растворенного воздуха, присутствует также воздух в свободном состоянии (пузырьки) [4,5]).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при попадании ЭМ излучения на открытую поверхность жидкой среды, последняя нагревается; создается температурный градиент по толщине. В поле температурного градиента на воздушный пузырек радиуса  $R$  действует сила, перемещающая его к более теплой области образца (термокапиллярный эффект) [6]:

$$F_T = -2\pi R^2 \nabla T d\sigma/dT.$$

(Здесь  $\nabla T$  - температурный градиент, поддерживаемый вдали от пузырька,  $\sigma$  - коэффициент поверхностного натяжения). Благодаря этой силе, а также силе Архимеда, воздушные пузырьки всплывают и покидают жидкость. Расчет показывает, что для реализации эффективной дегазации воды достаточен незначительный температурный градиент, который легко создается низкоинтенсивным микроволновым облучением. Экспериментально получено, например, что получасовое воздействие трехсантиметровыми радиоволнами с плотностью потока мощности 0,3 мВт/см<sup>2</sup> на образец воды объемом 0,6 см<sup>3</sup> оставляет неизменной его температуру. (Во всяком случае, это подтверждают температурные измерения, выполненные с точностью 0,2 градуса Цельсия). Тем не менее, это воздействие уменьшило газосодержание образца в 2 раза [7]. Этот факт еще раз подтверждает, что понятие “нетепловая интенсивность ЭМ излучения” не следует понимать слишком буквально. Оценки, выполненные в [7], показывают, что направленное движение воздушных пузырьков в воде может происходить и при температурном градиенте 0,05 кельвина на метр.

Рассмотрим нашу модельную систему – расположенный на дне чашки Петри тонкий (0,5 мм) слой воды с диэлектрическими включениями; облучение ведется сверху миллиметровыми волнами с плотностью потока мощности 0,25 мВт/см<sup>2</sup>. Такая схема опыта реализована в работах [2,3], где облучение проводилось рупорной антенной с близкого расстояния. Поскольку в миллиметровом диапазоне вода

нагревается сильнее, чем стекло (потери в воде больше), то возникает температурный градиент и, соответственно, движение пузырьков в поле этого градиента. Оценки показывают, что это движение опутимо и при меньших интенсивностях облучения. Проанализируем, будут ли меняться условия дегазации воды, если перестраивать частоту облучения. Изображение взаимного расположения рупора и объекта в [2,3] демонстрирует, что облучаемый объект находится в т.н. ближней зоне излучения антенны. Эта зона в случае прямоугольного раскрытия  $5\lambda \times 10\lambda$  ( $\lambda$  - длина волны) простирается от края излучателя на  $25\lambda$  [8], что в случае длин волн, используемых в [2,3], составляет около 170 мм. Необходимо заметить, что, согласно электродинамике антенн, ближняя зона характеризуется наличием нерегулярных осцилляций амплитуд напряженности электромагнитного поля (т.н. “тонкая структура”) [9]. Результаты соответствующего компьютерного расчета пространственного распределения напряженности ЭМ поля приведены в [8]. Согласно им, изменение частоты излучения приводит к смещению локализации упомянутых максимумов тонкой структуры. Наши расчеты показывают, что если, например, при  $\lambda = 6,00$  мм на слой воды в чашке Петри, размещенный на расстоянии 60,0 мм попадает один из максимумов тонкой структуры поля (и нагревает этот слой), то при перестройке длины волны к  $\lambda = 6,03$  мм, этот максимум смещается вперед по направлению распространения излучения на 0,3 мм. Поскольку толщина слоя воды составляет 0,5 мм, то такое смещение приводит к резкому уменьшению степени нагрева слоя.

Если в такой схеме опыта снимать зависимость изменения температуры воды от частоты облучения, то при перестройке длины волны оказывается, что в место локализации водного образца будет попадать (из-за передвижения “частотола” максимумов тонкой структуры поля) либо какой-то конкретный максимум, либо “провал” между максимумами. Рассмотрение графика соответствующей частотной зависимости изменения температуры образца может создать иллюзию существования “резонансных” частот, т.е. частот, облучение на которых осуществляет эффективный нагрев. Методически правильно было бы снимать частотную зависимость эффекта, расположив облучаемый объект в промежуточной или в дальней зоне, т.е. там, где напряженность поля не осциллирует, а монотонно спадает с расстоянием от излучателя. Для этого требуется поместить образец на удалении от рупора, превышающем 25 длин волн [8]. К сожалению, в работах [2,3] это условие не выполнено.

Рассмотрим, к каким последствиям для биологических включений, содержащихся в воде, приводит даже незначительное нагревание последней. Для упрощения, в качестве включений рассмотрим клетки. Клетка имеет плазматическую мембрану, через которую осуществляется перенос веществ. Из теории трансмембранного переноса следует, что по обе стороны мембраны расположены довольно тонкие слои неперемешиваемой жидкости (в нашем случае – воды), преодолеть которые обменивающиеся вещества могут лишь по диффузионному механизму [10]. К такому слою, находящемуся снаружи мембраны, непосредственно примыкает слой не столь плотно упакованной воды; его принято называть примыкающим слоем. Если в примыкающем слое отсутствуют гидродинамические возмущения, вещества проходят сквозь него достаточно медленно, по диффузионному механизму. Если же в нем имеются микропотоки, то перенос веществ осуществляется гораздо быстрее. Создателями микропотоков, “перемешивателями” могут выступать воздушные пузырьки, которые начинают двигаться, как только они оказываются в поле температурного градиента. Очевидно,



что чем меньше размеры пузырьков, тем ближе к неперемешиваемому слою они могут быть локализованы, тем эффективнее может быть их гидродинамическое влияние в глубине примыкающего слоя, приводящее, в итоге, к повышению скорости трансмембранного переноса веществ. (То обстоятельство, что в воде могут содержаться достаточно миниатюрные пузырьки, подтверждено в работе [5], где сообщено об обнаружении пузырьков радиуса  $2 \cdot 10^{-7}$  см).

Как отмечалось выше, в модельном эксперименте [7] незначительный нагрев воды низкоинтенсивными микроволнами приводил к ее эффективной дегазации. В случае, если в воде присутствуют клетки, уменьшение количества микропузырьков, обусловленное дегазацией, изменяет эффективность перемешивания примыкающего слоя и, соответственно, скорость трансмембранного переноса веществ. Это, в конечном счете, приводит к изменениям физиологического функционирования клетки, что может быть наблюдено как биологический ответ на микроволновое облучение.

Незначительный нагрев поверхности жидкости обеспечивает всплывание пузырьков в стоксовом режиме, т.е. достаточно медленно. (Нетрудно показать, что скорость движения пузырька радиуса  $R$  при этом равна

$$V = -VT \cdot d\sigma/dT \cdot R/3\eta ;$$

здесь  $\eta$  – вязкость жидкости). Это означает, что процесс дегазации, а, следовательно, и процесс формирования биологического ответа требует достаточно продолжительного времени. Из этих соображений становится понятным отсутствие биологического ответа (изменения коэффициента индукции синтеза колицина) в опытах [2] при 30-минутном облучении низкоинтенсивными микроволнами бактериальных клеток, монотонное возрастание этого показателя при часовой и двухчасовой экспозиции, и выход “на насыщение” при дальнейшем увеличении продолжительности облучения. (Выход на насыщение, повидимому, связан с завершением процесса дегазации по пузырьковому механизму). Этот опыт проводился при температуре 20 °С. Когда же авторы [2] изменили температуру проведения опыта, установив 37 °С, то и 30-минутное облучение обеспечило наблюдение эффекта. В рамках излагаемого здесь механизма это объясняется понижением вязкости жидкой среды при повышении температуры, что увеличивает скорость всплывания пузырьков (скорость дегазации), а, следовательно, сокращает время формирования биологического ответа на ЭМ облучение.

Из вышеизложенного следует, что концепция дегазации водной среды по пузырьковому механизму при облучении может быть использована в качестве основы для объяснения известных в литературе данных относительно наблюдения биологических ответов на воздействие низкоинтенсивными микроволнами.

## ВЫВОДЫ

1. Облучение водной суспензии клеток низкоинтенсивными микроволнами приводит к возникновению температурного градиента, что, в свою очередь, обуславливает ее дегазацию по пузырьковому механизму. Дегазация создает возможность формирования биологического ответа на облучение.

2. При облучении жидкого образца в ближней зоне важно наличие совпадения локализации одного из максимумов тонкой структуры распределения напряженности поля с локализацией жидкого образца. Изменение частоты

излучения влечет за собой перемещение локализаций максимумов указанной тонкой структуры; при несовпадении локализации максимума поля с локализацией образца резко уменьшается количество попадающей на образец ЭМ энергии. Поэтому частоты, на которых наблюдаются биологические ответы образца, помещенного в ближней зоне, не могут быть интерпретированы как "резонансные". Говорить о резонансе возможно, если соответствующая частотная зависимость биологического ответа наблюдается на образце, находившемся в промежуточной или в дальней зоне облучателя; здесь напряженность поля не имеет осцилляций, монотонно спадая с расстоянием от антенны. Публикации о таких наблюдениях автору неизвестны.

Автор благодарит Н.Н. Горобца за обсуждение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М. Радио и связь, 1991. 168 с.
2. Смолянская А.З., Виленская Р.Л. // Успехи физических наук. 1973. Т. 110. № 3. С. 458-460.
3. Голант М. Б., Брюхова А.К., Двадцатова Е.А. и др. // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты (под ред. акад. Н.Д. Девяткова). М. ИРЭ АН СССР, 1983. С. 115-122.
4. Сиротюк М.Г. // Акустический журнал. 1970. Т. 14. № 2. С. 286-290.
5. Бункин Н.Ф., Виноградова О.И., Куклин А.И. и др. // Письма в ЖЭТФ. 1995. Т. 62. № 8. С. 659-662.
6. Кузнецов В.М., Луговцов Б.А., Шер Е.И. // Журнал прикладной математики и технической физики. 1966. № 1. С. 124-126.
7. Емец Б.Г. // Письма в ЖТФ. 1996. Т. 22. № 8. С. 22-24.
8. Горобец Н.Н. // Вестник Харьковского университета. Радиофизика и электроника. 1980. № 9. С. 26-34.
9. Уолтер К. Антенны бегущей волны. М. Энергия, 1970. 392 с.
10. Николаев Н.И. Диффузия в мембранах. М. Химия, 1980. 232 с.

## ABSTRACTS

**HYDRATION AND STABILITY OF NUCLEIC ACIDS WITH DIFFERENT AT- AND GC - COMPOSITION IN CONDENSED STATE**

E.G.Bereznyak, M.A.Semenov, T.V.Bolbukh

*Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,  
12 Acad.Proskura str., Kharkov 310085, Ukraine*

In the suggested review the results of the investigation of influence of water on structure and stability of nucleic acids (NA) are generalized on the basis of literature dates and our method of studies of peculiarity hydration of NA with different nucleotide composition in the system NA - water with variable water content. An analysis showed that contribution of the water molecules in total energy of stabilization of helical structure of nucleic acids is up to 70-75% and contribution of H-bonds of Watson-Crick pairs in this energy does not exceed 25%. These results allowed to bring out effect of other factors except influence of water on formation and stabilization of DNA hydration shell.

**THERMODYNAMICS OF HELIX-TO-COIL TRANSITION IN DUPLEX AND TRIPLEX COMPLEXES OF OLIGOADENILATE WITH OLIGOTHYMYDYLATE. INFLUENCE OF COVALENTLY ATTACHED DYE**

Yu.P. Blagoi, V.N. Zozulya, A.S. Shcherbakova

*Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,  
47 Lenin Ave., Kharkov 310164, Ukraine*

Helix-to-coil transitions in oligonucleotide (dA)<sub>15</sub> complexes with (dT)<sub>10</sub> and (dT)<sub>12</sub> as well as with intercalating phenazine dye attached, covalently, have been thermodynamically analyzed. At molar strand ratios 1:1 and 1:2 and  $\mu = 0.1$  and 1 thermodynamic transition parameters  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  and  $\Delta G$  and equilibrium constants were calculated for duplex and triplex structures by using the «two state» model and the modified «staggering zipper» model. Declination of experimental dependencies from the «two state» model was found for duplexes containing phenazine attached. This effect is interpreted as a result of the effect of the impurity triplex state. It was stated by the help of model «staggering zipper» calculations that terminal group of the complexes are in a partially disordered state the degree of which increases with temperature. It is shown that strengthening of both complex types by the dye attached may be taken into account by multiplication of the complex binding constant by the attachment constant of the dye in the complementary structure.

**PARAMETER DISTRIBUTED MODEL OF THE CONFORMATIONAL TRANSITIONS INDUCED WITH CHANGE OF RELATIVE HUMIDITY IN THE NUCLEIC ACID SAMPLES**

M.Ye. Tolstornikov, S.V. Gatash, V.Ya. Maleev

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

The parameter distributed model, which describes the conformational transitions induced with change of the sample relative humidity, is presented in the paper. Three main nucleic acid conformational states are presumed in the model. The numerical calculations have been performed for evolution of the perturbations of the initially homogeneous biopolymer conformational state.

**ENERGETIC AND DYNAMIC PROPERTIES OF WATER IN HYDRATE SHELL OF DNA**

K.M. Virnik, A.I. Gasan, A.V. Shestopalova, V. Ya. Maleev

*Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,  
12 Akad. Proskura St., Kharkov 310085, Ukraine*

A new approach to studying dynamic properties of water molecules bound to biopolymer matrices has been proposed. It is based on measuring dehydration energy of biopolymer-water systems at various levels of relative humidity with using the differential scanning microcalorimetry method. Correlation between the dehydration energy and nucleotide composition of a native DNA has been found. Some characteristics of dynamic mobility of the water molecules in the hydration shells of biopolymers studied have been calculated with using experimental data. Also, systems containing dinucleotides ApA, TpT, UpU and water clusters of various sizes (20, 40 and 200 water molecules) have been studied by Monte Carlo computer simulation. Results of this simulation correlate with appropriate calorimetric data.

**QUANTUM-MECHANICAL STUDY OF NUCLEIC ACID BASE CATIONS**Rubin Yu. V.<sup>1</sup>, Rubina A. Yu.<sup>2</sup>, Sorokin V. A.<sup>1</sup><sup>1</sup> *Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine,  
47 Lenin Ave., Kharkov 310164, Ukraine;* <sup>2</sup> *Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine*

With the aim to study spectroscopic properties of nucleic acid base cations electronic-excited states (EES) energy

calculations of four guanine cations, three adenine cations and its dication were performed by using of two versions of CNDO/S method. Results of these calculations were compared with experimental ones for cation forms of such bases to be studied formerly. This comparison shows enough good agreement between experimental EES energies and calculated ones. The calculations predict positions of the first UV absorption bands for adenine, guanine and cytosine cation forms which experimental results are absent till present time. These calculations, in particular, predict a blue shift of cytosine 07H cation UV absorption spectrum relatively neutral form spectrum. A red shift of N3H-, 01 OH- and N7H enol guanine cations, adenine N3H and N7H cations UV absorption spectrum is predicted, also.

#### EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDY OF INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN THE RECOGNITION COMPLEX OF METHYLURACILE AND ACRYLAMIDE

I.K. Galetich, S.G. Stepanian, V.S. Shelkovsky, M.V. Kosevich, Yu.P. Blagoi, L. Adamovich\*

*Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov 310164, Ukraine; \*University of Arizona, Dept. Of Chemistry, Tuscon, Arizona, 85721 AZ, USA.*

Structural and energetical parameters of the intermolecular interactions in the model recognition complex between the 1-methyluracil and side chains of the aminoacids Asparaglyne and Glutamine were determined. Enthalpy value of the complex formation, measured by the method of temperature dependent field ionization mass spec-trometry is equal to  $(-40,6 \pm 4,2)$  kJ/mole and it is in a good agreement with the values of interaction energy in two most favourable dimer configurations, calculated by MP2 and DFT methods.

#### IR-SPECTROSCOPIC STUDY OF $\text{Cu}^{2+}$ ION INTERACTION WITH DNA IN AQUEOUS SOLUTIONS CONTAINING ADDITIONS OF 1,2-PROPANEDIOL AND GLYCEROL

E.V. Hackl, S.V. Kornilova, Yu.P. Blagoi

*Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov 310164, Ukraine*

The present work studied the  $\text{Cu}^{2+}$  ion interaction with DNA in aqueous solutions containing low (up to 20 v %) additions of glycerol or 1,2-propanediol at 29 and 45°C by IR-spectroscopy.  $\text{Cu}^{2+}$  ions were shown to induce the DNA transition into compact form in aqueous and water-glycerol (propanediol) solutions both at 29 and at 45°C. This process is of high positive cooperativity. 1,2-propanediol added to the DNA aqueous solution increases cooperativity of the DNA transition into compact state and decreases the  $\text{Cu}^{2+}$  ions concentration required to induce DNA compactisation. The 1,2-propanediol effect increases monotonously with the rise of its volume concentration (in the concentration range 0-20 v %) at 29 and 45°C. In contrast to propanediol, the glycerol effect on DNA compactisation is of non-monotonous character: small (4 v %) glycerol additions to DNA aqueous solution decrease cooperativity of the DNA transition into compact state at 29°C. Comparison of effects of small additions of 1,2-propanediol and glycerol for which dielectric permeability of solution changes practically the same, on the  $\text{Cu}^{2+}$ -induced DNA condensation, permits the conclusion that the DNA condensation induced by the  $\text{Cu}^{2+}$  ions depends not only on dielectric permeability but on the structure of the solution formed.

#### TERMOTROPIC CHANGES OF FIBRINOGEN CONFORMATION

V.P. Berest<sup>1</sup>, S.V. Gatash<sup>1</sup>, T.F. Morozova<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine <sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine*

The information concerning the structural changes of fibrinogen molecule at temperatures from 4 to 52°C has been obtained by means of UV-spectroscopy and dielectric-spectroscopy methods. Besides the known conformational transition II (at about 10°C), under physiological conditions conformational transition at 18-22°C has been observed in fibrinogen. This transition might be connected with structural transition in D-domain of fibrinogen and accompanied by an increase in tryptophanyl accessibility to the solvent. Revealed conformational transition, probably, determines the character of the temperature dependence of blood platelet aggregation.

#### PHYSICO-MATHEMATICAL MODEL OF BIOMACROMOLECULE CONFIGURATION FLUCTUATION IN A VISCOSITY MEDIUM.

A.I. Osetsky

*Institute for problems of cryobiology and cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine*

In this work the physico-mathematical model allowing to compute the probability of fluctuative alteration of configuration of long linear macromolecular and to take into account the influence of medium viscosity, in which the macromolecules are suspended, has been developed.



### THE PHYSICO-MATHEMATICAL MODEL OF HYPOTONIC HEMOLYSIS OF HUMAN ERYTHROCYTES BEHAVIOURE. I. SWELLING STAGE.

E.A. Gordienko, Y.E. Panina

*Institute for problems of cryobiology and cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine,  
23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine*

In this work the physico-mathematical model of hypotonic hemolysis of human erythrocytes has been developed. It describes the kinetics of this phenomenon under cells plunging into hypertonic water solution of electrically neutral permeable substance during the swelling of cell to critical volume.

### USING OF DSM FLUORESCENCE SPECTRA INHOMOGENEOUS BROADENING ANALYSIS FOR INVESTIGATION OF MODEL AND NATURAL MEMBRANES STRUCTURAL CHANGES

G.P.Gorbenko\*, O.A.Nardid, T.S.Dyubko

*\* Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine; Institute for problems of cryobiology and cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine*

Modification of inhomogeneous broadening parameters analysis method in reference to fluorescent probe DSM was developed. Possibilities of the method using for investigation of model and biological membranes structural changes under influence of proteins, ionizing radiation and low temperatures were studied. It was shown that DSM spectra analysis allows receiving of information about character of probe microenvironment polarity under different conditions.

### GROWTH KINETICS OF MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS: ANALYSIS BY MATHEMATICAL MODELLING

G.I.Solyanik

*R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, 45 Vasil'kovskaya Str., Kiev 252022, Ukraine*

Effect of oxygen and glucose on the cellular heterogeneity and growth kinetics of multicellular tumor spheroids has been analyzed by a mathematical model. The model takes into account the processes of cell division, death and transition from proliferation to rest in which oxygen and glucose are considered as nonspecific regulatory factors of cell viability. The model was used to analyze growth kinetics and cellular heterogeneity of EMT6/Ro murine mammary carcinoma cell spheroids growing under the standard conditions. The model gives a good representation of growth kinetics and oxygen distribution in spheroids and allows to study the proliferative heterogeneity of their cells. The comparison of model predictions with experimental data showed, that oxygen consumption rate per cell estimated theoretically more than 4 times lower as that measured experimentally.

### APPLICATION OF QUASIPOLYNOMIALS IN STOCHASTIC SIMULATION OF PHARMACOKINETIC

K.B. Radzishhevskaya, V.G. Knigavko

*Kharkov Research Institute of Medical Radiology, 82 Pushkinskaya str., Kharkov 310024, Ukraine*

In the paper structural functional pharmacokinetic model was constructed. Methods of probable simulation was used. The new approach to the choice of analytical expression for the unimodal probability density function is offered. The domain of function is positives semiaxis and it has infinite zero and cipher zero. Model of system which consists of several consecutive blocks is examined. An entrance of each subsequent block is the previous block exit.

### INFLUENCE OF $\gamma$ -IRRADIATION ON STATE OF DNA ION - HYDRATION SHELL

V. A. Kashpur, O. V. Dubovitskaya, A. A. Krasnitskaya, V. Ya. Maleev

*Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,  
12 Acad.Proskura str., Kharkov 310085, Ukraine*

The effect of  $\gamma$ -radiation on the state of DNA hydration shell has been investigated. The changes of dielectric permittivity of DNA aqueous solutions irradiated at doses 19, 370, and 1650 Gy have been studied using the differential dielectrometric method. The DNA state was checked by conductance-measuring and electrophoresis methods. Some noticeable changes of DNA hydration at 370 and 1650 Gy have been found. It has been shown that the effects revealed are due to the breach of water backbone structure arising from double helix reconstructions which appear to be a result of radiation deoxyribosyl lesions and also to the appearance of DNA radiation-altered bases.



**INFLUENCE OF  $\gamma$ -RADIATION ON STRUCTURAL STATE OF DNA IRRADIATED AT VARIOUS HUMIDITY LEVELS****A.A. Krasnitskaya, A.I. Gasan, K.M. Virnik***Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,  
12 Acad. Proskura str., Kharkov 310085, Ukraine*

A study of  $\gamma$ -radiation influence on calf thymus NaDNA at various relative humidity levels has been carried out with using gel-electrophoresis and UV-spectroscopy techniques. It has been shown that irradiated DNA samples differ from check sample in molecular mass (fragment lengths) distribution due to partial fragmentation of DNA molecules, the fragmentation degree depending upon relative humidity of the sample during irradiation. The most destruction of DNA is observed at minimum (0%) and maximum (90%) relative humidity, and the least one - in the interval of 56-64% relative humidity. UV-spectroscopy data give evidence of that with increase of relative humidity of DNA samples irradiated with a certain dose shift of DNA melting temperature towards its increase is observed. It is concluded that main targets of  $\gamma$ -radiation influence on DNA are diesteric bonds between AT-pairs.

**THE INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON THE  $Mg^{2+}$ -ATPase OF ERYTHROCYTE PLASMATIC MEMBRANE ACTIVITY****G.V. Zima, V. I. Dreval***Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine*

The alteration of  $Mg^{2+}$ -ATPase activity under the comparison of ionizing radiation influence in small and large dose diapasons (from  $4 \cdot 10^{-3}$  to  $10^3$  Gr) on the erythrocyte plasmatic membrane have been studied. The Michaelis' constant and maximum rate of enzymic reactions were determined. The data obtained during the experiment give us possibility to suppose, that under the dose equal 1 Gr the ionizing radiation effect is stipulated by action of water radiolysis products, and under the dose equal  $10^3$  Gr - by combinative action of direct and indirect radiation influence.

**THE ROLE OF THE LIPID AND THE PROTEIN IN RADIATION DEFEAT OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES****L.V. Sichevska***Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine*

The intensity processes of the lipid peroxidation, microtenacity of free and fixed of the lipid, polarization of membrane proteins under the influence of ionizing radiation in doses  $10 \div 10^3$  Gr have been investigated. The interconnection between level of radiation defeat of membrane's lipid and conformation agility of membrane's protein have been established.

**ON A POSSIBLE CAUSE OF OBSERVABLE "RESONANCE" EFFECTS OF MICROWAVE IRRADIATION ON BIOLOGICAL OBJECTS****B.G. Yemets***Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine*

Physical mechanism is advanced for arising the response of biological objects to microwaves of nonthermal intensity. Swipping the frequency results in shifting the fine spatial pattern of the field along the path of propagation in near zone of the antenna. Therefore, the biological object fixed in this zone is affected by different amount of radiation when the frequency is being changed. In according with this, the dependencies of the response obtained in described conditions are not recommended to be called "resonance".

Підписано до друку 18.06.98. Формат 60х84 1/8. Умов. друк.  
арк. 8,37. Облік.-вид. арк. 9,0. Тираж 200.

310077, Харків, пл. Свободи, 4, Харківський державний  
університет. Видавничий центр ХДУ. 4-20

---

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).

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**

УДК 576.8.21

### **НАЗВА СТАТТІ, ЯКА ПОДАЄТЬСЯ ДО РЕДАКЦІЇ**

**А.Б. Автор, В.Г. Співавтор**

*Назва організації, адреса*

Надійшла до редакції 1 липня 1998 г.

В даній роботі представлені результати експериментальної перевірки адекватності існуючих моделей взаємодії біологічно активних речовин з ...

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** об'єкт, метод, область дослідження, специфіка даної роботи

В попередніх роботах даного циклу досліджень [1,2] був запропонований алгоритм побудови та експериментальної перевірки моделей взаємодії біологічно активних речовин з ..... запропоновано загальний механізм взаємодії.

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

В експерименті використовувались хімічно чисті препарати фірми "REANAL" у концентраціях ..... температура зразка вимірювалась з точністю  $\pm 0,1$  °C.

### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

$$\frac{dX}{dt} = f(X) + \int_{\Omega} g(y) dy \quad (1)$$

### **ВИСНОВКИ**

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Иванов А.Б., Петров В.Г. // Биофизика. 1997. Т.42. С.997-1002
2. Гантмахер Ф.Р. Теория матриц. М. Наука, 1967. 575 с.