

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету № 422

Біофізичний ВІСНИК

ВІСНИК

1998

1998

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

Математичні та хімічні символи, рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою комп'ютерної техніки. Рисунки, у вигляді повністю 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 рядки; на третьому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 9 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 9 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкуються за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число-цифрами, місяць-прописом, рік-цифрами (шрифт прямий, 9 pt., вирівнювання по центру).

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

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

Текст реферату і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку).

Потім, після пропуску одного рядка, вміщується основний текст статті. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендуються розбити статтю 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 рекомендується розділи ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ та ін. Розділи не нумеруються (в назвах розділів усі букви прописні і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу йде один пустий рядок. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться.

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

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

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

Для статей написаних англійською мовою, крім окремого реферату англійською мовою, у кінці статті, після списку літератури наводиться реферат українською мовою за тими ж правилами. Зверніть увагу на компактне викладення матеріалу статті, бо друківання журналу здійснюється на підставі самофінансування.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

(Зразок оформлення статті на 3 сторінці обкладинки)

ISSN 0453-8048

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ

Вісник Харківського університету
№ 422, 1998

БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК

Заснований у 1998 році

випуск 2

Харків
1998

УДК 577.3

Від редакції:

Шановні читачі та автори !

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

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

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

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

Запрошуємо до плідного співробітництва!

Редакційна колегія

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

д.ф.-м.н., проф. **Благой Ю.П.**

д.б.н., проф. **Бондаренко В.А.**

д.б.н. **Гордієнко Є.О.**

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

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

- М.В. Косевич** Наблюдение эффектов, связанных с гидратацией, в охлажденных и замороженных растворах методом вторичной ионной масс-спектрометрии 5
- М.В. Косевич, В.А. Пащинская, З. Шилаги, К. Векей, В.С. Шелковский, Ю.П. Благой** Стабильность дикатиона декаметоксина по данным вторично-ионной масс-спектрометрии 15
- К.М. Virnik, M.Ye. Tolstorukov, V.Ya. Maleev** Surface diffusion of bound water in hydrate surroundings of DNA 23
- Е.Г. Березняк, М.А. Семенов, Е.Б. Стариков, Ю.Ф. Педаш, Т.В. Больбух, Д.А. Матвеев, В.Я. Малеев** ИК-спектроскопическое и квантово-химическое изучение гидратации динатриевой соли рибогуанозин-5'-монофосфата 29
- К.М. Virnik, M.Ye. Tolstorukov** Binding energy differentiation of water molecules in DNA hydration shell 35
- Е.В. Хакл, С.В. Корнилова, Ю.П. Благой** Влияние мочевины на переход ДНК в компактное состояние при связывании с ионами Cu^{2+} 39

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- В.П. Берест, Т.Ф. Морозова, С.В. Гаташ** Спектрофотометрическое исследование влияния температуры на тромбоциты плазмы человека 45
- Г.П. Горбенко** Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами 49
- Е.А. Гордиенко, Ю.Е. Панина** Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. II. Этап гемолиза 54
- О.И. Гордиенко, Ю.Е. Панина, И.Ф. Коваленко** Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротектора 59
- Е.В. Хакл, С.В. Гаташ, В.П. Берест** Влияние грамицидина S на тромбоциты человека 64
- Г.П. Горбенко** Связывание цитохрома C с модельными фосфолипидными мембранами 69
- A.G. Anishkin, V.V. Lemeshko** Theoretical dependence of phosphate potential on magnitude of protonmotive force for two-electron proton-chemical coupling point model 74

- Т.Н. Овсянникова, Ю.В. Никитченко, В.В. Лемешко** Влияние препарата из *Rhodiola rosea* L. на целостность мембран ишемизированного миокарда 78
- С.Е. Коваленко** Физическая модель явления гипертонического криогемолиза 82

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- О.В. Корзовская, Л.Н. Лисецкий, В.Д. Паникарская** УФ-спектроскопия и структурные особенности модельных мембран и жидкокристаллических биоэквивалентных систем 85
- А.И. Осецкий** Исследование процесса кристаллизации водных растворов криопротекторов методом термопластической деформации 90
- В.И. Грищенко, В.А. Керос** Изучение процесса замораживания-оттаивания 5%-ного и 10%-ного растворов диметилсульфоксида на среде Хенкса методом тензодилатометрии 93
- В.Е. Шеханин** Физико-математический анализ и экспериментальное изучение механических свойств пружины, используемой при протезировании кровеносных сосудов 96

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООБ'ЄКТИ

- Е.Б. Круглова, Н.А. Крутько, А.А. Красницкая, Н.А. Карпенко, В.Я. Малеев, М.Ю. Алесина** Влияние структурных изменений в ДНК, выделенной из гонад облученных крыс, на связывание биологически активных нуклеозидов 100
- Э.А. Ромоданова, Е.К. Андреева, С.В. Гаташ, Т.С. Дюбко** Изменение спектральных свойств фибриногена при действии γ -излучения 105
- Г.В. Зима, В.І. Древаль** Вплив іонізуючого випромінювання на структуру Mg^{2+} -АТФази 109
- В.І. Древаль, Л.В. Січевська** Структурні зміни плазматичних мембран еритроцитів під впливом радіації 113
- Б.Г. Емец** Низкоинтенсивные электромагнитные микроволны и биообъекты: эффекты действия и биофизические механизмы 118
- II з'їзд Українського біофізичного товариства** 131
- Abstracts** 133

УДК: 577.3 : 546.212

НАБЛЮДЕНИЕ ЭФФЕКТОВ, СВЯЗАННЫХ С ГИДРАТАЦИЕЙ, В ОХЛАЖДЕННЫХ И ЗАМОРОЖЕННЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

М.В. Косевич*Физико-технический институт низких температур им. Б.И.Веркина НАН Украины,
Харьков, 310164, пр. Ленина, 47, e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 25 сентября 1998 г.

Дается анализ возможностей низкотемпературной масс-спектрометрии с бомбардировкой ускоренными атомами или ионами в изучении явлений, связанных с гидратацией в замороженных и охлажденных растворах. Описана модель образования низкотемпературных масс-спектров; выделены параметры спектров, в частности такие как качественный состав и количественное распределение кластерных ионов, которые несут информацию о типах межмолекулярных взаимодействий в образце, его агрегатном состоянии и фазовых переходах при изменении температуры. Показана возможность распыления гидратных кластеров из жидкой фазы водно-спиртовых смесей и формалина, существующей в узком диапазоне субнулевых температур при низком давлении, при этом условиям масс-спектрометрического эксперимента. В случае твердых образцов распыление ионов крайне затруднено для органических веществ, образующих сетку водородных связей (что является существенным препятствием в изучении органических кристаллогидратов), однако возможно для твердых образцов с преобладанием ван-дер-ваальсовых взаимодействий. К последнему типу относятся замороженные образцы олигомеров производных полиоксиметилена, образующихся при полимеризации в формалине, для которых впервые методом низкотемпературной масс-спектрометрии было зарегистрировано наличие сильно связанной воды в твердой фазе. Приводятся также примеры исследования кристаллогидратов неорганических солей при низких температурах. Обсуждаются возможности использования данных низкотемпературной масс-спектрометрии для оценки криопротекторных свойств различных соединений, связанных с особенностями их взаимодействия с водой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: низкотемпературная масс-спектрометрия, гидраты, кристаллогидраты, криопротекторы, спирты, полиоксиметилен, кластеры

Изучение изменения параметров межмолекулярных взаимодействий биомолекул и биологически активных соединений с водой при охлаждении и замораживании водных растворов необходимо для установления механизмов криповреждения биологического материала и разработки стратегии криопротекции. Эффекты, связанные с гидратацией, представляют также фундаментальный интерес для молекулярной криобиофизики. Связанная вода, стабильные гидраты, кристаллогидраты изучаются разнообразными экспериментальными методами [1-8], набор которых в последние годы пополнился низкотемпературной вторично-ионной масс-спектрометрией (НТ ВИМС) [9-18].

Метод НТ ВИМС (а также его вариант с бомбардировкой нейтральными быстрыми атомами, ББА) применялся ранее в ряде специализированных лабораторий, в основном, для получения и исследования кластеров простейших органических и неорганических соединений [20-26]. Однако попытки приложения метода к более сложным многокомпонентным системам встречали существенные трудности в связи с отсутствием адекватной модели для интерпретации масс-спектров. Модель, позволяющая устанавливать соответствие между характером масс-спектров (т.е. наличием в них определенных пиков и их интенсивностью) и структурой охлажденных и замороженных образцов, а также фазовыми переходами в них при изменении температуры была предложена недавно в серии работ [10-17]. Эта модель была с успехом использована при изучении методом НТ ББА ряда систем, представляющих собой замороженные растворы низкомолекулярных органических и неорганических соединений в воде и в некоторых органических растворителях. Было показано, что на основании ряда параметров НТ ББА масс-спектров можно делать выводы о характере некоторых процессов, представляющих интерес для криобиофизики: формировании сложной морфологии многокомпонентных образцов, фазовых переходах, образовании новых веществ в охлажденной системе, концентрировании веществ при замораживании, дегидратации биомолекул, защитной роли криопротекторов [10-19]. Практически во всех исследованиях, относящихся к водным растворам, наблюдались те или иные эффекты, связанные с гидратацией растворенного вещества. В связи с этим, целью настоящей работы явилась систематизация

данных о некоторых особенностях взаимодействия биологически активных соединений с водой при субнулевых температурах, накопленных к настоящему времени с помощью метода НТ ББА/ВИМС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Масс-спектрометрия

НТ ББА масс-спектрометрические эксперименты проводили с использованием магнитного масс-спектрометра МИ-1201Е (ПО «Электрон», Сумы, Украина), снабженного специализированным низко-температурным вторичным источником ионов, описанным в [9]. Источник ионов содержал криогенный блок, охлаждаемый жидким азотом. Образец (обычно капля раствора объемом 2-5 мкл) замораживали на медной подложке, которую на штоке системы прямого ввода помещали в подогнанный паз криогенного блока. Температуру регулировали изменением потока азота и контролировали терморезистором, вмонтированным непосредственно в подложку. В качестве бомбардирующего агента использовали поток нейтральных атомов аргона с энергией первичного пучка 4 кэВ.

Часть измерений в режиме НТ ВИМС выполняли на двухсекторном масс-спектрометре VG-ZAB-SEQ («Микромасс», Манчестер, Англия). Бомбардировку образца проводили ионами Cs^+ с энергией 15-30 кэВ. Образец замораживали на стальном штоке системы прямого ввода; спонтанный отогрев штока (без термостатирования) обеспечивал скорость отогрева $\sim 5^\circ\text{C}/\text{мин}$, достаточную для регистрации спектров с помощью специализированной автоматизированной программы сбора и обработки данных, входящей в комплект данного прибора [17-18].

В работе использовали препараты производства фирмы «REANAL», Венгрия.

Модель для интерпретации низкотемпературных ВИМС/ББА масс-спектров

Модель, необходимая для адекватной интерпретации НТ ББА/ВИМС масс-спектров замороженных растворов, основана на учете гетерогенной морфологии образца, формирующейся вследствие фазового разделения при замораживании, а также фазовых переходов при изменении температуры [4-6, 10]. В самом общем случае, при охлаждении двухкомпонентных водных растворов, в соответствии с фазовой диаграммой данной конкретной системы, образуется структура, состоящая из кристаллитов воды и кристаллов (аморфных зерен) растворенного вещества, соотношение которых зависит от начальной концентрации раствора, а размеры - от режимов замораживания: при концентрации растворенного вещества ниже эвтектической (C_e) в образце будут присутствовать поликристаллический лед и эвтектическая фаза, состоящая из смеси более мелкодисперсных кристаллов льда и растворенного вещества; при концентрации выше C_e будут преобладать кристаллы растворенного вещества плюс эвтектика (заполняющая межкристаллитные пространства). Анализ имеющихся в литературе данных о геометрических размерах структурных элементов таких образцов [27-29] показал, что средние размеры кристаллитов, зерен, межкристаллитных каналов, составляющие 10^{-4} - 10^{-6} м, на несколько порядков больше зоны, возбуждаемой ударом одной бомбардирующей частицы (10^{-8} м) [30]. Именно этот факт весьма важен для интерпретации масс-спектров, поскольку каждый индивидуальный удар частицы будет выбивать ионы из зоны поверхности определенного химического состава, соответствующей индивидуальному веществу. Из этого следует, что суммарный результирующий спектр должен представлять собой суперпозицию спектров, характерных для индивидуальных компонентов системы, и при полном фазовом расслоении смешанные ассоциаты не могут образовываться по чисто стерическим причинам. Это позволяет объяснить отсутствие в спектрах таких образцов смешанных кластерных ионов, принимая во внимание, в частности, тот факт, что вода (лед) не сокристаллизуется (за редкими исключениями) с растворенными веществами [3, 5]. Однако, при замораживании в системе возможно образование новых веществ, например, кристаллогидратов [1-4], в которых «смешение» отдельных компонентов происходит на молекулярном уровне. Регистрация в спектрах смешанных кластеров свидетельствует о появлении в исследуемой системе таких новых веществ; образование гетероассоциатов возможно также в случае гомогенных аморфных образцов и, естественно, жидких растворов.

В контексте данного исследования наибольший интерес представляют гидратные кластеры, поскольку именно они могут служить свидетелями существования связанной воды в конденсированных замороженных образцах и стабильных гидратов в жидкой фазе.

Наряду с зависимостью характера спектров от геометрических (морфологических) параметров образца, метод НТ ББА/ВИМС проявляет чувствительность к различным типам межмолекулярных взаимодействий в образце и его агрегатному состоянию. Для *твердых образцов* можно выделить следующие различия:

- *ионная кристаллическая решетка* - спектры в широком диапазоне положительных и отрицательных температур содержат интенсивные пики катионов (анионов в режиме отрицательных ионов) и наборы кластеров катионов с анионами, примеры - галлоидные соли щелочных металлов [12];

Наблюдение эффектов, связанных с гидратацией ...

- **кристаллическая решетка с ионными и водородными связями** - НТ спектры содержат интенсивные сигналы катионов и ряды интенсивных смешанных кластеров различной стехиометрии; примеры - кристаллогидраты солей, кислот, щелочей (многие из которых существуют в этой форме только при низких температурах) [12];

- **решетка с преобладанием ван-дер-ваальсовых связей** - возможна регистрация спектров, содержащих молекулярные ионы и кластеры, начиная с азотной температуры; примеры - кремнийорганические соединения [23], параформ [14, 19];

- **решетка с водородными связями** - в случае простых неорганических соединений, таких как вода (лед), кластерные спектры регистрируются начиная с азотной температуры [9-13, 26]; органические же соединения являются наиболее сложным случаем, поскольку быстрое загрязнение поверхности продуктами разложения (под воздействием бомбардировки) не позволяет получить удовлетворительные спектры [11, 16, 30].

Жидкая фаза в составе образца может возникать вследствие плавления замороженного образца при его нагреве [14-19] и существовать в температурном интервале, «разрешенном» в соответствии с фазовой диаграммой данной системы при низком давлении [16]. В этом случае регистрируются хорошие интенсивные спектры кластерного типа, по своим параметрам не уступающие спектрам труднолетучих жидкостей при комнатной температуре. Наблюдается зависимость характера спектра от вязкости жидкости; в частности, увеличение вязкости при понижении температуры приводит к ухудшению качества спектра [25]. Примеры - глицерин [10, 25], первичные спирты [14-18, 21-25], формалин [19].

Газовая фаза достаточной плотности при низких температурах и низком давлении в установке может возникать в температурном интервале активной сублимации твердого образца (и испарения жидкости); это достаточно экзотический случай, и ионизация отдельных молекул может проходить по специфическому газофазному ББА механизму; примеры - сублимация воды [11-13] и испарение спиртов [15-18].

Как и любой другой экспериментальный метод, НТ ВИМС имеет свою область применимости и определенные ограничения. Последние связаны, в основном, с условиями эксперимента, такими как высокий вакуум и высокоэнергетичная бомбардировка образца. Условия низкого давления не позволяют проводить прямые корреляции с фазовыми диаграммами, полученными для многих систем в основном при атмосферном давлении, а также приводят к быстрому исчерпанию жидкой фазы и, в ряде случаев, сублимации твердой фазы. Интенсивная бомбардировка приводит к быстрому загрязнению поверхности твердых органических образцов продуктами деструкции как при низких, так и при высоких температурах, что затрудняет получение стабильных спектров [30]. Однако, при правильном учете этих эффектов при планировании эксперимента, методом НТ ББА/ВИМС можно эффективно решать достаточно большое число задач, представляющих криобиологический и криобиофизический интерес.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение гидратных кластерных ионов из жидкой фазы

Образцы в жидком состоянии могут существовать при низком давлении (10^{-5} - 10^{-7} Па), характерном для экспериментальных условий масс-спектрометрического эксперимента, если давление насыщенных паров исследуемой жидкости при данной температуре достаточно мало и, соответственно, скорость испарения невелика. Этим свойством обладает большинство веществ, используемых в качестве ББА матриц при комнатной температуре, наиболее употребительным из которых является глицерин [31]. Область существования жидкой фазы для ряда органических растворителей, легколетучих в нормальных условиях при комнатной температуре и атмосферном давлении, смещается в область более низких давлений при понижении температуры, благодаря чему их можно исследовать в условиях НТ ББА/ВИМС. Это условие, к сожалению, невыполнимо для воды и водного льда: ниже тройной точки для льда характерен фазовый переход непосредственно из твердой в газовую фазу (сублимация), который в условиях данных НТ ББА масс-спектрометрических экспериментов [10-14] завершается полным исчерпанием всего объема льда в образце при $-55 \pm 5^\circ\text{C}$. Следует отметить, что сублимации подвергаются не только относительно крупные кристаллы льда, но и мелкодисперсные кристаллиты из фазы эвтектики, в связи с чем при -55°C соотношение компонентов в образце нарушается и эвтектическая фаза исчезает как таковая. В связи с этим плавление эвтектики в условиях НТ ББА можно наблюдать только для тех образцов, у которых $T_3 < -55^\circ\text{C}$.

НТ ББА масс-спектры для жидкой фазы были зарегистрированы для систем, состоящих из воды и первичных спиртов метанола и этанола [15, 17, 18]. Серию образцов с различным соотношением воды и спирта замораживали со скоростью порядка $200^\circ\text{C}/\text{мин}$ и отогревали со скоростью $3^\circ\text{C}/\text{мин}$ в экспериментах на установке МИ-1201 [15] и $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ на установке VG-ZAB [17]. Примечательно, что характер изменения спектров с температурой был практически одинаков как в экспериментах на двух названных

установках, так и в более ранних работах [21-25], и не зависел от параметров конкретной установки, зарядового состояния и энергии бомбардирующих частиц. Данный факт свидетельствует о том, что ионы во всех экспериментах образуются по одним и тем же механизмам, а изменения в спектрах связаны с физическими процессами в самом образце.

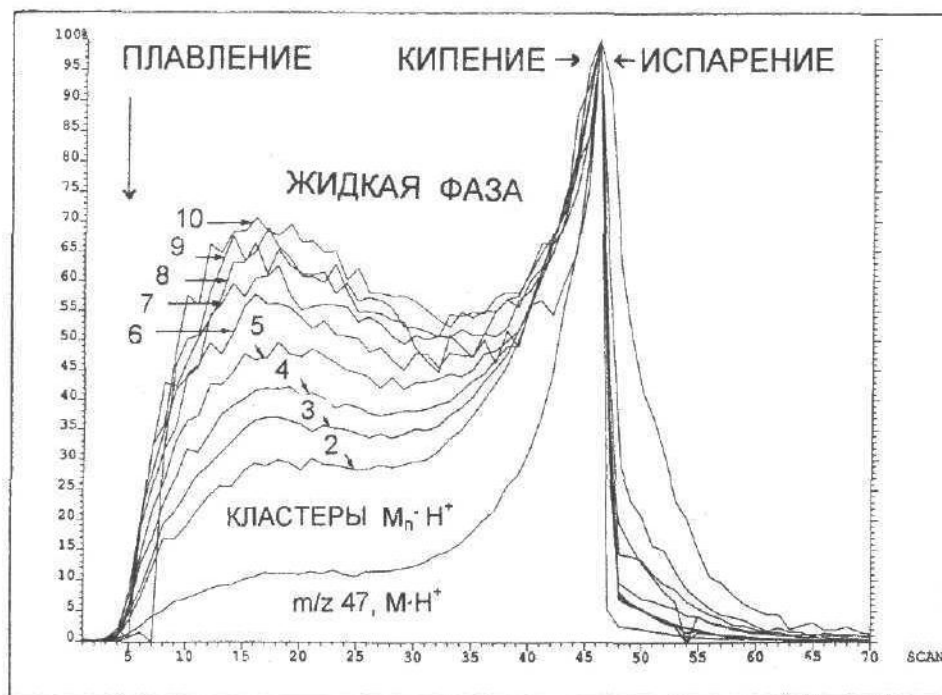


Рис. 1. Ионные термограммы, полученные при нагреве со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ образца замороженного дистиллированного этилового спирта на приборе VG-ZAB (см. пояснения в тексте). Приведены зависимости относительной интенсивности (I) ионных токов, соответствующих кластерам $M_n \cdot H^+$ при $n = 1-10$. Номера сканирования на оси X прямо пропорциональны времени, отсчитываемому от начала измерений и температуре образца; порог появления ионов соответствует примерно -130°C .

На рис. 1 приведены ионные термограммы (представляющие собой зависимость относительной интенсивности данного пика в масс-спектре от температуры образца) ряда ионов в НТ ВИМС масс-спектрах 95% (дистиллированного) этанола, полученные на установке VG-ZAB в режиме нагрева замороженного образца. Ранее в работе [16] были установлены корреляции между фазовыми диаграммами водно-спиртовых смесей и температурными изменениями в масс-спектрах, в соответствии с которыми порог появления кластерных ионов в масс-спектрах совпадает с температурой плавления водно-спиртовой эвтектики T_e , т.е. появлением жидкой фазы в образце. Это заключение позволяет объяснить практически полное отсутствие зависимости характера спектров, зарегистрированных в первые минуты после «порога», от соотношения компонентов в исходном образце, поскольку эти спектры соответствуют одной и той же фазе эвтектического состава. При повышении температуры образца (рис. 1) наблюдается некоторая область стабильного распыления кластерных ионов, в конце которой интенсивность последних заметно возрастает, что можно связать с уменьшением вязкости жидкости и началом ее кипения, затем достигает максимума и резко падает, что может быть обусловлено как исчерпанием всего объема образца, так и сильным переохлаждением его поверхности вследствие бурного испарения [18]. Узкий температурный диапазон существования жидкой фазы не позволяет наблюдать значительного изменения количественного состава жидкости вследствие плавления других компонентов системы. Близкая картина наблюдается и для водно-метанольной смеси [17, 18].

Таким образом, кластерные спектры водно-спиртовых смесей регистрируются только в том температурном диапазоне, в котором образцы находятся в жидком состоянии, и их НТ ББА спектры по своим характеристикам близки к жидкостным спектрам других веществ при комнатной температуре [31]. Отсутствие распыления ионов из замороженных образцов спиртов в твердом состоянии связано с причинами, отмеченными выше для случая соединений, образующих водородные связи. Приведенное обсуждение агрегатного состояния образца необходимо для подтверждения того, что рассматриваемые ниже гидратные кластеры были получены из жидких растворов при низких температурах.

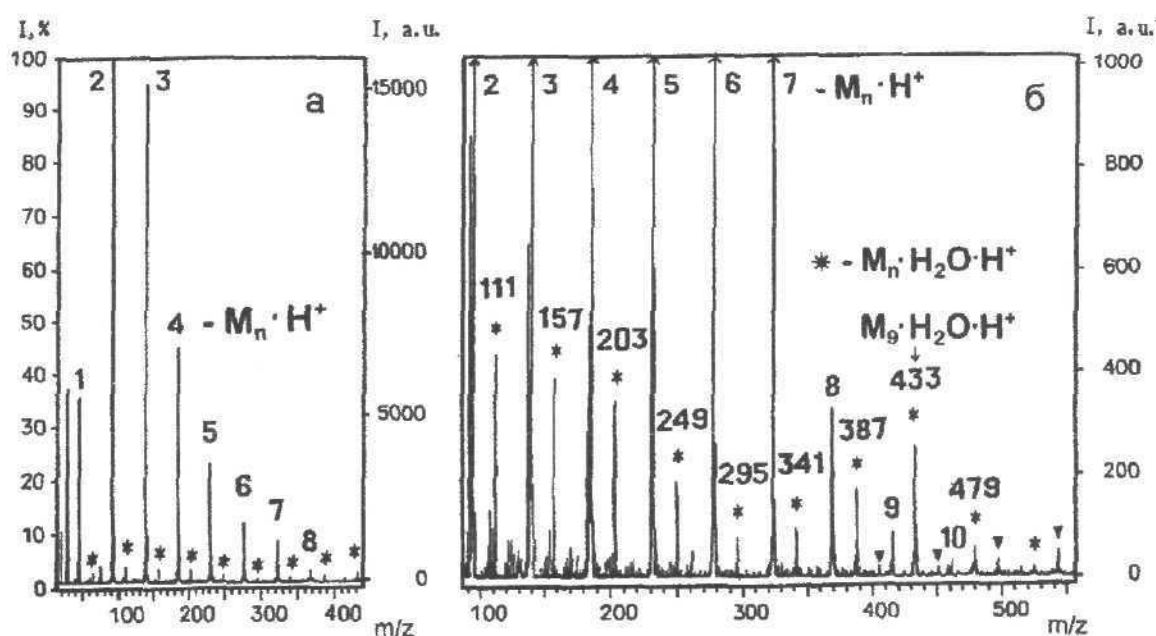


Рис. 2. Участки НТ ББА масс-спектров образца дистиллированного этанола, зарегистрированных на установке МИ-1201Е при температуре -125°C . Бомбардирующий газ - аргон, энергия первичного пучка 4 кэВ. Спектр содержит кластерные серии спирта $M_n \cdot H^+$ и гидратные кластеры $M_n \cdot (H_2O)_m \cdot H^+$ с $m = 1$ (*) и 2 (▼).

На рис. 2 представлены участки НТ ББА масс-спектров водно-этанольной эвтектики, зарегистрированные при температуре -125°C . Известно, что ББА и ВИМС спектры полярных растворителей, характеризуются набором протонированных ионов кластеров или ассоциатов, связанных водородными связями. В спектре на рис. 2, наряду с кластерами $M_n \cdot H^+$, состоящими исключительно из молекул спирта (М), присутствуют также смешанные водно-спиртовые кластеры $M_n \cdot (H_2O)_m \cdot H^+$, что свидетельствует о наличии воды в жидкой фазе при данной столь низкой температуре. Интересно, что распределение (состав и интенсивность) кластеров в НТ ББА масс-спектрах качественно совпадает с распределением, наблюдавшимся ранее другими методами в газофазных экспериментах [32, 33]. Для кластеров $M_n \cdot H^+$ наблюдается практически монотонный спад интенсивности с увеличением n , а для смешанных кластеров распределение носит более сложный характер. Огибающая максимумов пиков в кластерной серии моногидрата $M_n \cdot H_2O \cdot H^+$ имеет колоколообразную форму и распределение достигает максимума при $n = 9$ (m/z 433 на рис. 2), в то время как отношение интенсивности моногидратов (равно как и высших гидратов) к интенсивности кластеров из чистого этанола с тем же числом мономеров $M_{n+1} \cdot H^+$ монотонно возрастает с увеличением n . Пики дигидратов $M_n \cdot (H_2O)_2 \cdot H^+$ становятся заметными в спектре при $n \geq 8$, тригидратов - при $n \geq 10$. Контрольный эксперимент на приборе VG-ZAB с большим массовым диапазоном позволил зарегистрировать гидратные кластеры, содержащие до 5 молекул воды и общей размерностью до 30 мономеров; гидратные серии имели «колоколообразное» распределение интенсивностей, максимум которых смещался в область больших n при увеличении m [17]. Общие качественные тенденции такого распределения соответствуют статистической вероятности включения двух типов частиц, имеющих в системе в определенных концентрациях, в ассоциаты размером $(n+m)$. Оценки величин параметров m и p [17] в гомогенных и смешанных кластерах показали, что молярное содержание воды в образце весьма близко к эвтектической концентрации (составляющей для данной системы 7,5% весовых [34]). Количественные соотношения интенсивностей пиков в сериях кластеров в спектрах, однако, несколько отличаются от соотношений, следующих из равновероятностного статистического распределения, что может быть связано как с существованием некоторых более выгодных структур (стабильных гидратов), так и с рядом особенностей поведения заряженных кластеров в условиях масс-спектрометрического эксперимента (таких как фрагментация и десольватация, различия в сродстве к протону, которые также, в конечном счете, определяются энергетикой межмолекулярных взаимодействий в ассоциатах [32, 33]). Вытекающие из этого количественные оценки в настоящий момент находятся на стадии дальнейшего изучения. В частности, представляется весьма интересным провести корреляции между существованием стабильных гидратов в водно-этанольных растворах и характером НТ ББА масс-спектров. Однако, в случае водно-этанольной смеси выделение эффектов, связанных с образованием стабильных гидратов, осложняется существованием азеотропного раствора, причем азеотропная концентрация этанола (95,5%

[34]) отличается от эвтектической (92,5% [35]) всего на ~2%. Характер испарения водно-этанольной смеси при низких температурах указывает на неизменность ее состава, а именно, соотношение интенсивностей спиртовых и гидратных кластеров не меняется с температурой и их интенсивности достигают максимума в одной и той же точке, указанной на рис. 1. Отметим, что противоположная ситуация, а именно увеличение со временем интенсивности гидратных кластеров вследствие изменения концентрации раствора при неазеотропном кипении, наблюдалась для водно-метанольной смеси [18].

Интересно, что в случае глицерина, несмотря на его высокую гигроскопичность, гидратные кластеры в условиях ББА не были зарегистрированы ни при комнатной, ни при пониженных температурах [10, 25, 31], что коррелирует с отсутствием стабильных гидратов для данного многоатомного спирта в жидкой фазе. В то же время в газовой смеси паров воды и глицерина образование смешанных водородно-связанных ассоциатов наблюдалось при использовании мягкого газовой фазы метода ионизации - ионизации полем [35]. Можно предположить что, поскольку глицерин не образует ни стабильных гидратов, ни азеотропной смеси с водой, то вода, присутствующая в образце, легко испаряется (отгоняется) из жидкости при низком давлении. Подтверждением тому служат данные для системы ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$), также являющейся классическим объектом для изучения стабильных гидратов среди неорганических соединений. В работе [36] при использовании метода ББА при комнатной температуре было показано, что, вне зависимости от начального молярного соотношения H_2O и H_2SO_4 в растворе (которое варьировалось от 0,1 до 11), в спектре наблюдалось одно и то же распределение гидратных кластеров. По всей видимости, в этом случае происходило быстрое испарение воды до определенной равновесной (при данном давлении) концентрации. Для глицерина, как следует из масс-спектров, такая концентрация равна нулю.

Поиск систем, в которых методом масс-спектрометрии можно было бы наблюдать гидраты в жидкой фазе при низких температурах в настоящее время продолжается, и еще одним примером может служить обсуждающийся в следующем разделе раствор олигомеров полиоксиметилена.

Наблюдение сильно связанной воды в конденсированном состоянии

Сильно связанная вода, как известно, это вода, которая остается связанной с биомолекулами при низких температурах и не «вымораживается» в кристаллы льда, растущие при охлаждении и замораживании растворов [1-4, 8]. Одним из вариантов связывания воды является формирование регулярных кристаллогидратов, которые может образовывать ряд органических соединений [1, 2, 4, 6, 7]. При изучении данных объектов методом НТ ББА, однако, возникают заметные осложнения. Во-первых, как отмечалось ранее, твердые органические образцы с водородными связями практически не дают ББА масс-спектров; кроме того, возможно быстрое обезвоживание поверхностных слоев органического кристаллогидрата в условиях низкого давления. Во-вторых, диапазон масс, доступный для изучения методом ББА, ограничивается не столько массовым диапазоном выпускаемых приборов, сколько в принципе достижимой эффективностью распыления больших молекул в ионизированной форме данным способом, и составляет не более 10000 Да [37], что не позволяет изучать природные биополимеры.

Оба эти препятствия, однако, практически отсутствуют для образца специфического состава и структуры, для которого впервые при помощи метода НТ ББА удалось зарегистрировать наличие связанной воды в конденсированном состоянии при низких температурах. Таким объектом явился водный раствор олигомеров полиоксиметилена, образующихся при охлаждении водного раствора формальдегида [38, 39]. Явление полимеризации, качественный и количественный состав олигомеров изучался ранее разными методами [38-40].

При отогреве медленно замороженного на подложке формалина (40% водного раствора формальдегида) наблюдались три стадии эволюции спектров, которые с уверенностью можно связать с физическими процессами в образце. На первой стадии, начиная с азотной температуры, при которой образец находится в твердом состоянии, регистрировался спектр, подобный представленному на рис. 3а. Далее, при отеплении до примерно -20°C (соответствующих T_g [39]), наблюдалось резкое повышение интенсивностей всех пиков, связанное, по всей видимости, с появлением жидкой фазы в образце (рис. 3б). Дальнейшее повышение температуры сопровождалось существенным падением общего ионного тока, вызванным повторным затвердеванием образца вследствие испарения легколетучих компонентов жидкости, однако характерные пики продолжали присутствовать в спектре.

Основные серии пиков в спектрах соответствовали протонированным олигомерам - продуктам конденсации формальдегида - с разными типами терминальных групп и числом мономерных звеньев n в цепи до 9: $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-H}$, $\text{H}-(\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-H}$, $\text{H}-(\text{CH}_2\text{-O})_n\text{-CH}_3$. Названным сериям сопутствовали пики, соответствующие моно- и дигидратам олигомеров, причем они наблюдались как для твердофазного (рис. 3а) так и для жидкого (рис. 3б) состояния образца, но существенно теряли в интенсивности после формирования параформа выше -20°C . Регистрация гидратов в расплавленном образце аналогична ситуации, описанной в предыдущем разделе для водных смесей; в то же время образование ионов гидратных кластеров полиоксиметилена при бомбардировке твердого образца является первым случаем

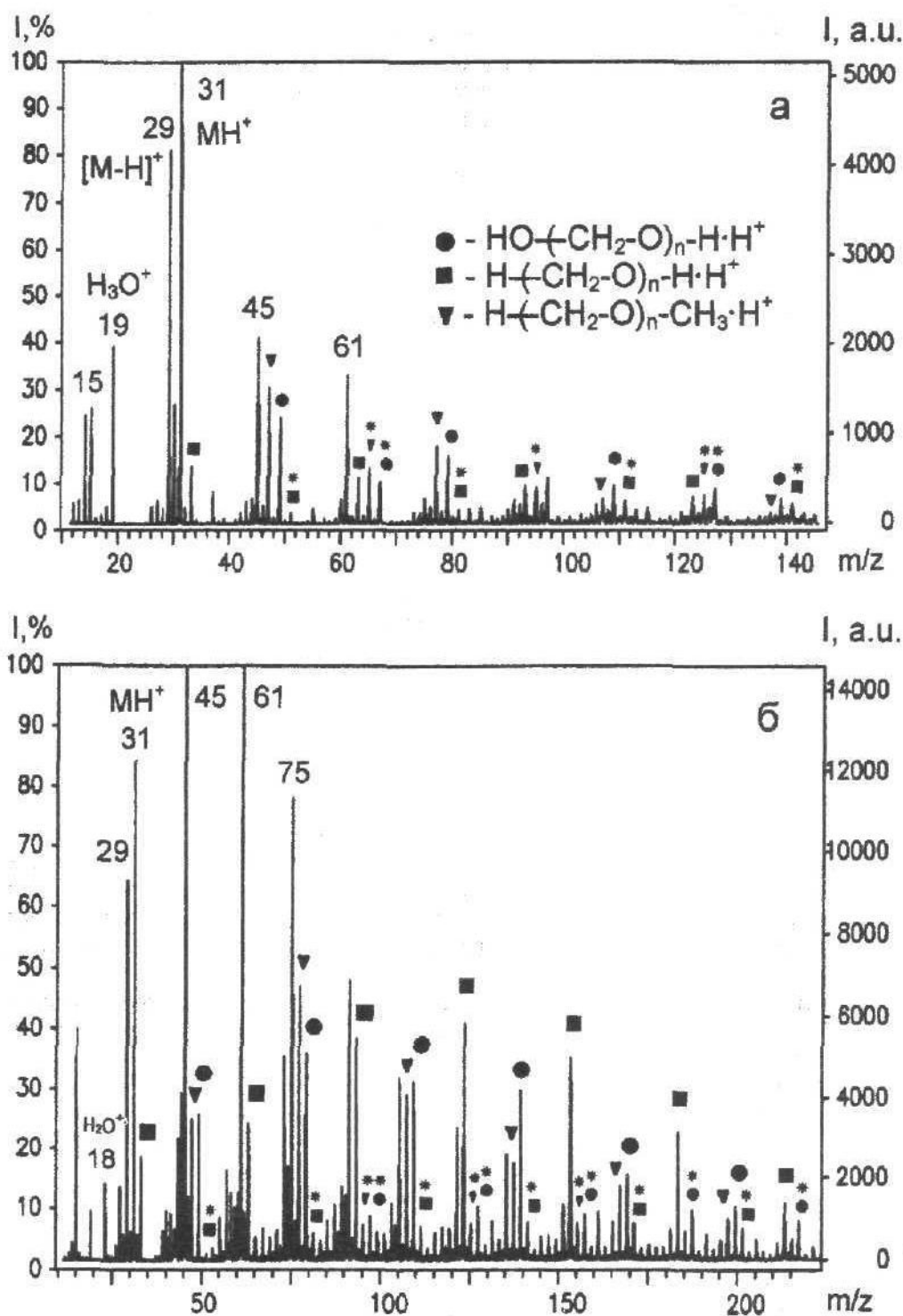


Рис. 3. НТ БА масс-спектры замороженного раствора формалина, зарегистрированные для образца в твердой фазе при $T = -190^\circ\text{C}$ (а) и в жидкой фазе после плавления при $T = -20^\circ\text{C}$ (б).

Пики, соответствующие олигомерам полиметиленоксов с различными терминальными группами, обозначены как $\bullet$, $\blacktriangledown$, $\blacksquare$, гидраты отмечены знаком *.

регистрации сильно связанной воды в замороженных растворах органических соединений посредством методом НТ БА.

Примечательным является сам факт распыления ионов из твердофазных образцов данного типа, которое становится возможным благодаря преобладанию более слабых (в сравнении с водородными связями) ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Молекулы олигомеров полиоксиметилена представляют собой жесткие палочки [41], на периферии которых отсутствуют протонодонорные группы, необходи-

мые для образования водородных связей. В то же время молекулы воды могут образовывать Н-связи как с эфирными кислородами (создавая «сшивки» между цепями), так и с концевыми группами полимеров гликольного типа. Известно, что мономер формальдегида присутствует в растворах в форме гидрата [38-40]; было показано, что образующиеся при полимеризации олигомеры также гидратированы; при замораживании эти гидраты, по всей видимости, сохраняются в твердой фазе.

Отметим, что в НТ ББА масс-спектрах замороженного формалина отсутствуют кластерные серии воды, что указывает на отсутствие в образце сравнительно крупных кристаллов льда. При плавлении образца относительная интенсивность гидратных кластеров не увеличивается. На основании этих двух фактов можно заключить, что практически вся вода при замораживании либо связывается в форме гидратов, либо оказывается захваченной растущей полимерной сеткой (что ограничивает подвижность молекул воды и препятствует образованию крупных кристаллов льда). Именно такие трансформации воды в охлаждаемом растворе и ожидаются от эффективного криопротектора [28, 29]. Однако, полиоксиметилен не может применяться на практике вследствие высокой множественной токсичности его мономера формальдегида; в то же время его ближайший гомолог полиоксиэтилен (в форме полиэтиленгликоля) широко применяется в криопротекции [28, 29]. Таким образом, существуют определенные корреляции между некоторыми параметрами НТ ББА масс-спектров и криопротекторными свойствами раствора, что может быть использовано в дальнейшем для оценки эффективности различных криопротекторов.

Следует упомянуть также о явлении, противоположном гидратации, а именно, дегидратации, которая является одним из повреждающих факторов при замораживании биоматериала. Удаление молекул воды в растущие кристаллы льда уменьшает количество контактов растворенных молекул с растворителем; при полном фазовом расслоении происходит выделение безводной фазы растворенного вещества. Для образцов такого типа, как уже отмечалось выше, невозможно образование смешанных гидратных кластеров, что наблюдалось, например, для замороженных водных растворов азотистых оснований [11]. В то же время из затвердевших аморфно растворов органических молекул в растворителе с криопротекторными свойствами, например, глицерине, возможно распыление «солевых» кластеров [11], что свидетельствует о сохранении водородных связей растворенного вещества с молекулами растворителя в твердой фазе - эффект, важный для сохранения тех конформационных особенностей биомолекул, которые обусловлены их взаимодействием с молекулами растворителя.

Вода, связанная в кристаллогидратах неорганических веществ

Для полноты картины возможностей НТ ББА масс-спектрометрии в изучении свойств связанной воды коротко опишем примеры ее приложения к исследованию неорганических кристаллогидратов, в частности, криогидратов солей. Данные объекты также имеют отношение к проблемам криопротекции, поскольку все биологические жидкости представляют собой солевые растворы, и неорганические компоненты также оказывают влияние на структуру замораживаемого образца.

Были изучены водные растворы NaCl [12] как основного солевого компонента физиологических жидкостей. Для серии растворов разных концентраций наблюдалось хорошее соответствие между структурой образца, определяемой фазовой диаграммой данной системы, фазовыми переходами при повышении температуры и характером НТ ББА масс-спектров. При охлаждении системы в ходе перитектической реакции ($T_n = +0,15^\circ\text{C}$, $C_n = 26,8\%$ [42]) образуется новое соединение - кристаллогидрат $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Замороженный образец содержит кристаллы льда и кристаллогидрата (соотношение и морфология которых зависят от начальной концентрации) и, в полном соответствии с моделью формирования НТ ББА масс-спектров, его спектр (рис. 4а) представляет собой суперпозицию серии кластеров воды $(\text{H}_2\text{O}) \cdot \text{H}^+$, распыляемых из кристаллитов льда и ряда ионов, связанных с фазой $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Na^+ , $(\text{NaCl})_m \cdot \text{Na}^+$ ($m = 1-3$), $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{Na}^+$ ($n = 1-4$), $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot (\text{NaCl})_m \cdot \text{Na}^+$ ($n, m = 1, 2$) [12].

С повышением температуры в системе наблюдаются два типа фазовых переходов: сублимация кристаллов льда (фактически, сублимационная сушка образца) и обезвоживание кристаллогидрата. При этом наблюдать плавление эвтектики не представляется возможным, поскольку $T_e = -21,2^\circ\text{C}$ [42] лежит выше температуры сублимации льда в данных условиях. Соответствие гидратных кластеров фазе кристаллогидрата однозначно доказывается тем фактом, что после полной сублимации чистого льда и исчезновения из спектра кластерной серии воды смешанные гидратные кластеры продолжают присутствовать в спектре (рис. 4 б) и их абсолютная интенсивность понижается при последующем повышении температуры за счет обезвоживания поверхности кристаллогидрата. Смешанный тип водородных и ионных связей в неорганическом кристаллогидрате способствует достаточно интенсивному распылению кластерных ионов; фазовый переход от кристаллогидрата к безводной соли при положительных температурах, сопровождающийся структурной перестройкой кристаллической решетки в чисто ионную, приводит к падению абсолютной интенсивности кластеров $(\text{NaCl})_m \cdot \text{Na}^+$.

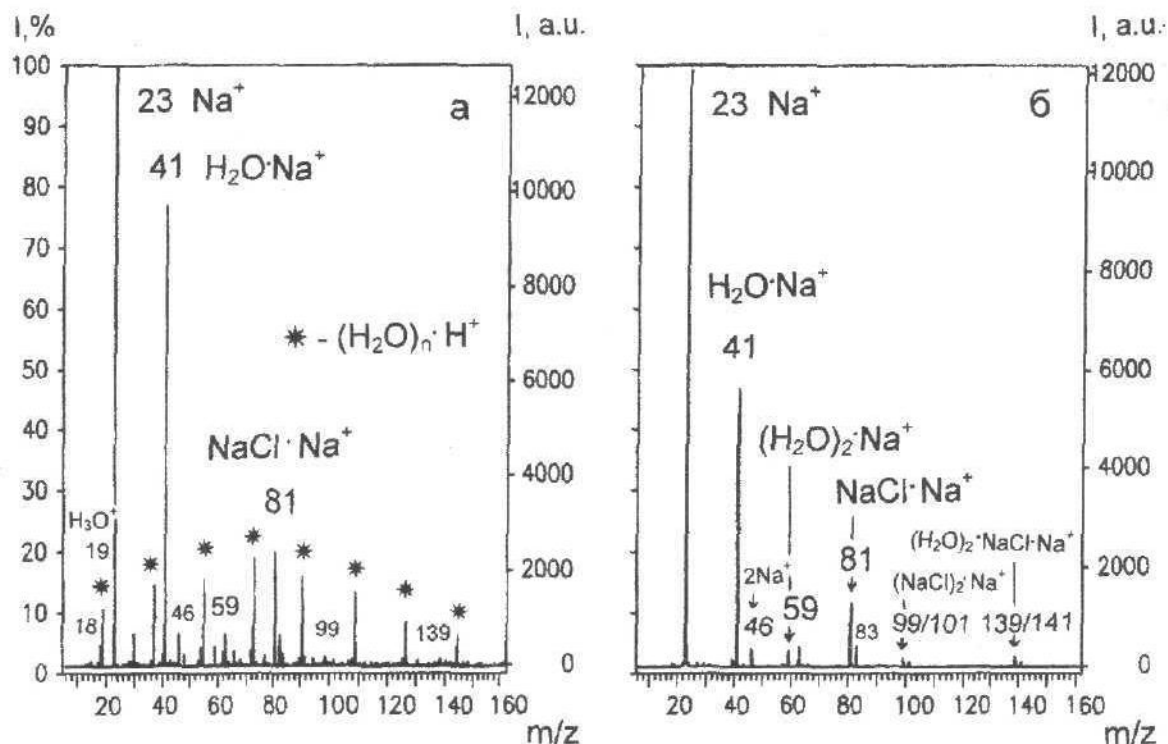


Рис. 4. НТ ББА масс-спектры замороженного 23% водного раствора NaCl. (а) $T = -175^{\circ}\text{C}$, образец содержит кристаллы льда, из которых распыляются кластеры воды $(\text{H}_2\text{O})_n \cdot \text{H}^+$ (*), и кристаллогидрат $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в составе эвтектической фазы; (б) $T = -50^{\circ}\text{C}$, спектр соответствует фазе чистого кристаллогидрата, оставшегося после завершения сублимации воды из кристаллов льда.

Гидратные кластеры наблюдались и для водных растворов ряда других солей, образующих кристаллогидраты при низких температурах. Данная информация необходима для выделения ионов, относящихся к солям металлов, в НТ ББА масс-спектрах более сложных многокомпонентных растворах биомолекул. Отметим, что в плане криопротекции связывание части воды в составе кристаллогидратов, с одной стороны, уменьшает количество свободной воды, способной образовывать крупные кристаллы льда, а с другой стороны, снижает концентрацию ионов металлов в оставшейся жидкой фазе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный в данной работе анализ ряда результатов, полученных к настоящему времени с помощью метода НТ ББА, позволяет сделать вывод о том, какой круг объектов и явлений, связанных с гидратационными эффектами, можно эффективно изучать этим методом. Можно выделить три типа таких объектов: 1) твердофазные замороженные водные растворы органических веществ, в которых присутствует так называемая сильно связанная вода (пример - раствор олигомеров полиоксиметилена); 2) образцы, содержащие жидкую фазу в некотором интервале экспериментальных условий НТ ББА, в которых могут присутствовать стабильные гидраты (примеры - водно-спиртовые растворы); 3) кристаллогидраты неорганических соединений (примеры - криогидраты солей). Характер НТ ББА масс-спектров этих образцов определяется их агрегатным состоянием, однако общей чертой спектров является наличие в них интенсивных гидратных кластеров органического или неорганического компонента раствора. Распределение гидратных кластеров несет качественную и, в определенных пределах, количественную информацию о состоянии гидратной воды в образце. В случае полного фазового разделения при замораживании водного раствора гидратные кластеры не наблюдаются.

Область применения метода получения ионов с помощью ББА ограничена сравнительно низкомолекулярными соединениями. Можно ожидать, что более мощные, в сравнении с ББА, методы ионизации, такие как матричная лазерная десорбция, позволят в недалеком будущем зарегистрировать стабильные гидраты более крупных биомолекул, в частности, белков и пептидов. Экспериментальные приемы получения низкотемпературных масс-спектров, накопленные в работах с использованием ББА, и модель для интерпретации спектров могут быть использованы в таких перспективных исследованиях.

Благодарности. Часть результатов, приведенных в работе, получена в исследованиях в рамках гранта INTAS-96-0865 и программы межакадемического обмена между Украинской и Венгерской академиями наук. Автор выражает благодарность коллегам Боряку О.А., Шелковскому В.С., Орлову В.В., Благому Ю.П. за поддержку в работе, а также профессору К. Векею (Венгрия) за любезно предоставленную возможность проведения ряда измерений на оборудовании в его масс-спектрометрической лаборатории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bernal J.D. // J.Chim. Phys. et Phys.-Chim. Biol. 1953. V. 50. P. C1.
2. Franks F. Water - A Comprehensive Treatise, Vol. 2. Water in crystalline hydrates. Aqueous Solutions of simple nonelectrolytes. New York. Plenum Press, 1973. 690 p.
3. Франкс Ф. Вода и водные растворы при температуре ниже 0°C. Киев. Наукова Думка, 1985. - 388 с.
4. Franks F. Water science reviews 2. Crystalline hydrates. Cambridge, Cambridge. University Press, 1986.
5. Fletcher N.H. The chemical physics of ice. Cambridge, Cambridge. University Press, 1970. 265 p.
6. Hamilton W.C., Ibers J.A. Hydrogen bonding in solids. New York. W.A.Benjamin Inc., 1968. 280 p.
7. Clark J. Rev. Pure Appl. Chem. 1963. V. 13. P. 50.
8. Габуда С.П. Связанная вода. Факты и гипотезы. Новосибирск. Наука, 1982. 160 с.
9. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С. Приборы и техника эксперим. 1993. №6. С. 176-181.
10. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1995. V. 9. P. 978-984.
11. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Blagoy Yu.P. Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1996. V.10. P. 197-199.
12. Boryak O.A., Stepanov I.O., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Orlov V.V., Blagoy Yu.P. Europ. Mass Spectrom. 1996. V. 2. P. 329-339.
13. Kosevich M.V., Boryak O.A., Stepanov I.O., Shelkovsky V.S., Europ. Mass Spectrom. 1997. V. 3. P. 11-17.
14. Kosevich M.V., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Derrick P.S. Europ. Mass Spectrom. 1998. V. 4. P. 31-37.
15. Boryak O.A., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1977. V. 163. P. 177-184.
16. Kosevich M.V., Europ. Mass Spectrom. 1997. V. 3. P. 320-322.
17. Kosevich M.V., Czira G., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Vekey K., Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997. V. 11. P. 1411-1416.
18. Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Boryak O.A., Czira G., Vekey K. Proc. 16th Inform. Meeting on Mass Spectrom., 4-6 May 1998, Budapest, Hungary, 1998. P. 84-85.
19. Boryak O.A., Limanskaya O.Yu., Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Abstr. 14th Int. Mass Spectrom. Conf., 25-29 Aug., Tampere, Finland, 1997. P. 165.
20. Michl J. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1983. V.53, P. 255-272.
21. Katz R.N., Chaudhary T., Field F.H. J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 108. P. 3897-3903.
22. Katz R.N., Chaudhary T., Field F.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1987. V. 78. P. 85-97.
23. Katz R.N., Field F.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1989. V. 87. P. 95-104.
24. Johnstone R.A.W., Wilby A.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1989. V. 89. P. 249-264.
25. Sunner J., Ikononou M.J., Kebarle P. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1988. V. 82. P. 221-237.
26. Dettler L.D., Hand O.W., Cooks R.G., Walton R.A., Mass Spectrom. Rev. 1988. V. 7. P. 465-502.
27. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А., Строна В.И., Репин Н.В. Влияние криопротекторов на биологические системы. Киев. Наук. Думка, 1989. 240 с.
28. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. М. Высшая школа, 1987. 80 с.
29. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. Киев. Наук. Думка, 1994. 432 с.
30. Cherepin V. Secondary ion mass spectroscopy of solid surfaces. Utrecht. Science Press, 1987. 138 p.
31. De Pauw W.E. Mass Spectrom. Rev. 1986. V. 5. P. 191-212.
32. Stace A.J., Shukla A.K. J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 5314-5318.
33. Karpfs Z., Eiceman G.A., Harden C.S., Ewing R.G. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993. V. 4. P. 507-512.
34. Третьяков Ю.Д., Олейников Н.Н., Можжев А.П. Основы криохимической технологии. М. Высшая школа, 1987. 143 с.
35. Kosevich M.V., Shelkovsky V.S. Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1996. V. 10. P.435-438.
36. Sharp T.R., Futrell J.H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1986. V. 90. P. 39-46.
37. Siuzdak G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego. Academic Press, 1996. 162 p.
38. Walker J.F. Formaldehyde. New York. Am. Chem. Soc. Monogr. Ser., 1953.
39. Огородников С.К. Формальдегид. Ленинград. Химия. 1984. 280 с.
40. Балашов А.Л., Данов С.М., Головкин А.Ю., Краснов В.Л., Пономарев А.Н., Борисова И.А. Журн. прикл. химии. 1996. Т.69. С. 190-192.
41. Вундлерих Б. Физика макромолекул. Кристаллическая структура, морфология, дефекты. М. Мир. 1976. 624 с.
42. Гороневский И.Т., Назаренко Ю.П., Некрасов Е.Ф. Краткий справочник по химии. Киев. Наук. Думка, 1987. 830 с.

СТАБИЛЬНОСТЬ ДИКАТИОНА ДЕКАМЕТОКСИНА ПО ДАННЫМ ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

М.В. Косевич¹, В.А. Пашинская¹, З. Шилаги², К. Векей²,
В.С. Шелковский¹, Ю.П. Благой¹

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

² Центральный институт химии Венгерской Академии наук, Будапешт II, Венгрия
Поступила в редакцию 15 июня 1998г.

Изучена стабильность дикатиона антимикробного препарата декаметоксина в условиях действия различных физических факторов. Обнаружены существенные различия путей трансформации декаметоксина под воздействием повышенной температуры и при длительном хранении. С помощью метода вторично-ионной масс-спектрометрии установлено, что изменение препарата со временем при нарушении режимов хранения связано, по-видимому, с удалением противоионов хлора из кристаллического образца с сохранением структуры дикатиона соли, в то время как при термическом воздействии происходит декватернизация четвертичных азотов декаметоксина с образованием нейтральных аминов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: декаметоксин, вторично-ионная масс-спектрометрия, термическая дегградация.

Изучение стабильности биологически-активных химических соединений является необходимым этапом при разработке новых лекарственных средств; соответствующие методы регламентированы в специализированных изданиях, таких как Государственная фармакопея [1]. Одной из высокочувствительных методик, используемых в этих исследованиях, является масс-спектрометрия. Однако ее применение ограничено в основном чисто аналитическими задачами контроля состава и идентификации продуктов дегградации фармакологических препаратов (проводимых по стандартизированным процедурам [1]).

К настоящему времени разработан ряд масс-спектрометрических методик, различающихся по способам ионизации вещества, основанным на различных физических принципах [2-5]. Эти методики позволяют подвергать химические соединения воздействию облучения, температуры, электрического поля высокой напряженности, бомбардировке высокоэнергетичными частицами непосредственно в условиях масс-спектрометрического эксперимента и дают информацию, которая может дополнить данные, получаемые стандартными фармакопейными методиками.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение направлений дегградации антимикробного препарата декаметоксина под воздействием температуры и при длительном хранении (при нарушении рекомендованных правил хранения). В качестве основного метода исследования использовали вторично-ионную масс-спектрометрию (ВИМС) [6-8]. Данные о стабильности, возможных путях распада препарата и продуктах его дегградации представляют интерес не только для фармакологии, но и для дальнейших биофизических исследований механизмов биологического действия декаметоксина и его межмолекулярных взаимодействий с молекулами-мишенями в клетках бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВИМС измерения проводили с использованием масс-спектрометра с двойной фокусировкой VG-ZAB-SEQ («Micromass», Великобритания). Первичный источник ионов обеспечивал формирование первичного бомбардирующего пучка ионов Cs^+ с энергией 30 кэВ. Ускоряющий потенциал в источнике вторичных ионов составлял 8 кВ.

Образцы растворяли в жидких матрицах - глицерине или нитробензиловом спирте - и вводили во вторичный источник в виде капли объемом 10 мкл посредством штока системы прямого ввода.

В работе использовали препарат декаметоксина, синтезированный в Институте органической химии НАН Украины (Киев). Известно, что декаметоксин отличается повышенной чувствительностью к воздействию света, в связи с чем рекомендуется хранить чистый препарат в посуде из темного стекла [9]. Принадлежность к классу солей (бис)четвертичного аммония обуславливает свойство декаметоксина разлагаться под воздействием высокой температуры путем деалкилирования.

Препарат подвергался воздействиям по следующим трем методам:

- (I) хранение в течение 3-х лет с соблюдением правил, рекомендованных фармакопеей [1], а именно, в сосуде из темного стекла в холодильнике;
- (II) хранение в течение 2-х лет в прозрачном (светлом) пластмассовом сосуде в холодильнике;
- (III) бомбардировка ионами Cs^+ в глицериновом растворе непосредственно в условиях масс-спектрометрического эксперимента в течение 40 минут.

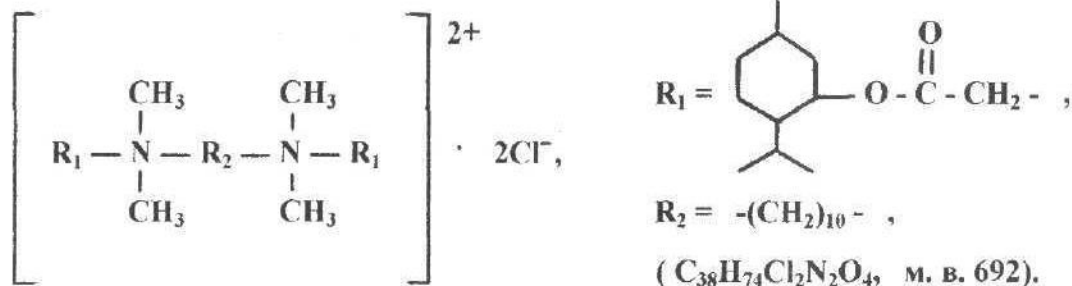
В двух первых случаях контрольные ВИМС масс-спектры снимались с периодичностью в один год. В третьем случае в течение 40 минут проводили сканирование спектров с периодичностью в 10 секунд, результаты которого регистрировали в виде ионных хроматограмм с помощью специального пакета программ компьютерной обработки масс-спектрометрических данных. Ионная хроматограмма представляет собой зависимость интенсивности пика конкретного иона в масс-спектре от времени (отсчитываемого обычно от момента начала бомбардировки образца). Суммирование интенсивностей всех пиков спектра дает величину полного ионного тока (ПИТ). Программа обеспечивает возможность просмотра спектров, относящихся к любой точке ионной хроматограммы.

Использованный прибор обеспечивает высокую точность и воспроизводимость экспериментальных условий, что гарантирует возможность сравнения данных, полученных с интервалом в несколько лет.

Для систематизации путей термического разложения были привлечены данные, полученные с использованием масс-спектрометрической методики с ионизацией электронным ударом (ЭУ). Методика измерений, проводившихся с помощью магнитного масс-спектрометра МИ-1201Б (ПО «Электрон», Сумы, Украина) описана в [10]: кристаллический образец декаметоксина подвергался нагреву в стеклянной ампуле-испарителе до температуры $90^\circ C$; газообразные продукты разложения ионизировали электронами с энергией 70 эВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура молекулы декаметоксина может быть представлена как



В нижеследующих формулах принято обозначение органического дикатиона декаметоксина как M^{++} .

При хранении кристаллического препарата декаметоксина в течение 3-х лет с соблюдением рекомендованных условий (метод (I)) масс-спектры ВИМС, регистрировавшиеся с периодичностью в 1 год, совпадали качественно и количественно и имели вид, представленный на Рис. 1 а. Данный факт свидетельствует о высокой стабильности препарата декаметоксина.

ВИМС масс-спектры препарата, хранившегося с нарушением условий (метод (II)), и зарегистрированные через 1 и 2 года, представлены на Рис. 1 б, в, соответственно. Сравнение Рис. 1 а, б и в позволяет заметить количественные изменения в распределении интенсивности ряда пиков, увеличивающиеся со временем, что указывает на постепенную деградацию исходного препарата.

На Рис. 2 приведена зависимость ПИТ для ВИМС масс-спектров раствора декаметоксина в глицерине, полученных при непрерывной бомбардировке образца ионами Cs^+ в течение 40 минут (метод (III)). Из данного графика следует, что наиболее стабильное распыление ионов происходит в интервале 5–15 минут после начала бомбардировки образца; далее наблюдается монотонное падение ПИТ.

На Рис. 3 а-в представлены ВИМС спектры, зарегистрированные через 10, 25 и 35 минут после начала бомбардировки (см. Рис. 2). Спектр на Рис. 3 а количественно совпадает со спектром на Рис. 1 а, полученным для другого образца через 5 минут после начала измерений, что свидетельствует о хорошей воспроизводимости спектров и их стабильности в первые 10–15 минут (достаточных для проведения качественного и количественного анализа чистого препарата). При дальнейшем увеличении времени экспозиции становится заметной деградация образца, причины и направления которой будут обсуждаться ниже.

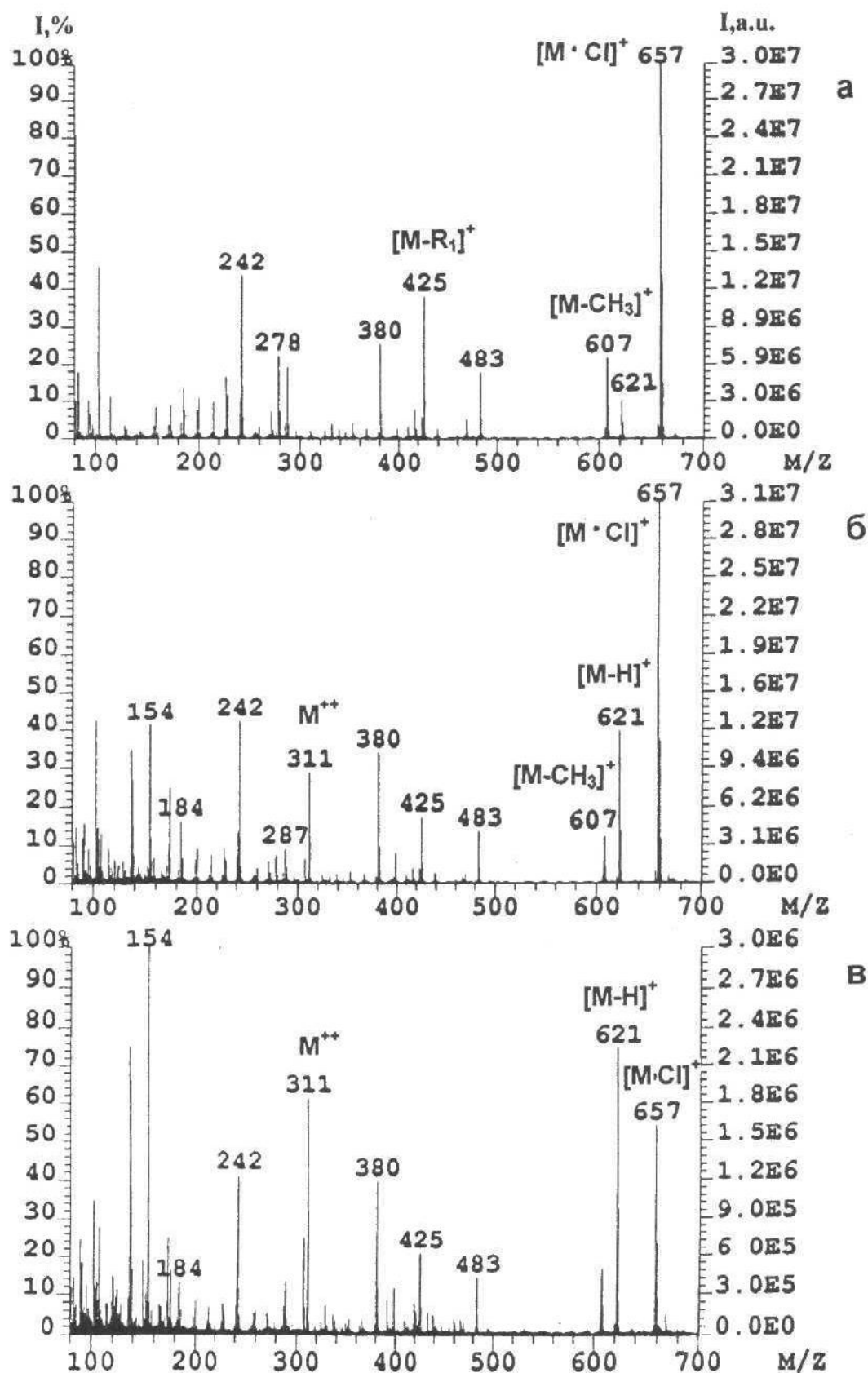


Рис. 1 Масс-спектры ВИМС препарата декаметоксина, хранившегося в течение трех лет соблюдением правил хранения (а) и при нарушении этих правил (см. «Материалы и методы») в течение одного года (б) и двух лет (в).

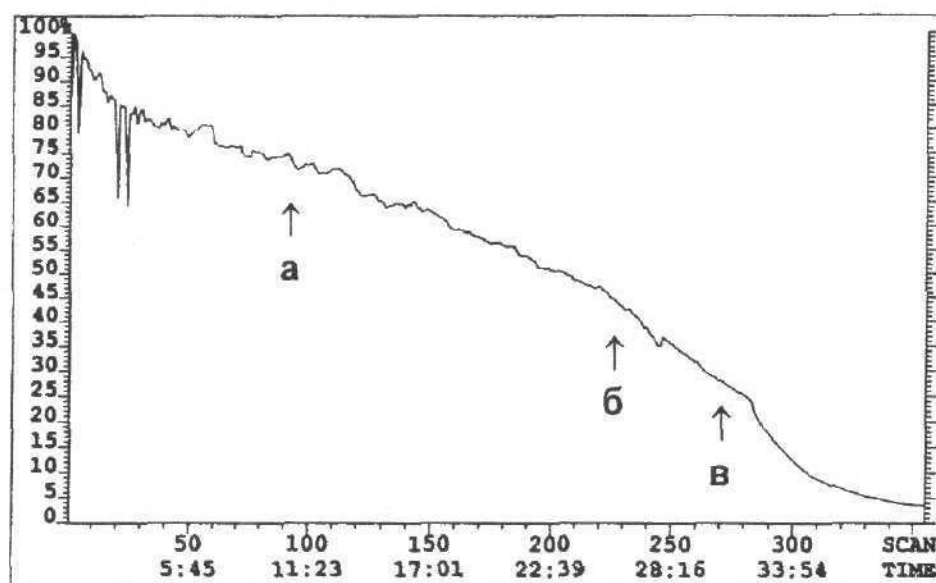
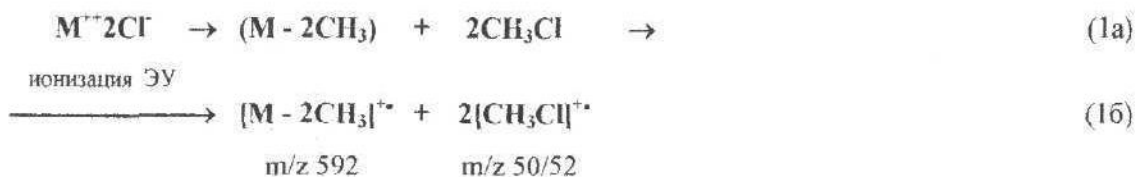


Рис. 2 Зависимость полного ионного тока ВИМС масс-спектров глициринового раствора декаметоксина от времени облучения образца ионами Cs^+ . Стрелками отмечены точки, которым соответствуют спектры, приведенные на Рис. 3 а, б, в.

Следует отметить, что декаметоксин является поверхностно-активным веществом, что находит отражение в его жидкостных ВИМС спектрах в форме полного подавления ионов, соответствующих использовавшимся жидким матрицам [8].

Распыление ионов из жидкой матрицы в методе ВИМС обеспечивает достаточно мягкие условия ионизации и образование молекулярных и квазимолекулярных ионов исследуемых веществ [6-8]. ВИМС, как и другие десорбционные методы, отличается высокой селективностью к так называемым «готовым» ионам. Однозарядный комплекс дикатона с противоионом хлора $[\text{M} \cdot \text{Cl}]^+$, m/z 657, является квазимолекулярным ионом декаметоксина. Он обладает наибольшей интенсивностью в спектре исходного препарата; большинство менее интенсивных пиков в спектре относятся к его фрагментам (Рис. 1 а, 3 а). Высокая интенсивность квазимолекулярного иона свидетельствует о заметной стабильности молекулы декаметоксина в условиях ВИМС.

Перейдем теперь к рассмотрению возможных путей деградации декаметоксина. Известно, что класс солей четвертичного аммония, к которому относится декаметоксин, отличается термической нестабильностью. Основные направления термодегradации соединений данного класса связаны с так называемой декватернизацией: превращением четвертичного аммония в третичный амин путем деалкилирования с элиминированием галогеналкила [4, 5, 11]. Продукты термодеструкции обладают высокой летучестью, могут быть легко переведены в газовую фазу и зарегистрированы с помощью газожидкостного метода ионизации, например ЭУ. При нагреве кристаллического образца декаметоксина до 90°C такими продуктами являются [10]:



Отщепление наименьшего алкильного радикала является наиболее выгодным процессом [11], однако возможно деалкилирование с отрывом R_1 и R_2 радикалов. Отметим, что в данном случае наблюдается полная декватернизация двух четвертичных групп.

Специфические особенности метода ВИМС позволяют наблюдать термодегradацию препарата в растворе (жидкой матрице). К настоящему времени механизмы образования ионов в жидкостном ВИМС изучены достаточно полно [6-8]; известно, что в зоне удара бомбардирующей частицы в матрице

Стабильность дикатиона декаметоксина ...

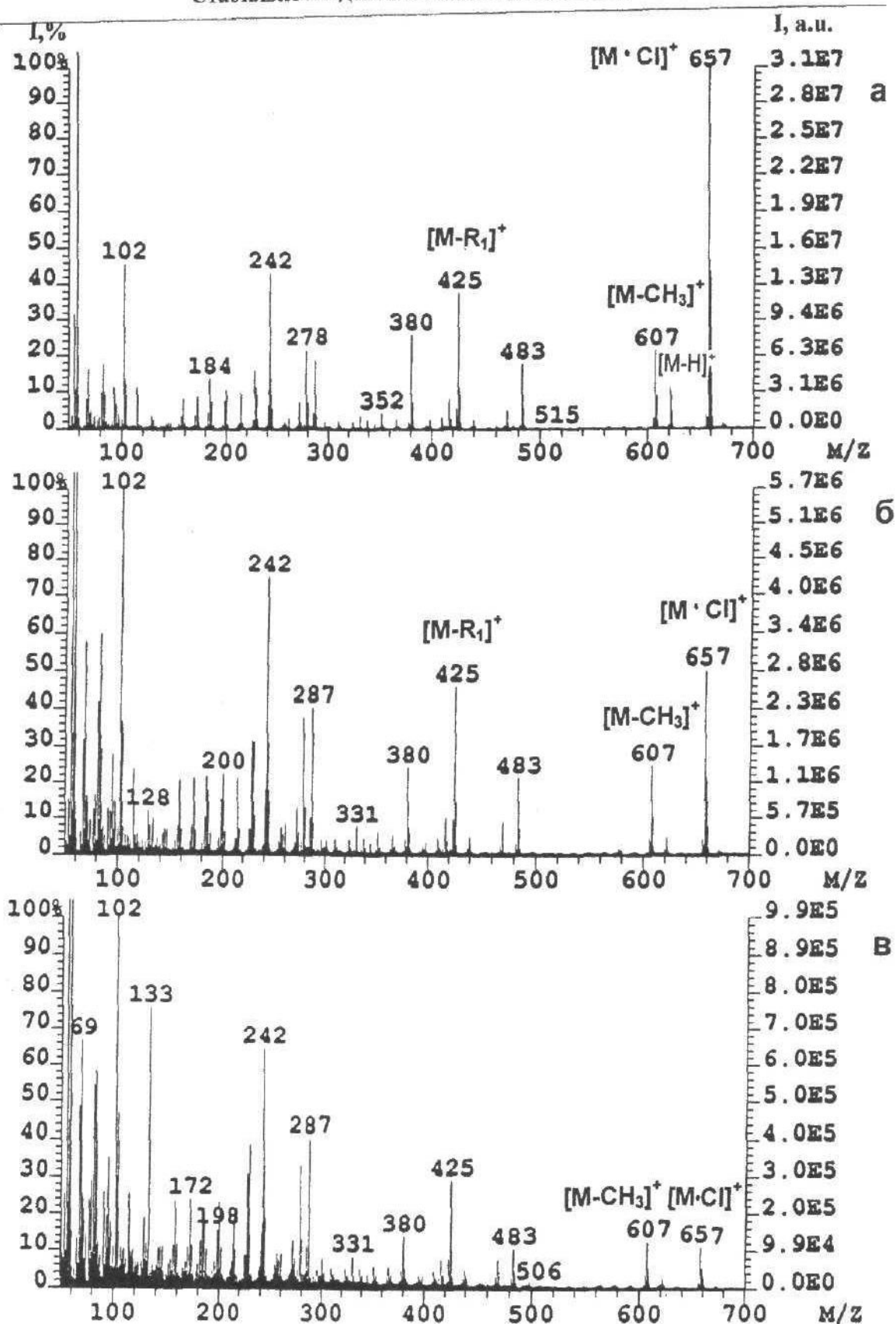


Рис. 3 ВИМС масс-спектры раствора декаметоксина в глицерине, соответствующие трем точкам ионной хроматограммы, приведенной на рис.2, и зарегистрированные через а) 10 мин.; б) 25 мин.; в) 35 мин. после начала бомбардировки образца ионами Cs^+ .

образуется так называемое горячее пятно [6], в котором значительная часть кинетической энергии первичного иона трансформируется в энергию термического возбуждения образца. Однако лишь небольшой процент молекул из этой зоны переходит из матрицы в газовую фазу в виде молекулярных ионов [8]; часть молекул разлагается за счет теплового воздействия и некоторых других процессов, индуцированных бомбардировкой. Продукты разложения, как правило, сублимируют с поверхности в нейтральном состоянии или диффундируют вглубь матрицы и не загрязняют спектр [6]. В случае поверхностно-активных веществ продукты термодеградации могут накапливаться в поверхностном слое.

Продукты, образовавшиеся на локальном участке (пятне диаметром около 10 нм) поверхности, могут быть распылены как индивидуальные вещества при попадании в ту же зону следующей бомбардирующей частицы. Теоретические оценки показывают, что при плотности ионного потока порядка 10^{-4} ионов/сек $\cdot$ нм² такое событие (повторный удар) происходит примерно через 8 минут [3]. Это означает, что в первый десяток минут после начала бомбардировки ионы распыляются преимущественно с неповрежденных участков поверхности и соответствуют чистому исследуемому веществу. При превышении этого временного лимита в спектре должны появляться продукты реакций индуцируемых бомбардировкой, что хорошо согласуется с данными, полученными в настоящей работе для декаметоксина (Рис. 3 б). Дальнейшее увеличение времени бомбардировки приводит к увеличению концентрации продуктов разложения на поверхности (Рис. 3 в). Следует отметить, что термическое возбуждение микроскопической зоны образца является наиболее весомым следствием взаимодействия бомбардирующей частицы с образцом, что позволяет делать, по крайней мере, качественные выводы о путях термодеградации исследуемого вещества в растворе.

Как было указано выше, одним из основных направлений термодеградации солей аммония является декватернизация. Для бисчетвертичных соединений полная декватернизация проходит по реакции (1а), однако ее нейтральные продукты не подвергаются реионизации в условиях ВИМС и в спектрах не регистрируются. В случае декаметоксина достаточно большое расстояние между двумя четвертичными азотами позволяет последним реагировать на локальное термическое воздействие отдельно и независимо, т. е. декватернизация может подвергаться только один из четвертичных азотов. Сохранение заряда на втором азоте обеспечивает возможность регистрации таких «готовых» ионов методом ВИМС (заметим, что моночетвертичная соль также обладает поверхностно-активными свойствами). В принципе, возможны три основных пути декватернизации (в горячем пятне) с отщеплением трех углеводородных радикалов (CH_3 , R_1 , R_2) в комплексе с Cl^- (реакции типа (а)), ионные продукты которых распыляются при повторном попадании бомбардирующей частицы в поврежденную зону (реакции типа (б)):



На Рис. 4 приведены кривые, иллюстрирующие временные зависимости изменения интенсивности ряда пиков в масс-спектрах, соответствующих некоторым продуктам термодеградации. Степень увеличения интенсивности иона с $\text{m/z } 242$ со временем наиболее высока в сравнении с другими ионами (Рис. 3, 4), поскольку в его образование может вносить вклад не только реакция (4 б), но и продукты фрагментации других ионов, проходящей посредством разрыва связи $\text{N}-\text{R}_2$, сопровождающегося переносом водорода [11].

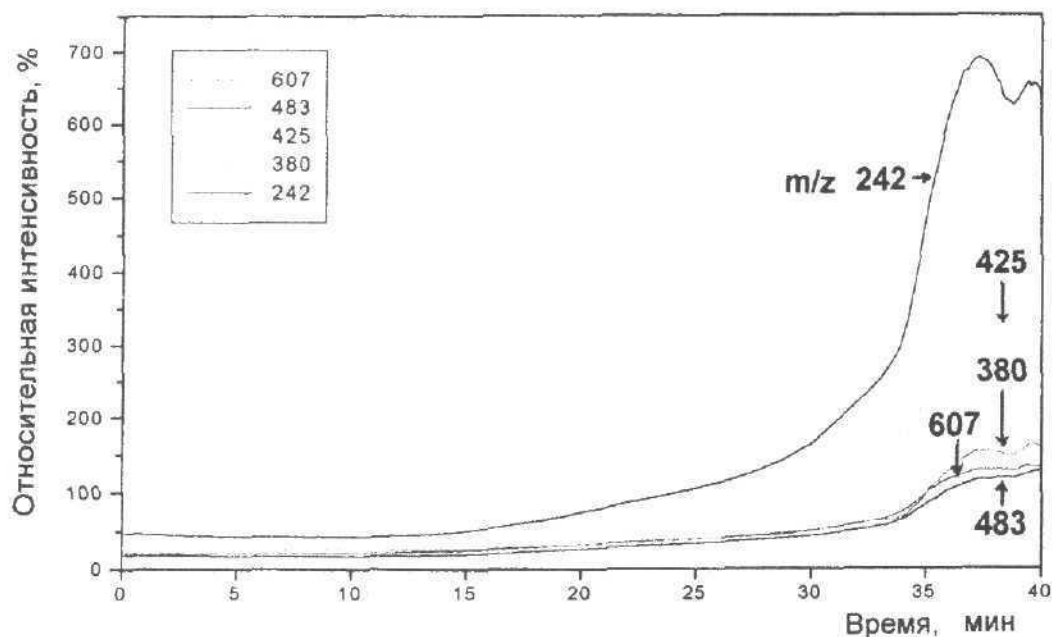


Рис. 4 Зависимость относительной интенсивности (определяемой как отношение интенсивности пика данного иона к интенсивности пика квазимолекулярного иона $[M \cdot Cl]^+$) ряда ионов в спектрах ВИМС, соответствующих продуктам термодегградации декаметоксина, от времени бомбардировки его раствора в глицерине ионами Cs^+ .

Следует отметить, что ионы с m/z 607, 425, а также m/z 416/418 присутствуют и в спектрах чистого (неповрежденного) препарата (Рис. 1 а, 2 а); в этих спектрах они соответствуют фрагментам, образующимся при распаде квазимолекулярного иона $M^{++}Cl^-$ в газовой фазе по путям, совпадающим с путями термодегградации:



Таким образом, названные пики представляют собой суперпозицию ионов, относящихся к продуктам фрагментации (интенсивность которых, как следует из Рис. 4, практически постоянна в первые 15-20 минут) и продуктам термической дегградации; вклад последних и определяет увеличение интенсивности данных пиков со временем (Рис. 4).

Что касается препарата, хранившегося в неправильных условиях, то в его спектрах (Рис. 1 б) также наблюдается заметное возрастание интенсивности ряда пиков (по сравнению со спектром исходного препарата, Рис. 3 а). Однако тип соответствующих им ионов качественно отличается от ионов, вклад которых увеличивается при термической обработке препарата. Эти пики соответствуют двухзарядному дикатиону M^{++} , m/z 311, и продукту $[M-H]^+$, m/z 621. Характер этих пиков позволяет предположить, что при длительном хранении противоионы хлора неким путем (механизмы которого требуют дальнейшего изучения) удаляются из кристаллического препарата. При растворении в матрице и последующих процессах, индуцированных ВИМС, в матрице наблюдается недостаток противоионов для комплексообразования, что приводит к увеличению интенсивности пика интактного дикатиона M^{++} . Можно предположить, что элиминирование HCl (в процессе хранения) дает однозарядный продукт $[M-H]^+$. Большинство других пиков в спектрах на Рис. 3 б, в соответствии с фрагментами, качественно совпадающим с наблюдаемыми в спектре исходного препарата (Рис. 3 а). Заметно также увеличение интенсивности ряда пиков в области малых масс, свидетельствующих о более глубоких превращениях первичных продуктов. Сохранение структуры дикатиона даже при удалении противоионов хлора можно рассматривать как положительный факт в плане стабильности препарата, поскольку биологическое

антибактериальное и фунгицидное действие декаметоксина обусловлено наличием в структуре его молекулы четвертичных азотов.

Интересно отметить, что во многих случаях хранение термически нестабильных препаратов при пониженной температуре лишь замедляет ход реакций разложения, но не меняет их направления. В описанном в данной работе случае при хранении декаметоксина при пониженной температуре (но с нарушением других условий) обнаружено нарушение стехиометрии состава соли и изменения, качественно отличающиеся от термодеструкции. Можно предположить, что разложение в данном случае происходило под влиянием света (попадавшего на препарат в ограниченных количествах при открытии холодильника) или при взаимодействии препарата с материалом пластмассового сосуда. Установление природы этих реакций требует дальнейших дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

Проведенные в настоящей работе исследования показывают, что препарат декаметоксина характеризуется достаточно высокой стабильностью. Отсутствие качественных и количественных изменений в ВИС масс-спектрах декаметоксина, периодически снимавшихся в течение трех лет, указывает на практическое отсутствие деградации препарата при соблюдении рекомендованных условий его хранения. Данные масс-спектрометрии с ЭУ позволяют установить летучие продукты разложения кристаллического препарата декаметоксина при нагреве, которые представляют собой третичные амины и хлорметил, образующиеся в реакции декватернизации четвертичной соли. Использование эффекта локального разогрева поверхности матрицы при бомбардировке ее ускоренными частицами в условиях жидкостного ВИС позволяет проследить динамику термодегradации препарата в растворе. В отличие от кристаллического образца, в растворе возможно частичное разложение бисчетвертичного соединения, а именно декватернизация одного из двух четвертичных азотов. Достаточно неожиданным оказался обнаруженный характер деградации препарата при нарушении режимов его хранения: значительное повышение интенсивности пика дикатиона в ВИС спектрах указывает на изменение стехиометрии соли за счет уменьшения содержания противоионов хлора в кристаллическом образце; структура дикатиона, однако, не претерпевает при этом заметной модификации. Таким образом, пути термической деградации декаметоксина и пути его разложения при неправильном хранении качественно различаются. Высокая стабильность квазимолекулярного иона декаметоксина в условиях ВИС позволяет использовать этот метод в дальнейших исследованиях невалентных взаимодействий декаметоксина с его мишенями в бактериальных клетках и идентификации его супрамолекулярных комплексов с биомолекулами.

БЛАГОДАРНОСТИ: Проведение данных исследований стало возможным благодаря межакадемической программе научного обмена между Украинской и Венгерской Национальными Академиями наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР, 11-е изд., доп. М. Медицина, 1987. 336 с.
2. Siuzdak G. Mass Spectrometry for Biotechnology. New York: Academic Press, 1996. 161 p.
3. Галль Л.Н., Туркина М.Я. // Успехи химии. 1985. Т. 54. С. 741-764
4. Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. М. Химия, 1986. 312 с.
5. Терентьев П.Б., Станкявичус А.П. Масс-спектрометрия биологически активных азотистых оснований. Вильнюс. Моклас, 1987. 280 с.
6. Танцырев Г.Д., Баранов Ю.Ф. В сб.: Поверхностные методы ионизации в масс-спектрометрии. Уфа. БФАН СССР. 1986. С. 44-57
7. Покровский В.А., Мосин В.Б. // Теорет. и эксперим. химия. 1987. № 1. С. 62-78.
8. Benninghoven A. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1983. V.53. P. 85-99.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - 8-е изд. М. 1978. Ч.2
10. Суходуб Л.Ф., Косевич М.В., Шелковский В.С., Волянский Ю.Л. // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т.34. С. 823-827
11. Veith Y.J. // Mass Spectrom. Rev. 1983. V.2. P. 419-446.

SURFACE DIFFUSION OF BOUND WATER IN HYDRATE SURROUNDINGS OF DNA

K.M. Virnik, M.Ye. Tolstorukov*, and V.Ya. Maleev

*Biophysics Division, Institute of Radiophysics and Electronics, Ak. Proskura St. 12, Kharkov 310085, Ukraine
(e-mail: virnik@ire.kharkov.ua).*

**Chair of Molecular and Applied Biophysics, Kharkov State University, Svobody Sq. 4, Kharkov 310077, Ukraine
(e-mail: tolstor@ktu.kharkov.ua).*

Received October 29, 1998

Diffusion of water bound to a DNA molecule along its surface has been studied. A lattice model has been proposed to describe this process. The DNA sorbing surface has been considered as a fractal one. The values of the water diffusion coefficient, which depend on relative humidity of environment, have been estimated in the framework of the model within each interval of the ambient relative humidity where the DNA restores its conformation. They increase monotonously within each interval involved to about $5 \cdot 10^{-11}$, $1.7 \cdot 10^{-10}$ and $3.5 \cdot 10^{-10}$ m²/s for partly disordered form of DNA, A- and B-DNA, respectively. Also, we estimated values of longitudinal diffusion coefficient, i.e. the diffusion directed along the helix axis, which for conformational states considered run into about $9 \cdot 10^{-11}$, $3.8 \cdot 10^{-10}$ and $7 \cdot 10^{-10}$ m²/s. At the highest relative humidities the diffusion coefficient values tend to the values of the water self-diffusion coefficient for DNA solutions. We consider this fact as a result of increasing the number of the water molecules indirectly bound to the DNA binding sites.

KEY WORDS: DNA molecule, water sorption, bound water, surface diffusion, fractal dimension

Ion-hydrate surroundings play a fundamental role in determining a structure and physical properties of a DNA molecule [1-3 and references therein]. Conformational state of a DNA molecule depends strongly on its water content as well as on concentration and type of the counterions [1-5]. Therefore, the problem of studying the properties of the DNA surrounding elements is of great interest. One of the base physical characteristics of interactions between the ion-hydrate shell and the DNA molecule is a water diffusion coefficient near the DNA molecule surface.

Beginning with the work of Wang [6], researchers studied the diffusion process systematically. *In vivo* most often a DNA molecule is in a closely packed and ordered form. This fact caused an interest to investigate the diffusion process in ordered DNA samples both experimentally and theoretically. There have been obtained the diffusion coefficients of counterions and water for macroscopic, i.e. intermolecular, diffusion process (for review see [7] and references therein). As for a water diffusion, data on the diffusion coefficient of bulk water and water in dilute solutions of DNA, in which characteristics of the hydration water are spread, are available [6,8]. Besides, in the work [9] the diffusion coefficients of water molecules in oriented wetted DNA films have been experimentally determined. However, theory of the bound water diffusion in a DNA-water system with a small water content has not been developed enough yet.

This paper is an attempt to stop a gap in this field to some degree. We have carried out estimation of the water diffusion coefficients in the hydrate surroundings of an individual NaDNA molecule for various water contents (in the whole relative humidity (r.h.) range).

THEORY

Molecules adsorbed on a solid surface are in the thermal motion and in the presence of a concentration gradient of an adsorbate phase a diffuse stream against the gradient direction appears. In the present paper a simple model of adsorbed water translational diffusion along a DNA matrix is proposed. As a basis we took the approach described by Frenkel [10] in the kinetic theory of real crystals. As known the theory of such a type is used to describe self-diffusion in liquids and solids. Classic Frenkel-Eyring theory supposes a molecular motion in liquids and real crystals to be a one-particle one, a particle travelling in a potential field spatially periodic and stationary [10]. The motion consists of oscillations near an equilibrium position in the vicinity of the bottom of a potential well and periodic jumps over the barrier to a new equilibrium position. In case of a biopolymer-water system we assume that an application of this theory is possible as a certain approximation due to existence of the distinct water binding sites on the biopolymer surface and a low water content in the system. That is to say "condensed" state of the DNA-water system is studied here.

In order to describe the diffusion process let us consider the polymer matrix as a lattice structure with a period equal to a . In this case migration of water molecules adsorbed is a thermal-activated process due to

energy barriers on the adsorbent surface. The energetic heterogeneity in such a structure arises because of spacing of the matrix elements. Let us assume also that each water molecule adsorbed is disposed in a lattice knot (a binding site) which, in its turn, is situated within a nucleotide. The diffusion process is considered as a process of a water molecule release from one binding site with subsequent occupation of the nearest one by a water molecule. One should note that in the DNA-water system involved there is no bulk water, therefore, a process of exchange with bulk water is not considered.

Let $w=n/N$ be the probability of finding a binding site being occupied by a water molecule, where N is a total number of binding sites in the DNA sample, n is number of the binding sites occupied. Within time interval t a binding site is occupied for time $t_{oc}=wt$ and the number of occupation events M is equal to wt/τ , where τ is the lifetime of a water molecule in the bound state or the duration of an occupation event. Then, $\tau_{tr}=t/M = \tau/w$ is the mean time between release of one binding site and occupation of another one or the time for which a water molecule displacement between the two binding sites equal to a occurs. In other words τ_{tr} is the time between two "collisions" of the water molecule with knots, i.e. the translational time.

The water molecules are assumed to diffuse according to Fick's law. In the case of one-dimensional diffusion one can write down some modified solution of the Fick's diffusion equation, which spatially corresponds to a Gaussian's distribution of squared standard deviation $\sigma^2=2D_1t$ [8]:

$$P(x_0|x, t) = (4\pi D_1 t)^{-1/2} \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{4D_1 t}\right), \quad (1)$$

where parameter D_1 is a diffusion coefficient (for the case of one-dimensional diffusion); $P(x_0|x, t)$ is a probability of finding a molecule at the moment t in the point with coordinate x provided it was in the point x_0 at the zero time. The squared standard deviation σ^2 is equal to the mean square displacement along a single direction of a molecule from its starting point. An analogy with the problem of random walks of a particle can be traced here. Taking into account the fact that the value of the mean square displacement from starting point for time τ_{tr} is fixed (equal to a) and assuming displacements along different directions are statistically independent, we have $\langle x^2 \rangle = a^2 = 2D_1 \tau_{tr}$, i.e.:

$$D_1 = \frac{a^2}{2\tau_{tr}} = \frac{a^2}{2\tau} w \quad (2)$$

By analogy with the case of one-dimensional diffusion the diffusion coefficients of two- and three-dimensional diffusion can be obtained. They are expressed as $D_2=a^2/4\tau_{tr}$ and $D_3=a^2/6\tau_{tr}$, respectively. The diffusion coefficients for the different dimension problems are seen to differ only with a numerical factor. It is obvious this factor is equal to $1/2d$, where d is a dimension of the diffuse problem. Thus, in a general case we have:

$$D = \frac{a^2}{2d\tau} w. \quad (3)$$

Therefore, in consideration of the diffusion process of bound water along the DNA surface a question of DNA molecule dimension arises. To assume the diffusion involved as a two-dimensional one is incorrect since the DNA molecule is known to have a very complicated structure of its surface. In connection with this fact it is necessary to note that surfaces of the most sorbents are very uneven. Such surfaces are characterized with a fractal dimension, D . The values of D lie within interval $2 \leq D \leq 3$ although some sorbents have a fractal dimension even a little greater than 3 [11]. Also, it is interesting that the fractal dimension values of water clusters bound to DNA molecules are within the same interval of the D values [12]. The problem of the fractal dimension of DNA surface has been considered in work [13]. In the work the fractal dimensions of the A- and B-DNA surfaces, $\bar{D}$, have been obtained by using a method of determination of DNA accessible surface [11, 14]. They are equal to about 3.0 and 2.5 for A- and B-form of DNA, respectively.

Thus, calculating the water diffusion coefficients in the hydrate surroundings of the NaDNA by using the equation (3), we have to substitute in this equation the fractal dimension $\bar{D}$ for a topological one d for each form of the DNA molecule:

$$D = \frac{a^2}{2\bar{D}\tau} w. \quad (4)$$

Surface diffusion of bound water in hydrate surroundings of DNA

The evaluative calculations were realized in the following way. From the whole region of r.h. from 0 to 100% (that corresponds to the number of water molecules per nucleotide (n) from 0 to about 22 [2]) three intervals were chosen by using a criterion of the existence of certain DNA forms having their definite structural characteristics in these intervals. Three distinct DNA structures exist in the r.h. region involved: a B-like form [1] or in P-form [15] (r.h. $\leq 72\%$, $n \leq 7$), A-form (r.h. = 78-90%, $n = 8-15$) [2], and B-form (r.h. $> 92\%$, $n > 16$) [2]. Therefore, the water diffusion coefficients were estimated for the following intervals of n :

- (1) $n \leq 7$ (B-like form);
- (2) $n = 8-15$ (A-form);
- (3) $n = 16-22$ (B-form).

The intervals $n = 7-8$ and $n = 15-16$ correspond to conformational transitions from the B-like form to A-form and from A-form to B-form of DNA, respectively. Therefore, it is problematical to say about the DNA structure in these intervals. In connection with this the calculations for these values of n cannot be performed by using procedure described.

The τ values necessary for the diffusion coefficient estimations have been calculated by using an equation linking the lifetime of a water molecule in the bound state with the hydration energy excess $\Delta E(n)$:

$$\tau(n) = \tau_0 \exp(\Delta E(n)/RT) \quad (5)$$

where τ_0 (equal to about $2.5 \cdot 10^{-10}$ s [16]) is the lifetime of a water molecule in the bound state in bulk water at room temperature; R is the universal gas constant; T is temperature; n is water content expressed as number of moles of water per mole of nucleotide ($\text{MH}_2\text{O}/\text{MN}$), which corresponds to the number of the binding sites occupied. Besides, for calculation of $w = n/N$ figuring in the equation (4) the N value is taken as the total number of water molecules per a nucleotide necessary to form the DNA hydration shell and equal to about 22 (in other words $N = n$ at 100% r.h.).

In energy terms a water molecule can be considered "bound" if its energy of interactions E with an hydrate-active center exceeds the mean energy of water-water interaction in liquid phase ($E_0 = 40.5 \text{ kJ/MH}_2\text{O}$). Then the hydration energy excess ΔE is equal to $E - E_0$. We made use of data on dependence of the hydration energy excess on n obtained by direct microcalorimetry measurements for NaDNA [2].

In the first interval of n ($n \leq 7$) mainly phosphates are hydrated [17] although hydration of sugars and bases is also observed [2]. Within this interval DNA molecule exists in partly disordered state, structural parameters of the sugar-phosphate backbone resembling ones for B-form of DNA [1]. Since NaDNA is supposed to be in the B-like form, which is structurally similar to the B-form, the surface dimension $\bar{D}$ for the B-like form is accepted the same one as for the B-form of DNA.

In the second interval of n ($n = 8-15$) where NaDNA is in the A-form there are the following features of hydration: the clear primary shell of sugars and bases are absent while the most polar groups, phosphates, are hydrated and their hydration shells are high-ordered (in contrast with B-form); in the grooves there are no water spines, however, functional groups exposed to the grooves are hydrated; the water bridges binding adjoining phosphates are formed along each strand of DNA; there also exist the water bridges binding the phosphate groups of different strands across the major groove, which tighten its edges [3, 18].

In the last interval of n ($n = 16-22$) where the B-form exists, the hydration reaches its high level: phosphates are hydrated significantly; there are hydration shells of bases and sugars; the binding sites in the grooves are taken by water molecules (thus, the water spines in the grooves are formed); the water bridges bind bases and phosphates of the opposite strands [3, 18, 19].

Estimates of the values of the lattice parameter a were found from consideration of water molecule transitions between various hydration centers. These transitions are supposed to occur both within the same DNA strand (e.g. between phosphate groups) and between strands across and inside the grooves. Besides, in the two latter cases (A- and B-form) the formation of water bridges was allowed for [3, 18, 19]. Taking into account the possible hydration centers, their implication to the hydration process with water content growth, and distances between them, after averaging over the distances for possible transitions we obtained the a values for B-like form, A- and B-form equal to about 8.2 Å, 6.9 Å and 7.7 Å, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Dependence of the lifetime of a water molecule in the bound state, τ , on r.h. (the water content in the system) is presented in fig. 1.

As one can see from this figure the τ values decrease about by factor of 50 when the water content in the system changes from low to high values. This fact clearly demonstrates decreasing the energy of interaction of water molecules with the hydrate-active centers. In the work [9] the experimental results of pulsed proton NMR

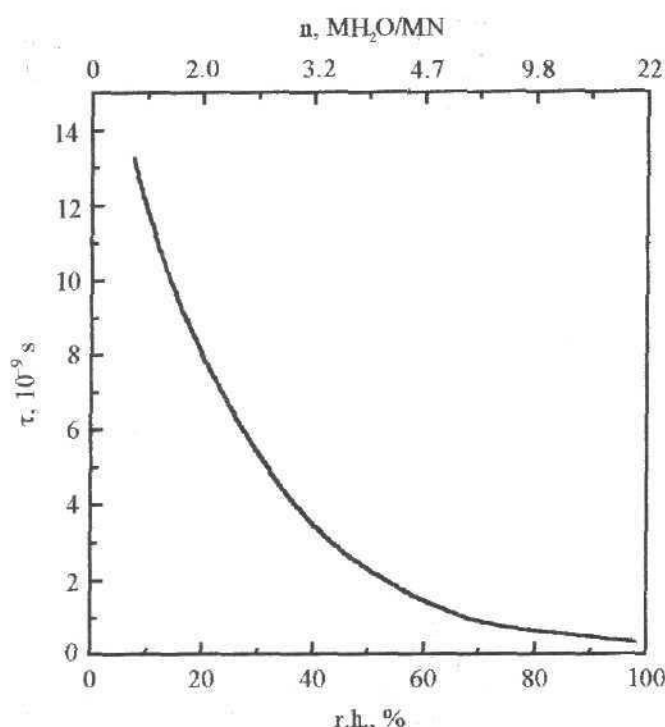


Fig. 1. Dependence of the lifetime of a water molecule in the bound state on r.h. (water content in the NaDNA-water system).

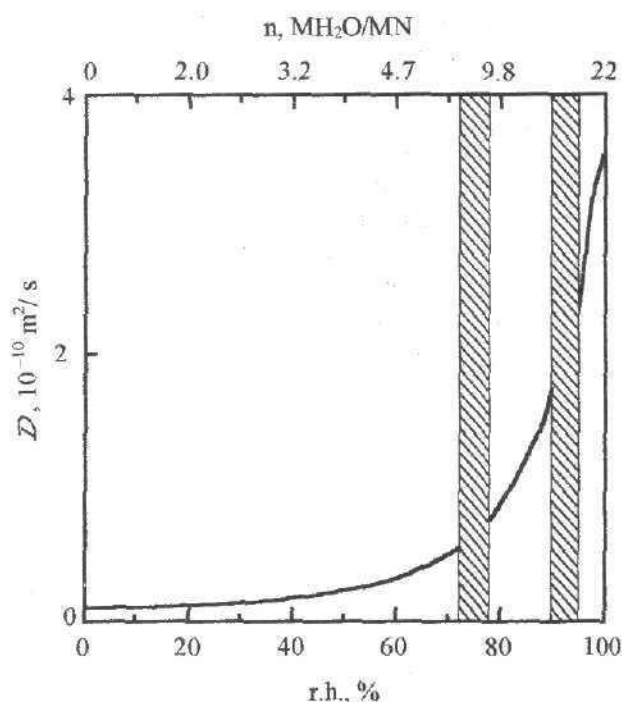


Fig. 2. Dependence of the diffusion coefficient of the bound water molecules along the NaDNA surface on r.h. (water content). Hatched areas correspond to r.h. intervals of conformational transitions, which have been eliminated from consideration in the present study.

relaxation and diffusion study of water sorbed in solid oriented NaDNA samples at moderate r.h. (48.8% - 86.6% r.h.) are reported. Our τ values are in good agreement with the estimate of τ (about 10^{-9} s) obtained in this work in the appropriate water content region.

Real DNA naturally is not "static" object and its structure fluctuates. However, times of these motions are on the time scale of microseconds. These times are much greater than ones considered in our case. Therefore, we did not take these motions into account in the present model.

Dependence of the diffusion coefficient D calculated from equation (4) with appropriate values of the parameters on r.h. (water content) is plotted in fig. 2. Three sections of the dependence correspond to the hydration intervals where the diffusion coefficient estimation has been performed: in the first section $\text{r.h.} \leq 72\%$ ($n \leq 7$), in the second section $\text{r.h.} = 78-90\%$ ($n = 8-15$), and in the last one $\text{r.h.} > 92\%$ ($n > 16$).

The dependence of the diffusion coefficient D increases monotonically in each section of graph (fig. 2). Such a behavior of D values can be explained by reducing the part of the water molecule "strongly" bound to the DNA due to multilayer sorption with small binding energies.

Steps of the D values in case of a passage from one section of the graph to another one are probably connected to rearrangement of secondary structure of the DNA molecule and hydration shell, i.e., of geometry of the system considered, during conformational transitions.

One of particular cases of the bound water diffusion is a longitudinal one D_1 , i.e. the diffusion directed along the DNA helix axis. Such a type of diffusion is supposed to be a one-dimensional diffusion. Thus, in the model one should consider the biopolymer matrix as a one-dimensional lattice (in the equation (4) $\bar{D}$ is equal to 1) and, therefore, use the equation (2) to estimate values of the longitudinal diffusion coefficient D_1 . The values of the lattice parameter a , which corresponded to the mean displacement of a water molecule in the direction of the helix axis, were taken as the averaged values of the axis projections of the water molecule transitions considered in the

Surface diffusion of bound water in hydrate surroundings of DNA

previous case of diffusion along the fractal surface. For the three n intervals involved the a values are equal to $\sim 7\text{\AA}$ for $n \leq 7$, $\sim 6.1\text{\AA}$ for $n=8-15$ and $\sim 6.7\text{\AA}$ for $n=16-22$. In this case the w values were the same ones as for the diffusion along the fractal surface.

Dependence of the longitudinal diffusion coefficient D_1 calculated from equation (2) with appropriate values of the parameters on r.h. (water content) is presented in fig.3. It is seen from this figure that the dependence obtained demonstrates similar features as one in the previous case of diffusion. However,

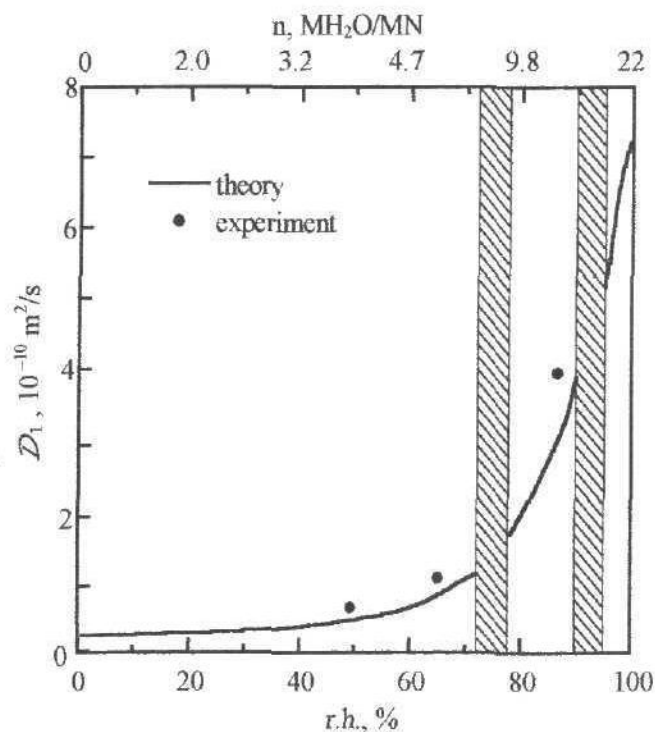


Fig. 3. Dependence of the longitudinal diffusion coefficient of the bound water molecules on r.h. (—). For comparison the experimental data are presented (•) [9]. Hatched areas correspond to r.h. intervals of conformational transitions, which have been eliminated from consideration in the present study.

quantitative differences are observed. The values of the longitudinal diffusion coefficient are greater than the values of the fractal surface one. This is due to the fact that the general case of the surface diffusion comprises the diffusion processes in all directions over the surface (including slow lateral diffusion) and, therefore, total process goes slower than the longitudinal diffusion. Our D_1 values agree with the experimental ones presented in fig.3 [9] in the appropriate intervals. The experimental data considered correspond to the case of diffusion parallel to the DNA helix axis. The good agreement between the theoretical and experimental results attests adequacy of the longitudinal diffusion process description by using the equation (2). At high r.h. the D values calculated tend to the water self-diffusion coefficient for DNA solutions obtained in the work [6].

It is obvious if water content in the DNA-water system grows further the values of the diffusion coefficient will gradually increase, approaching the value of the diffusion coefficient for bulk water ($2.5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$). Qualitatively such a behavior of the D_1 (and D) values can be demonstrated in the framework of the model. From the third section shape of the D_1 (and D) dependence as well as from the

equations (2) or (4) it is seen while the water content in the sample grows the τ values decrease and the w values increase, and this will cause the gradual increasing of the diffusion coefficient values. They will finally tend to a limiting value.

Our calculations have been made for hydrate surrounding of NaDNA, however, we believe that the procedure described in the present paper is suitable for a case of DNA with other counterions.

The diffusion of the bound water molecules along the DNA surface studied in the present paper could contribute to long-range effects of conformational reorganization [20]. In any case such a water diffusion should be taken into account when local conformational changes of a DNA molecule are considered.

REFERENCES

1. 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.
2. Maleev V. Ya., Semenov M. A., Gasan A. I. and Kashpur V. A. // *Biophysics*. 1993. V. 38. P.789-811.
3. Saenger W. // *Ann.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* 1987. V.16. P.93-114.
4. Lavallo N., Lee S.A., Rupprecht A. // *Biopolymers*. 1990. V.30. P.877-887.
5. Weidlich T., Lindsay S.M., Rupprecht A. // *Phys. Rev. Lett.* 1988. V.61. P.1674-1677.
6. Wang J.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V.77. P.258-260.
7. Andreasson B., Nordenskiöld L., Eriksson D.-O., Rupprecht A. // *Biopolymers*. 1994. V.34. P.1605-1614.
8. Stejskal E.O., Tanner J.E. // *J. Chem. Phys.* 1965. V.42. P.288-292.
9. Lahajnar G., Zupancic I., Rupprecht A. // *Biophysics of Water*. New York: Wiley. 1982. P.231-234.
10. Frenkel Ya. I. *Kinetic theory of liquids*. L. Nauka, 1975. 592p.

11. Feder E. Fractals. M. Mir, 1991. 262p.
12. Bul'enkov N. A. // Biofizika. 1991. V.36. P.181-243.
13. Virnik K.M., Tolstorukov M.Ye. // Vest. problem v biol. i meditsine. 1998. No.2. P.5-16.
14. Nauchitel V. V. and Bayramov Sh. K. // Molekulyarnaya biologiya. 1991. V.25. P.162-171.
15. Zehfus U.H., Johnson W.C. // Biopolymers. 1984. V.23. P.1269-1281.
16. Gordeev G.P., Haydarov T. // Water in Biological Systems and Their Components. L. Lenigrad. Univ., 1983. P.3-9.
17. Falk M., Hartman K.A., Lord R.C. // J. Am. Chem. Soc. 1963. V.85. P.387-391.
18. Saenger W., Hunter W.N., Kennard O. // Nature. 1986. V.324. P.385-388.
19. Drew H.R., Dickerson R.E. // J. Mol. Biol. 1981. V.151. P.535-556.
20. 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.

ПОВЕРХНОСТНАЯ ДИФФУЗИЯ СВЯЗАННОЙ ВОДЫ В ГИДРАТНОМ ОКРУЖЕНИИ ДНК

К.М. Вирник, М.Е. Толсторуков*, В.Я. Малеев

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

(e-mail: virnik@ire.kharkov.ua)

**Кафедра молекулярной и прикладной биофизики, Харьковский государственный университет, пл. Свободы 4, Харьков, 310077 (e-mail: tolstor@ktu.kharkov.ua)*

Рассматривается поверхностная диффузия молекул воды, связанных на матрице ДНК. Для описания этого процесса предлагается решетчатая модель. Сорбирующая поверхность ДНК рассматривается в качестве фрактальной. В рамках предложенной модели произведены оценки коэффициента диффузии воды в интервалах относительной влажности окружающей среды, в которых ДНК сохраняет свое конформационное состояние. Рассчитанные величины оценок коэффициента поверхностной диффузии связанных молекул воды увеличиваются с ростом содержания воды в ДНК и достигают значений $5 \cdot 10^{-11}$, $1,7 \cdot 10^{-10}$ и $3,5 \cdot 10^{-10}$ м²/с для частично разупорядоченного состояния, А- и В-формы соответственно. Кроме того, были получены оценки значений коэффициента продольной диффузии, т.е. диффузии, направленной вдоль оси спирали. Максимальные значения этих оценок приблизительно равны $9 \cdot 10^{-11}$, $3,8 \cdot 10^{-10}$ и $7 \cdot 10^{-10}$ м²/с для рассматриваемых конформационных состояний. При высоких относительных влажностях значения коэффициентов диффузии стремятся к величинам коэффициента самодиффузии воды в растворах ДНК. Этот факт рассматривается как результат увеличения числа молекул воды, слабо связанных с сорбирующими центрами ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекула ДНК, сорбция воды, связанная вода, поверхностная диффузия, фрактальная размерность

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК 577.3

ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГИДРАТАЦИИ ДИНАТРИЕВОЙ СОЛИ РИБОГУАНОЗИН-5'-МОНОФОСФАТА

Е.Г.Березняк, М.А.Семенов, Е.Б.Стариков*, Ю.Ф.Педаш**, Т.В.Большух,
Д.А.Матвеев, В.Я.Малеев

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул.Ах.Проскуры 12, г.Харьков, 310085. E-mail: berez@ire.kharkov.ua

*Institut für Kristallographic, Universität Berlin

**Харьковский государственный университет, пл.Свободы, 7, г.Харьков, 310077

Получены ИК-спектры пленок динатриевой соли рибогуанозин-5'-монофосфата ($5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$) в диапазоне $900\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ в интервале относительной влажности 0-96%. На основании анализа частот и интенсивностей полос поглощения определены центры и уровень гидратации нуклеотида. Обнаружено, что сорбция ~ 8 молекул воды приводит к кристаллизации $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$. Расчет резонансных взаимодействий показал, что кристаллическая структура $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ соответствует тетрамерной модели. Проведенный квантово-химический расчет электронной плотности свидетельствует о том, что наблюдаемые спектральные изменения при увлажнении пленок $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ качественно могут быть объяснены эффектами гидратации и влиянием катионов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: динатриевая соль рибогуанозин-5'-монофосфата, ИК-спектроскопия, гидратация, резонансные взаимодействия, квантово-химические расчеты, влияние противоионов.

В ИК-спектрах пленок ДНК и соответствующих модельных соединений в ходе увеличения относительной влажности (ОВ) на начальных этапах увлажнения образцов (до $\sim 50\%$ ОВ) наблюдаются низкочастотные сдвиги и/или рост интенсивности ряда полос поглощения валентных колебаний в диапазоне $950 - 1750\text{ см}^{-1}$ [1-4]. По общеизвестным эмпирическим правилам [5] указанные изменения принято считать проявлением образования водородных связей между молекулами воды и активными группами нуклеиновых кислот [1]. Однако, в такой схеме интерпретации совершенно не учитывается влияние противоионов, которые обязательно присутствуют в образце, если исследуются солевые формы нуклеиновых кислот. Между тем, очевидно, что даже для качественного понимания физико-химических механизмов гидратации полианионных биомакромолекул необходимо оценивать вклады противоионных и гидратных эффектов в наблюдаемые спектроскопические изменения. В этой связи представляется полезным детальный квантово-химический анализ природы сдвигов в ИК-спектрах гидратированных нуклеиновых кислот. Наиболее удобными объектами подобных исследований могут служить соли мононуклеотидов, поскольку для этого класса соединений накоплен более обширный и более разнообразный экспериментальный и теоретический материал, чем для соответствующих полимеров. Кроме того, относительно небольшие размеры молекул мононуклеотидов позволяют параллельно с экспериментальным изучением проводить квантово-химические расчеты. В предыдущей работе [2] было изучено влияние присутствия молекул воды вблизи гидратно-активных центров $5'\text{-дезокситидинмонофосфатного}$ ($5'\text{-дЦМФ}$) дианиона на распределение его электронной плотности. Отклик атомных зарядов и порядков связей $5'\text{-ЦМФ}$ на протонирование соответствующего дианиона с учетом возможных конформационных изменений подробно обсужден в работе [6].

Целью настоящей работы является экспериментальное исследование ИК-спектроскопических проявлений гидратации твердофазных пленок динатриевой соли рибогуанозин-5'-монофосфата ($5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$) и квантово-химический анализ этих проявлений с учетом противоионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аморфные пленки $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ (производства фирмы "Reanal") готовили на подложках из флюорита путем выпаривания воды и этанола при 60°C из слабых водно-спиртовых растворов при $\text{pH}=7$. Дейтерирование пленок проводили в парах тяжелой воды. По методике, описанной в работе [5], в диапазоне $900\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ были записаны спектры дейтерированных и недейтерированных пленок $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ с различной степенью увлажнения в D_2O и H_2O . Методом кварцевого резонанса была получена изотерма гидратации этого вещества в легкой воде.

Степень гидратации $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ и состояние его гидратно-активных центров определялось путем построения зависимостей частот (ν) и относительных интенсивностей (R) полос поглощения сахарофосфатных групп и гуанина от количества сорбированных молекул воды (n) на моль нуклеотида.

Относительная интенсивность полосы поглощения для i -той влажности определялась как отношение оптических плотностей максимума ИК-полосы при i -той (D_i) и нулевой (D_0) влажности:

$$R = \frac{D_i}{D_0}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 (а,б) представлен общий вид спектров дейтерированных и недейтерированных пленок $5'$ -ГМФ· 2Na^+ при разных ОВ. Видно, что спектральные параметры (частоты, полуширины и интенсивности) большинства полос в интервале 950 – 1750 см^{-1} в ходе увлажнения пленок претерпевают существенные изменения. Ниже будут рассмотрены зависимости ν и R от p для надежно отнесенных ИК-полос $5'$ -ГМФ· 2Na^+ с наиболее выраженными сдвигами спектральных параметров. Отнесения этих полос сделаны на основании работ [7,8].

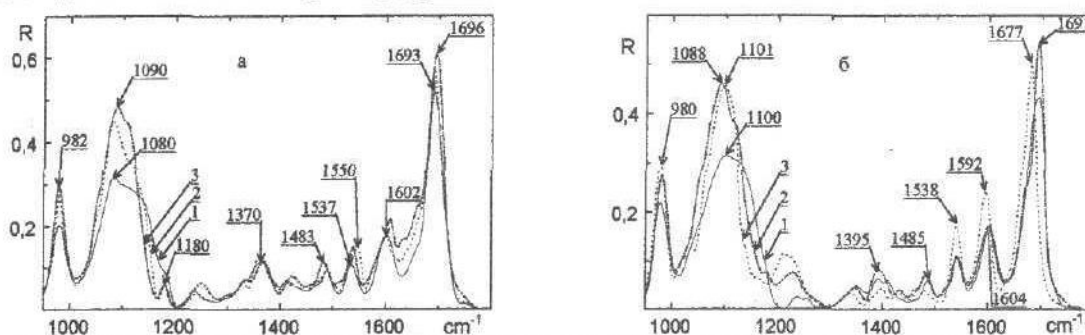


Рис. 1. ИК-спектры пленок $5'$ -ГМФ· 2Na^+ в недейтерированном (а) и дейтерированном (б) состояниях при ОВ: 1- 0%, 2- 44%, 3- 80%.

Область валентных колебаний сахаро-фосфатных групп (950 – 1200 см^{-1}). На рис.2 показаны зависимости ν и R от p для полосы 980 см^{-1} , относящейся к колебаниям С-С и С-О связей рибозы и сложной полосы с максимумом 1080 см^{-1} , отнесенной к антисимметричным дважды вырожденным колебаниям PO_3^{2-} -групп.

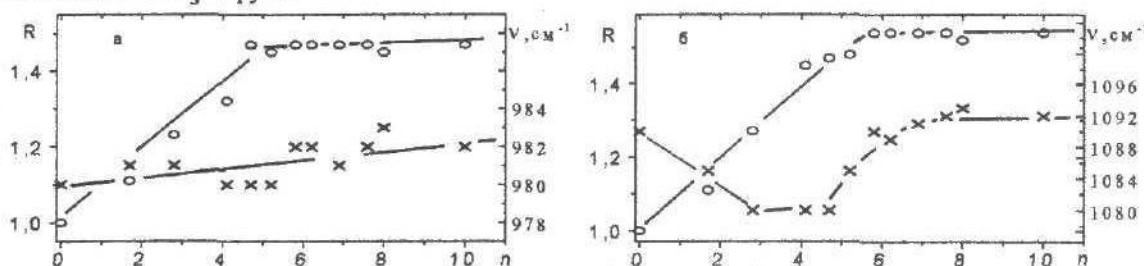


Рис.2. Зависимости ν и R от p для полос поглощения 980 см^{-1} (а) и 1080 см^{-1} (б).

В первую очередь обращает на себя внимание существенный (до 60%) рост интенсивности этих полос, который происходит в процессе связывания первых пяти молекул воды на нуклеотид, после чего обе зависимости R от p выходят на “плато”. Указанный рост интенсивностей сопровождается “красным” сдвигом частоты полосы 1080 см^{-1} , а при изменении p от 5 до 8 частота этой полосы увеличивается на 11 см^{-1} . При этом полуширины полос уменьшаются на 25 – 30 см^{-1} . Такое изменение спектральных параметров свидетельствует о том, что в интервале $5 \leq p \leq 8$ (или 64–90% ОВ) нуклеотид $5'$ -ГМФ· 2Na^+ , по-видимому, переходит из аморфного состояния в кристаллическую фазу.

Область внутри- и внекольцевых колебаний гуанина (1200 – 1750 см^{-1}). На рис. 3 (а-г) изображены зависимости ν и R от p для полос поглощения 1485 см^{-1} , 1537 см^{-1} , 1604 см^{-1} и 1691 см^{-1} . Первые три полосы представляют собой суперпозиции валентных мод С-С и С-N гуанинового остатка, последняя полоса отвечает, в основном, валентным колебаниям карбонила $\text{C}=\text{O}$ [7,8]. Эти зависимости характеризуются весьма существенными изменениями спектральных параметров в двух интервалах сорбции воды на пленках $5'$ -ГМФ· 2Na^+ : $0 < p \leq 6$ и $6 \leq p \leq 8$. В ходе увлажнения пленок в первом интервале p интенсивность полосы 1485 см^{-1} (рис.3а) без частотного смещения увеличивается на 40%, затем во втором интервале она претерпевает низкочастотный сдвиг на $\Delta\nu \approx 5$ см^{-1} и уменьшается по

ИК-спектроскопическое и квантово-химическое изучение гидратации ...

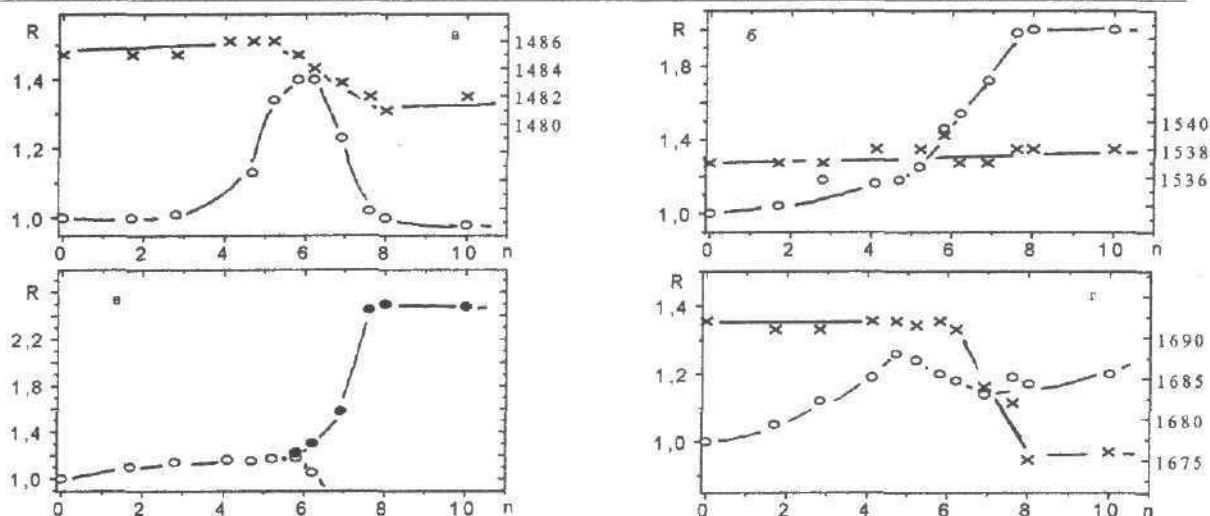


Рис.3. Зависимости ν и R от n для полос поглощения 1485 см^{-1} (а), 1537 см^{-1} (б), 1604 см^{-1} (в) и 1691 см^{-1} .

интенсивности (инфракрасный гипохромизм). Ранее подобный эффект на этой полосе (рамановский гипохромизм) наблюдался в спектрах комбинационного рассеяния при самоассоциации $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ в концентрированных растворах [9]. Можно предположить, что в первом интервале изменения n молекулы воды связываются с атомами гуанина N1, N7 и N9, поскольку полоса 1485 см^{-1} связана с колебаниями именно этих атомов [7,8]. Такое взаимодействие, как известно [2], приводит к перераспределению зарядов на атомах и, как следствие, к росту интенсивностей полос поглощения. Естественно предположить, что на распределение электронной плотности гуанинового кольца оказывает влияние катион Na^+ , который взаимодействует с атомами N7 и O6 [10].

Во втором интервале изменения n , по всей вероятности, произошла кристаллизация нуклеотида, что привело к появлению межплоскостного взаимодействия соответствующих внутрикольцевых колебательных моментов переходов, являющегося причиной уменьшения интенсивности полосы поглощения 1485 см^{-1} [11]. Уменьшение частоты этой полосы по-видимому связано с различным вкладом указанного типа взаимодействия и вкладом Н-связей между молекулами воды и центрами гидратации гуанина.

В отличие от рассмотренной полосы, полоса поглощения 1537 см^{-1} , связанная с колебаниями тех же атомов, что и полоса 1485 см^{-1} , в ходе увлажнения пленок в интервале сорбции молекул воды $0 < n \leq 8$ без заметного изменения частоты увеличивается по интенсивности в 2 раза (рис.3б). Этот эффект, как и в предыдущем случае, объясняется влиянием катиона и взаимодействием молекул воды с гидратно-активными центрами гуанина, расположенными на атомах N1, N7 и N9.

Интенсивность полос поглощения 1604 см^{-1} и 1691 см^{-1} (рис.1 и рис.3в,г), связанных в основном с колебаниями атомов N3-C2 и C6=O6 [7,8], в первом интервале изменения n увеличивается незначительно (на 15-25%). Во втором интервале сорбции молекул воды спектральные параметры этих полос резко изменяются: частоты уменьшаются до 1592 см^{-1} и 1677 см^{-1} , соответственно, полосы сужаются, интенсивность полосы 1592 см^{-1} возрастает (рис.1). Возрастание интенсивности R этих полос в первом интервале изменения n свидетельствует о гидратации гуанина по атомам N3 и O6, а уменьшение частот и полуширин полос во втором интервале изменения n связано с изменением аморфного состояния пленки $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ и с появлением другого типа взаимодействия. Как и в случае с сахаро-фосфатными группами, гуаниновые остатки при кристаллизации $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ образуют в этом интервале n "стопки", что, как известно, приводит к появлению межплоскостных резонансных взаимодействий колебательных моментов переходов соответствующих связей [11]. В зависимости от вкладов этих взаимодействий будут наблюдаться смещения полос поглощения различного знака. По-видимому, в "красное" смещение полос 1604 см^{-1} и 1691 см^{-1} больший вклад вносят Н-связи.

Резонансные взаимодействия. Оценку влияния Н-связей и резонансных взаимодействий на C6=O6 связь мы провели на примере рассмотрения резонансного взаимодействия карбонильных колебаний в диполь-дипольном приближении. Расчет резонансных частот проводился в рамках элементарной теории молекулярных экситонов, как и в работе [11]. При этом использовали координаты атомов C6 и O6 из рентгеноструктурной модели Виссамитры и др. [10] для тетрамерной структуры $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$ с

геометрией гуаниновых “стопок”, предложенной Липановым и др. [12]. Для связи С6=О6 была взята величина дипольного момента 0,49D, что соответствует значению интенсивности $10,2 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ [13]. Расчет частотных сдвигов $\Delta\nu$ резонансного взаимодействия моментов переходов каждой карбонильной группы проводили для пяти ближайших соседних групп в “стопке” гуаниновых оснований, поскольку учет следующих оснований не давал существенного частотного сдвига. Из-за большого расстояния между соседними стопками гуанинов (более $29\text{\AA}$) взаимодействие их карбонильных колебаний не учитывалось.

Для расчета экспериментально наблюдаемых частот в ИКС и СКР величина невозмущенной частоты ν_0 карбонильного колебания была взята равной 1690 см^{-1} [14], что отвечает частоте этого колебания, наблюдаемой для аморфного состояния пленки 5'-ГМФ·2Na⁺ (рис.1). Активные колебательные моды в ИКС - E_u, и в СКР - A_g и B_g [9], рассчитывались по формуле:

$$\nu = \nu_0 - \Delta\nu_{H-cs} + \Delta\nu_{res} \quad (1)$$

где $\Delta\nu_{H-cs}$ - сдвиг частоты за счет образования H-связи между карбонилем и молекулой воды, $\Delta\nu_{res}$ - частотный сдвиг резонансного взаимодействия. В Табл.1 приведены рассчитанные и экспериментально наблюдаемые частоты, а также направления момента перехода карбонильного колебания относительно плоскости гуанина, найденного нами и рассчитанного из рентгеноструктурной модели [10]. Видно хорошее согласие экспериментальных и рассчитанных значений. Оно достигнуто путем смещения оси спирали гуаниновых “стопок” относительно такой же оси в тетрамерной модели, предложенной в работе [12].

Таблица 1. Резонансные частоты в ИКС и СКР и направление момента перехода карбонильного колебания С6=О6 в тетрамерной структуре 5'-ГМФ·2Na⁺

Мода	ИКС расчет (см ⁻¹)	ИКС экспер. (см ⁻¹)	СКР расчет (см ⁻¹)	СКР экспер. (см ⁻¹)	Направление мом. перех. Расчет(°)	Направление мом. перех. Рентген(°)
E _u	1676	1677	не активно	не активно	7	1
A _g	не активно	не активно	1708	1708 [13]	-	-
B _g	не активно	не активно	1664	1664 [13]	-	-

Из формулы (1) можно найти, что частотный сдвиг за счет H-связи карбонила и молекулы воды равен $\sim 30 \text{ см}^{-1}$. Отметим, что эта величина близка к частотному сдвигу за счет образования водородной связи в ГЦ-паре [14].

Квантово-химический расчет. Проведенный ранее квантово-химический расчет 5'-дЦМФ·2Na⁺ [2] показал, что присоединение молекул воды приводит к осязательному изменению порядка связей и распределению зарядов на гидратно-активных атомах. Этим эффектом были объяснены изменения частот и интенсивностей полос поглощения цитозина и фосфата PO₃⁻² в ходе увлажнения пленок 5'-дЦМФ·2Na⁺. Выше было указано, что наряду с молекулами воды на спектральные параметры полос поглощения будут оказывать влияние и перемещения противоионов Na⁺. Поскольку молекулы воды, как это следовало из вышеприведенных ИК-спектроскопических данных для 5'-ГМФ·2Na⁺, а также для 5'-дЦМФ·2Na⁺ [2], непосредственно взаимодействуют с гидратно-активными центрами, расположенными на основаниях и PO₃⁻²-группах, то естественно, это должно привести к перемещению противоионов, что в свою очередь также скажется на спектральных параметрах соответствующих полос поглощения.

Для качественного выяснения этого влияния нами был проведен квантово-химический расчет методом ППДП/2 в spd-базисе [15] в два этапа: 1) расчет дианиона 5'-ГМФ в комплексе с двумя ионами Na⁺ и одной молекулой воды согласно координатам атомов кристаллографически различимой модификации 5'-ГМФ-А [10]; 2) то же самое для модификации 5'-ГМФ-В. Эти модификации имеют по данным РСА практически идентичные конформации, но отличаются по расположению ионов Na⁺ и молекул воды относительно них [10]. Это дало возможность проанализировать влияние перемещения ионов Na⁺ относительно дианиона на распределение электронной плотности последнего, отвлекаясь от эффектов возможных конформационных изменений. Интересно отметить, что сходимость процедуры самосогласования достигалась только в том случае, когда один из ионов Na⁺ помещался вблизи N7 гуанина, а второй ион Na⁺ контактировал с одним из кислородов фосфата через “мостик” из одной молекулы воды. Относительные расстояния между ионами Na⁺, молекулами H₂O и центрами дианиона при расчете полностью соответствовали тем же расстояниям, определенным с помощью РСА для

модификаций А и В [10]. Попытки рассчитать изолированные дианионы, а также другие варианты расположения противоионов относительно дианиона согласно рентгеноструктурным данным, не увенчались успехом (координаты атомов из работы [10] изменениям не подвергали). На рис.4 представлены заряды и порядки связей комплексов $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ для кристаллических модификаций А и В, соответственно.

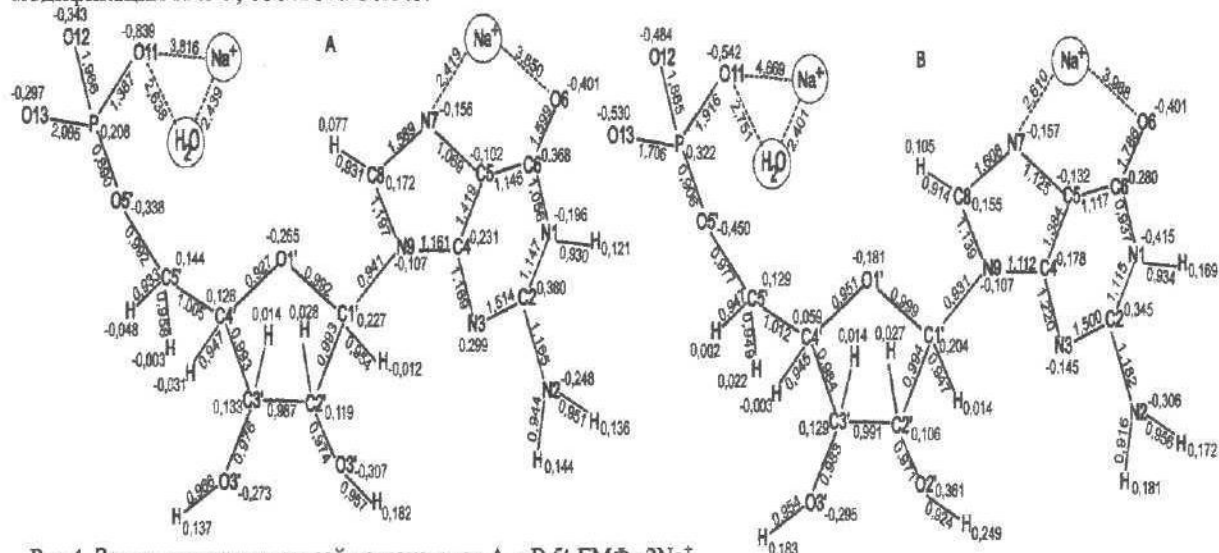


Рис.4. Заряды и порядки связей на молекулах А и В $5'\text{-ГМФ} \cdot 2\text{Na}^+$.

Видны существенные изменения в распределении электронной плотности $5'\text{-ГМФ}$, которые можно отнести на счет перемещений противоионов относительно дианиона, поскольку конформации $5'\text{-ГМФ-А}$ и $5'\text{-ГМФ-В}$, согласно данным РСА практически не изменяются [10], а наличие гидратной оболочки $5'\text{-ГМФ}$ в кристаллогидрате в настоящих расчетах не учитывалось. Рассмотрим подробнее эти изменения для каждого из фрагментов $5'\text{-ГМФ}$.

Гуанин. Весьма значительные изменения как зарядов, так и порядков связей при переходе от $5'\text{-ГМФ-В}$ к $5'\text{-ГМФ-А}$ можно наблюдать во всем гуаниновом остатке в целом. Для более детального анализа влияния присутствия ионов Na^+ на распределение электронной плотности азотистого основания были проведены расчеты изолированных гуаниновых фрагментов $5'\text{-ГМФ-В}$ и $5'\text{-ГМФ-А}$, взятых с атомом водорода в положении N9, в приближении ППДП/2-spd. Сравнение полученных результатов показало, что расположение Na^+ вблизи гуанина в $5'\text{-ГМФ-А}$ вызывает практически только резкое локальное уменьшение порядка связи C8-N7 и мало влияет на атомные заряды гуанинового остатка. В то же время появление иона Na^+ вблизи гуанина в $5'\text{-ГМФ-В}$ приводит к ярко выраженному общему перераспределению электронной плотности гуанинового остатка. Причина этого, по-видимому, заключается в том, что по данным РСА [10] в $5'\text{-ГМФ-А} \cdot 2\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ расположение противоиона относительно гуанинового остатка существенно отличается от того, что наблюдается в $5'\text{-ГМФ-В} \cdot 2\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ (рис.4). Таким образом, наблюдаемые на начальных этапах увлажнения значительные изменения интенсивности колебательных полос гуанинового остатка (рис.1) могут быть связаны с перемещениями иона Na^+ вблизи соответствующих полярных групп $5'\text{-ГМФ}$.

Рибоза. Сравнение результатов расчетов для $5'\text{-ГМФ-А} \cdot 2\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $5'\text{-ГМФ-В} \cdot 2\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ показало, что, несмотря на значительное удаление противоионов от атомов рибозы, перемещение иона Na^+ относительно гуанина и фосфата влияет на атомные заряды O'1, C'4 и O'2, однако, порядки связей рибозного остатка практически не изменяются (рис.4). Поэтому наблюдаемое значительное изменение интенсивности полосы поглощения рибозы при 980 см^{-1} может быть связано с перемещением иона Na^+ .

Фосфат. Согласно данным РСА [10] имеется достаточно широкий выбор вариантов расположения противоионов относительно фосфатной группы $5'\text{-ГМФ}$. Причем, интересно отметить, что для любого из этих вариантов контакт ионов Na^+ с кислородами фосфата осуществляется через водные "мостики". В настоящей работе для исследования влияния перемещения ионов Na^+ на распределение электронной плотности фосфата выбраны следующие варианты: $\text{Na}^+ \cdots \text{H}-\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}11$ в $5'\text{-ГМФ-А}$ и $\text{Na}^+ \cdots \text{H}-\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}13$ в $5'\text{-ГМФ-В}$. Координаты ионов Na^+ и молекул H_2O взяты из данных РСА [10]

В результате расчета оказалось, что изменение расположения противоиона Na^+ относительно PO_3^{-2} вызывает крайне резкие изменения как атомных зарядов, так и порядков связей последнего (рис.4). Это

обстоятельство может служить качественным объяснением наблюдаемых в диапазоне 1000-1200 см⁻¹ изменений в спектрах 5'-ГМФ · 2Na⁺ на начальных этапах увлажнения (рис. 1,2).

Полезная с точки зрения анализа ИК-спектроскопических изменений информация содержится также в суммарных квантово-химических характеристиках изученных в настоящей работе комплексов. Эти характеристики приведены в табл.2.

Таблица 2. Суммарные квантово-химические характеристики комплексов 5'-ГМФ-А · 2Na⁺ · 1H₂O и 5'-ГМФ-В · 2Na⁺ · 1H₂O и их фрагментов в приближении ПДП/2-spd

Комп-лекс	Суммарные заряды (e)							Дипольный момент (D)	Полная энергия (eV)
	Na1 на N7	Na2 на фосфате	фосфат	рибоза	гуанин	H ₂ O в "мостике"	весь дианион нуклеотида		
5'-ГМФ-А	0,5745	0,6024	-1,6089	0,1714	0,1209	0,1393	-1,3166	21,5	-8509,8
5'-ГМФ-В	0,5573	0,6081	-1,6842	0,2799	0,1132	0,1255	-1,2911	5,2	-8443,3

Видно, что перемещения иона Na⁺ практически не изменяют заряд дианиона 5'-ГМФ в целом и его гуанинового фрагмента, но вызывает значительный обмен электронной плотностью между рибозой и фосфатом. Интересно отметить, что энергетически более выгодный комплекс 5'-ГМФ-А · 2Na⁺ · 1H₂O обладает более высоким значением дипольного момента. Последнее обстоятельство позволяет на качественном уровне понять наблюдаемую в эксперименте общую тенденцию роста интенсивностей колебательных полос 5'-ГМФ с повышением ОВ образцов во всем исследованном в работе диапазоне частот.

ВЫВОДЫ

Сравнение представленных выше результатов с данными предыдущей работы [2], касающейся анализа влияния связанных молекул воды на распределение электронной плотности 5'-дЦМФ, показывает, что противоионные эффекты намного более значительны по величине и разнообразны по своим проявлениям, чем гидратные. Кроме того, в отличие от протонуклеотида, трактуемого как образование ковалентной связи с протоном и приводящем к значительным изменениям электронной плотности в местах присоединения протона [6], влияние перемещения противоионов на распределение электронной плотности нуклеотидов оказывается глобальным. Таким образом, мы приходим к необходимости конкретизировать использовавшуюся до сих пор [1-4] схему отнесения наблюдаемых ИК-спектроскопических изменений в ходе гидратации пленок моно- и полинуклеотидов, привязав их к тем или иным процессам на молекулярном уровне. Наблюдаемые ИК-спектроскопические изменения на начальных этапах увлажнения пленок (до ~50% ОВ) связаны с образованием водных "мостиков" между противоионами и гидратно-активными центрами нуклеотида, перемещением противоионов относительно нуклеотида, образованием Н-связей, упорядочением нуклеотидов в кристаллические структуры и влиянием противоионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я.// Биофизика. 1981. Т.26. С.979-984
2. Стариков Е.Б., Семенов М.А.// Журнал физ.химии. 1988. Т.12. N.8. С.2120-2126
3. Semenov M.A., Bolbukh T.V., Starikov E.B.// Studia biophysica. 1985. V.106. N 3, p.181-192
4. Семенов М.А., Больбух Т.В., Малеев В.Я.// Биофизика. 1985. Т.30. С.571-577
5. Пиментел Дж., Мак-Клеллан О. Водородная связь. М. Мир, 1964. С.462
6. Starikov E.B., Semenov M.A., Maleev V.Ya., Gasan A.J.// Biopolymers. 1991 V.31, p.255-261
7. Tsuboi M. Infrared and Raman spectroscopy. In: Basic principles nucleic acid chemistry// N.Y.-L., Acad.Press. 1974. V.1, p.399-453
8. Majoube M.// J.De Chimie Physique. 1981. V.81. N 5, p.303-315
9. Andet P., Simard Ch. and Savole R.// Biopolymers. 1991. V.31, p.243-251
10. Katti S.K., Seshadri T.R. and Vismamitra M.A.// Acta Cryst. 1981. V.37, p.1825-1851
11. Semenov M.A. and Bolbukh T.V.// Studia Biophysica. 1984. V.102, p.215-220
12. A.A.Liparov, J.Quintana, R.E.Dickerson// J.Biomol.Struc. and Dyn. 1990. V.8. p.489-503
13. Е.Г.Березняк, М.А.Семенов.// Препринт N 379, Харьков: Изд. ИРЭ АН УССР. 1989
14. Kyogoka G., Lord R.C. and Rich A.// J.Am.Chem.Soc. 1967. V.89, p.496-504
15. Губанов В.А., Жуков В.П., Литвинский А.О. Полуэмпирические методы молекулярных орбиталей в квантовой химии. М. Наука, 1976. С.219

УДК 577.32

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

BINDING ENERGY DIFFERENTIATION OF WATER MOLECULES IN DNA HYDRATION SHELL

K.M. Virnik*, M.E. Tolstorukov
**Biophysics Division, Institute of Radiophysics and Electronics, Ak. Proskura St. 12, Kharkov 310085, Ukraine
(e-mail: virnik@ire.kharkov.ua.)*
*Chair of Molecular and Applied Biophysics, Radiophysics Department, Kharkov State University, Svobody Sq. 4,
Kharkov 310077, Ukraine (e-mail: tolstor@ktu.kharkov.ua)*

Received October 2, 1998

An energetics study of water molecule binding to a DNA matrix has been performed. Bound water molecules have been differentiated according to their binding energies, the water molecules being supposed to participate in three types of sorption (hydration): sorption by Langmuir's binding centers, sorption by Henry's ones and multilayer sorption. It has been found that waters of the different sorption types take part in stabilizing a certain DNA conformation to a different degree. Consideration of the obtained values of free binding energies within each sorption type has shown that waters bound to Langmuir's centers mainly advantage A-DNA stabilization while ones bound to Henry's centers facilitate B-DNA stabilization. The water molecules bound in multilayer are more important for stabilization of both A- and B-form in comparison with unordered state, but largely for B-form. This is due to occurring the basic formation of multilayer part of hydration surroundings at high water content in DNA.

KEY WORDS: DNA, conformations, hydration, sorption, binding energy

Structural state of DNA molecule is well known to depend on its water content to a high degree [1-3]. While being wetted or dried a DNA molecule undergoes conformational transitions, i.e., changes of secondary structure. For instance, NaDNA demonstrates an unordered state at relative humidity (r.h.) up to 74-76%, A-form up to 92-94% r.h., then NaDNA exists in B-form [3]. Relationship between DNA structure and its properties makes a problem of study of the DNA-water system undoubtedly of great interest. Determining thermodynamic parameters of the DNA-water systems and their variation in hydration-dehydration process is a part of the problem which is important to come to understanding the DNA organization and functioning. One of such parameters is binding energy of water molecules to the DNA matrix. This energy corresponds to the part of DNA stabilization energy contributed from the hydration surroundings. Integral values of binding energy have already been determined by both direct measurements (microcalorimetry method) [1] and in indirect manner (gravimetry and infrared spectroscopy methods) [1, 4, 5]. However, such data do not tell us about energetic properties of the distinct water molecules in the DNA-water interaction.

In the present paper an attempt to differentiate the energetic characteristics of the distinct water molecules in binding process to NaDNA has been made. The free energies corresponding to the binding processes of water molecules to different hydration center types have been determined by using data obtained by microcalorimetry method and a model of conformation dependent hydration of DNA [6].

THEORY

Generally it is more convenient to consider a binding process of some substance (sorbate) on a matrix (sorbent) in terms of the binding energy excess $\Delta E = E - E_0$ (E is energy of sorbate-sorbent interaction, E_0 is energy of interaction between sorbate molecules in bulk phase) [1]. The greater a value of the binding energy excess ΔE the stronger interaction between the sorbed molecules and the matrix, which characterizes the binding process demonstrably. In case of the hydration within the DNA-water system involved

$$\Delta E(n) = E(n) - E_0, \quad (1)$$

where n is the water content in the system expressed as moles of water per mole of nucleotides ($\text{MH}_2\text{O}/\text{MN}$), $\Delta E(n)$ is the hydration energy excess, $E(n)$ is the hydration (dehydration) energy obtained experimentally, $E_0 = 40.5 \text{ kJ}/\text{MH}_2\text{O}$ – the mean energy of water-water interaction in the bulk phase [1]. So, ΔE represents binding energy of water molecule with a hydration center of DNA.

For DNA one can distinguish several types of hydration centers different in their character and strength of binding [7]. Dividing sorption (hydration) into three types is shown to be adequate to describe the DNA hydration almost completely [8]. There are the following types of sorption: a) by Langmuir's binding centers supposedly lying on nitrogenous bases (hydration with saturation); b) by Henry's binding centers disposed apparently on cation-phosphate groups (hydration without saturation); c) multilayer sorption (hydration of previously occupied binding sites). It can be shown that such a separation is possible in the framework of

Gascoyne-Pethig theory provided one chooses appropriate partial distribution functions [6, 9]. We neglect heterogeneity of binding centers within one hydration type not to complicate the problem. Thus, a binding energy of water molecules with hydrate-active centers ΔE is considered as a sum of three summands representing the contributions to the value of the energy from water molecules sorbed after three mentioned types:

$$X_L(n)\Delta E_L + X_H(n)\Delta E_H + X_{ML}(n)\Delta E_{ML} = \Delta E(n) \quad (2)$$

where $X_L(n)$, $X_H(n)$, $X_{ML}(n)$ are the fractions of water molecules bound to Langmuir's, Henry's binding centers and in multilayer with energies ΔE_L , ΔE_H , and ΔE_{ML} , respectively. It is necessary to note that the partial energies are considered not to depend on the water content but to be constant for a certain type of sorption.

It is more general to describe sorption in free energy terms, therefore, proceeding to the free energies of sorption we obtain:

$$X_L(n)\Delta G_L + X_H(n)\Delta G_H + X_{ML}(n)\Delta G_{ML} = \Delta G(n) \quad (3)$$

where ΔG_L , ΔG_H , and ΔG_{ML} are the free binding energies contributed to the total free binding energy ΔG from water molecules bound after different types.

In the framework of the equilibrium thermodynamics: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ or in the units of RT $\Delta G = \Delta H - \Delta S$. (Herefrom and then throughout all thermodynamic parameters are expressed in the units of RT per mole of water.) Thus, considering the total changes of binding entropy ΔS and enthalpy ΔH corresponding to the total change of sorbed water molecule number, we have:

$$X_L(n)\Delta G_L + X_H(n)\Delta G_H + X_{ML}(n)\Delta G_{ML} = \Delta H(n) - \Delta S(n) \quad (4)$$

The fact that DNA hydration depends on conformational state of the biopolymer [2, 3] allows us to assume that the energy contribution of each type of bound water is conformational-dependent. As NaDNA exists in three possible conformations over the whole r.h. range (unordered state, A- and B-form), we take into account the energy contributions from water molecules sorbed after types concerned to the stabilization of these conformational states:

$$\begin{aligned} X_L(n)A(n)\Delta G_L^A + X_L(n)B(n)\Delta G_L^B + X_L(n)U(n)\Delta G_L^U + X_H(n)A(n)\Delta G_H^A + X_H(n)B(n)\Delta G_H^B + \\ + X_H(n)U(n)\Delta G_H^U + X_{ML}(n)A(n)\Delta G_{ML}^A + X_{ML}(n)B(n)\Delta G_{ML}^B + X_{ML}(n)U(n)\Delta G_{ML}^U = \Delta H(n) - \Delta S(n) \end{aligned} \quad (5)$$

where $A(n)$, $B(n)$, $U(n)$ are the fractions of A-, B-conformation and unordered form in DNA secondary structure, respectively; ΔG_k^m is a desirable value of energy contribution to the stabilization of m -th conformation from water molecules participating in hydration of k -th type ($k=L, H, ML$; $m=A, B, U$).

The values of the total change of binding enthalpy $\Delta H(n)$ have been determined in work [1] by using microcalorimetry technique. This technique allows one to obtain values of $\Delta H(n)$ in a certain narrow interval of r.h. (from ϕ_1 to ϕ_2) or water content (from n_1 to n_2). $\Delta H(n)$ corresponds to the evaporation enthalpy of Δn water molecules from DNA matrix, where $\Delta n = n_2 - n_1$ and $n = (n_1 + n_2)/2$. Dependence of entropy ΔS on water content n was obtained by Bolbukh and coworkers [10] by using a hydration isotherm analysis. Since there are nine unknowns ΔG_k^m in equation (5), the values of ΔH and ΔS were taken at nine different values of water content n . Thus, writing down equation (5) for nine n values, one can obtain a closed set of equations:

$$\left\{ \begin{aligned} &X_L^{(1)}(n)A^{(1)}(n)\Delta G_L^A + X_L^{(1)}(n)B^{(1)}(n)\Delta G_L^B + X_L^{(1)}(n)U^{(1)}(n)\Delta G_L^U + X_H^{(1)}(n)A^{(1)}(n)\Delta G_H^A + \\ &\quad + X_H^{(1)}(n)B^{(1)}(n)\Delta G_H^B + X_H^{(1)}(n)U^{(1)}(n)\Delta G_H^U + X_{ML}^{(1)}(n)A^{(1)}(n)\Delta G_{ML}^A + \\ &\quad + X_{ML}^{(1)}(n)B^{(1)}(n)\Delta G_{ML}^B + X_{ML}^{(1)}(n)U^{(1)}(n)\Delta G_{ML}^U = \Delta H^{(1)}(n) - \Delta S^{(1)}(n), \\ &\quad \dots \quad \dots \quad \dots \\ &\quad \dots \quad \dots \quad \dots \\ &X_L^{(9)}(n)A^{(9)}(n)\Delta G_L^A + X_L^{(9)}(n)B^{(9)}(n)\Delta G_L^B + X_L^{(9)}(n)U^{(9)}(n)\Delta G_L^U + X_H^{(9)}(n)A^{(9)}(n)\Delta G_H^A + \\ &\quad + X_H^{(9)}(n)B^{(9)}(n)\Delta G_H^B + X_H^{(9)}(n)U^{(9)}(n)\Delta G_H^U + X_{ML}^{(9)}(n)A^{(9)}(n)\Delta G_{ML}^A + \\ &\quad + X_{ML}^{(9)}(n)B^{(9)}(n)\Delta G_{ML}^B + X_{ML}^{(9)}(n)U^{(9)}(n)\Delta G_{ML}^U = \Delta H^{(9)}(n) - \Delta S^{(9)}(n). \end{aligned} \right. \quad (6)$$

Binding energy differentiation of water molecules in DNA hydration shell

The values of parameters $A(n)$, $B(n)$, $U(n)$, $X_L(n)$, $X_H(n)$, $X_{ML}(n)$ can be determined from a model of conformation dependent hydration of DNA [6] where they are variables and ΔG_k^m included as parameters. This model takes into account mutual influence of the DNA hydration and conformational state of DNA, allowing one to simulate hysteresis phenomenon during hydration-dehydration cycle. Considering jointly the set of equations (6) and one featuring in the model of conformation dependent hydration of DNA, we have closed problem. The problem can be solved by using successive approximation method in which the found values of variables of one set are substituted into another set as parameters and then the procedure repeats.

RESULTS AND DISCUSSION

The most reasonable and rational values of ΔG_k^m resulted from solving the problem considered are presented in tab.1.

Table1. Values of the free binding energy changes for water molecules bound after different sorption types and participating in stabilizing the possible conformational states of NaDNA

ΔG_k^m	Type of conformational state stabilized (m)		
Type of sorption (k)	A-form	B-form	Unordered state
L	3.99	3.69	3.57
H	1.97	2.16	1.86
ML	0.18	0.19	0.01

Analysis of ΔG_k^m values within each sorption type shows that waters bound to Langmuir's centers mainly advantage A-form stabilization while ones bound to Henry's centers facilitate B-form stabilization. This agrees

with an idea that hydration of nitrogenous bases and one of phosphates play the leading role in stabilizing the A- and B-form of DNA, respectively [2, 3]. Water molecules bound in multilayer are more important for stabilization of both A- and B-form in comparison with unordered state although they stabilize largely B-form than A-form. This is due to the fact that the basic formation of multilayer part of hydration surroundings occurs at high water content in DNA [2, 3].

Comparison of the results obtained with experimental ones [1] is presented in fig.1. In this figure the experimental values of enthalpy change ΔH_{exp} [1] and the ΔH_{th} values calculated from set (6) by using ΔG_k^m obtained here and $\Delta S(n)$ [10] are plotted as dependencies on the water content n . It is seen that the curves coincide well enough over the interval of the water content considered. Deviation of the theoretical results from the experimental ones does not exceed the values of experimental error, which attests adequate approximation in the calculation of ΔG_k^m achieved during solving the problem. Decrease of the enthalpy values with the water content growth in the system indicates that the fraction of water molecules

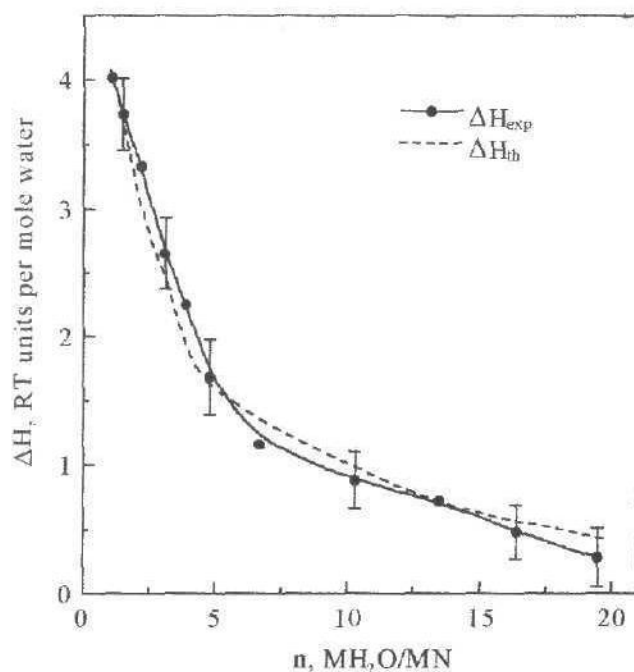


Fig.1. Dependencies of enthalpy change obtained experimentally [1] and calculated in this work on the water content.

strongly bound to primary hydration centers (Langmuir's and Henry's ones) on the DNA matrix reduces due to increase of weak secondary sorption of water, i.e. multilayer sorption.

REFERENCES

1. Maleev V. Ya., Semenov M. A., Gasan A. I., Kashpur V. A. // Biophysics. – 1993. – V.38. – P.789-811.
2. Saenger W. Principles of the Structural Organization of Nucleic Acids. – M.: Mir, 1987. – 584pp. (In Russian.)
3. Saenger W. // Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. – 1987. – 16. – P. 93-114.
4. Gasan A. I., Maleev V. Ya., Semenov M. A. // Studia Biophys. – 1990. – V.130. – P.171-178.
5. Semenov M. A., Starikov E. B., Bolbukh T. V. // Stud. Biophys. – 1988. – V.123. – P.217-224.
6. Tolstorukov M.E., Gatash S.V., Maleev V.Ya. // Vestnik problem biologii i meditsiny. – 1998. – No.16. – P.6-12. (In Russian.)
7. Falk M., Hartman K. A., Lord R. C. // J. Am. Chem. Soc. – 1963. – V.85. – P. 387-391.
8. D'Arcy R.L., Watt J.C. // Trans. Faraday Soc. – 1970. – V.66. – P.1236-1245.
9. Gascoyne P.R.C., Pethig R. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. – 1977. – V.1. – P.171-180.
10. Bolbukh T. V., Semenov M. A., Starikov E. B., Maleev V. Ya. // Proc. of Third Europ. Conf. on the Spectr. of Biol. Mol. – Bologna (Italy). – 1989. – P.185-188.

РАЗДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛ ВОДЫ В ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКЕ ДНК ПО ЭНЕРГИЯМ СВЯЗЫВАНИЯ

К.М. Вирник*, М.Е. Толсторуков

**Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Академика Проскуры 12, Харьков, 310085
(e-mail: virnik@ire.kharkov.ua)*

*Кафедра молекулярной и прикладной биофизики, Харьковский государственный университет, пл. Свободы 4,
Харьков, 310077 (e-mail: tolstor@ktu.kharkov.ua)*

В данной работе проводилось изучение процесса связывания молекул воды с матрицей ДНК. Произведено разделение молекул воды гидратной оболочки ДНК по их энергиям связывания. При этом предполагалось, что молекулы воды могут участвовать в процессах сорбции (гидратации) трех типов: сорбции на Ленгмюровские центры связывания, сорбции на Генриевские центры связывания и мультислойной сорбции, т.е. сорбции на уже занятые места связывания. Обнаружено, что молекулы воды, сорбированные по различному типу, принимают участие в стабилизации определенной конформации ДНК в различной степени. Анализ полученных значений свободных энергий связывания молекул воды в пределах каждого типа сорбции показал, что вода, связанная с Ленгмюровскими центрами, главным образом способствует стабилизации А-ДНК. В то же время основная роль молекул воды, связанных с Генриевскими центрами заключается в стабилизации В-ДНК. Молекулы воды, образующие мультислой, наиболее важны для стабилизации как А-, так и В-формы ДНК по сравнению с неупорядоченным состоянием, хотя в большей мере это касается В-формы. Такое поведение молекул мультислоя может объясняться тем фактом, что основное формирование мультислоя происходит при высоком содержании воды, т.е. когда идет образование В-формы ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, конформации, гидратация, сорбция, энергия связывания

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА ПЕРЕХОД ДНК В КОМПАКТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ИОНАМИ Cu^{2+}

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

Поступила в редакцию 29 сентября 1998 г.

В работе методом ИК-спектроскопии изучено взаимодействие ионов Cu^{2+} с ДНК в водных растворах, содержащих добавки мочевины (0.17 ± 5 М). Во всех исследованных растворах под влиянием ионов Cu^{2+} происходил переход ДНК в компактное состояние, причем, как и в водном растворе, этот переход носил кооперативный характер. Показано, что добавление мочевины к водному раствору ДНК понижает концентрацию ионов Cu^{2+} , необходимую для индуцирования компактизации ДНК, что связано с усилением экранирующего действия противоионов за счет их дегидратации в присутствии мочевины. Вероятно, процесс перехода ДНК в компактное состояние под действием ионов меди определяется не только эффектами диэлектрической проницаемости раствора на связывание ионов Cu^{2+} с биополимером, но и эффектами сольватации, причем при небольших изменениях ϵ эффекты сольватации могут преобладать.

Добавление мочевины к раствору ДНК также понижает кооперативность процесса компактизации под действием ионов Cu^{2+} . Возможно, кооперативность перехода ДНК в компактное состояние хотя бы частично опосредована кооперативностью изменений структуры воды.

При увеличении концентрации ионов натрия в растворе переход ДНК в компактное состояние становится гораздо менее кооперативным и требует значительно большей концентрации ионов Cu^{2+} , что может объясняться конкуренцией ионов Na^+ и Cu^{2+} за места связывания на ДНК.

Связывание ионов Cu^{2+} с ДНК определяет переход ДНК в компактное состояние даже в растворах с измененной структурой воды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, ИК-спектроскопия, ионы меди, мочевина, конденсация ДНК.

В наших предыдущих работах [1-4] мы показали, что под действием двухвалентных ионов металлов, в частности, ионов Cu^{2+} , ДНК может переходить в компактную форму в водном и смешанных растворах, содержащих небольшие добавки незлектролитов, причем этот переход зависит не только от диэлектрической проницаемости, но и от структуры образующегося раствора. Исследованные в этих работах незлектролиты - 1,2-пропандиол, глицерин - при малых объемных концентрациях в растворе стабилизируют структуру воды. Поэтому представляется интересным изучить взаимодействие ионов Cu^{2+} с ДНК и происходящую в результате такого взаимодействия компактизацию ДНК в водных растворах, содержащих добавки мочевины, которая, как известно, является разрушителем структуры воды [5, 6].

По своему влиянию на структуру воды и конформацию макромолекул мочевина существенно отличается от добавок типа спиртов, что может быть обусловлено следующими факторами [6]:

- молекулы спиртов в качестве функциональной группы содержат ОН, в состав мочевины входят группы NH_2 и $\text{C}=\text{O}$;
- молекулы спиртов обладают существенно меньшей величиной дипольного момента (1.6 D) по сравнению с молекулами мочевины (5.7 D);
- добавление спиртов понижает статическую диэлектрическую проницаемость ϵ водно-незлектролитной смеси, смеси вода-мочевина характеризуются более высокой, чем у воды, величиной ϵ [5, 6].

В работах [7, 8] показана возможность связывания мочевины с ионами за счет нон-дипольного взаимодействия, в результате чего может происходить дегидратация противоионов и уменьшение их гидратных радиусов.

При высокой концентрации мочевины дестабилизирует двойную спираль ДНК, понижает температуру плавления и энтальпию перехода спираль-клубок [9-12]. В ряде работ дестабилизация молекул ДНК в водных растворах мочевины объясняется конкуренцией мочевины за образование водородных связей с азотистыми основаниями, а в других - уменьшением прочности ван-дер-ваальсовых взаимодействий при увеличении содержания мочевины в растворе [13, 14 и ссылки этой работы].

Дестабилизация в водных растворах с высокой концентрацией мочевины характерна не только для макромолекул ДНК, но и РНК, различных белков и хроматина [15-19], что говорит о неспецифичности действия мочевины. При увеличении концентрации мочевины происходит встраивание молекул мочевины непосредственно в гидратную оболочку и их взаимодействие с макромолекулой [20]. При этом за счет предпочтительного взаимодействия с макромолекулой [21]

молекулы мочевины могут образовывать водородные связи с атомами, участвующими в внутримолекулярных Н-связях [22], что приводит к дестабилизации биополимера.

Влияние мочевины на ДНК в зависимости от концентрации подробно исследовано в работах [6, 13, 23], в которых показано, что до концентрации ~ 2 М действие мочевины на структуру и конформацию ДНК носит, в основном, опосредованный характер через структуроразрушающее действие на воду. Последнее должно сопровождаться изменениями в гидратной оболочке ДНК, а именно уменьшением числа гидратированных на спирали ДНК молекул воды. При увеличении концентрации мочевины может происходить непосредственное связывание молекул амида с активными группами двойной спирали ДНК.

В водных растворах мочевины не происходит внутри- и межмолекулярной компактизации ДНК. Этот вывод вытекает из независимости гидродинамических свойств ДНК от присутствия мочевины [6], так как известно, что образование агрегатов должно приводить к изменению гидродинамических свойств ДНК. Полученные в работе [14] результаты свидетельствуют о том, что конформация ДНК в водных растворах мочевины принадлежит к В-семейству форм, при этом она отличается от конформации ДНК в водно-метанольных и водно-солевых растворах. Конформационный переход аналогичен $B \rightarrow C$ переходу, однако конечное состояние отличается от «чистой» С-формы ДНК.

Принимая во внимание все вышесказанное, в настоящей работе мы исследовали, в основном, относительно небольшие концентрации мочевины, влияющие на структуру ДНК путем изменения структуры раствора. Следует отметить, что, в отличие от спиртов, мочевина даже при незначительной концентрации неспособна стабилизировать структуру воды [5, 6], т.е. в исследованных нами растворах структуроразрушающий эффект мочевины сохранялся.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась нативная ДНК тимуса теленка с молекулярным весом $1.9 \cdot 10^7$ Да, содержанием белка менее 0.3 %, РНК менее 0.2 % и гипохромным эффектом 36 %. Количество элементов Na^+ и 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). Препараты ДНК растворяли в какодилатном буфере, $[\text{Na}^+] = 5 \cdot 10^{-3}$ М, $\text{pH} = 7 \pm 0.1$. Концентрация ДНК в растворе определялась с помощью УФ-спектроскопии [28] и была в пределах $(3 \div 5) \cdot 10^{-2}$ М фосфора.

В работе также использовались мочевина («Sigma») и CuCl_2 (х.ч.).

Инфракрасные спектры комплексов ДНК с ионами меди регистрировали с помощью двухлучевого инфракрасного спектрофотометра UR-20 (Karl Zeiss, Германия). Оптимальная ширина щели соответствовала целевой программе N 4, скорость регистрации спектра - $10 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$. Для записи спектров использовались флюоритовые разборные кюветы с толщиной рабочего слоя 50 мкм . Подробно конструкция кювет и принцип компенсации растворителя описаны в [25]. Кюветы термостатировались при 29°C .

Оптическую плотность D (с точностью 2 %) определяли методом базовой линии [26], за которую принимали значение D при построении общего спектра поглощения на частоте $\nu = 1400 \text{ см}^{-1}$, где отсутствовали полосы поглощения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе получены ИК-спектры ДНК и комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водных растворах, содержащих добавки мочевины (0.17 - 5 М). Спектры регистрировались в области поглощения фосфатных групп ДНК ($1000\text{-}1400 \text{ см}^{-1}$).

На рис.1 приведены ИК спектры ДНК и комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водных растворах мочевины с концентрациями 0.25, 0.5 и 5 М. Как видно из рис., в области поглощения фосфатных групп в спектрах ДНК и комплексов ДНК- Cu^{2+} в растворах мочевины, как и в водном растворе, присутствуют 3 основные полосы поглощения при 1053 (колебания С-О-Р групп сахарофосфатного остова), 1089-90 (симметричные колебания фосфатных групп) и 1223 см^{-1} (асимметричные колебания фосфатных групп). Во всех полученных спектрах четко выражена маркерная полоса В-формы ДНК при 1223 см^{-1} , причем, в отличие от комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водно-глицериновых и водно-пропандиоловых растворах [1], ее смещение составляет лишь $2\text{-}3 \text{ см}^{-1}$ в область больших частот при повышении концентрации меди. Это подтверждает данные работ [14, 23] о том, что конформация ДНК в водных растворах мочевины (при концентрации мочевины $< 5\text{-}6$ М) принадлежит к В-семейству форм. Маркерная полоса двухспирального состояния ДНК при 1053 см^{-1} также присутствует во всех полученных спектрах, при этом ее смещение к $1058\text{-}1060 \text{ см}^{-1}$ наблюдается лишь при достаточно высокой концентрации мочевины (5М) и ионов Cu^{2+} (> 0.016 М), что свидетельствует о частичном разупорядочении структуры ДНК в этих условиях.

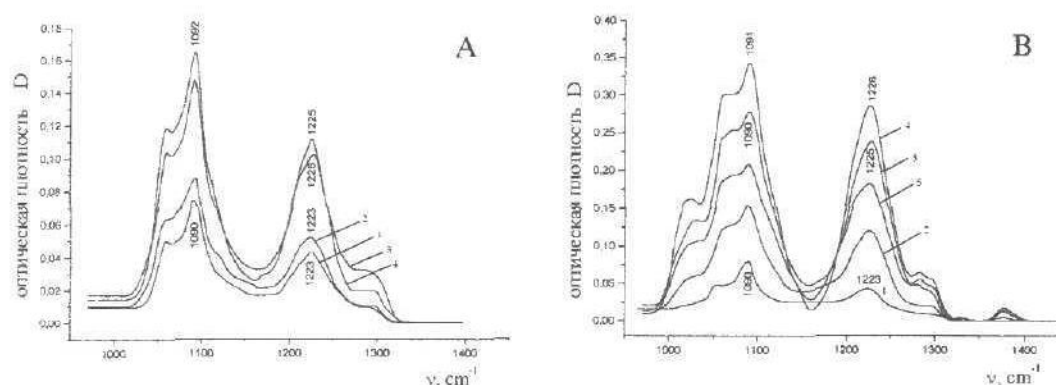


Рис. 1. ИК - спектры комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водных растворах мочевины с концентрацией 0.5 М (А) и 5 М (В). Концентрации ионов Cu^{2+} : А: 1 - 0; 2 - 0.0066; 3 - 0.0086; 4 - 0.011 М; В: 1 - 0; 2 - 0.0088; 3 - 0.0124; 4 - 0.015; 5 - 0.0176 М.

Из рис. 1 видно, что интенсивность полос поглощения фосфатных групп ДНК возрастает с увеличением концентрации ионов Cu^{2+} . В наших предыдущих работах мы связывали подобное увеличение интенсивности с переходом ДНК в компактную форму под действием ионов Cu^{2+} [1-4]. Таким образом, можно сказать, что компактизация ДНК при связывании с ионами Cu^{2+} происходит также в водных растворах мочевины.

На рис. 2 приведены зависимости относительного изменения оптической плотности R для полосы поглощения фосфатных групп ДНК при 1090 см^{-1} ($R = D_i/D_0$, где D_i - оптическая плотность в максимуме полосы поглощения комплекса ДНК с i -той концентрацией металла, D_0 - та же величина для ДНК без ионов двухвалентных металлов) от полной концентрации ионов Cu^{2+} в растворах, содержащих добавки мочевины. Из рис. 2 видно, что для всех исследованных растворов зависимости $R(C)$ (C - концентрация ионов Cu^{2+}) имеют вид кривой с насыщением, аналогичный зависимости для комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водном растворе. Подобный вид зависимостей $R(C)$ в наших предыдущих работах [1-3] мы объясняли высокой кооперативностью перехода ДНК в компактную форму в результате связывания с ионами Cu^{2+} . Данные рис. 2 позволяют заключить, что кооперативный характер процесса компактизации ДНК под действием ионов Cu^{2+} сохраняется в присутствии мочевины.

Как видно из рис. 2, с ростом концентрации мочевины максимальное увеличение интенсивности (то есть значения R при выходе зависимости $R(C)$ на насыщение) возрастает для обеих полос поглощения. Вероятно, подобный характер зависимости объясняется дегидратирующим влиянием мочевины как на макромолекулу ДНК, так и на ионы металлов, что приводит к более эффективному экранированию отрицательных зарядов на ДНК при связывании и, возможно, образованию более компактной структуры.

На рис. 3 приведены зависимости величины $C_{1/2}$ от концентрации мочевины в растворе для полос поглощения при 1090 и 1223 см^{-1} . Величину $C_{1/2}$ мы определяем как концентрацию, при которой значение R равно половине максимального для данной зависимости $R(C)$: $R(C_{1/2}) = R_{\text{max}}/2$. Таким образом, величина $C_{1/2}$ показывает, насколько зависимость $R(C)$ для комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водном растворе с i -той концентрацией мочевины сдвигается по оси концентраций относительно аналогичной зависимости для комплексов ДНК- Cu^{2+} в водном растворе.

Зависимость величины $C_{1/2}$ от концентрации мочевины можно разбить на 3 области (рис. 3). При относительно низких концентрациях мочевины (до $\sim 0.7\text{ М}$ - область А) добавление мочевины к водному раствору ДНК уменьшает концентрацию ионов Cu^{2+} , необходимую для перевода ДНК в компактное состояние. При увеличении концентрации мочевины до 1 - 2 М уменьшение величины $C_{1/2}$ прекращается, на зависимости наблюдается участок, почти параллельный оси x (область В), при еще большей концентрации мочевины (3 - 5 М) величина $C_{1/2}$ начинает немного возрастать, не достигая, однако, значений $C_{1/2}$ для водного раствора (область С). Суммируя, можно сказать, что при всех исследованных в работе концентрациях мочевины ее добавление к водному раствору ДНК понижает концентрацию ионов Cu^{2+} , необходимую для индуцирования компактизации ДНК. Уменьшение необходимой концентрации ионов Cu^{2+} наблюдалось также при добавлении 1,2-пропандиола к раствору ДНК [1, 2]. В этом случае для объяснения уменьшения концентрации ионов Cu^{2+} , необходимой для перевода ДНК в компактную форму, мы использовали теорию Мэннинга, так как, согласно [27], доля заряда, нейтрализованного при связывании полиэлектролита с противоионами, возрастает при понижении ϵ за счет

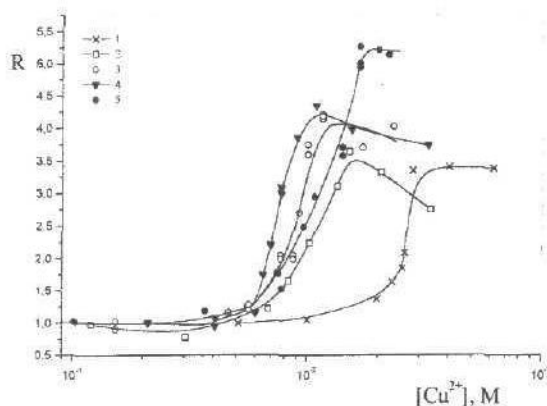


Рис. 2. Зависимости относительного изменения оптической плотности R от полной концентрации ионов Cu^{2+} в растворе для полосы поглощения при 1090 см^{-1} для комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в водных растворах мочевины с концентрацией: 0 (1), 0.17 (2), 0.25 (3), 1 (4) и 3 (5) М.

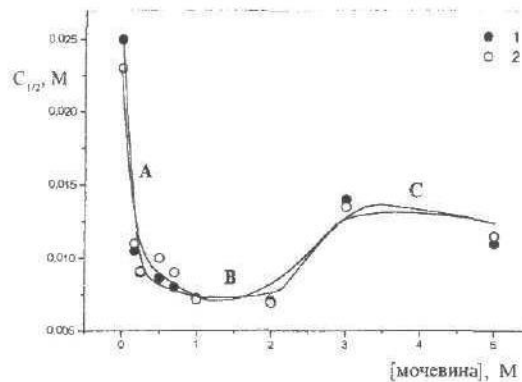


Рис. 3. Зависимости величины $C_{1/2}$ от концентрации мочевины в растворе для полос поглощения при 1090 (1) и 1223 см^{-1} для комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} .

добавления менее полярного, чем вода, 1,2-пропандиола. Однако присутствие мочевины, в отличие от пропандиола, в растворе приводит к возрастанию величины ϵ_s раствора, что исключает дополнительную конденсацию противоионов. Скорее возможна деконденсация противоионов, что должно приводить к возрастанию объемных эффектов в макромолекуле и увеличению концентрации ионов Cu^{2+} , необходимой для перевода ДНК в компактное состояние. Характер зависимости $C_{1/2}$ от концентрации мочевины можно объяснить тем, что в данном случае присутствует конкуренция двух разнонаправленных процессов: с одной стороны, при увеличении диэлектрической проницаемости раствора при добавлении мочевины уменьшается доля заряда на фосфатах, нейтрализованного за счет связывания полиэлектролита с противоионами, с другой стороны, дегидратация ионов Na^+ и Cu^{2+} приводит к более эффективной экранировке зарядов на фосфатах, что усиливает эффект ионов Cu^{2+} . Возможно, что при различных концентрациях мочевины соотношение между этими процессами различно, что и определяет характер зависимости $C_{1/2}$ от концентрации мочевины. Вероятно, в области А преобладают именно эффекты, связанные с дегидратирующим влиянием мочевины на противоионы (Na^+ и Cu^{2+}) и саму макромолекулу. Таким образом, в данном случае процесс перехода ДНК в компактное состояние под действием ионов меди определяется не только эффектами изменения диэлектрической проницаемости раствора, но и эффектами сольватации. При небольших изменениях диэлектрической проницаемости (при концентрации мочевины 8 М величина ϵ_s раствора ≈ 96 , т.е. на 20% больше значение ϵ_s воды) эффекты сольватации могут преобладать. Подобное заключение согласуется с данными работы [28], в которой показано, что добавление амидов к водному раствору ДНК понижает константы связывания некоторых лекарственных веществ с ДНК, причем наблюдается линейная зависимость между свободной энергией интеркаляции и концентрацией соразтворителя. Авторы [28] также делают вывод о том, что основное действие амидов не может быть связано только с электростатическими эффектами, так как учет электростатических эффектов дает гораздо меньшее изменение констант связывания, чем наблюдалось в работе, а определяется эффектами сольватации.

В областях В и С, в которых наблюдается возрастание величины $C_{1/2}$, помимо усиления экранировки зарядов на фосфатах ДНК, приводящей к уменьшению величины $C_{1/2}$, должны присутствовать иные механизмы влияния мочевины на связывание ионов меди с ДНК. Среди возможных механизмов можно отметить возрастание ϵ_s раствора при повышении концентрации мочевины, препятствующее дополнительной конденсации противоионов, необходимой для компенсации заряда на ДНК, а также конкуренцию молекул мочевины и ионов Cu^{2+} за места связывания на ДНК (в работах [11, 14] показано, что при концентрации мочевины порядка 3 М происходит непосредственное взаимодействие мочевины с ДНК за счет образования водородных связей, при этом молекулы мочевины преимущественно связываются с основаниями ДНК [6, 14]). Кроме того, в работе [29] приводятся данные о превращении дестабилизирующего действия L-глутамина и акриламида на ДНК в стабилизирующее при увеличении концентрации лиганда в узком интервале концентраций. Совпадение влияния глутамина и акриламида на температуру и интервал плавления ДНК позволило авторам [29] предположить, что эффект дестабилизации или стабилизации ДНК обусловлен именно амидной группой. В обзоре [30] рассмотрена теоретическая возможность дополнительной стабилизации соседних GC-пар в двойной спирали ДНК за счет

Влияние мочевины на переход ДНК в компактное состояние ...

образования амидной группой водородных связей с N4-Н цитозина одной пары и O6 гуанина второй. Такое комплексообразование эквивалентно увеличению стэкинг-взаимодействия в этих парах. Таким образом, в зависимости от концентрации мочевины и характера образующихся водородных связей мочевины с ДНК ее связывание с азотистыми основаниями может приводить либо к дестабилизации, либо к стабилизации двойной спирали. Исходя из зависимости, приведенной на рис. 3 (область С), можно предположить, что взаимодействие мочевины с ДНК при увеличении концентрации мочевины может приводить к частичной стабилизации структуры ДНК, что, в свою очередь, приводит к увеличению концентрации ионов Cu^{2+} , необходимой для перевода ДНК в компактную форму.

Из анализа данных, приведенных на рисунке 2, также следует, что переход ДНК в компактное состояние в водных растворах мочевины происходит в большем интервале концентраций ионов Cu^{2+} , чем переход ДНК в водном растворе, то есть имеет меньшую кооперативность. Для количественной характеристики интервала концентраций ионов Cu^{2+} , в котором происходит переход ДНК в компактную форму, мы ввели величину Ω : $\Omega = \frac{\Delta C}{C_{1/2}}$, где ΔC -

интервал перехода, определяемый по аналогии с величиной интервала плавления ДНК [24]. Таким образом, значение $1/\Omega$ пропорционально параметру кооперативности процесса компактизации ДНК, введенному в работе [3]. На рис. 4 приведены зависимости Ω_0/Ω_i (где Ω_i - величина, характеризующая переход ДНК в компактную форму в растворе с i -той концентрацией мочевины, Ω_0 - та же величина для раствора, не содержащего добавки мочевины) от концентрации мочевины в растворе. Из рис. 4 следует, что кооперативность процесса компактизации ДНК под действием ионов Cu^{2+} уменьшается при добавлении мочевины вплоть до ~ 0.7 -1 М, при дальнейшем увеличении концентрации мочевины величина Ω практически не изменяется. Возможно, это связано с тем, что при добавлении мочевины нарушается упорядоченная структура воды, в том числе входящей в гидратную оболочку ДНК. Таким образом, можно предположить, что кооперативность перехода ДНК в компактное состояние под действием ионов Cu^{2+} хотя бы частично опосредована кооперативностью изменений структуры воды.

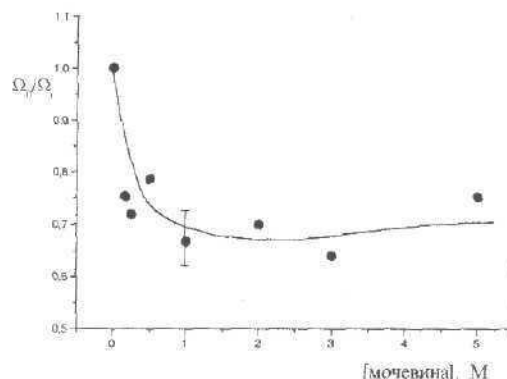


Рис. 4. Зависимость Ω_0/Ω_i от концентрации мочевины в растворе для полосы поглощения при 1090 см^{-1} .

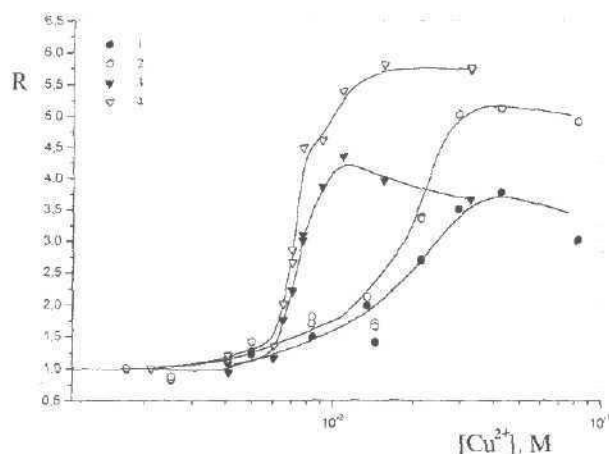


Рис. 5. Зависимости относительного изменения оптической плотности R от полной концентрации ионов Cu^{2+} в растворе для полос поглощения при 1090 (1 и 3) и 1223 см^{-1} (2 и 4) для комплексов ДНК с ионами Cu^{2+} в 1 М - растворах мочевины с концентрацией ионов Na^+ - 7×10^{-2} (1 и 2) и 10^{-3} М (3 и 4).

На рисунке 5 приведены зависимости относительного изменения оптической плотности R полос поглощения фосфатных групп ДНК от полной концентрации ионов Cu^{2+} в растворе для ДНК в 1-молярном растворе мочевины, содержащем различные концентрации ионов натрия. Из рисунка следует, что при увеличении концентрации ионов натрия в растворе до $\sim 10^{-1}$ М переход ДНК в компактное состояние становится гораздо менее кооперативным и требует значительно большей концентрации ионов Cu^{2+} . Подобное влияние повышенной концентрации ионов натрия на взаимодействие ионов Cu^{2+} с ДНК может объясняться, во-первых, конкуренцией ионов Na^+ и Cu^{2+} за места связывания на фосфатах ДНК, и, во-вторых, усилением неспецифического дебай-хьюккелевского экранирования зарядов на ДНК. Данные настоящей

работы по связыванию ионов Cu^{2+} с ДНК в водных растворах мочевины согласуются с литературными данными по связыванию ионов Cu^{2+} с ДНК в водных растворах с различной концентрацией ионов Na^+ [24 и ссылки этой работы]. В частности, в работе [31] показано, что

константа связывания ионов Cu^{2+} с основаниями нативной ДНК при 10^{-3} М Na^+ в растворе почти на порядок больше константы связывания при 10^{-2} М Na^+ .

Характер связывания ионов Cu^{2+} с ДНК в водных растворах мочевины в зависимости от концентрации ионов Na^+ , полученный в настоящей работе, подобен характеру связывания различных ионов ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, спермин, спермидин) с ДНК в водных растворах [32]. Таким образом, связывание ионов Cu^{2+} с ДНК определяет переход ДНК в компактное состояние даже в растворах с измененной структурой воды.

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

Во всех исследованных в данной работе растворах мочевины под влиянием ионов Cu^{2+} происходит переход ДНК в компактное состояние, причем, как и в водном растворе, этот переход носит кооперативный характер. Показано, что добавление мочевины к водному раствору ДНК понижает концентрацию ионов Cu^{2+} , необходимую для индуцирования компактизации ДНК. Это связано с усилением экранирующего действия противоионов за счет их дегидратации в присутствии мочевины. Вероятно, процесс перехода ДНК в компактное состояние под действием ионов меди определяется не только эффектами диэлектрической проницаемости раствора на связывание ионов Cu^{2+} с биополимером, но и эффектами сольватации, причем при небольших изменениях диэлектрической проницаемости эффекты сольватации могут преобладать.

Добавление мочевины к раствору ДНК также понижает кооперативность процесса компактизации под действием ионов Cu^{2+} . Возможно, кооперативность перехода ДНК в компактное состояние хотя бы частично опосредована кооперативностью изменений структуры воды.

При увеличении концентрации ионов натрия в растворе переход ДНК в компактное состояние становится гораздо менее кооперативным и требует значительно большей концентрации ионов Cu^{2+} , что может объясняться конкуренцией ионов Na^+ и Cu^{2+} за места связывания на ДНК. Таким образом, связывание ионов Cu^{2+} с ДНК определяет переход ДНК в компактное состояние даже в растворах с измененной структурой воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хакл Е.В., Корнилова С.В., Благой Ю.П. // Біофізичний вісник. 1998. № 1. Ст. 62-70
2. Hackl E., Kornilova S., Blagoi Yu. // Metal ions in biology and medicine. 1998. V. 5. P. 74-79
3. Hackl E., Kornilova S., Kapinos L. et al. // J. Mol. Struct. 1997. V. 408/409. P. 229-232
4. Хакл Е.В., Корнилова С.В., Благой Ю.П. // Вестник проблем биологии и медицины 1998. N 8. С. 41-51
5. Структура и стабильность биологических макромолекул. - М.: Мир, 1973. - 220с.
6. Веселков А.Н. Влияние внешних факторов на конформацию молекулы нуклеиновой кислоты в растворе. Дис... д-р физ.-мат. наук. Севастополь. 1988. 463 с.
7. Schleich T., Genzler R., von Hippel P. // J. Amer. Soc. 1968. V. 90. P. 5954-5960
8. Самойлов О.Я. Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов. М.: АН СССР, 1957. - 189 с.
9. Olins D., Bryan P., Harrington R., et al. // Nucleic Acids Res. 1977. V. 4(6). P. 1911-1931
10. Chan H.K., Au-Yeung K.L., Gonda I. // Pharm. Res. 1996. V. 13(5). P. 756-761
11. Бабаян Ю.С. // Молек. биол. 1988. Т. 22. вып. 5. с. 1204-1209
12. Klump H., Burkart W. // Biochim Biophys Acta. 1977. 475(4). P. 601-604
13. Бабаян Ю.С. Влияние мочевины на конформацию молекулы ДНК. Дис... канд. ф.-м. наук, Ереван, 1980, 120с.
14. Асланян В.М., Бабаян Ю.С., Арутюнян С.Г. // Биофизика. 1984. Т. 29. вып. 3. С. 372-376
15. Ling G.N., Ochsenfeld M.M. // Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. 1989. V. 21(1). P. 19-44
16. Rose C., Mandal A.B. // Int. J. Biol. Macromol. 1996. 18(1-2). P. 41-53
17. From N.B., Bowler B.E. // Biochemistry. 1998. 37(6). P. 1623-1631
18. Dotsch V., Wider G., Siegal G., Wuthrich K. // FEBS Lett. 1995. V. 372 (2-3). P. 288-290
19. Zama M., Olins D.E., Wilkinson-Singley E., Olins A.L. // Biochem Biophys Res Comm. 1978. 85(4). P. 1446-1452
20. Tirado-Rives J., Orozco M., Jorgensen W.L. // Biochemistry. 1997. 36(24). P. 7313-7329
21. Dotsch V., Wider G., Siegal G., Wuthrich K. // FEBS Lett. 1995. V. 366 (1). P. 6-10
22. Schellman J.A., Gassner N.C. // Biophys. Chem. 1996. 59(3). P. 259-275
23. Слоникский С.В., Лаевский В.В., Фрисман Э.В. // Мол. биол. 1980. Т. 14. вып. 4. С. 743-752
24. Ю.П.Благой, В.Л.Галкин, Г.О.Гладченко и др. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наукова думка. 1991. - 272 с.
25. Кальвин Н.Н., Вельяминов С.Ю. // ЖПС. 1987. N 4. С. 592-597
26. Бабушкин А.А., Бажулин П.А., Королев Ф.В. и др. Методы спектрального анализа. М., МГУ. 1962. 273 с.
27. Manning G. // Q Rev Biophys. 1978. V. 11(2). P. 179-246
28. Varani G., Della Torre L., Baldini G. // Biophys Chem. 1987. 28(3). P. 175-181
29. Смольянинова Т.И., Брусков В.И., Кашпарова Е.В. // Мол. биол. 1985. Т. 19. вып. 4. С. 992-1000
30. Helene C., Lancelot G. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1982. V. 39(1). P. 1-68
31. Sorokin V.A., Blagoi Yu.P., Valeev V.A. et al. // J. Inorg. Biochem. 1987. 30. N. 2. P. 87-101.
32. Braunlin W.H., Anderson C.F., Record M.T. Jr. // Biochemistry. 1987. V. 1. 26(24). P. 7724-7731.

УДК 577.322.7+591.111.1:57.043

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТРОМБОЦИТЫ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

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

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

Поступила в редакцию 12 октября 1998 г.

Методом УФ-спектрофотометрии исследованы изменения структурного состояния тромбоцитов до и после АДФ-индуцированной агрегации в области температур 6-40°C. Отмечено изменение формы нативных тромбоцитов при температурах 14-18°C при нагревании суспензии клеток, связанное, по-видимому, с реорганизацией микрофиламентов примембранного цитоскелета и полимеризацией актина. Предполагается, что наблюдаемые структурные изменения, по-видимому, мембранных рецепторов АДФ и фибриногена, при 18-20°C и 30-32°C определяют характер зависимости параметров АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов от температуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, агрегация, мембранные рецепторы, температура, ультрафиолетовая спектрофотометрия

В практике трансфузиологии тромбоциты обычно хранятся при 22°C, реже при 4°C, так как температура хранения оказывает значительное влияние на характеристики конечного продукта, в том числе и на поведение тромбоцитов в кровяном русле после трансфузии [1,2]. В частности известно, что тромбоциты, хранившиеся при 4°C в течение 24 часов клинически эффективны сразу же после переливания, тогда как хранившиеся при 22°C в течение тех же 24 часов должны некоторое время циркулировать в кровяном русле реципиента перед тем, как их функциональная активность станет определяемой [3].

Ранее нами было показано, что зависимость функциональной активности тромбоцитов от температуры имеет экстремальный характер [4]. Максимальная АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов наблюдается при 18-22°C, а скорость процессов связанных с образованием агрегатов максимальна при температурах 30-34°C. Показано влияние температуры и на структурно-морфологические характеристики тромбоцитов. Так, по мере снижения температуры, при 12-13°C происходит изменение формы тромбоцитов, обусловленное изменением структуры микротрубочек примембранного слоя, причем данные изменения, по-видимому, обратимы [5].

Роль тромбоцитарного цитоскелета и его структурного состояния в функционировании клетки в области физиологических температур недостаточно ясна, хотя известно, что дискообразная форма интактного тромбоцита без псевдоподий поддерживается кольцом микротрубочек, построенным из максимально полимеризованного тубулина и примембранным поясом микрофиламентов (основу которого составляет актин) [6]. При исследовании тромбоцитов в ряде работ было показано, что методы УФ-спектрофотометрии способны дать информацию о состоянии актина цитоскелета этих клеток [7].

В данной работе проведено спектрофотометрическое исследование спектральных характеристик обогащенной тромбоцитами и бестромбоцитарной плазмы (ОТП и БТП) крови человека, в области температур 6-40°C, до и после агрегации, индуцированной АДФ, с целью выявления вклада структурного состояния белков тромбоцитов в морфо-функциональные изменения кровяных пластинок при действии температуры. Изменения структурного состояния тромбоцитарных белков оценивали по изменению спектров поглощения суспензии клеток в ультрафиолетовом диапазоне длин волн.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) выделяли из стабилизированной цитратом натрия крови доноров путем центрифугирования в течение 10 мин при 167g, бестромбоцитарную плазму (БТП) – центрифугированием ОТП 15 мин при 1100g [8]. Для исследования спектров поглощения ОТП разводили фосфатным буфером (рН 7,2), концентрация тромбоцитов в кювете составляла $(2-3) \cdot 10^5$ кл/мм³. Спектры поглощения БТП, ОТП и суспензии клеток после агрегации получали с помощью ультрафиолетового регистрирующего спектрофотометра "PYE UNICAM SP 8000" (Великобритания) в диапазоне 250-350 нм. Запись спектров проводилась через 2°C при нагревании клеточных суспензий от 6 до 40°C. По спектрам поглощения определялись мутность раствора, интенсивность поглощения и интенсивность максимумов первой производной спектров поглощения (ПСП).

Агрегацию тромбоцитов вызывали добавлением $2 \cdot 10^{-5}$ М раствора АДФ ("Реанал") к ОТП в объемном отношении 1:9 и перемешиванием в течение 15 мин при скорости вращения мешалки 10 с⁻¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ПСП БТП наблюдаются хорошо разрешенные максимумы 287, 292-293 нм, менее интенсивный - 288 нм и пики 280-282, 298 нм.

В ИПСП ОТП до агрегации регистрируются отрицательные максимумы 287, 292-293 нм, менее интенсивные 288, 291, 295 нм и слабые пики 280-282, 284, 298 нм.

После агрегации изменяется вид ИПСП. Уменьшается интенсивность указанных выше максимумов. Максимумы 290 нм, 284 нм, 296 нм практически исчезают из ИПСП, но появляются интенсивные максимумы 286, 288-289, 298 нм и слабые пики 270, 274, 280-281 нм.

Изменение мутности БТП происходит при 16-18°C, в ОТП такое изменение происходит при 14-18°C, а в ОТП после агрегации изменение мутности отмечено около 30°C.

Интенсивность максимумов ИПСП зависит от температуры, причем изменения спектральных характеристик БТП и ОТП происходят в несовпадающих температурных областях. Так, изменения интенсивности максимумов ИПСП БТП 281, 292-293, 298 нм отражают существование общего структурного перехода белков плазмы около 20°C, зафиксированного ранее другими методами [9].

Интенсивность основных максимумов ИПСП ОТП 287 и 292-293 нм практически не изменяется во всем диапазоне температур. Но для некоторых пиков наблюдаются температурные интервалы, в которых интенсивность пиков ИПСП резко меняется. Так для ОТП наблюдается изменение интенсивности пиков 280 нм при температуре 30-32°C (Рис. 1), 284 нм при 14-16°C (Рис. 2), а при температурах 18-20°C изменяются интенсивности максимумов ИПСП 288 и пика 298 нм (Рис. 3, 4).

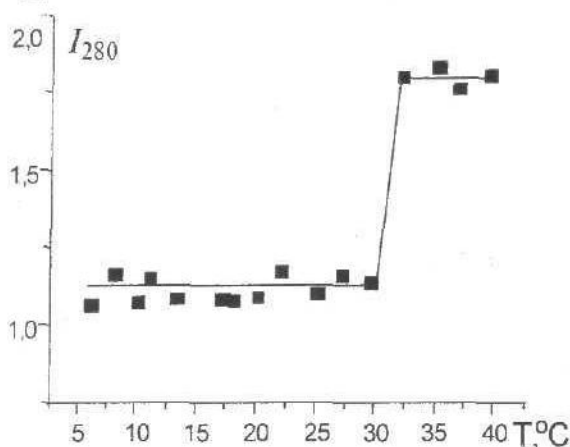


Рис. 1. Зависимость интенсивности пика ИПСП 281 нм от температуры.

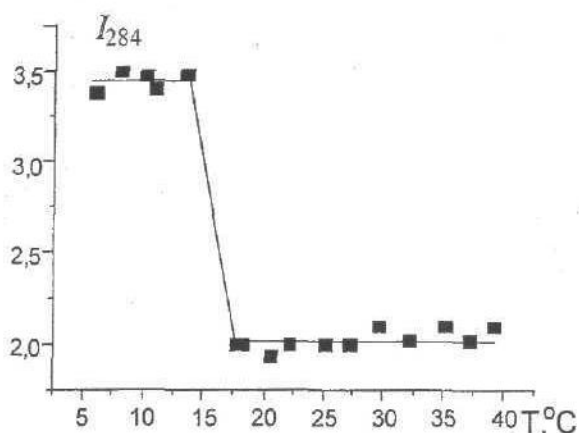


Рис. 2. Зависимость интенсивности максимума ИПСП 284 нм ОТП от температуры.

После агрегации в ИПСП суспензии клеток наблюдается изменение системы термопереходов на разных полосах. Изменение интенсивности максимума 298 нм происходит при температуре 30°C, вместо 18°C до агрегации. При температуре около 20°C происходит изменение интенсивности максимума ИПСП 292-293 нм и пика 280-281 нм.

Мутность суспензии нативных тромбоцитов изменяется при температурах 14-18°C (Рис. 5). В литературе встречаются сведения о том, что при охлаждении при температурах 12-13°C изменяется форма тромбоцитов [5]. При этом наблюдаются изменения в структуре цитоскелета: происходит деполимеризация тубулина, распад микротрубочек и примембранного пояса микрофиламентов [6]. С другой стороны известна обратимость эффектов охлаждения-нагрева тромбоцитов, в частности показано, что нагревание до 37°C стимулирует сборку микротрубочек, а охлаждение до 4°C блокирует этот процесс и вызывает их распад [8]. Поэтому зарегистрированное в работе изменение мутности ОТП при 14-18°C, предположительно, связано с изменением формы клеток от сферы к диску.

Неким подтверждением существования изменения формы тромбоцитов при 14-18°C служит обнаруженный факт температурозависимых изменений интенсивности максимумов ИПСП ОТП 284 и 288 нм.

Во всем исследованном диапазоне температур интенсивность максимума ИПСП 288 нм значительно выше у ОТП до агрегации чем у суспензии клеток после агрегации. Максимум 288 нм по-разному ведет себя у нативных и агрегированных тромбоцитов, то есть, по-видимому, имеет отношение к агрегации тромбоцитов.

Изменения интенсивности максимума ИПСП 288 нм происходят при 18-20°C у ОТП и не наблюдаются для тромбоцитов после агрегации.

Интенсивности максимумов ИПСП 284 нм, 288 нм, по-видимому, меняются синхронно, но противоположно друг другу.

При нагревании ОТП отмечено уменьшение интенсивности пика ИПСП 284 нм при температурах 14-16°C, а при 18-20°C — увеличение интенсивности максимума 288 нм (Рис. 2, 3).

В работе [7] показано, что преобладание актина в значительной степени определяет форму спектра суммарного свечения тромбоцитов в коротковолновой области. Из результатов этой работы следует также, что при комнатной температуре полимеризация тромбоцитарного актина, при добавлении к суспензии тромбоцитов CaCl_2 в концентрации 10^{-4}M , сопровождается увеличением интенсивности максимума ИПСП 288 нм и исчезновением из ИПСП максимума 284 нм. Из этого, по-видимому, следует, что максимумы ИПСП суспензии нативных тромбоцитов 284 нм и 288 нм отра-

Спектрофотометрическое исследование влияния температуры на тромбоциты ...

жают состояние актина микрофиламентов цитоскелета тромбоцитов в мономерной и полимерной форме соответственно.

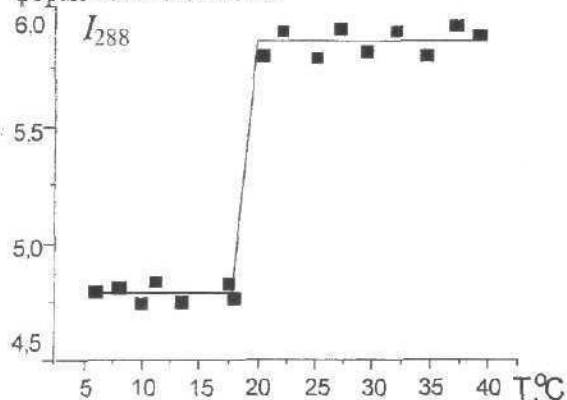


Рис. 3. Зависимость интенсивности максимума ИПСП 288 нм ОТП от температуры.

Рис. 4. Зависимость интенсивности пика ИПСП 298 нм ОТП от температуры.

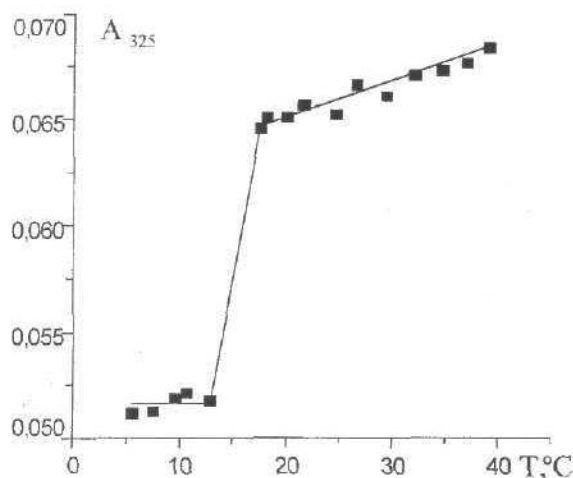
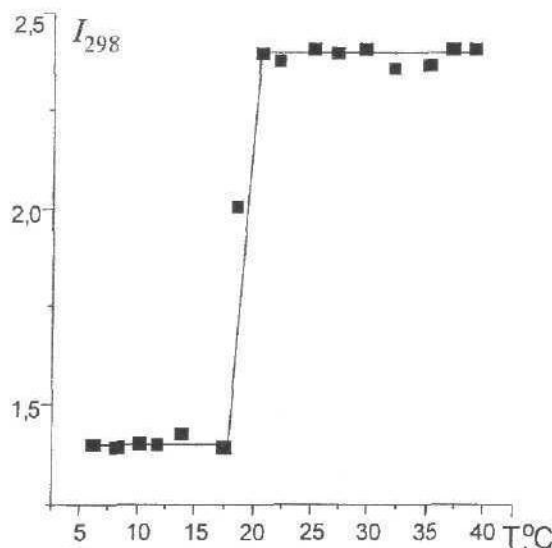


Рис. 5. Зависимость светорассеяния ОТП от температуры.

Поэтому можно предположить, что регистрируемые нами уменьшение интенсивности пика ИПСП 284 нм при температурах 14-16°C и увеличение интенсивности максимума 288 нм при 18-22°C свидетельствуют о полимеризации актина тромбоцитов в этой области температур. Этот процесс, вероятно, сопровождается наблюдаемым изменением формы клеток при 14-18°C, которое осуществляется благодаря изменению структурного состояния белков и, в частности, актина микрофиламентов примембранного цитоскелета [6].

Так как в БТП и суспензии тромбоцитов после агрегации не наблюдается значительных изменений интенсивности максимумов ИПСП 284 нм и 288 нм во всем диапазоне температур, можно предположить, что у тромбоцитов после агрегации не происходит дополнительной полимеризации актина при 18-20°C. Вероятно, это

является следствием того, что активация и агрегация клеток сопровождаются реорганизацией всего цитоскелета, полимеризацией актина, при этом депо G-актина полностью истощается [8].

Изменения интенсивности максимума ИПСП 288 нм происходят около 30°C в БТП.

В ИПСП ОТП при 18°C наблюдаются изменения интенсивности пика 298 нм, отражающего состояние внутренних гидрофобных (или трансмембранных) участков молекул белков, содержащих остатки триптофана [10].

Температура изменений интенсивности пика 298 нм совпадает с областью температур в которой происходит фазовый переход липидов мембран [11]. После агрегации изменение интенсивности пика 298 нм происходит при 30°C, при этих же температурах отмечено изменение интенсивности пика 270 нм, который определяется поглощением АДФ, и, вероятно, отражает состояние рецепторов АДФ на мембране тромбоцита с которым связан агонист. Вероятно поэтому, изменения интенсивности пика ИПСП ОТП 298 нм при 18°C отражают изменения состояния тромбоцитарного рецептора АДФ.

Совпадение участков температур, в которых происходит изменение мутности ОТП и интенсивности пика ИПСП 298 нм, подтверждает предположение о том, что существует связь между мембранными рецепторами АДФ и фибриногена и белками примембранного цитоскелета, а изменения структуры рецепторов и цитоскелета взаимосвязаны.

Изменение интенсивности пика ИПСП ОТП 280 нм при температурах 30-32°C (Рис.1) говорит, вероятно, об изменении структуры гидрофильных экстрацеллюлярных участков белков, содержащих остатки тирозина [10]. Из литературы известно, что цитоплазматические участки тромбоцитарного рецептора фибриногена комплекса гликопротеинов Pb-IIIa содержат остатки тирозина [12]. Однако рецепторы АДФ также представлены гликопротеинами, в состав которых весьма вероятно входит тирозин [13]. Показано, что изменение скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов происходит при температурах 30-34°C [4]. Совпадение температурных областей, в которых происходят изменения скорости агрегации тромбоцитов и интенсивности пика ИПСП ОТП 280 нм, вероятно, свидетельствуют о существовании некой взаимосвязи между ними. По-видимому, так как скорость агрегации определяется функциональным состоянием рецепторов, можно предположить, что изме-

нения интенсивности пика 280 нм при 30-32°C свидетельствуют о структурных изменениях тромбоцитарных рецепторов фибриногена и АДФ. Структурные изменения рецепторов при 30-32°C могут лежать в основе уменьшения скорости агрегации тромбоцитов (активации клеток), наблюдаемого при температурах выше 32-34°C [4].

Процессу АДФ-индуцированной агрегации предшествует стадия изменения формы клетки от диска к сфере с дальнейшим образованием псевдоподий. В таких преобразованных формах тромбоциты вступают во взаимодействие друг с другом и образуют агрегаты. Известно, что при изменении формы клетки происходит распад микротрубочек (деполимеризация тубулина), изменяется распределение микрофиламентов и микротрубочек, которое сопровождается быстрой полимеризацией актина [6]. По этой причине, вероятно, отсутствуют особенности в температурной зависимости светорассеяния проагрегировавших тромбоцитов при температурах 10-20°C. Характерно, что при этом не отмечено изменений полос 284, 288 нм.

Наблюдаемое увеличение светорассеяния при температуре 28-30°C суспензии тромбоцитов после агрегации, вероятно связано с изменением формы клеток. Этот процесс, по-видимому, имеет место при дезагрегации и сопровождается дальнейшей рефрактерностью тромбоцитов к действию индукторов [8]. Рефрактерные тромбоциты отличаются от интактных измененным структурным состоянием плазматической мембраны и деструктивными изменениями в системе микротрубочек. В тромбоцитах исчезают псевдоподии, но сохраняется организованный цитоскелет и остается нарушенной система микротрубочек. Авторы [8] предполагают, что рефрактерное состояние тромбоцитов может быть обусловлено тем, что при действии индуктора и активации клеток происходит взаимодействие цитоскелетных структур с гликопротеинами, являющимися рецепторами для АДФ. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемое в работе при 28-30°C увеличение мутности суспензии тромбоцитов после агрегации, по-видимому, обусловлено разрушением связей между рецепторами АДФ плазматической мембраны тромбоцита и микрофиламентами примембранного пояса цитоскелета.

Основываясь на полученных нами результатах можно предположить следующую гипотетическую схему изменения структурно-функционального состояния тромбоцитов в зависимости от температуры. Нагревание от 6°C приводит к изменению формы интактных тромбоцитов при 14-18°C. Этот процесс сопровождается изменениями структуры актина примембранного цитоскелета: при температурах 14-16°C наблюдается уменьшение количества G-актина в тромбоцитах (уменьшение интенсивности пика ПСП 284 нм) и увеличение содержания F-формы актина (что выражается в увеличении интенсивности максимума ПСП 288 нм). В этой же области температур отмечено изменение интенсивности максимума 298 нм, отражающего, по-видимому, состояние прежде всего тромбоцитарного рецептора АДФ. Вероятно эти изменения взаимосвязаны, так как возможность цитоскелета тромбоцитов влиять на состояние рецепторов АДФ была показана в работе [8]. Нельзя исключить и возможность участия рецептора фибриногена в этом процессе. Определенное влияние на изменение структуры рецепторов может оказывать и фазовый переход липидов мембран при 20°C. Возможно, отмеченные структурные изменения рецепторов при 18-20°C определяют изменение зависимости степени агрегации тромбоцитов от температуры при 20°C.

При дальнейшем увеличении температуры изменения структурно-функциональных свойств тромбоцитов, отражающиеся в наблюдаемых ранее изменениях температурной зависимости скорости агрегации от температуры при 30-34°C, также коррелируют с изменением структурных характеристик тромбоцитарных рецепторов.

В суспензии тромбоцитов после агрегации изменения структуры тромбоцитарных рецепторов наблюдаются при 30°C.

ВЫВОДЫ

Изменения морфо-функциональных характеристик тромбоцитов в зависимости от температуры связаны, по-видимому, при температурах ниже 20°C, с изменением структуры примембранного цитоскелета и изменением состояния мембранных рецепторов для индукторов и кофакторов агрегации; а в области температур около 30°C - с изменениями структуры рецепторов плазматической мембраны тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Welch M., Champion A.B. // *Transfusion*. 1985. V.25. P.283-285.
2. Компаниец А.М. Функциональная полноценность тромбоцитов, сохраняемых при различных температурных режимах. Автореф. дис... канд. мед. наук. М. 1980. 22 с.
3. Valeri C.R. // *Transfusion*. 1976. V.16. P. 20-23.
4. Берест В.П., Гаташ С.В. // *Физиологичний журнал*. 1998. Т.44, № 5-6. С.89-94.
5. Trenchard P.M. // *Journal of Medical Engineering and Technology*. 1988. Vol. 12, № 2. P. 47-53.
6. Ермолаева Т.А. // *Гематология и трансфузиология*. 1989. Т.34, № 2. С. 43-49.
7. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. // *Биофизика*. 1983. Т. 28, вып. 2. С. 298-301.
8. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: Методы изучения и механизмы. Минск. Университетское, 1990. 104 с.
9. Липина О.В., Морозова Т.Ф. // *Биофизика*. 1991. Т. 36, вып. 3. С. 509-510.
10. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев, Наук. думка, 1981. 208 с.
11. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. М. Наука, 1981. 296 с.
12. Calvete J.J. In: *Cell Adhesion Molecules*. New York. Plenum Press, 1993. P.63-91.
13. Pawłowska Z., Cierniewski C., Krzesłowska J., Koziolkiewicz W. // *Postępy Biochemii*. 1988. T.34, Zes.3. P.183-207.

УДК 577.37

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ С ЛИПОСОМАМИ

Г.П.Горбенко

Харьковский государственный университет, пл. Свободы 4, 310077

Поступила в редакцию 22 сентября 1998 г.

Исследовано взаимодействие катионного белка рибонуклеазы с отрицательно заряженными липосомами, состоящими из смесей фосфатидилхолина с дифосфатидилглицерином. В рамках решеточных и континуальных моделей адсорбции больших лигандов на поверхности проведена оценка параметров образования белок-липидных комплексов. Обнаружена положительная кооперативность связывания рибонуклеазы с липидным бислоем. Предполагается, что при возрастании заряда бислоя увеличивается степень самоассоциации связанного белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибонуклеаза, липосомы, модели адсорбции, параметры связывания, кооперативность, самоассоциация белка

Взаимодействие белков с липидным бислоем, являющееся одной из стадий формирования надмолекулярной структуры биомембран [1], характеризуется рядом особенностей, существенно осложняющих термодинамический анализ процесса комплексообразования. Особые статистические свойства белок-липидных систем определяются, в частности, а) большим размером лиганда, т.е. способностью белка одновременно контактировать с несколькими центрами связывания, б) стерическими препятствиями, возникающими при адсорбции (эффект исключенной площади), в) зависимостью процесса связывания от формы лиганда, т.е. от формы контактного участка в белок-липидном комплексе. Попытки учесть эти особенности привели к развитию моделей адсорбции больших лигандов на поверхности, которые можно разделить на две группы - решеточные и континуальные [2-6]. Несмотря на то, что эти модели позволяют получить наиболее корректную оценку параметров комплексообразования в белок-липидных системах, в литературе описаны лишь единичные случаи их применения [4,7,8].

В настоящей работе модели адсорбции больших лигандов на поверхности были использованы для анализа данных по связыванию катионного белка рибонуклеазы с липосомами, состоящими из смеси цвиттерийного фосфолипида фосфатидилхолина (ФХ) с отрицательно заряженным фосфолипидом дифосфатидилглицерином (ДФГ). Кривые связывания белка с модельными мембранами получали с помощью предложенного ранее метода, основанного на изучении конкурентного взаимодействия флуоресцентного зонда 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний п-толуолсульфоната (ДСМ) и рибонуклеазы с липидным бислоем [9-11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ФХ, ДФГ (Концерн "Биолек", Харьков), рибонуклеазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота ("Reanal", Венгрия). Липосомы формировали из смесей ФХ с ДФГ как описано в [11]. При анализе экспериментальных данных использовали решеточные модели адсорбции линейного лиганда и диска на однородной поверхности, связывания диска с разреженными центрами, кооперативного связывания линейного лиганда [3,4] и континуальные модели связывания линейного лиганда и диска с поверхностью [6]. Взаимодействие линейного лиганда с двумерной решеткой центров описывали соотношениями:

$$K_a F = \frac{r}{1 - nr} \left(\frac{1 - (1 - \lambda)nr}{1 - nr} \right)^{n-1}; r = \frac{B}{L}; \lambda = \frac{z-2}{z} - \frac{2}{nz} \quad (1)$$

где B, F - концентрации связанного и свободного белка, соответственно, n - число липидных молекул, приходящихся на молекулу связанного белка, K_a - константа ассоциации, z - координационное число решетки ($z=6$), L - концентрация липида. В предположении дискообразной формы лиганда кривые связывания анализировали с помощью соотношения:

$$K_a F = \frac{r}{1 - nr} \exp \left(\frac{\alpha nr}{1 - \alpha r} \right) \quad (2)$$

где α - параметр исключенной площади (для диска $\alpha=3$), $\omega = 2\sqrt{3}n/\pi$. Связывание диска с разреженными центрами решетки описывали уравнением:

$$K_a F = \frac{r}{(1-nr)^n} \exp\left(\frac{\alpha nr}{1-nr}\right) \quad (3)$$

При анализе возможности кооперативного взаимодействия линейного лиганда с поверхностью использовали соотношения:

$$K_a F = B_0 (1 + A/p)^\delta (1 + Ap)^{-r-\delta}; \quad B_0 = \frac{r}{1-nr} \left(\frac{1-(1-\lambda)nr}{1-nr} \right)^r; \quad p = \frac{\lambda nr}{1-nr};$$

$$A = (\sqrt{\eta} - 1) / (\sqrt{\eta} + 1); \quad \sqrt{\eta} = \left[1 + \frac{4(\eta-1)\lambda nr(1-nr)}{(1-(1-\lambda)nr)^2} \right]^{1/2} \quad (4)$$

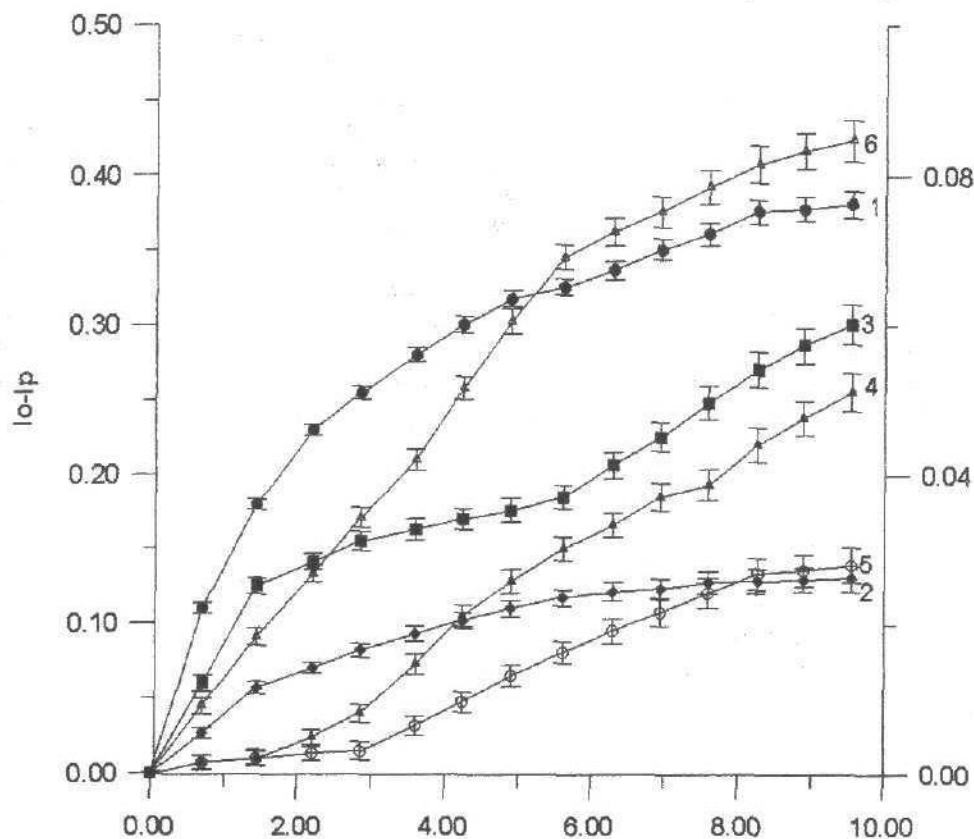
где η - параметр кооперативности. Континуальные модели были представлены соотношениями:

$$K_a F = \Phi G(\Phi); \quad \ln G = -\ln(1-\Phi) - \varepsilon - 1 + \frac{1}{1-\Phi} + \frac{\varepsilon}{(1-\Phi)^2}; \quad (5)$$

где ε - параметр, зависящий от формы лиганда, ($\varepsilon=1$ для диска, $\varepsilon = (g/\pi)(1+1/g)^2$ для прямоугольника с соотношением осей g).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами сопровождается уменьшением флуоресценции ДСМ, которое является следствием конкуренции между белком и зондом за мембранные центры связывания.



Концентрация белка, мкМ

Рисунок 1. Изменение интенсивности флуоресценции ДСМ при добавлении рибонуклеазы. Содержание ДФГ, мол.% - 1 - 5, 2 - 11, 3 - 25, 4 - 43, 5 - 67, 6 - 100. Концентрация липидов, мкМ: 1 - 67, 2 - 61, 3 - 23, 4 - 11, 5 - 9, 6 - 4. Концентрация ДСМ - 5 мкМ. Кривым 2, 5, 6 соответствует левая ось Y, кривым 1, 3, 4 - правая ось Y. I_0 - интенсивность флуоресценции ДСМ в отсутствие белка.

Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами

На рис. 1 представлены типичные кривые вытеснения зонда белком, полученные при изучении зависимости флуоресценции ДСМ от концентрации рибонуклеазы. Предыдущие исследования показали, что в липосомальных мембранах имеется два типа центров сорбции ДСМ, различающиеся по параметрам связывания и молярной флуоресценции [12]. Было высказано предположение, что конкуренция между ДСМ и рибонуклеазой происходит, главным образом, за более полярные участки связывания [11]. В настоящей работе предложенный ранее метод конкурентного анализа [10,11] был развит для случая конкуренции за оба типа центров сорбции. Первый этап анализа данных заключался в оценке доли площади поверхности липосом, занятой белком, из экспериментальных зависимостей интенсивности флуоресценции ДСМ (I_p) от концентрации белка (P). Интенсивность флуоресценции ДСМ, связанного с центрами двух типов, можно представить в виде:

$$I_p = B_1 f_1 + B_2 f_2 \quad (6)$$

где B_i - концентрация зонда, f_i - интенсивность флуоресценции одного моля зонда, связанного с центрами i -го типа (отметим, что флуоресценция свободного зонда пренебрежимо мала по сравнению с измеряемой величиной I_p). Концентрация свободного зонда (Z_f) равна:

$$Z_f = Z_o - B_1 - B_2 = Z_o - \frac{I_p}{f_2} - B_1 \left(1 - \frac{f_1}{f_2}\right) = a_1 - B_1 a_2 \quad (7)$$

где Z_o - общая концентрация зонда. Константы связывания зонда с центрами двух типов определяются выражениями:

$$K_1 = \frac{B_1}{Z_f N_1^f}; K_2 = \frac{B_2}{Z_f N_2^f} \quad (8)$$

где N_1^f, N_2^f - концентрации свободных центров связывания. Из соотношений (8) получаем:

$$N_1^f = \frac{B_1}{Z_f K_1}; \quad N_2^f = \frac{B_2}{Z_f K_2}; \quad \frac{B_1}{K_1 N_1^f} = \frac{B_2}{K_2 N_2^f} \quad (9)$$

Если общее число центров 1-го и 2-го типов обозначить N_1 и N_2 , доля площади поверхности, занятой белком, будет равна:

$$\Phi = 1 - \frac{N_1^f + B_1}{N_1} = 1 - \frac{N_2^f + B_2}{N_2} \quad (10)$$

Из уравнений (6), (7), (9) и (10) получаем:

$$B_2 = \frac{B_1 N_2 \left(1 + \frac{1}{K_1(a_1 - B_1 a_2)}\right)}{N_1 \left(1 + \frac{1}{K_2(a_1 - B_1 a_2)}\right)} = \frac{I_p - B_1 f_1}{f_2} \quad (11)$$

Выражение (11) можно преобразовать в квадратное уравнение:

$$aB_1^2 + bB_1 + c = 0; \text{ где}$$

$$a = K_1 K_2 \left(1 - \frac{f_1}{f_2}\right) \left(N_2 + \frac{f_1}{f_2} N_1\right);$$

$$b = -N_1 K_1 \left(\frac{I_p K_2}{f_2} \left(1 - \frac{f_1}{f_2}\right) + \frac{f_1}{f_2} + \frac{f_1 K_2}{f_2} \left(Z_o - \frac{I_p}{f_2}\right) \right) - N_2 K_2 \left(1 + K_1 \left(Z_o - \frac{I_p}{f_2}\right)\right);$$

$$c = \frac{I_p N_1 K_1}{f_2} \left(1 + Z_o K_2 - \frac{I_p K_2}{f_2}\right);$$

$$B_1 = \frac{-b - \sqrt{D}}{2a}; \quad D = b^2 - 4ac \quad (12)$$

Используя вычисленное таким образом значение B_1 , из уравнений (6), (9) и (10) можно найти значение Φ , соответствующее данной интенсивности флуоресценции I_p . Значения $N_1, N_2, K_1, K_2, f_1, f_2$ для исследуемых липосом были определены ранее [11]. С помощью описанного выше алгоритма был

проведен анализ массива данных, полученных для 5-7 концентраций липосом различного состава. На основе экспериментальных зависимостей $I_p(P)$, были найдены зависимости $\Phi(P)$, которые использовались в дальнейшем для определения параметров связывания рибонуклеазы с липосомами. Значения n и K_a , обеспечивающие наилучшую аппроксимацию экспериментальных данных уравнениями (1)-(5) находили путем минимизации функции:

$$f = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (P_o^e - P_o^c)^2 \quad (13)$$

где P_o^e - концентрация белка, определенная экспериментально, m - число экспериментальных точек, P_o^c - концентрация белка, вычисляемая при данном наборе параметров, n , K_a и η , $P_o^c = B + F$; $B = \Phi L/n$; значение F находили, используя уравнения (1) - (5).

Таблица 1. Параметры связывания рибонуклеазы с липосомами

Состав липосом	ФХ : ДФГ	ФХ : ДФГ	ФХ : ДФГ	ФХ : ДФГ	ФХ : ДФГ	ДФГ
Содержание ДФГ, мол. %	18 : 1	8 : 1	3 : 1	4 : 3	1 : 2	100
	5	11	25	43	67	100
Решеточные модели						
Линейный лиганд						
K_a, M^{-1}	$(6.1 \pm 1.1) \times 10^5$	$(7.9 \pm 1.3) \times 10^6$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5$	$(7.3 \pm 1.3) \times 10^4$	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^5$
n	13 ± 2	12 ± 3	7 ± 2	4 ± 1	→ 0	→ 0
Диск						
K_a, M^{-1}	$(7.6 \pm 1.5) \times 10^3$	$(4.8 \pm 1.0) \times 10^5$	$(6.3 \pm 1.2) \times 10^4$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$	$(2.1 \pm 0.5) \times 10^6$	$(4.6 \pm 1.0) \times 10^6$
n	78 ± 17	15 ± 4	10 ± 3	→ 0	→ 0	→ 0
Разреженные центры						
Диск						
K_a, M^{-1}	$(4.2 \pm 0.7) \times 10^6$	$(2.6 \pm 0.5) \times 10^8$	$(7.0 \pm 1.5) \times 10^5$	$(9.1 \pm 2.1) \times 10^5$	$(1.7 \pm 0.4) \times 10^6$	$(2.9 \pm 0.7) \times 10^6$
n	9 ± 2	9 ± 2	3 ± 1	→ 0	→ 0	→ 0
Кооперативность						
Линейный лиганд						
K_a, M^{-1}	$(4.3 \pm 0.9) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^7$	$(9.7 \pm 1.9) \times 10^5$	$(7.5 \pm 1.4) \times 10^5$	$(4.3 \pm 1.6) \times 10^6$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^7$
n	12 ± 3	13 ± 3	11 ± 2	10 ± 2	12 ± 4	13 ± 4
η	1.0 ± 0.02	1.05 ± 0.02	1.1 ± 0.02	1.2 ± 0.06	1.3 ± 0.08	1.4 ± 0.08
Континуальные модели						
Линейный лиганд ($g = 10$)						
K_a, M^{-1}	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^8$	$(5.3 \pm 1.1) \times 10^{11}$	$(3.1 \pm 0.7) \times 10^8$	$(7.7 \pm 1.5) \times 10^8$	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(8.9 \pm 1.7) \times 10^{11}$
n	7 ± 2	7 ± 2	2 ± 0.6	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Диск						
K_a, M^{-1}	$(7.4 \pm 1.4) \times 10^5$	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^7$	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^6$	$(1.8 \pm 0.5) \times 10^6$	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^7$	$(5.2 \pm 1.1) \times 10^7$
n	135 ± 24	11 ± 3	4 ± 1	1 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1

Как видно из представленных в таблице данных, с увеличением отрицательного заряда бислой (при повышении содержания ДФГ) величина n уменьшается, и в ряде случаев при подгонке $n \rightarrow 0$. Исключение составляет лишь модель кооперативного связывания - в этом случае n практически не зависит от состава липосом. Изменение константы связывания при возрастании заряда мембран имеет немонотонный характер - при увеличении содержания ДФГ от 5 до 11 и от 47 до 100 мол. % наблюдается повышение K_a , тогда как в области 25-43 мол. % ДФГ K_a достигает минимального значения. Обнаруженные тенденции позволяют сделать некоторые предположения о характере взаимодействия рибонуклеазы с модельными мембранами. Среднее сечение молекулы белка составляет $\sim 3340 \text{ \AA}^2$ [13], что соответствует площади ~ 48

Взаимодействие рибонуклеазы с липосомами

молекул ФХ или 28 молекул ДФГ [14]. Поскольку при используемых в эксперименте значениях pH (~7.4) рибонуклеаза имеет суммарный положительный заряд (изоэлектрическая точка белка ~ 9.6), определяющую роль в стабилизации белок-липидных комплексов играют электростатические взаимодействия. Если предположить, что с белком контактируют только отрицательно заряженные полярные головки ДФГ, параметр n , полученный с помощью модели разреженных центров (ур-е (3)) можно рассматривать как приближенную оценку числа таких контактов (n_c). Континуальные модели и модели адсорбции на однородной решетке (ур-я (1), (2), (5)) позволяют приближенно оценить общее число липидных молекул, приходящихся на молекулу связанного белка (n_o). Как видно из таблицы, разумные оценки n_c и n_o были получены только для липосом, содержащих 5 и 11 мол. % ДФГ. Наблюдаемое резкое уменьшение n_c и n_o при повышении заряда бислоя послужило основанием для предположения о кажущемся увеличении плотности упаковки белковых молекул на поверхности липосом, или положительной кооперативности комплексообразования. В связи с этим экспериментальные данные были проанализированы в рамках модели кооперативного связывания (ур-е (4)). Оказалось, что взаимодействие рибонуклеазы с липосомами действительно характеризуется положительной кооперативностью, степень которой возрастает при увеличении заряда бислоя. Наиболее вероятной причиной этого эффекта представляется образование белковых ассоциатов на поверхности липосомальных мембран. Следующий закономерный этап работы заключался в попытке анализа результатов с помощью континуальной модели, описывающей самоассоциацию сорбированного лиганда [6]. Однозначная оценка параметров связывания в рамках этой модели невозможна, однако анализ положения минимума функции f (ур-е (13)) позволил выявить некоторые качественные закономерности. Так, оказалось, что степень самоассоциации белка возрастает с увеличением заряда бислоя - параметр, характеризующий количество белковых молекул в ассоциате, равнялся 2 при содержании ДФГ 25 мол. %, 4 при 43 мол. % и 8 при 67 и 100 мол. % ДФГ.

Существование минимума зависимости константы ассоциации от заряда бислоя может быть следствием суперпозиции двух противоположно направленных эффектов - а) увеличения числа электростатических белок-липидных контактов и б) взаимного отталкивания молекул сорбированного белка. При повышении содержания ДФГ в липидном бислое возрастает степень экранирования суммарного заряда рибонуклеазы и увеличивается число белковых молекул на единицу площади поверхности мембран, что создает предпосылки для самоассоциации белка. Полученные результаты позволяют предположить, что плотность поверхностного заряда липидного бислоя является одним из факторов, модулирующих взаимодействия между периферическими белками биомембран.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе с использованием решеточных и континуальных моделей адсорбции больших лигандов на поверхности проведена оценка параметров связывания рибонуклеазы с липосомами, состоящими из смесей ФХ с ДФГ. Показано, что процесс образования белок-липидных комплексов характеризуется положительной кооперативностью, обусловленной, по-видимому, образованием белковых ассоциатов, размер которых возрастает при увеличении заряда липидного бислоя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benga G., Holmes R. // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 1984. V.43. P.195-257.
2. Miyazawa S. // *Biopolymers*. 1983. V.22. P.2253-2271.
3. Stankowski S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1983. V.735. P.341-360.
4. Stankowski S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V.777. P.167-182.
5. Tamm L., Bartoldus I. // *Biochemistry*. 1988. V.27. P.7453-7458.
6. Chatelier R., Minton A. // *Biophys. J.* 1996. V.71. P.2367-2374.
7. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. // *Биополимеры и клетка*. 1990. Т.6. С.87-90.
8. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. // *Укр. биохим. журнал*. 1990. Т. 62. С. 106-111.
9. Горбенко Г.П. // *Укр. биохим. журн.* 1994. Т. 66. С. 99-104.
10. Горбенко Г.П. // *Укр. биохим. журн.* 1996. Т. 68. С.55-60.
11. Горбенко Г.П. // *Биофизика*. 1996. Т. 41. С. 355-362.
12. Горбенко Г.П., Дюбко Т.С. // *Биофизика*. 1996. Т.68. С.348-354.
13. Каптор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия*. М.: Мир. Т. 3. 1985. 535 с.
14. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. *Липидный бислой биологических мембран*. М.: Наука, 1982. 224 с.

УДК 577.352.4:611.018.51

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ГИПОТОНИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА. II. ЭТАП ГЕМОЛИЗА.

Е.А.Гордиенко, Ю.Е.Панина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины Харьков, ул. Переяславская, 23, 310015
Поступила в редакцию 1 августа 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 гемолиза.

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

В соответствии с представлениями, изложенными в [1,2], через образовавшуюся в изотропно растянутой мембране эритроцита макроскопическую пору происходит выброс части внутриклеточного содержимого из клетки наружу под действием остаточного давления. При этом давление внутри клетки быстро падает до критического значения, и относительный объем клетки уменьшается до значения, с точностью до пренебрежимо малой поправки совпадающего с $y_s = (1/6\sqrt{\pi})(S_0)^{3/2}$ (S_0 - площадь поверхности мембраны в физиологическом растворе). В этот момент времени пора закрывается, так как ее существование становится термодинамически невыгодным (свободная энергия деформации в отсутствие поры принимает меньшее значение, чем свободная энергия мембраны, в которой имеется пора). Поскольку при этом не исчезает трансмембранный перепад концентрации проникающего в эритроцит вещества, процесс проникновения этого вещества в клетку продолжается и соответственно объем клетки по мере его проникновения снова увеличивается вплоть до образования новой мембранной поры по указанному выше механизму. Таким образом, гемолиз эритроцита, как будет показано ниже, представляет собой "почти периодический" процесс.

Будем ради краткости называть участок процесса гемолиза от момента закрывания i -й поры до момента образования $(i+1)$ -й макроскопической поры в мембране отдельного эритроцита i -м этапом его гемолиза. Нижним индексом p в дальнейшем будем обозначать значения помеченных им величин в момент образования макроскопической поры в мембране эритроцита. Верхним индексом (в круглых скобках) (i) обозначаются текущие значения помеченных им величин на i -м этапе гемолиза. Момент образования i -й поры в мембране эритроцита обозначается как $t_p^{(i)}$, а значение относительного объема клетки в этот момент времени - через $y_p^{(i)}$. Остальные обозначения совпадают с обозначениями, принятыми в предыдущей статье. Промежутки времени, за которые осуществляется выброс внутриклеточного раствора через пору [2] пренебрежимо малы по сравнению с продолжительностью i -го этапа гемолиза, вследствие чего можно считать эти промежутки времени равными нулю.

Если считать внутриклеточное содержимое равномерно распределенным внутри эритроцита и принять во внимание, что через макроскопическую пору часть внутриклеточного раствора выбрасывается как единое целое, получаем очевидные соотношения между количеством молей проникающего и не проникающего через клеточную мембрану веществ (M) и объемной долей осмотически неактивных внутриклеточных веществ (α) до и после образования i -й поры:

$$M_p^{(i)} = M^{(i)}(t_p^{(i)}) = M^{(i-1)}(t_p^{(i)}) \frac{y_s}{y_p^{(i)}} \quad (1)$$

$$\alpha_p^{(i)} = \alpha^{(i)}(t_p^{(i)}) = \alpha^{(i-1)}(t_p^{(i)}) \frac{y_s}{y_p^{(i)}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots$$

Следствием первого из условий (1) является то, что концентрация растворенных внутри эритроцита веществ в результате выброса внутриклеточного раствора через мембранную пору не изме-

Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза ...

няется. Поскольку содержание не проникающих через клеточную мембрану и осмотически неактивных веществ внутри клетки изменяются только в моменты времени, когда в сфероците образуются мембранные поры, для текущих значений этих величин на i -м этапе гемолиза имеем

$$M^{(i)} = M(0) \frac{y_s^i}{\prod_{k=1}^{i-1} y_p^{(k)}}, \quad \alpha^{(i)} = \alpha \frac{y_s^i}{\prod_{k=1}^{i-1} y_p^{(k)}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots \quad (2)$$

где $M(0)$ - исходное содержание не проникающих через мембрану эритроцита в норме веществ внутри клетки. Легко показать, что приведенная концентрация $\hat{n}^m$ или приведенное осмотическое давление $\hat{\pi}^m$ непроникающих внутриклеточных веществ на интервале времени между образованием i -й и $(i+1)$ -й пор равно

$$\hat{n}^m = \hat{\pi}^m = \frac{(1 - \alpha) \frac{y_s^i}{\prod_{k=1}^{i-1} y_p^{(k)}}}{y - \alpha \frac{y_s^i}{\prod_{k=1}^{i-1} y_p^{(k)}}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots \quad (3)$$

легко сообразить также, что начальное значение внутриклеточной концентрации проникающего через клеточную мембрану вещества на i -м этапе гемолиза равно конечному значению этой величины на предыдущем этапе.

$$A^{(i)} = \frac{y_s^i}{\prod_{k=1}^{i-1} y_p^{(k)}}, \quad x^{(i)} = y^{(i)} - \alpha A^{(i)},$$

$$x_s^{(i)} = y_s^{(i)} - \alpha A^{(i)}, \quad \tilde{x}^{(i)} = \tilde{y}^{(i)} - \alpha A^{(i)},$$

$$y^{(i)}(t_p^{(i)}) = \tilde{y}^{(i)}, \quad i = 1, 2, 3, \dots$$

На i -м этапе гемолиза с учетом приведенных выше соображений и обозначений уравнения трансмембранного переноса веществ в водном растворе проникающего в клетку растворенного неэлектролита имеют вид

$$\begin{aligned} \sigma \pi^{(i)} - \sigma \pi' + \frac{(1 - \alpha) A^{(i)}}{x^{(i)}} - \frac{2}{3} C'(x^{(i)} - x_s^{(i)}) &= 0 \\ x^{(i)} \frac{dx^{(i)}}{dt} (4C'x^{(i)} + 3\sigma\pi' - 2C'x_s^{(i)}) dx^{(i)} &= 3(1 - \alpha)A^{(i)} - 2C'x^{(i)}(x^{(i)} - x_s^{(i)}) \end{aligned} \quad (4)$$

$i = 1, 2, 3, \dots$

Решение второго из этих уравнений есть

Таким образом, изменение относительного объема эритроцита со временем на i -м этапе гемолиза полностью определяется уравнениями (5) и (8). Время, при котором в мембране эритроцита образуется i -я пора, равно:

$$t_p^{(i)} = t_p + \sum_{k=1}^{i-1} t_p(k) + \frac{\langle t_p^{(i)} \rangle^*}{1 + \frac{\gamma K \langle t_p^{(i)} \rangle^* 3\pi\gamma_o^2 [3(1-\alpha)A^{(i)} - 2C'(y^{(i)*} - y_s)(y^{(i)*} - \alpha A^{(i)})]}{2kTR_s\pi_o C'(y^{(i)*} - y_s)^2 (y^{(i)*} - \alpha A^{(i)}) [3\pi\pi' + 2C'(2y^{(i)*} - y_s - \alpha A^{(i)})]}}}, \quad i=1,2,3,\dots \quad (9)$$

Здесь $y^{(i)*}$ - значение относительного объема клетки, при котором $t^{(i)} = \langle t_p^{(i)} \rangle = \langle t_p^{(i)} \rangle^*$, где $t^{(i)}$ определяется решением (5) с учетом начального условия (8), а $\langle t_p^{(i)} \rangle$ равно [2]:

$$\langle t_p^{(i)} \rangle = A'C'(y - y_s)^{-1/2} \exp \left(\frac{3\pi\gamma_o^2}{kTR_s\pi_o C'(y - y_s)} \right)$$

Полученные выше соотношения полностью описывают кинетику гемолиза отдельного эритроцита в гипертоническом водном растворе проникающего в клетку вещества. При этом параметр α , очевидно, можно трактовать как объемное содержание гемоглобина в эритроците. На рис. 1, 2 представлены рассчитанные по разработанному нами алгоритму зависимости относительного объема эритроцита и объемной доли осмотически неактивных внутриклеточных веществ (гемоглобина) от времени как на этапе набухания, так и на этапе гемолиза при типичных для

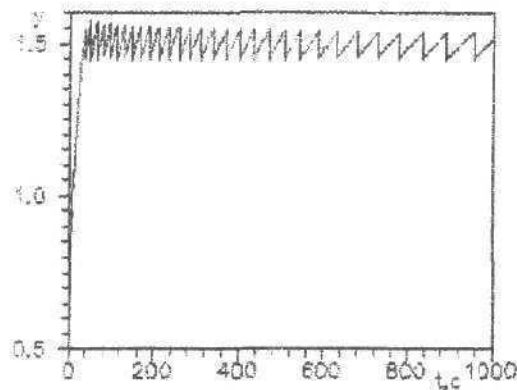


Рис.1 Зависимость относительного объема эритроцита от времени, вычисленная при следующих значениях параметров:

$$\alpha = 0,4; \sigma = 0,95; T = 298 \text{ K}; \pi' = 3; \\ \gamma K = 0,1 \text{ c}^{-1}; C' = 0,25.$$

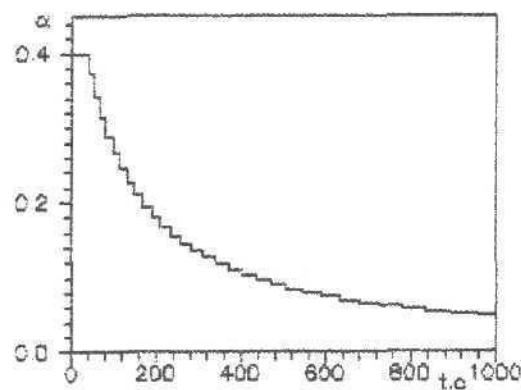


Рис.2 Зависимость объемной доли осмотически неактивных внутриклеточных веществ от времени вычисленной при следующих значениях параметров:

$$\alpha = 0,4; \sigma = 0,95; T = 298 \text{ K}; \pi' = 3; \\ \gamma K = 0,1 \text{ c}^{-1}; C' = 0,25.$$

эритроцита человека значениях фигурирующих в теории параметров C' , π' и γK . На рис. 3,4 показана зависимость времени, за которое из эритроцита выбрасывается половина гемоглобина от первоначально содержащегося в клетке количества, от тех же параметров. Как следует из приведенных данных, с уменьшением коэффициента проницаемости мембраны эритроцита для проникающего в клетки вещества и увеличением параметра C' , который прямо пропорционален модулю изотермического растяжения мембраны, в среднем увеличивается частота образования пор в ней и понижается амплитуда связанных с этим изменений клеточного объема на этапе гемолиза. Время, за которое из эритроцита выбрасывается определенное количество гемоглобина, с увеличением параметров K и C' падает и растет прямо пропорционально осмотическому давлению растворенного во внеклеточной среде вещества. Количество внутриклеточного раствора,

$$\begin{aligned}
 \hat{t}^{(i)} = \hat{t}_p^{(i-1)} - 2[\hat{x}^{(i)} - \hat{x}^{(i)}(\hat{t}_p^{(i-1)})] - \frac{3\sigma\pi' + 2C'\hat{x}_s^{(i)}}{4C'} \times \ln \left[\frac{3(1-\alpha)\hat{A}^{(i)} - 2C'\hat{x}^{(i)}(\hat{x}^{(i)} - \hat{x}_s^{(i)})}{3(1-\alpha)\hat{A}^{(i)} - 2C'\hat{x}^{(i)}(\hat{t}_p^{(i-1)})(\hat{x}^{(i)}(\hat{t}_p^{(i-1)}) - \hat{x}_s^{(i)})} \right] + \\
 + \frac{3\sigma\pi'\hat{x}_s^{(i)} + 2C'\hat{x}_s^{(i)}\hat{x}_s^{(i)} + 12(1-\alpha)\hat{A}^{(i)}}{4\sqrt{C'}\sqrt{2C'\hat{x}_s^{(i)}\hat{x}_s^{(i)} + 12(1-\alpha)\hat{A}^{(i)}}} \times \ln \left[\frac{\sqrt{C'}\hat{x}_s^{(i)}\hat{x}_s^{(i)} + 6(1-\alpha)\hat{A}^{(i)} + 2\sqrt{C'}(\hat{x}^{(i)} - \hat{x}_s^{(i)}/2)}{\sqrt{C'}\hat{x}_s^{(i)}\hat{x}_s^{(i)} + 6(1-\alpha)\hat{A}^{(i)} - 2\sqrt{C'}(\hat{x}^{(i)} - \hat{x}_s^{(i)}/2)} \right] \times \\
 \times \frac{\sqrt{C'}\hat{x}_s^{(i)}\hat{x}_s^{(i)} + 6(1-\alpha)\hat{A}^{(i)} + 2\sqrt{C'}(\hat{x}^{(i)}\hat{t}_p^{(i-1)} - \hat{x}_s^{(i)}/2)}{\sqrt{C'}\hat{x}_s^{(i)}\hat{x}_s^{(i)} + 6(1-\alpha)\hat{A}^{(i)} - 2\sqrt{C'}(\hat{x}^{(i)}\hat{t}_p^{(i-1)} - \hat{x}_s^{(i)}/2)} \quad (5)
 \end{aligned}$$

Конечно, в начальный для i -го этапа гемолиза момент времени квазистационарное равновесие нарушается. Действительно, в этот момент времени $\hat{\pi}^{(i)}(\hat{t}_p^{(i-1)}) = \hat{\pi}_p^{(i-1)}$ и $\hat{y}^{(i)}(\hat{t}_p^{(i-1)}) = \hat{y}_s$, а в конце предыдущего этапа гемолиза те же уравнения удовлетворяют условиям

$$\hat{\pi}^{(i-1)}(\hat{t}_p^{(i-1)}) = \hat{\pi}_p^{(i-1)} \quad \text{и} \quad \hat{y}^{(i-1)}(\hat{t}_p^{(i-1)}) = \hat{y}_p^{(i)}$$

Можно, однако, считать, что очень быстро, за промежуток времени порядка τ_0 , квазистационарное состояние восстанавливается практически только за счет перераспределения воды, а не растворенных веществ, между клетками и окружающей их средой. Поэтому для расчета этого нового условия квазистационарности, которое определяет начальное условие для решения укороченной системы уравнений на i -м этапе гемолиза, можно допустить, что внутриклеточное содержание не только не проникающих через клеточную мембрану веществ, но и проникающего вещества на протяжении времени релаксации к новому квазистационарному состоянию остается неизменным. Поэтому при определении нового квазистационарного состояния можно считать (как и для непроникающего вещества)

$$\hat{\pi}^{(i)} = \hat{\pi}^{(i)} = \frac{\hat{\pi}_p^{(i-1)}(\hat{y}_s - \alpha\hat{A}^{(i)})}{\hat{y}^{(i)} - \alpha\hat{A}^{(i)}}, \quad i = 1, 2, 3, \dots \quad (6)$$

Поэтому в квазистационарном равновесии в начале i -го этапа гемолиза получаем

$$\frac{\sigma\hat{\pi}_p^{(i-1)}}{\hat{x}^{(i)}} - \sigma\pi' + \frac{(1-\alpha)\hat{A}^{(i)}}{\hat{x}^{(i)}} - \frac{2}{3}C'(\hat{x}^{(i)} - \hat{x}_s^{(i)}) = 0 \quad (7)$$

где через $\hat{y}^{(i)}$ обозначен относительный объем, соответствующий искомому квазистационарному состоянию, то есть начальное значение $\hat{y}^{(i)}(\hat{t}_p^{(i)})$, фигурирующее в решении (5). Из (7) следует, что это начальное значение равно

$$\hat{y}^{(i)} = \hat{y}_s - \frac{3\sigma\pi' + 2C'(\hat{y}_s - \alpha\hat{A}^{(i)})}{4C'} + \sqrt{\frac{[3\sigma\pi' + 2C'(\hat{y}_s - \alpha\hat{A}^{(i)})]^2}{16C'^2} + (\hat{y}_s - \alpha\hat{A}^{(i)})(\hat{y}_p^{(i-1)} - \hat{y}_s)} \quad (8)$$

$$i = 1, 2, 3, \dots$$

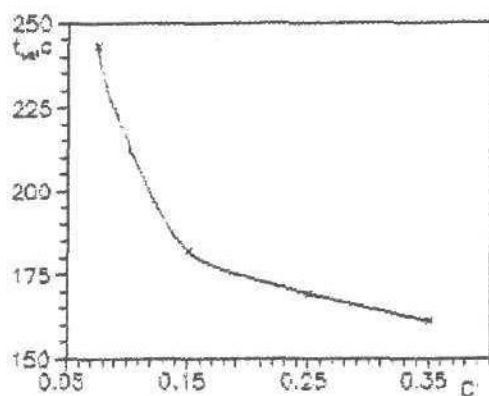


Рис.3 Зависимость времени, за которое из эритроцита выбрасывается половина гемоглобина от параметра C' .

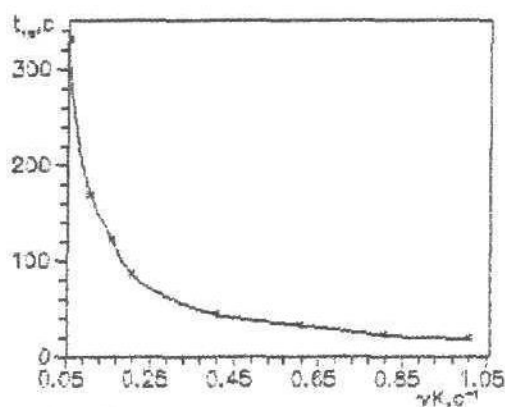


Рис.4 Зависимость времени, за которое из эритроцита выбрасывается половина гемоглобина от параметра γK .

выбрасываемого из клетки наружу при образовании каждой макроскопической поры, уменьшается с ростом параметра C' и увеличивается с ростом коэффициента проницаемости K . С течением времени на этапе гемоллиза во всех случаях уменьшаются частота выбросов внутриклеточного содержимого из клетки и вызванные этим изменения объема эритроцита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов М.М., Маркин В.С. // Биол. мембраны. 1984. Т.1, №1. С. 74-78.
2. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. К. Наук. думка, 1994. 143с.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 577.352.4:611.018.51

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТОВ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф.

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

Поступила в редакцию 10 сентября 1998 г.

В работе определены коэффициенты проницаемости эритроцитов донорской и пуповинной крови для диметилсульфоксида, глицерина и других криопротекторов методом малоуглового рассеяния света с использованием построенной ранее физико-математической теории явления гипотонического гемолиза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит, коэффициент проницаемости, диметилсульфоксид, глицерин, светорассеяние.

Если сфера радиуса R с показателем преломления n^n освещается параллельным пучком света с интенсивностью I_0 , то интенсивность рассеянного под небольшим углом Θ к направлению падающего пучка света определяется выражением [1]:

$$J(\Theta) = (2\pi/\lambda)^2 (R^4/r^2) F(\rho, z) \quad (1)$$

где

$$\rho = 2x (n^{in}/n^{out} - 1), \quad z = x\Theta \quad (2)$$

и $x = 2\pi R n^{out}/\lambda$, λ - длина волны света, падающего на раствор с показателем преломления n^{out} , в котором взвешена сфера, r - расстояние от рассеивающей свет сферы до фотоприемника. Поскольку в процессе гипотонического гемолиза, начиная с момента, когда объем клетки превосходит значение $S_0^{3/2}/6\sqrt{\pi}$, эритроцит представляет собой пульсирующую со временем сферу, объемное содержание гемоглобина в которой скачкообразно изменяется в моменты, когда в мембране эритроцита образуется очередная макроскопическая пора, в конце концов падая до нуля, формулу (1) можно использовать для вычисления интенсивности рассеиваемого сфероцитом света как функции времени в ходе этого процесса. При этом предполагается, что растворенные внутри клетки вещества равномерно распределены по объему клетки.

Зависимость коэффициента преломления внутриклеточного раствора от объемной концентрации гемоглобина в нем, то есть от параметра α/y ($\alpha = V_n/V_0$ - объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ, V_n - объем осмотически неактивных внутриклеточных веществ, то есть, практически, объем, занимаемый молекулами гемоглобина внутри клетки, V и V_0 - объем клетки в текущем и в начальном состоянии, $y = V/V_0$ - относительный объем клетки), можно представить в виде

$$n^{in} = n^{out} + (n_{Hb} - n^{out}) \left[1 - \exp \left(-k \frac{\alpha}{y - \alpha} \right) \right] \quad (3)$$

где n_{Hb} - показатель преломления гемоглобина, который можно считать вещественным в красной области спектра видимого света, так как спектральные полосы поглощения гемоглобина расположены в голубой области спектра. Коэффициент пропорциональности k рассматривается нами как подгоночный параметр, который можно определить, сопоставляя теоретически вычисленную с помощью (1) интенсивность рассеянного света с определяемой экспериментально. Для используемой нами экспериментальной установки ($\lambda = 10^{-6}$ м и $\Theta = \pi/20$) $k = 9,0$. Коэффициент преломления внеклеточного раствора примерно равен коэффициенту преломления плазмы крови, который равен 1,35 (тогда как коэффициент преломления воды составляет 4/3) [2]. Коэффициент преломления гемоглобина равен примерно $n_{Hb} = 1,4$ [2]. Таким образом, (2) можно представить в следующем виде

$$n^{\text{in}} - n^{\text{out}} = 0,05 \left[1 - \exp \left(-9 \frac{\alpha}{y - \alpha} \right) \right] \quad (4)$$

С учетом приведенных выше данных находим, что в рассматриваемом нами случае параметры (2) при рассеянии под углом 9° к направлению падающего пучка света равны

$$\rho = 0,05 (4\pi R/\lambda) \left[1 - \exp \left(-9 \frac{\alpha}{y - \alpha} \right) \right], \quad z = 2\pi^2 R n^{\text{out}} / 20\lambda \quad (5)$$

Очевидно, $R = (3V_0 y / 4\pi)^{1/3}$. Если, кроме того, $l = 10^{-6}$ м, то с учетом вышесказанного можно утверждать, что параметры ρ , x и $n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1$ при гипотоническом гемолизе изменяются примерно в пределах

$$\begin{aligned} 0 &\leq x \leq 2,75 \\ 27,6 &\leq x \leq 34,5 \\ 0 &\leq n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1 \leq 0,03 \end{aligned} \quad (6)$$

Как известно, при выполнении сильных неравенств $x \gg 1$, $n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1 \ll 1$ и промежуточных значениях параметра ρ (так называемый случай аномальной дифракции) точное решение Ми для рассеяния однородной сферой можно с большой точностью аппроксимировать приближенным решением, при котором

$$F(\rho, z) = \frac{\pi}{2} \frac{\rho^2}{2(\rho^2 + z^2)^{3/2}} I_{3/2}^2(r^2 + z^2)^{1/2} + \frac{\rho^4}{z^4} \left[\frac{1}{1 \cdot 3} I_2(z) - \xi \frac{1}{1 \cdot 3} I_3(z) + \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5} \xi^2 I_4(z) - \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7} \xi^3 I_5(z) + \dots \right] \quad (7)$$

где I_n - функция Бесселя первого рода n -го порядка, $\xi = \rho^2/z$ и ряд в квадратных скобках сходится при любой комбинации ρ и z . Подставляя (7) в (1) с учетом (2), (5) после несложных преобразований находим, что интенсивность света, рассеянного эритроцитом под углом 9° к направлению падающего пучка, равна

$$\begin{aligned} J = J(\pi/20) = Cy &\left\{ \frac{1}{\left[[1 - \exp(-9\alpha/(y-\alpha))] \left(1 + \frac{\pi^2 (n^{\text{out}})^2}{4[1 - \exp(-9\alpha/(y-\alpha))]^2} \right)^{3/2} \right]} \times \right. \\ &\times J_{3/2}^2 \left(\frac{0,2\pi}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} [1 - \exp(-9\alpha/(y-\alpha))] \left(1 + \frac{\pi^2 (n^{\text{out}})^2}{4[1 - \exp(-9\alpha/(y-\alpha))]^2} \right)^{1/2} \right) + \\ &+ 6,4 \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \frac{[1 - \exp(-9\alpha/(y-\alpha))]^4}{\lambda \pi^4 (n^{\text{out}})^4} \left[J_2 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{\text{out}}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \right) \right. \end{aligned} \quad (8)$$

Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов ...

$$\begin{aligned}
 & - \frac{1}{1.3} \xi J_3(z) \left(\frac{0,1\pi^2 n^{\text{out}} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3}}{\lambda} \right) + \frac{1}{1.3.5} \xi^2 J_4(z) \left(\frac{0,1\pi^2 n^{\text{out}} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3}}{\lambda} \right) - \\
 & - \frac{1}{1.3.5.7} \xi^3 J_5(z) \left(\frac{0,1\pi^2 n^{\text{out}} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3}}{\lambda} \right) + \frac{1}{1.3.5.7.9} \xi^4 J_6(z) \left(\frac{0,1\pi^2 n^{\text{out}} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3}}{\lambda} \right) - \dots \left. \right] \left. \right)^2 \} \\
 & \text{где } C = \frac{15}{2} \pi \frac{V_0}{\lambda r^2} I_0.
 \end{aligned}$$

Зная зависимость изменения относительного объема сфероцита y и содержания гемоглобина в клетке α от времени при $y \geq y_s$, с помощью (8) легко получить зависимость интенсивности рассеянного под углом $\pi/20$ к направлению падающего пучка света $\lambda c = 1 \text{ мкм}$ от времени, то есть с точностью до постоянного множителя, характеризующего усиление в регистрирующей рассеянный свет схеме, показания регистрирующего прибора.

Ранее нами построена физико-математическая модель всего процесса гипотонического гемолиза в целом, которая связывает время достижения клеткой максимального объема и время, при котором из эритроцита выходит 50% от первоначально содержавшегося в нем гемоглобина с коэффициентом проницаемости клеточной мембраны для растворенного во внеклеточной среде неэлектролита (рис.1).

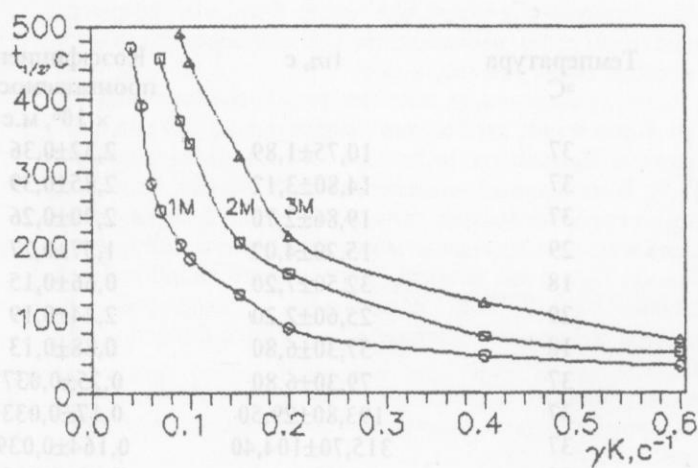


Рис.1 Теоретически вычисленная зависимость времени выхода из эритроцита донорской крови человека 50% от первоначально содержавшегося в них гемоглобина от параметра γK ($\gamma = 0,9(9) \cdot 10^6 \text{ м}^{-1}$ - поверхностно-объемное отношение эритроцита, K - коэффициент проницаемости клетки для растворенного во внеклеточном водном растворе неэлектролита).

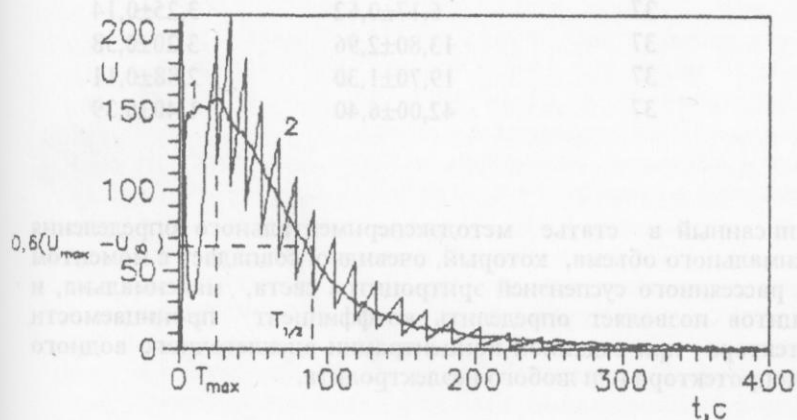


Рис.2 Экспериментальная (1) и рассчитанная по формуле (8) интенсивность рассеянного суспензией эритроцитов света под углом 9° к направлению падающего пучка ($\lambda = 1 \text{ мкм}$) (2) от времени при контакте клеток с 1М водным раствором глицерина.

На рис.2 показаны экспериментально измеренная интенсивность рассеянного суспензией эритроцитов света под углом 9° к направлению падающего пучка ($\lambda = 1 \text{ мкм}$) (1) и теоретическая зависимость (2), вычисленная по формуле (8). Как следует из представленных на рис.1 и 2 данных уменьшение интенсивности рассеянного под углом 9° к направлению падающего пучка света со временем на три пятых соответствует выходу из эритроцита 50% гемоглобина от его начального содержания в клетке.

Способ измерения коэффициента проницаемости для неэлектролитов осуществляют следующим образом. В начальный момент времени небольшое количество эритроцитов добавляют ко значительному большому объему водного раствора проникающего в клетки электрически нейтрального вещества, проницаемость эритроцитов для которого определяется. После этого регистрируется зависимость интенсивности рассеянной клеточной суспензией света, длина волны которого равна $\lambda = 1 \text{ мкм}$, под углом 9° к направлению падающего пучка с помощью специального устройства. По этой зависимости определяется момент времени $t_{1/2}$, при котором интенсивность рассеянного клеточной суспензией света падает до значения, соответствующего выходу из клетки половины первоначально содержащегося в ней гемоглобина. Далее коэффициент проницаемости клеточной мембраны определяется по теоретическим кривым, представленным на рис.1, которые каждому значению времени $t_{1/2}$ ставят в однозначное соответствие (при заданной концентрации внеклеточного раствора) определенное значение коэффициента проницаемости мембраны эритроцитов для растворенного в окружающей их среде вещества.

Определенные таким образом коэффициенты проницаемости эритроцитов донорской и пуповинной крови человека для некоторых криопротекторов представлены в табл.1 и 2.

Таблица 1

Значение коэффициентов проницаемости эритроцитов донорской крови человека для диметилсульфоксида, глицерина, 1,2-пропандиола, этиленгликоля и триэтиленгликоля ($P = 0,99$).

Проникающее в клетки вещество	Концентрация М	Температура $^\circ\text{C}$	$t_{1/2}$, с	Коэффициент проницаемости $\times 10^6$, м.с
диметилсульфоксид	1	37	10,75 $\pm$ 1,89	2,32 $\pm$ 0,36
диметилсульфоксид	2	37	14,80 $\pm$ 3,12	2,85 $\pm$ 0,39
диметилсульфоксид	3	37	19,86 $\pm$ 2,70	2,90 $\pm$ 0,26
диметилсульфоксид	1	29	15,20 $\pm$ 4,02	1,57 $\pm$ 0,27
диметилсульфоксид	1	18	32,50 $\pm$ 7,20	0,66 $\pm$ 0,15
диметилсульфоксид	3	29	25,60 $\pm$ 2,20	2,44 $\pm$ 0,19
диметилсульфоксид	3	18	57,30 $\pm$ 6,80	0,88 $\pm$ 0,13
глицерин	1	37	79,30 $\pm$ 6,80	0,25 $\pm$ 0,037
глицерин	2	37	193,80 $\pm$ 29,50	0,17 $\pm$ 0,033
глицерин	3	37	315,70 $\pm$ 104,40	0,164 $\pm$ 0,039
глицерин	1	18	117,00 $\pm$ 10,80	0,18 $\pm$ 0,012
глицерин	2	18	391,80 $\pm$ 115,80	0,09 $\pm$ 0,014
1,2-пропандиол	1	37	6,17 $\pm$ 0,62	3,25 $\pm$ 0,14
1,2-пропандиол	2	37	13,80 $\pm$ 2,96	3,20 $\pm$ 0,38
этиленгликоль	3	37	19,70 $\pm$ 1,30	2,88 $\pm$ 0,11
триэтиленгликоль	3	37	42,00 $\pm$ 6,40	1,40 $\pm$ 0,39

В совокупности с этой теорией описанный в статье метод экспериментального определения времени достижения сфероцитом максимального объема, который, очевидно, совпадает с моментом времени, при котором интенсивность рассеянного суспензией эритроцитов света, максимальна, и времени 50%-ного гемолиза эритроцитов позволяет определить коэффициент проницаемости клеточной мембраны для криопротектора при заданной концентрации внеклеточного водного раствора проникающего в клетки криопротектора или любого неэлектролита.

Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов ...

Таблица 2

Значения коэффициентов проницаемости эритроцитов пуповинной крови человека для диметилсульфоксида, глицерина, 1,2-пропандиола, этиленгликоля и триэтиленгликоля ($P=0,99$).

Проникающее в клетки вещество	Концентрация, М	Температура °C	$t_{1/2}$, с	Коэффициент проницаемости $\times 10^6$, м.с
диметилсульфоксид	1	37	$13,50 \pm 3,70$	$1,90 \pm 0,25$
диметилсульфоксид	3	37	$22,50 \pm 6,10$	$2,64 \pm 0,55$
диметилсульфоксид	3	12	$160,00 \pm 64,70$	$0,35 \pm 0,14$
глицерин	1	37	$776,00 \pm 208,10$	$0,024 \pm 0,0085$
глицерин	2	37	$960,20 \pm 257,30$	$0,036 \pm 0,0096$
глицерин	3	37	$1150,00 \pm 108,90$	$0,043 \pm 0,0052$
1,2-пропандиол	3	37	$13,30 \pm 1,95$	$3,69 \pm 0,32$
1,2-пропандиол	3	22	$44,50 \pm 8,10$	$1,26 \pm 0,22$
этиленгликоль	3	37	$20,00 \pm 3,40$	$2,85 \pm 0,023$
этиленгликоль	3	22	$58,50 \pm 18,80$	$0,88 \pm 0,36$
триэтиленгликоль	3	37	$45,70 \pm 8,20$	$0,85 \pm 0,21$
триэтиленгликоль	3	22	$108,20 \pm 21,40$	$0,49 \pm 0,15$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. ван де Хюлет. Рассеяние света малыми частицами//М.:Издат-во пн. лит.-1961.-536с.
2. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрин Н.Х. Реология крови//М.:Медицина.-1982.-272с.

УДК 577.322.7

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ВЛИЯНИЕ ГРАМИЦИДИНА S НА ТРОМБОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Е.В. Хакл*, С.В. Гаташ, В.П. Берест

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И.Веркина НАН Украины, 310164, Харьков, пр. Ленина, 47, Харьковский государственный университет, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4

Поступила в редакцию 15 октября 1998 г.

Исследовано влияние *in vitro* полипептидного антибиотика грамицидина S (GS) на тромбоциты человека оптическим методом. Установлено, что GS вызывает распад агрегатов тромбоцитов. Получены зависимости степени и скорости распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры в области 4-45°C. Показано, что мембраны тромбоцитов, формирующих агрегат, сохраняют свою целостность. Предполагается, что агрегаты, образующиеся при 33-37°C, обладают повышенной прочностью. Показана возможность определения фазовых переходов липидов мембран оптическим методом при помощи GS. Предложен метод изучения состояния липидного бислоя мембран с использованием антибиотика GS.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты, грамицидин S, распад агрегатов, мембраны, температура

Изучению тромбоцитов как одному из ключевых звеньев гемостаза в последнее время посвящено много работ, однако недостаточно, на наш взгляд, освещен вопрос о состоянии мембран тромбоцитов в процессе их агрегации. При изучении мембран главное место отводится рассмотрению белков (рецепторов, ионных каналов, цитоскелета и др.). Однако большую группу болезней крови и сердечно-сосудистой системы можно представить как своеобразную мембранную патологию клеток крови, часто связанную с изменением мембранной проницаемости вследствие изменения липидного состава мембран [1]. Не отрицая значительной роли белков в процессе агрегации тромбоцитов, мы хотим в данной работе показать возможность исследования состояния липидного компонента мембраны с помощью антибиотика грамицидина S.

Молекула грамицидина S (GS) построена из двух одинаковых пентапептидов, соединенных по типу "голова-хвост", и имеет две положительно заряженные свободные аминогруппы остатков L-орнитина. Молекула GS не имеет специфического белкового рецептора, она взаимодействует непосредственно с фосфолипидами мембран [2,3]. В начальный момент взаимодействия молекула GS фиксируется на мембране, связываясь электростатически посредством NH_3^+ -групп L-орнитина с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты липидных молекул. Далее такой липид-грамицидиновый комплекс внедряется в мембрану. При этом важную роль играет гидрофобный участок молекулы GS, образуемый остатками Val и Leu, способный к гидрофобному взаимодействию с мембраной [4,5]. Естественно, при изменении состояния липидного бислоя будет изменяться и взаимодействие с ним молекулы GS.

Поскольку в литературе отсутствуют данные о влиянии GS на агрегацию тромбоцитов, целью данной работы было изучить влияние GS на тромбоциты и показать некоторые возможности предлагаемого способа изучения изменений липидного бислоя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась кровь здоровых доноров обоих полов, стабилизированная глугициром в соотношении 1:4. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) выделялась путем центрифугирования цельной крови в течение 10 минут при 146g. Образцы ОТП разводились бестромбоцитарной плазмой до концентрации тромбоцитов $2.5 \times 10^5 \text{ мм}^{-3}$, при этом начальная оптическая плотность образца (D_0) была в пределах 0,7-0,8 относительных единиц.

Влияние антибиотика GS на тромбоциты изучалось оптическим методом [6]. Агрегация тромбоцитов исследовалась методом светорассеяния в области температур 4-45°C [16]. В качестве индукторов агрегации использовались ADP, адреналин, H_2O_2 . Раствор грамицидина S в соотношении ОТП:GS=11:1 или 11:2 добавляли к ОТП через 9 минут после начала агрегации тромбоцитов. Далее под концентрацией индуктора агрегации или раствора GS подразумевается их конечная концентрация в кювете. Степень и скорость агрегации и распада агрегатов тромбоцитов рассчитывали по методу, приведенному в [7].

В работе использовался медицинский препарат грамицидина S ("Фармахим"). Исходный 2% спиртовой раствор грамицидина S разбавлялся в 30-50 раз 0.15 M NaCl (pH 7.4). Для исключения влияния растворителя были проведены контрольные измерения, показавшие, что раствор этанола в концентрации до 1 % не влияет на агрегацию тромбоцитов.

Влияние грамицидина S на тромбоциты человека

В работе также использовались следующие химические реактивы: ADP и адреналин ("Reanal", Венгрия), папаверин, никотиновая кислота ("Фармахим"), H_2O_2 , $CaCl_2$ (х.ч.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характер влияния антибиотика грамицидина S на тромбоциты зависит от концентрации GS. При добавлении GS в концентрации $5-6 \times 10^{-3}$ мг/мл к ОТП наблюдалось увеличение светопропускания (уменьшение оптической плотности D) образца (рис. 1, А). Теоретические расчеты показывают, что набухание клеток ведет к увеличению светопропускания и уменьшению оптической плотности образца D [7,8,9]. Известно, что GS вызывает набухание различных клеток (например, митохондрий) [2,5,10]. Поскольку GS взаимодействует только с фосфолипидами мембран, можно сказать, что его действие на клетки неспецифично. Т.о. наблюдаемое увеличение светопропускания образца ОТП, вероятно, связано с набуханием тромбоцитов, индуцированным GS. При увеличении концентрации GS ($8-9 \times 10^{-3}$ мг/мл) уменьшение оптической плотности сменяется увеличением через 20-60 с (рис. 1, А). GS в большей концентрации ($1-2 \times 10^{-2}$ мг/мл) вызывает только увеличение оптической плотности образца. Подобное увеличение D характерно для начальной фазы агрегации тромбоцитов, индуцированной ADP, и объясняется изменением формы клеток [7]. Теоретически показано, что к увеличению оптической плотности должно приводить изменение формы тромбоцита от дисковидной к сферической (при неизменном объеме) [11]. В работе [7] делается вывод о том, что уменьшение светопропускания ОТП (увеличение D), индуцированное агрегантами, обусловлено структурно-морфологическими изменениями, в результате которых тромбоциты принимают неправильную форму с псевдоподиями. Подобное изменение формы тромбоцитов происходит при их активации. Т.о. можно предположить, что в определенной концентрации GS активирует тромбоциты. Возможно, механизм активации тромбоцитов грамицидином S связан либо с увеличением проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} , либо с высвобождением мембранного Ca^{2+} в результате встраивания GS в мембрану.



Рис. 1. Изменение оптической плотности образца ОТП под действием GS со временем при добавлении GS непосредственно к ОТП (А) или через 9 мин. после начала АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (В). Концентрация GS - 5×10^{-3} (1), 10^{-2} (2), 2×10^{-2} (3) мг/мл, АДФ - 0.18 мг/мл; $t = 22^\circ C$.

Участие ионов Ca^{2+} подтверждают наши эксперименты по набуханию тромбоцитов в гипотонической среде. Известно, что при помещении тромбоцитов в гипотоническую среду, содержащую $CaCl_2$ в концентрации 10^{-3} моль/л (в том числе при добавлении биdistиллированной воды к ОТП) наблюдается двухфазное изменение светопропускания образца: быстрый рост светопропускания за счет набухания клеток сменяется медленным падением - "обратным ходом" [7]. В отсутствие ионов Ca^{2+} наблюдается только быстрое увеличение светопропускания образца, микромолярные добавки ионов Ca^{2+} приводят к быстрому уменьшению светопропускания [7]. Следует отметить, что при набухании клеток внутриклеточный Ca^{2+} не высвобождается [7,12]. В наших экспериментах мы получили аналогичные результаты по набуханию тромбоцитов в гипотонической среде, при этом интактность тромбоцитов в гипотонической среде контролировалась по степени их агрегации с ADP. При добавлении деионизованной воды к образцу ОТП наблюдалось только увеличение светопропускания без "обратного" хода. Отсутствие фазы уменьшения светопропускания подтверждает литературные данные о том, что при набухании тромбоцитов в гипотонической среде Ca^{2+} не высвобождается. При добавлении GS к тромбоцитам, находящимся в гипотонической среде, наблюдалось резкое уменьшение светопропускания, аналогичное "обратному" ходу в среде, содержащей Ca^{2+} . Т.о. можно предположить, что механизм действия GS на тромбоциты (механизм активации тромбоцитов грамицидином) опосредован ионами Ca^{2+} .

Исходя из предположения о том, что GS активирует тромбоциты, можно объяснить зависимость влияния GS на тромбоциты от концентрации антибиотика. Добавление GS к ОТП индуцирует два процесса, по-разному влияющие на оптическую плотность образца: набухание тромбоцитов и их активацию. Как видно из рисунка 1, для того, чтобы процесс активации тромбоцитов грамицидином стал доминирующим, необходима определенная концентрация GS.

Чем она больше, тем сильнее увеличение оптической плотности при добавлении GS за счет активации тромбоцитов. Однако подобная активация тромбоцитов, заключающаяся в изменении формы клеток и увеличении концентрации свободного кальция, не приводит к агрегации тромбоцитов. Для инициирования агрегации, вероятно, необходимы более высокие концентрации индуктора агрегации. Возможно, при активации тромбоцитов GS не создается необходимый уровень свободного Ca^{2+} , обуславливающего процесс агрегации тромбоцитов.

После воздействия GS на тромбоциты последние не утрачивают способность к агрегации при последующем добавлении индуктора (ADP, адреналина, CaCl_2 , H_2O_2).

Изменение формы и набухание тромбоцитов под действием GS не зависят от процесса агрегации. При блокировании агрегации тромбоцитов папаверином (папаверин, ингибируя фосфодиэстеразу, предотвращает переход $\text{sAMP} \rightarrow 5'\text{-AMP}$, т.е. увеличивая уровень sAMP - ингибитора агрегации в клетке [13]), увеличение оптической плотности при добавлении GS к образцу ОТП сохранялось. Поскольку в данном случае папаверин блокировал основную функцию тромбоцитов, можно утверждать, что воздействие GS на клетки носит неспецифический характер. Подобный вывод позволяет использовать GS для исследования состояния липидного компонента мембран различных клеток.

Добавление грамицидина S к проагрегировавшим под действием индуктора тромбоцитам вызывает уменьшение светопропускания образца (увеличение оптической плотности). Типичные агрегатограммы, иллюстрирующие характер изменения светопропускания, приведены на рис. 1В. Для всех использованных нами индукторов агрегации (ADP, адреналин, H_2O_2 , CaCl_2) общий вид зависимостей оптической плотности образца от времени был одинаков. Подобное увеличение оптической плотности может быть связано с распадом агрегатов тромбоцитов. Исчезновение агрегатов в кювете после добавления GS можно наблюдать и визуально. Степень распада агрегатов тромбоцитов пропорциональна концентрации раствора GS.

Молекула GS, встраиваясь в мембрану, нарушает липид-липидные и липид-белковые взаимодействия [4,10] и, вероятно, вызывает упругое напряжение в мембране. Прочность белковых мостиков, соединяющих тромбоциты в агрегате, гораздо меньше прочности мембраны (т.к. в мембране действуют сильные гидрофобные силы [14]), поэтому напряжение, вызванное встраиванием молекулы GS в мембрану, может сниматься за счет разрывов именно белковых (фибриногеновых) мостиков. При разрыве этих связей агрегаты будут распадаться, при этом количество рассеивающих центров будет увеличиваться, что должно привести к возрастанию оптической плотности [9,11]. В случае, если бы мембраны тромбоцитов, входящих в агрегат, не сохраняли свою целостность, встраивание молекул грамицидина в мембрану не вызывало бы напряжения в мембране. Следовательно, можно заключить, что мембраны тромбоцитов, образующих агрегаты, сохраняют свою целостность даже в случае достаточно сильной агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ.

Степень и скорость распада агрегатов тромбоцитов под действием GS зависят от интервала времени между добавлением индуктора агрегации и GS к образцу ОТП (рис. 2). Этот результат не является неожиданным, так как чем дольше идет агрегация и чем больше тромбоцитов успело включиться в процесс агрегации, тем больше агрегаты и тем сильнее степень их распада под действием GS (в наших экспериментах раствор GS добавлялся к образцу ОТП не позднее 10 минут с момента добавления индуктора агрегации). Грамицидин вызывает увеличение оптической плотности образца за счет индуцирования двух процессов (в основном): изменения формы тромбоцитов в результате их активации и распада агрегатов тромбоцитов. Как следует из анализа данных, приведенных на рис. 2, основной вклад в суммарное увеличение оптической плотности образца (т.е. в величину ΔD) вносит увеличение оптической плотности за счет распада агрегатов тромбоцитов.

На рис. 3 приведены фрагменты кривых распада агрегатов, иллюстрирующие начальную стадию изменения светопропускания образца ОТП при добавлении GS при различных температурах. Особенно четко подобная зависимость была видна в случае, когда степень предшествовавшей добавлению GS агрегации тромбоцитов невелика (0.3-0.4 отн.ед). Как видно из рис. 3, при низких температурах (4-8°C) добавление GS к ОТП через 9 минут после начала ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов вызывает незначительное увеличение светопропускания образца; через 45-90с светопропускание начинает самопроизвольно уменьшаться. Подобное увеличение светопропускания может объясняться набуханием тромбоцитов либо их агрегацией под действием GS при низких температурах. При 4-8°C степень агрегации тромбоцитов небольшая [16], однако после добавления индуктора многие тромбоциты сохраняют потенциальную способность к агрегации. Взаимодействуя с фосфатными группами фосфолипидов, GS образует "липид-грамицидиновый" комплекс, способный внедряться в гидрофобную область мембраны, что влечет за собой фазовое ("видовое") обособление фосфолипидов и образование "жидкой" зоны

нейтральных липидов [3-5]. Т.к. гидрофобное взаимодействие ослабляется с уменьшением температуры, то процесс фазового обособления мембранных липидов может ускоряться при охлаждении мембраны. В работе [5] показано, что при уменьшении температуры от 37 до 4°C абсорбция GS мембранами бактерий уменьшается на 10-15%. Т.е. даже при 4°C достаточное количество молекул грамицидина связывается с липидами мембран. После внедрения липид-грамицидинового комплекса происходит "замораживание" одних участков липидного бислоя и "разжижение" других, что как раз и является, по данным [15], необходимым условием для готовности мембран к агрегации. Возможно, что в данном случае GS выступает в роли "активатора" мембраны, переводящего последнюю в необходимое для агрегации состояние.

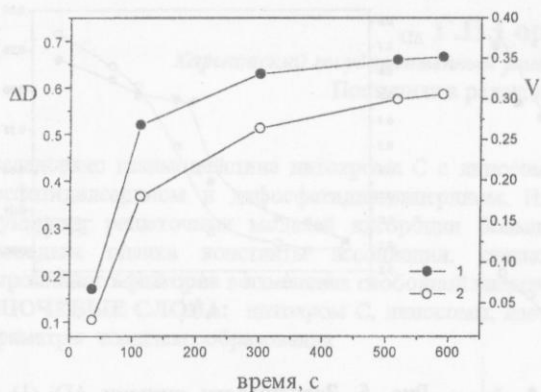


Рис. 2. Зависимость степени ΔD и скорости V распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от интервала времени между добавлением индуктора агрегации (АДФ) и GS к ОТП. Концентрация АДФ - 0.182 мг/мл, грамицидина - 10^{-2} мг/мл.

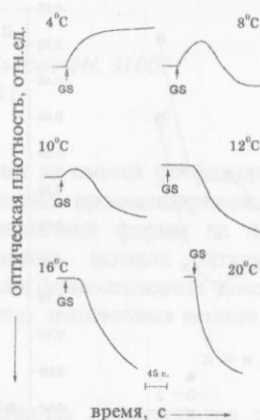


Рис. 3. Изменения оптической плотности образца ОТП под действием GS при различных температурах (показаны только начальные участки агрегатограмм). Концентрация GS - 10^{-2} мг/мл. Агрегация тромбоцитов, предшествующая добавлению GS, вызывалась АДФ в концентрации 0.182 мг/мл.

При температурах 10-18°C добавление GS не вызывает увеличения светопропускания образца, но появляется "лаг-период", т.е. промежуток времени (20-60 с) между добавлением GS и началом распада агрегатов, в течение которого светопропускание образца не изменяется. Авторами [3] было проведено изучение влияния GS на протопласты при различных температурах, однако ни в данной работе, ни в ряде других исследований, посвященных GS, не говорится об отличии механизмов взаимодействия молекулы GS с липидами мембран при низких и высоких температурах. Также в литературе отсутствуют данные о зависимости конформации самой молекулы грамицидина S от температуры (в физиологическом интервале температур). По-видимому, обнаруженный "лаг-период" связан именно с различной скоростью взаимодействия молекулы GS с мембраной, которая определяется различной подвижностью липидов при разных температурах, а по наличию и величине "лаг-периода" можно косвенно судить о подвижности липидов в мембранах тромбоцитов.

На рис. 4 (А, В) представлены зависимости степени и скорости распада агрегатов тромбоцитов под воздействием грамицидина S от температуры. Из рисунка видно, что при низких температурах (4-8°C) добавление GS к проагрегировавшим под действием индуктора тромбоцитам вызывает слабую агрегацию последних. С ростом температуры степень и скорость распада агрегатов тромбоцитов под действием GS увеличиваются. В области температур 33-37°C на графике зависимости степени распада агрегатов от температуры наблюдается участок, почти параллельный оси температуры. Это свидетельствует о том, что степень распада агрегатов при этих температурах почти одинакова. Т.к. степень и скорость распада агрегатов тромбоцитов под действием GS зависят от взаимодействия молекул GS с липидным компонентом мембраны, то подобное замедление роста ΔD может быть связано с достижением предельной (максимальной) подвижности липидов в мембране при 33°C. В этом случае резкое возрастание степени распада агрегатов при температурах выше 38-40°C может объясняться отсутствием сшивающего действия мембранных белков. Однако более вероятным представляется предположение о том, что агрегаты тромбоцитов, образованные при этих температурах, более прочные. При температурах выше 37-38°C степень распада агрегатов с температурой растет быстрее.

На графике зависимости степени распада агрегатов под воздействием GS от температуры для H_2O_2 -индуцированной агрегации (рис. 5) наблюдаются два линейных участка, причем излом соответствует области температур 23-26°C. После этой температуры степень распада агрегатов с

температурой начинает расти быстрее. В области 23-26°C происходит фазовый переход липидов в жидкокристаллическое состояние, что облегчает встраивание молекулы GS в бислой. Возможно, что H_2O_2 делает эти переходы более выраженными.

Использование GS в качестве индикатора изменений липидов мембраны имеет преимущество благодаря своей широкой применимости. Белки мембран клеток крови, в большинстве своем, специфичны для каждого вида клеток. Липиды же, в частности фосфолипиды, универсальны и (в разном количестве) входят в состав мембран всех клеток крови. Поэтому на основании полученных результатов мы предполагаем, что GS может быть использован для определения состояния липидного бислоя мембран различных клеток.

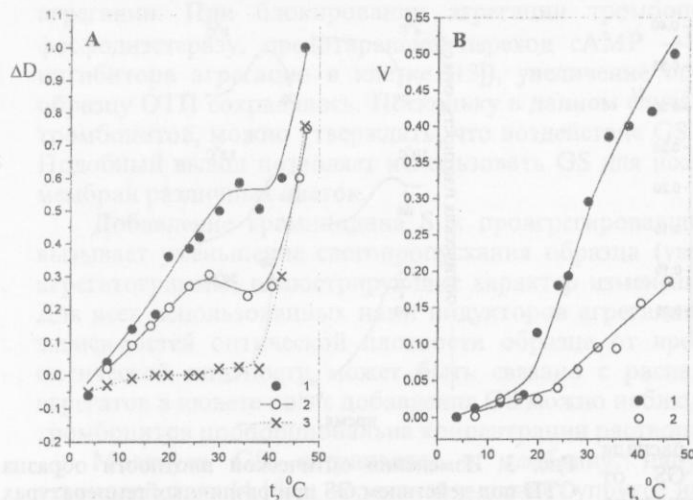


Рис. 4. Зависимости степени ΔD (А) и скорости V (В) распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры для различных образцов ОТП (1,2,3); концентрация GS - 10^{-2} мг/мл (1, 2), $5.7 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (3). Агрегация тромбоцитов, предшествующая добавлению GS, вызывалась АДФ в концентрации 0.182 мг/мл.

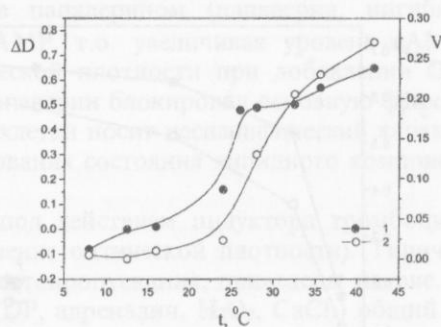


Рис. 5. Зависимости степени ΔD (1) и скорости V (2) распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры; концентрация GS - 10^{-2} мг/мл. Агрегация тромбоцитов, предшествующая добавлению GS, вызывалась H_2O_2 в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

ВЫВОДЫ

В работе изучено влияние антибиотика грамицидина S (GS) на тромбоциты человека оптическим методом. Грамицидин S индуцирует изменение формы интактных тромбоцитов, механизм воздействия опосредован ионами Ca^{2+} . Изменение формы тромбоцитов под действием GS не зависит от процесса агрегации.

Установлено, что GS вызывает распад агрегатов тромбоцитов. Получены зависимости степени и скорости распада агрегатов тромбоцитов под действием GS от температуры в области 4-45°C. Показано, что мембраны тромбоцитов, формирующих агрегат, сохраняют свою целостность. Предполагается, что агрегаты, образующиеся при 33-37°C, обладают повышенной прочностью. Скорость взаимодействия GS с мембраной зависит от температуры и определяется подвижностью липидов мембраны. Показана возможность определения фазовых переходов липидов мембран оптическим методом при помощи GS. Предложен метод изучения состояния липидного бислоя мембран с использованием антибиотика GS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малая Л.Т., Коваль С.Н., Бровкович В.М., Курило Н.Б. // Бюл. эксперим. биол. 1993. N2. С. 151-152.
2. Антибиотики-полипептиды. - М.: Изд-во МГУ, 1987. 262с.
3. Семенов С.Н., Снежкова Л.Г., Иванов В.Т. и др. // Биоорг. химия. 1977. Т.3, N 8. С.1055-1063.
4. Королев П.Н., Булгакова В.Г., Полин А.Н. и др. // Биол. науки. 1988. N 7. С.31-35.
5. Островский Д.Н., Булгакова В.Г., Жукова И.Г. и др. // Биохимия. 1976. Т. 41, вып. 1. С. 175-180.
6. Born G.V.R. // Nature. 1962. V. 206. P. 927-929.
7. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. Минск: Университетское, 1990. 103с.
8. Born G.V.R. // J.Physiol. 1970. V.209, N 3. P. 487-511.
9. Latimer P., Born G.V.R., Michal F. // Arch.Biochem.Biophys. 1977. V. 180, N1. P.151-159.
10. Takashi K., Masakazu K., Morikawa T. et al. // J. Pharmacobio. Dyn. 1989. V.12, N5. P.124-132.
11. Latimer P., Wamble F. // Appl. Opt. 1982. V.21, N13. P.2447-2455.
12. Rink T.J. // Experientia. 1988. V. 44, N 2. P.97-100.
13. Haslam R.J., Daudson M.L. // Thromb. Haemost. 1978. V.40, N 2. P.232-240.
14. Coorssen J., Rand R.P. // Stud.Biophys. 1988. V.127, N 1-3. P.53-60.
15. Маркин В.С., Козлов М.М. // И.н. и т., сер. Биофизика мембран. 1984. Т.3. С. 105-174.
16. Берест В.П., Гаташ С.В. // Физиол. журн. 1998. Т.44, №5-6. С.89-94.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 577.37

СВЯЗЫВАНИЕ ЦИТОХРОМА С С МОДЕЛЬНЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ
МЕМБРАНАМИ

Г.П.Горбенко

Харьковский государственный университет, пл. Свободы 4, 310077

Поступила в редакцию 22 июля 1998 г.

Исследовано взаимодействие цитохрома С с липосомами, состоящими из смесей фосфатидилхолина с фосфатидилсеринном и дифосфатидилглицерином. Изотермы связывания проанализированы в рамках двумерных решеточных моделей адсорбции больших лигандов различной формы на поверхности. Проведена оценка константы ассоциации, стехиометрии связывания, вкладов энтальпийного и энтропийного факторов в изменение свободной энергии при образовании белок-липидных комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром С, липосомы, изотермы связывания, решеточные модели адсорбции, параметры комплексообразования

Модельные белок-липидные системы в настоящее время широко применяются при изучении факторов, определяющих особенности структурной организации и функционирования биологических мембран [1-3]. В качестве одной из моделей липидной фазы мембран используются замкнутые липидные везикулы - липосомы. Основным критерием выбора белкового компонента модельных систем является способность белков образовывать комплексы с липидными молекулами. К числу белков, удовлетворяющих этому критерию, принадлежит, в частности, периферический белок митохондриальных мембран цитохром С. Стабилизация комплексов цитохрома С с липидами обеспечивается, главным образом, электростатическими взаимодействиями, поскольку при нейтральных рН молекула белка имеет суммарный положительный заряд (ca. 9.5) [4,5]. Вместе с тем, в литературе имеются свидетельства частичного проникновения цитохрома С в неполярную область липидного бислоя [6,7]. Соотношение двух основных типов белок-липидных взаимодействий - электростатического и гидрофобного, определяется множеством факторов - природой полярных головок и ацильных цепей фосфолипидов, физическими параметрами липидного бислоя, конформационным состоянием белка и т.д.. Одной из проблем, возникающих при изучении такого рода взаимодействий, является адекватное термодинамическое описание процесса комплексообразования. Это связано с необходимостью учета особенностей белок-липидных систем, обусловленных, в частности, большим размером лиганда, стерическими ограничениями, возникающими при адсорбции, характером сорбирующей поверхности. Предложенные к настоящему времени модели адсорбции больших лигандов на поверхности можно условно разделить на две группы. К первой группе относятся решеточные модели адсорбции, получившие развитие в серии работ [8-10]. В рамках этих моделей поверхность рассматривается как двумерная решетка дискретных связывающих центров (e.g. липидных молекул), а участок связывания представляется в виде комбинации определенного числа этих центров, расположенных в соответствии с формой лиганда. Вторая группа включает континуальные модели, основанные на вычислении химического потенциала сорбированного лиганда [11,12]. Несмотря на то, что модели адсорбции больших лигандов на поверхности наиболее адекватно отражают свойства белок-липидных систем, при анализе большинства полученных к настоящему времени данных по связыванию белков с липидным бислоем использовался традиционный подход, основанный на описании кривых связывания изотермой Ленгмюра. Вместе с тем, как продемонстрировано в ряде работ [10-12], применение этого подхода приводит к некорректной оценке количественных характеристик процесса образования белок-липидного комплекса.

В настоящей работе решеточные модели адсорбции больших лигандов на поверхности были использованы для анализа изотерм связывания цитохрома С с модельными мембранами, сформированными из смесей критерийного фосфолипида фосфатидилхолина (ФХ) с отрицательно заряженными фосфолипидами - дифосфатидилглицерином (ДФГ) и фосфатидилсеринном (ФС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ФХ, ДФГ, ФС (Концерн "Биолек", Харьков), феррицитохром С ("Реахим", Россия). Липосомы формировали из смесей ФХ с ДФГ (6:1, моль:моль) и ФС (3:1, моль:моль) как описано в [13]. Реакцию комплексообразования проводили в 0.01 М трис-НСI буфере, рН 7.4. Белок инкубировали с липосомами в течение 1 часа. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $E_{407}=1.05 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальном исследовании процесса равновесного связывания белков с липидным бислоем используются два основных подхода. Первый подход заключается в разделении свободного и

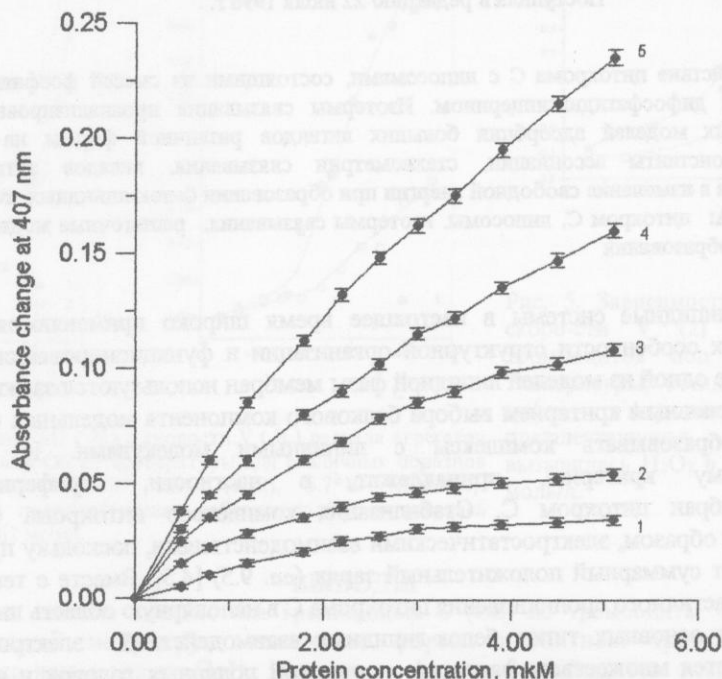


Рисунок 1. Изотермы связывания цитохрома С с липосомами, состоящими из ФХ и ДФГ. Температура, °C: 1 - 2, 2 - 10, 3 - 21, 4 - 29, 5 - 37. Концентрация липида - 0.8 мМ.

связанного белка с помощью гель-фильтрации или ультрацентрифугирования, а второй подход основан на применении спектроскопических методов, позволяющих дифференцировать свободное и связанное состояние белка [15]. Взаимодействие цитохрома С с фосфолипидами приводит к изменению спектров поглощения белка в видимой области, что проявляется, в частности, в уменьшении оптической плотности белок-липидной смеси в полосе S_{ore} [16]. В связи с этим в настоящей работе изотермы связывания цитохрома С с липосомами были получены путем регистрации изменения поглощения белка в максимуме полосы S_{ore} (ΔA_{407}) при различных соотношениях белок : липид (Рис. 1, 2). Полагали, что величина ΔA_{407} пропорциональна концентрации связанного белка (B): $\Delta A_{407} = aB$. Коэффициент пропорциональности (a) оценивали, представляя данные по титрованию белка липосомами в координатах $1/\Delta A_{407} = f(1/L)$, (L - концентрация липида) и экстраполируя значение $1/\Delta A_{407}$ к бесконечно большой концентрации липида ($1/L \rightarrow 0$). Для количественного описания процесса комплексообразования в системе цитохром С - липосомы использовали двумерные решеточные модели адсорбции больших лигандов различной формы на мембране [9,10]. Поверхность липидного бислоя моделировали гексагональной решеткой (координационное число решетки $z=6$), структурными элементами (центрами) которой являются полярные головки фосфолипидов. Под формой лиганда подразумевали геометрическое расположение центров решетки, образующих контактный участок в белок-липидном комплексе. Поскольку однозначное определение конфигурации этого участка невозможно, были рассмотрены два предельных случая, соответствующие предположениям о линейной и дискообразной форме лиганда. Связывание линейного лиганда с мембраной описывали уравнениями:

$$K_a F = \frac{r}{1 - nr} \left(\frac{1 - (1 - \lambda)nr}{1 - nr} \right)^{n-1} \quad (1)$$

$$r = \frac{B}{L}; \lambda = \frac{z-2}{z} - \frac{2}{nz} \quad (2)$$

где F - концентрация свободного белка, n - число липидных молекул, приходящихся на молекулу связанного белка, K_a - константа ассоциации. В предположении дискообразной формы лиганда кривые связывания анализировали с помощью соотношения:

$$K_a F = \frac{r}{1 - nr} \exp \left(\frac{\alpha nr}{1 - \omega r} \right) \quad (3)$$

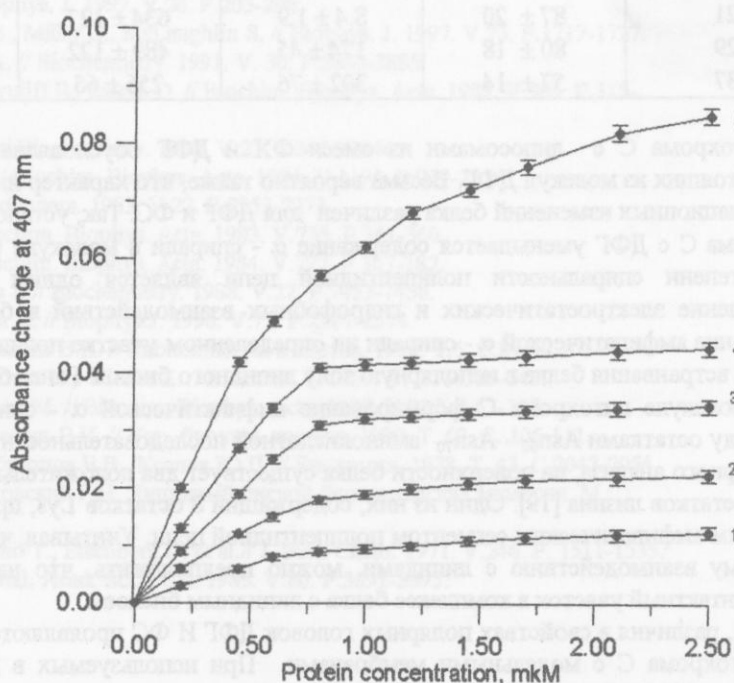


Рисунок 2. Изотермы связывания цитохрома С с липосомами, состоящими из ФХ и ФС. Температура, °C: 1 - 2, 2 - 10, 3 - 21, 4 - 29, 5 - 37.

где α - параметр исключенной площади (для диска $\alpha = 3$), $\omega = 2\sqrt{3}n / \pi$. Учитывая, что $B = \Delta A_{407} / a$ и используя уравнения (1) - (3) для определения F , можно вычислить общую концентрацию белка (P_o^c) при данном наборе параметров a , n и K_a . Значения n и K_a , обеспечивающие наилучшую аппроксимацию экспериментальных данных уравнениями (1)-(3) (Табл. 1) находили путем минимизации функции:

$$f = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (P_o^e - P_o^c)^2 \quad (4)$$

где P_o^e - концентрация белка, определенная экспериментально, m - число экспериментальных точек.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, параметры связывания цитохрома С с липосомами существенно зависят от природы полярных головок фосфолипидов. Процесс адсорбции цитохрома С на поверхности бислоя, состоящего из смеси нейтральных и отрицательно заряженных липидов, очевидно, включает несколько стадий. Первоначально белок образует один-два электростатических контакта с полярными головками фосфолипидов, а затем число таких контактов увеличивается вследствие латеральной диффузии заряженных фосфолипидов и/или изменения конформации белка. Наблюдаемые различия в стехиометрии связывания цитохрома С с липосомами различного состава можно объяснить следующим образом. Поскольку отрицательный заряд ДФГ в два раза превышает заряд ФС, для формирования контактного участка с определенным суммарным зарядом необходимо меньшее число молекул ДФГ, чем ФС. Кроме того, известно, что ДФГ обладает более высокой латеральной подвижностью в смешанных бислоях, по сравнению с ФС [15]. Не исключено, что большая компактность

Таблица 1. Параметры связывания цитохрома С с липосомами

Состав липосом	Температура °C	Линейный лиганд		Диск	
		<i>n</i>	$K_a \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$	<i>n</i>	$K_a \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$
ФХ:ДФГ	2	44 ± 9	1.2 ± 0.3	227 ± 44	1.0 ± 0.3
	10	42 ± 8	4.0 ± 1.1	184 ± 48	2.8 ± 0.7
	21	25 ± 7	5.2 ± 1.2	76 ± 18	4.2 ± 0.9
	29	19 ± 4	6.9 ± 1.6	54 ± 13	7.6 ± 1.9
	37	12 ± 3	8.6 ± 2.0	27 ± 7	10.4 ± 2.5
ФХ:ФС	2	115 ± 30	3.0 ± 0.8	991 ± 198	1.1 ± 0.2
	10	76 ± 18	3.7 ± 0.9	746 ± 164	7.5 ± 1.9
	21	87 ± 20	8.4 ± 1.9	634 ± 127	149 ± 39
	29	80 ± 18	174 ± 45	489 ± 122	190 ± 46
	37	57 ± 14	302 ± 76	256 ± 66	254 ± 56

участка связывания цитохрома С с липосомами из смеси ФХ и ДФГ обусловлена образованием липидных кластеров, состоящих из молекул ДФГ. Весьма вероятно также, что характер индуцированных фосфолипидами конформационных изменений белка различен для ДФГ и ФС. Так, установлено, что при взаимодействии цитохрома С с ДФГ уменьшается содержание α -спирали в молекуле белка [17]. Как известно, изменение степени спиральности полипептидной цепи является одним из факторов, модулирующих соотношение электростатических и гидрофобных взаимодействий в белок-липидном комплексе [18]. Образование амфипатической α -спирали на определенном участке полипептидной цепи создает предпосылки для встраивания белка в неполярную зону липидного бислоя. Ранее было высказано предположение, что в молекуле цитохрома С формирование амфипатической α -спирали наиболее вероятно на участке между остатками Asp₆₀ - Asp₇₀ аминокислотной последовательности [17]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, на поверхности белка существует два положительно заряженных кластера, состоящих из остатков лизина [19]. Один из них, содержащий 8 остатков Lys, пространственно сближен с предполагаемым амфипатическим сегментом полипептидной цепи. Учитывая, что цитохром С способен к гидрофобному взаимодействию с липидами, можно предположить, что на основе этого кластера формируется контактный участок в комплексе белка с липидным бислоем.

Как следует из табл. 1, различия в свойствах полярных головок ДФГ и ФС проявляются в различиях констант ассоциации цитохрома С с модельными мембранами. При используемых в данной работе молярных соотношениях ФХ:ДФГ и ФХ:ФС липосомы различного состава имеют практически одинаковый поверхностный заряд. Вместе с тем, ФС характеризуется более выраженной способностью к образованию водородных связей, чем ДФГ [18]. Это может быть одной из причин более высокого сродства цитохрома С к ФС - содержащим липосомам.

Таблица 2. Термодинамические характеристики комплексов цитохрома С с липосомами

Состав липосом	Линейный лиганд		Диск	
	ΔH , кДж моль ⁻¹	ΔS , Дж моль ⁻¹ К ⁻¹	ΔH , кДж моль ⁻¹	ΔS , Дж моль ⁻¹ К ⁻¹
ФХ:ДФГ	36 ± 10	194 ± 58	45 ± 13	224 ± 63
ФХ:ФС	106 ± 29	449 ± 121	116 ± 30	484 ± 126

Анализ зависимостей константы ассоциации от температуры с использованием соотношения $\ln K_a = \Delta S/R - \Delta H/RT$ позволил приблизительно оценить изменение энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) при образовании белок-липидных комплексов. Как видно из табл. 2, связывание цитохрома С с липосомами сопровождается увеличением энтальпии и энтропии системы. Энергетически выгодное возрастание энтропии может быть обусловлено рядом причин: а) образованием ионных контактов в воде, б) гидрофобным взаимодействием белка с липидами, в) структурной реорганизацией липидного бислоя, г) изменением структуры белковой молекулы [20].

ВЫВОДЫ

В настоящей работе изотермы связывания цитохрома С с модельными фосфолипидными мембранами проанализированы в рамках решеточных моделей адсорбции больших лигандов на поверхности. В предположении линейной и дискообразной формы контактного участка проведена оценка нижнего и верхнего пределов числа липидных молекул, приходящихся на молекулу связанного белка. Комплексообразование цитохрома С с липосомами, состоящими из ФХ и ДФГ характеризуется большей компактностью участков связывания, но меньшей константой ассоциации, по сравнению с липосомами, сформированными из ФХ и ФС. Основной вклад в стабилизацию белок - липидных комплексов вносит энтропийный фактор.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tamm L. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V.1071. P.123-148.
2. Marsh D. // Eur. Biophys. J. 1997. V.26. P.203-208.
3. Ben-Tal N., Honig B., Miller C., McLaughlin S. // Biophys. J. 1997. V.73. P.1717-1727.
4. Spooner P., Watts A. // Biochemistry. 1991. V. 30. P.3880-3885.
5. Sankaram M., De Kruijff B., Marsh D. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V.986. P.315-320.
6. Vincent J., Levin I. // Biochemistry. 1988. V.27. P.3438-3446.
7. Zhang F., Rowe E. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V.1193. P.219-225.
8. Miyazawa S. // Biopolymers. 1983. V.22. P.2253-2271.
9. Stankowski S. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V.735. P.341-360.
10. Stankowski S. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V.777. P.167-182.
11. Tamm L., Bartoldus I. // Biochemistry. 1988. V.27. P.7453-7458.
12. Chatelier R., Minton A. // Biophys. J. 1996. V.71. P.2367-2374.
13. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. // Биополимеры и клетка. 1990. Т.6. С.87-90.
14. Margolias E., Frohwirt N., Wienes E. // Biochem. J. 1959. V.71. P.559-563.
15. Devaux P., Seigneuret M. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V.822. P.63-125.
16. Горбенко Г.П., Древалъ В.И. // Укр. биохим. журнал. 1990. Т. 62. С. 106-111.
17. Селищева А.А., Образцов В.В., Козлов Ю.П. // Биохимия. 1978. Т. 43. С.2047-2054.
18. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. М.: Наука, 1982. 224 с.
19. Dickerson R., Takano T., Eisenberg D. et al. // J. Biol. Chem. 1971. V.246. P. 1511-1535.
20. Jahnig F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V.80. P.3691-3695.

УДК 577.152.6

THEORETICAL DEPENDENCE OF PHOSPHATE POTENTIAL ON MAGNITUDE OF PROTONMOTIVE FORCE FOR TWO-ELECTRON PROTON-CHEMICAL COUPLING POINT MODEL.

A.G. Anishkin, V.V. Lemeshko.

Biology Research Institute of Kharkov State University. 310077, Kharkov, 4 Svobody Sq..

Received September 23, 1998.

In the work the electrical model of a two-electronic proton-chemical coupling point is considered. The computer analysis of the model shows that for mitochondria in respiration state 4 (by Chance) the ratio of the phosphate potential to the proton-motive force grows as the concentration of an uncoupler in the medium increases. The obtained theoretical dependence correlates qualitatively with experimental data contradicting to the chemyosmotic hypothesis.

KEYWORDS: respiration, oxidative phosphorylation, coupling mechanism, mathematical modelling.

At the present time the overwhelming majority of works concerned with the study of energy coupling in biomembranes use Mitchell's chemyosmotic hypothesis [1] as a theoretical basis. Nevertheless, some experimentally measured characteristics of energy coupling system cannot be described in terms of chemiosmosis [2, 3]. The proton-chemical hypothesis of energy coupling gives possible variants of the explanation of the mentioned experimental data [4 - 7].

Among the most substantial objections to the orthodox chemyosmotic coupling principle is the variable ratio of phosphate potential to the magnitude of protonmotive force [8, 9]. This ratio grows with the reduction of membrane potential in the process of a titration of mitochondria in respiration state 4 (by Chance) by uncoupler-protonophore. The purpose of the present work is the analysis of the theoretical dependence of the ratio of the phosphate potential to the membrane potential resulting from the proton-chemical mechanism of ATP synthesis. This dependence is considered on the example of a two-electron proton-chemical coupling point. For this purpose the corresponding electrical model of the system of mitochondrial oxidative phosphorylation is used.

MODEL

In fig.1 the general system of reactions in the considered model of oxidative phosphorylation system is shown. Since the detailed description of a two-electronic proton-chemical coupling point and the principles of composing of the equivalent electrical circuits was published earlier [6, 7], it seems expedient only to mention briefly some key moments of the proton-chemical point organization. The coupling point is divided in two subunits "a" and "b" according to [5, 6]. In the subunit "a" the transfer of the electron pair ($2\bar{e}$) is coupled only with pumping out $2H^+$ from a mitochondrion, and in the subunit "b" $2\bar{e}$ can pass either by Mitchell's way coupled with pumping out $2H^+$, or by chemical way, coupled with synthesis 1 ATP and transfer of $2H^+$ into

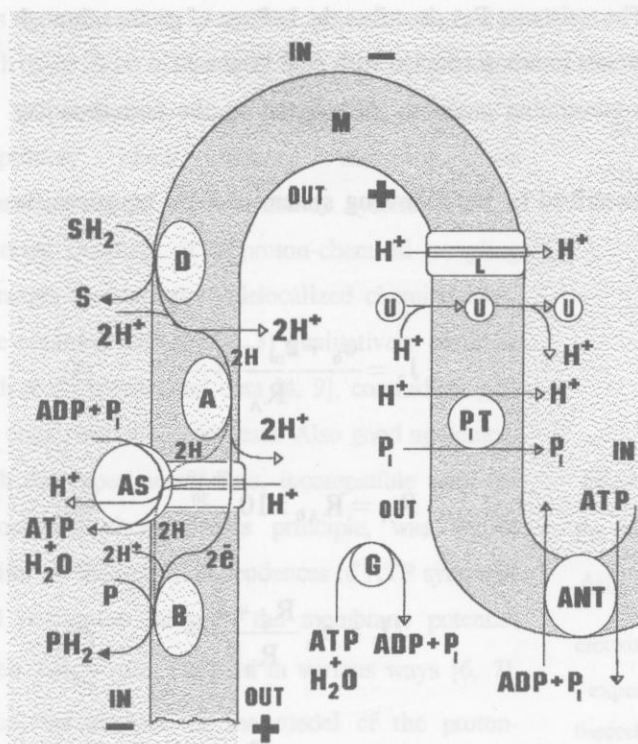


Fig. 2. The system of reactions of oxidative phosphorylation in a two-electronic proton-chemical coupling point. Symbols: D, A, B, - redox-centers of a respiratory chain; SH₂ and P - respectively, donor and acceptor of hydrogen atoms; --- - flow of electrons through the ATP-synthase (As) by the chemical way; ANT - adeninnucleotidetranslocase; G - ferments hydrolysing ATP; PiT - phosphate carrier; U - uncoupler; L - natural leakage of protons.

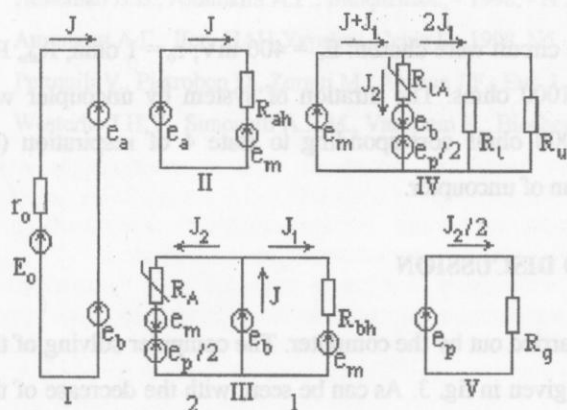


Fig. 1. The equivalent electrical circuit of a two-electron proton-chemical coupling point

mitochondrial matrix.

The given system of energy coupling can be modelled by the equivalent electrical circuit given in fig. 2. The circuit consists of five contours. The contour I describes a flow of electrons through the whole coupling point. The current J corresponds to a flow of electrons, the voltage E_0 reflects the difference of redox potentials ΔE_{BD} , r_0 corresponds to internal resistance of E_0 source. The voltage e_a and e_b in contour I and other contours reflects respectively redox potential decrease ΔE_{AD} and ΔE_{BA} in the subunits "a" and "b" of a proton-chemical point.

Contour II shows the coupling of electron flow with pumping out of protons in the subunit "a". The resistance R_{ah} characterizes the work of the appropriate proton pump. The voltage e_m corresponds to the transmembrane potential $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$.

Contour III describes the coupling of electrons transfer in the subunit "b" of a respiratory chain with pumping out of protons (flow J_1) and ATP synthesis (flow J_2). In the given contour the resistance R_{bh} corresponds to H^+ -pump of the subunit "b", and the voltage e_p describes the phosphate potential in nonmitochondrial bulk phase. The resistance R_A reflects the work of the ATP-synthase. According to the redox nature of the formation of "high-energy" bond in the proton-chemical mechanism of ATP synthesis [4 - 7], R_A exponentially depends on the magnitude of $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ and redox potential e_b . It is reflected in the equation (6), where R_{A0} - normalising multiplier.

Contour IV describes the distribution of proton flows in the simulated system. In the given contour resistance R_L reflects natural leakage of protons through a membrane, and R_U

describes the leakage caused by an added uncoupler. The resistance R_{LA} describes the leakage of protons through the ATP-synthase and system of phosphorylation substrates transport coupled with ATP synthesis.

Contour V displays ATP hydrolysis in energy-consuming processes determined by the corresponding resistance R_g .

The given equivalent electrical circuit can be described by the following system of eight equations, in which there are eight unknown variables.

$$J = \frac{E_o - e_a - e_b}{r_o} \quad (1);$$

$$J_2 = \frac{e_b + e_m - e_p / 2}{R_A} \quad (5);$$

$$J = \frac{e_a - e_m}{R_{ah}} \quad (2);$$

$$R_A = R_{A0} \times 10^{\frac{e_b + e_m}{30}} \quad (6);$$

$$J = J_1 + J_2 \quad (3);$$

$$2J_1 = e_m \frac{R_u + R_L}{R_u R_L} \quad (7);$$

$$J_1 = \frac{e_b - e_m}{R_{bh}} \quad (4);$$

$$J_2 / 2 = \frac{e_p}{R_g} \quad (8).$$

The choice of numerical values of resistances was based on the general qualitative characteristics of mitochondrial oxidative phosphorylation system, such as low proton conductivity of a coupling membrane, approximate value of the respiratory control ratio, the maximum degree of respiration activation, and others. For some parameters, such as a normalising multiplier of the ATP-synthase resistance, which are not obviously determined by general reasons the selection was carried out empirically with the subsequent computer analysis of the model behaviour. (The more detailed description of the parameters' values choice see in work [6].) The values of resistances given below are normalized per one coupling point and have a relative character, though they are expressed in ohms.

The following values of parameters of the electrical circuit were chosen: $E_o = 400$ mV; $r_o = 1$ ohm, R_{ah} , $R_{bh} = 10$ ohms; $R_{A0} = 10^9$ ohms, $R_L = 100$ ohms; $R_g = 1000$ ohms. The titration of system by uncoupler was simulated by the resistance R_U change from value 1000 ohms corresponding to state 4 of respiration (by Chance), up to value 1 ohm at the maximum concentration of uncoupler.

RESULTS AND DISCUSSION

The solving of the equations system (1) - (8) was carried out by the computer. The computer solving of the equations system allowed us to receive the dependences given in fig. 3. As can be seen, with the decrease of the membrane potential the ratio $\Delta G_p / \Delta \bar{\mu}_{H^+}$ grows. From the point of view of the proton-chemical coupling principle it can be explained as follows. For ATP synthesis both the energy $\bar{\mu}_{A..}$ and directly the energy of redox potentials difference in a respiratory chain are used. At the uncoupler addition the part of energy received from $\bar{\mu}_{A..}$ is reduced much more than the part of energy received from the redox-potentials difference. Due to

this the ratio of the phosphate potential (including both these parts) to the membrane potential grows.

Thus, the redox status of the redox-centers of a respiratory chain directly influences the characteristics of ATP formation system. This is inherent quality of a proton-chemical coupling principle in contrast to delocalized chemiosmosis. The obtained curves (fig. 3) qualitatively correlate with real experimental data [8, 9], contradicting to the chemiosmotic hypothesis. Also good agreement with the experimental data, incompatible with the delocalized chemiosmosis principle, was shown earlier for theoretical dependences of ATP synthesis and respiration rates on the membrane potential when $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ was changed in various ways [6, 7]. Thus, the analysis of the model of the proton-chemical coupling mechanism can be considered as an argument in favor of a principle possibility of its existence.

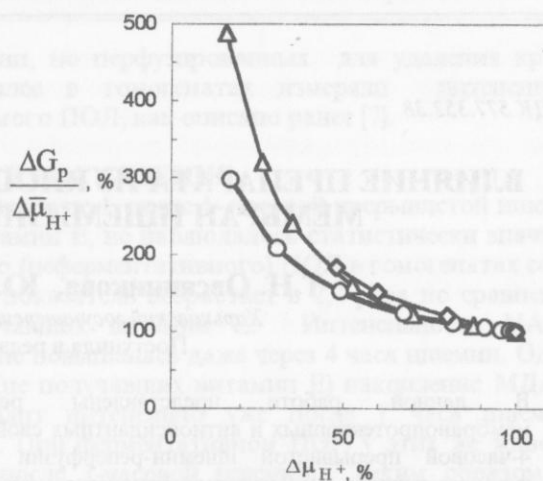


Fig. 3 Dependences of the ratio of the phosphate potential to the membrane potential ($\Delta G_P / \Delta \bar{\mu}_{H^+}$) on the magnitude of $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ at the uncoupler titration for the model of two-electronic proton-chemical coupling unit. Symbols: $\diamond, \triangle$ - experimental data (taken from [8] and [9] accordingly); $\circ$ - theoretical dependence for a two-electronic coupling unit. All values are normalized relative to the respiration state 4 (by Chance). (Parameters of the electrical circuits see in the text).

LITERATURE

1. Mitchell P.; Nature (London), 1961, v. 191, pp. 144-148
2. Ferguson S.J.; Biochem. et Biophys. Acta, 1985, v.811, N1, pp. 47- 95.
3. Slater E.C., Berden J.A., Herweijer M.A.; Biochem. et Biophys. Acta, 1985, v. 811, N 1, pp. 217-231.
4. Лемешко В.В.; Докл. АН УССР, сер. Б, 1980, N 10, с. 78-81.
5. Лемешко В.В.; Киев: Наукова Думка, Биохимия животных и человека, 1988, вып. 12, с. 54- 65.
6. Лемешко В.В., Анишкин А.Г.; Биофизика., - 1998, - N 2, - с. 308-314
7. Анишкин А.Г., Доп. НАН України. Серія Б., 1998, N5, с. 183-189
8. Petronili V., Pietrobon D., Zoratti M., Azzone J.F.; Eur. J. Biochem., 1986, v. 155, N 2, pp. 423-431.
9. Westerhoff H.V., Simonetti A.L.M., Van Dam K.; Biochem. J., 1981, v. 200, pp. 193 - 202.

УДК 577.352.38

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ RHODIOLA ROSEA L. НА ЦЕЛОСТНОСТЬ МЕМБРАН ИШЕМИЗИРОВАННОГО МИОКАРДА

Т.Н. Овсянникова, Ю.В. Никитченко, В.В. Лемешко

Харьковский госуниверситет, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4

Поступила в редакцию 2 ноября 1998 г.

В данной работе представлены результаты экспериментального доказательства мембранопротекторных и антиоксидантных свойств спиртовой настойки *Rhodiola rosea* L. на модели 4-часовой прерывистой ишемии-реперфузии изолированного миокарда крыс. Интенсивность ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов, а также выход лактатдегидрогеназы в перфузат из изолированного миокарда крыс, получавших настойку родиолы розовой, снижались более интенсивно по сравнению как с интактными животными, так и с крысами, получавшими препарат сравнения - витамин Е.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ишемия миокарда, мембраны, перекисное окисление липидов, *Rhodiola rosea* L., витамин Е, лактатдегидрогеназа

Рядом исследователей показана активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сердце при моделировании ишемии миокарда [1,2,3], сопровождающаяся нарушением целостности мембран миокарда [6], а также, в ряде случаев, снижением активности антиоксидантных ферментов и уровня низкомолекулярных антиоксидантов в органе [1]. В связи с этим, одним из средств защиты кардиомиоцитов от повреждающего действия ПОЛ в условиях ишемии, возможно, могут быть антиоксиданты неферментативной природы, такие, как витамин Е, предшественники глутатиона и он сам, а также комплексные препараты, содержащие эти вещества, поскольку они обладают мембранопротекторным действием не только в качестве перехватчиков свободных радикалов [1,4], но и могут влиять на пул восстановительных эквивалентов в клетке, замедлять выход из клеток глутатиона [5], повышая тем самым эффективность тиол-зависимых антиоксидантных ферментов.

Таким образом, поиск нетоксичных веществ с комплексными антиоксидантными свойствами является одним из перспективных подходов к разработке как средств противоишемической защиты миокарда, так и способов коррекции липоперекисного потенциала организма, и, в частности сердца, в условиях, способствующих активации свободнорадикального ПОЛ. Нам представлялось эффективным вести поиск антиоксидантов природного происхождения, используя в качестве их источника лекарственные растения, а в качестве способа активации ПОЛ - модель ишемии-реперфузии миокарда. В результате проведения скрининга антиоксидантов природного происхождения были выбраны настойка *Rhodiola rosea* L., ранее не употреблявшаяся в качестве антиоксидантного и противоишемического средства, а также хорошо известный антиоксидант с уже описанными противоишемическими свойствами - витамин Е [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на самцах крыс линии Вистар 1- и 3-месячного возраста. Животным одной группы в течение 3 дней вводили посредством внутрижелудочного зондирования спиртовую настойку корня *Rhodiola rosea* L. (родиолы розовой), приготовленную в условиях лаборатории (20 % по весу сухого корня и 40 % по спирту) в дозе 0,5 - 1,0 мл на 250 г массы тела. Животные другой группы в течение 3 дней получали внутримышечно масляный раствор витамина Е в дозе 100 мг на 1 кг массы тела. Контролем служили интактные крысы.

После декапитации животного быстро извлекали сердце и помещали в холодную среду Хенкса. Остановленное и охлажденное сердце взвешивали, канюлировали аорту и затем в течение 3 минут перфузировали средой Хенкса без глюкозы, насыщенной кислородом воздуха, с помощью перистальтического насоса. Скорость перфузии составляла 5 мл в мин на 1 г массы сердца. Среду перфузии и сердце термостатировали при 37 °С. После указанной выше 3-х-минутной перфузии сердце периодически подвергали ишемии по схеме: 19 минут тотальной ишемии - 1 минута реперфузии аэрированной средой [3]. Степень повреждения кардиомиоцитов оценивали по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ), активность которой измеряли в 1-минутных перфузатах после каждых 19 минут ишемии методом, описанным ранее [6], регистрируя флуориметрически восстановление NAD⁺. В зависимости от необходимой длительности прерывистой ишемии по схеме "19-1" после 60 и 240 минут сердца охлаждали в 100 мМ трис-НСl буфере (рН 7,4) при температуре 0-2 °С и затем в такой же среде готовили 20 % гомогенаты. Контролем служили

гомогенаты сердец, не подвергавшихся ишемии, но перфузированных для удаления крови в течение 3 минут, как описано выше. Далее в гомогенатах измеряли интенсивность индуцированного NADPH- и аскорбат-зависимого ПОЛ, как описано ранее [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных в таблице 1, после 1- часовой прерывистой ишемии в группе крыс (1-мес. возраста), получавших витамин Е, не наблюдалось статистически значимого увеличения интенсивности аскорбат-зависимого (неферментативного) ПОЛ в гомогенатах сердца. Лишь после 4 часов ишемии-реперфузии этот показатель возрастает в 2,4 раза по сравнению с неишемизированными сердцами крыс, получавших витамин Е. Интенсивность NADPH-зависимого (ферментативного) ПОЛ при этом не повышалась даже через 4 часа ишемии. Однако, как показано, в миокарде контрольных крыс (не получавших витамин Е) накопление МДА при индукции неферментативного ПОЛ происходит интенсивно уже после 1 часа ишемии и продолжает возрастать после 4 часов ишемии. При ферментативном ПОЛ у этих же животных наблюдалась значительная активация ПОЛ после 1-часовой ишемии. Таким образом, был показан эффект ингибирования индуцированного ПОЛ в миокарде после ишемии-реперфузии у крыс, получавших витамин Е.

Табл. 1.

Интенсивность накопления МДА (нмоль на 1 мг белка) за 30 мин инкубации при NADPH (НЗП)- и аскорбат(АЗП) -зависимом ПОЛ в гомогенатах сердца крыс при 1- и 4- часовой прерывистой ишемии-реперфузии в норме и при применении витамина Е
($\bar{X} \pm Sx$; $n = 6$)

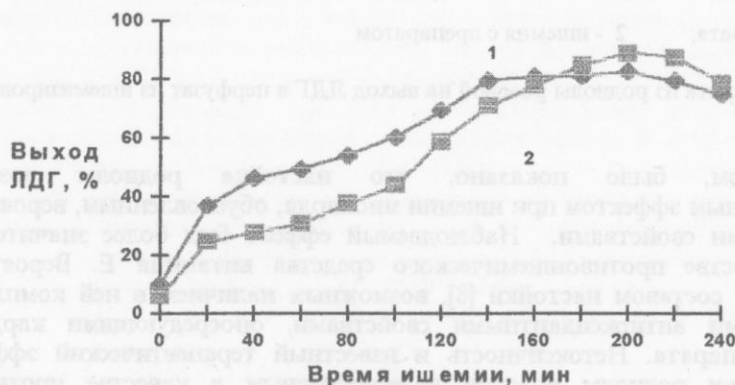
Условия опыта	НЗП	АЗП
Контроль без витамина Е	2,53±0,31	2,51±0,47
1 ч ишемии без витамина Е	7,02±1,10*	6,24±0,30*
4 ч ишемии без витамина Е	3,58±0,54	10,34±2,36*
Контроль с витамином Е	2,29±0,42	1,40±0,16
1 ч ишемии с витамином Е	2,68±0,38	2,57±0,62
4 ч ишемии с витамином Е	2,92±0,30	3,22±0,80

* - достоверно относительно соответствующего контроля

Известно, что антиоксидантный эффект витамина Е лежит в основе его защитных свойств при ишемии [1], что подтверждается полученными нами результатами измерения выхода ЛДГ из ишемизированного миокарда крыс в перфузат, представленными на рисунке 1.

Наблюдалось статистически значимое (согласно критерию Уилкоксона) снижение выхода фермента из миокарда крыс, получавших витамин Е. Особенно большие отличия от показателей контрольных животных на ранних сроках ишемии - от 20 до 100 минут, т.е. время, когда модель соответствует физиологически обратимым формам ишемии миокарда в организме.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии витамина Е на целостность мембран миокарда при ишемии. Причем этот эффект обусловлен его антиоксидантными свойствами.



1 - ишемия без витамина Е; 2 - ишемия с витамином Е
Рис.1. Влияние витамина Е на выход ЛДГ в перфузат из ишемизированного миокарда в перфузат

Испытание кардиопротекторных свойств настойки родиолы розовой проводилось на 3-месячных крысах-самцах. Поскольку более низкая интенсивность ПОЛ в миокарде более зрелых крыс по сравнению с 1-месячными замедляет начало ишемических повреждений [3], особый интерес представляют данные об активации липоперекисления после 4 часов ишемии-реперфузии, представленные в таблице 2.

Табл. 2.

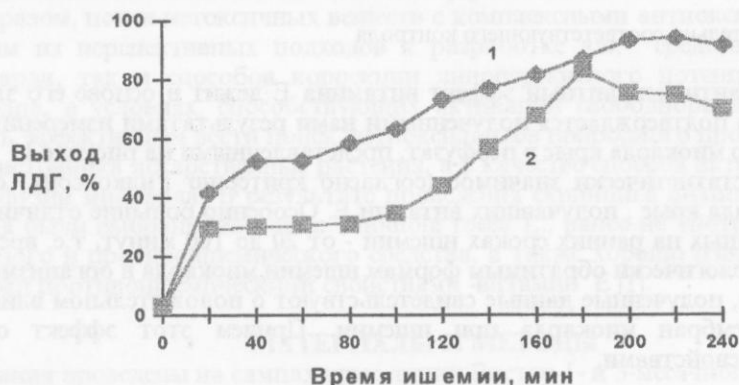
Интенсивность накопления МДА (нмоль на 1 мг белка) за 30 мин инкубации при NADPH (НЗП)- и аскорбат(АЗП)-зависимом ПОЛ в гомогенатах сердца крыс при 1- и 4- часовой прерывистой ишемии-реперфузии в норме и при применении препарата родиолы розовой ($X \pm Sx$; $n = 6$)

Условия опыта	НЗП	АЗП
Контроль без препарата	$0,19 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,005$
1 ч ишемии без препарата	$0,31 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,008$
4 ч ишемии без препарата	$0,95 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,06$
Контроль с препаратом	$0,24 \pm 0,05$	На уровне фона
1 ч ишемии с препаратом	$0,23 \pm 0,08$	На уровне фона
4 ч ишемии с препаратом	$0,64 \pm 0,10$	$0,23 \pm 0,09$

* - достоверно относительно 4 часов ишемии без препарата

Хотя при применении настойки родиолы розовой интенсивность ПОЛ в миокарде увеличивалась после 4-часовой ишемии, но и для неферментативного, и для ферментативного ПОЛ это увеличение было гораздо менее значительно, чем у животных, не получавших настойку.

Вероятно, антиоксидантные свойства настойки обуславливают ее кардиопротекторный эффект, который выражается, в частности, в уменьшении выхода ЛДГ из миокарда в перфузат. Как следует из данных, представленных на рисунке 2, при использовании родиолы розовой наблюдался выраженный защитный эффект. Так же, как и в случае введения витамина Е, кардиопротекторное действие обнаруживалось на ранних сроках ишемии, но при применении родиолы розовой оно продлевалось почти до 140 минут ишемии.



1 - ишемия без препарата; 2 - ишемия с препаратом

Рис. 2. Влияние препарата из родиолы розовой на выход ЛДГ в перфузат из ишемизированного миокарда в перфузат

Таким образом, было показано, что настойка родиолы розовой обладает мембранопротекторным эффектом при ишемии миокарда, обусловленным, вероятно, в том числе, ее антиоксидантными свойствами. Наблюдаемый эффект был более значительный, чем при применении в качестве противоишемического средства витамина Е. Вероятно, это можно объяснить сложным составом настойки [8], возможным наличием в ней комплекса веществ со взаимодополняющими антиоксидантными свойствами, опосредующими кардиопротекторное действие этого препарата. Нетоксичность и известный терапевтический эффект [9,8] делает применение настойки родиолы розовой целесообразным в качестве противоишемического средства в условиях, требующих повышенной работоспособности и сопротивляемости организма, например при выполнении тяжелых физических работ.

ВЫВОДЫ

1. Спиртовая настойка родиолы розовой обладает мембранопротекторными и антиоксидантными свойствами в условиях ишемии-реперфузии миокарда.
2. Обнаруженные эффекты более выражены, чем у известного препарата сравнения - витамина Е в аналогичных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). М. Медицина, 1989. 368 с.
2. Бобков Ю.Г., Виноградов М.В., Катков В.Ф. и др. Фармакологическая коррекция утомления. М. Медицина, 1984. С. 8-45.
- 287-3023. Воскресенский О.Н. Влияние природных биоантиоксидантов на патологические процессы, связанные со старением // ВИНТИ. Итоги науки и техники. Сер. общие проблемы биологии. М., 1986. Т.5.С. 163-201.
4. Иванов И.И., Коровкин Б.Ф., Маркелов И.М. Введение в клиническую эндокринологию, Л. Медицина, 1974. 350 с.
5. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Ланкин В.З. Ферменты утилизации гидропероксидов и O_2 в миокарде крыс разного возраста // Бюлл. экспер. биол. и мед. 1985. Т.99, N 5. С. 563-565.
6. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Троянова В.Н. и др. Особенности ишемического повреждения мембран и активация перекисного окисления липидов в миокарде крыс разного возраста // Укр. биохим. журн. 1989. Т.61, N 2. С.98-105.
7. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных ишемических повреждений сердца. М. Медицина, 1984. 272 с.
8. Саратиков А.С., Краснов Е.А. Родиола розовая - ценное лекарственное растение: Золотой корень. Томск. Изд-во Томского университета, 1987. 254 с.
9. Beutler E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione // Annu. Rev. Nutr. 1989. V.9. P.287-302.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 57.043

ФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЯВЛЕНИЯ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО КРИОГЕМОЛИЗА

С.Е.Коваленко

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

Поступила в редакцию 12 октября 1998 г.

В статье кратко изложена физическая модель явления гипер тонического криогемолиза, которая объясняет основные закономерности этого явления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит человека, физическая модель, гипертонический криогемолиз.

Гипертоническим криогемолизом (ГК) называется явление повреждения эритроцитов человека, которое возникает в результате экспозиции клеток в гипертоническом растворе не проникающего в них вещества и последующего охлаждения до околонулевой положительной температуры. Экспериментально определены основные закономерности этого явления [1]. В частности, установлено, что 1) сама по себе экспозиция эритроцитов человека в гипертонических растворах хлорида натрия, сахарозы и других не проникающих через клеточные мембраны веществ при постоянной температуре (в диапазоне от 45 до 20°C) вызывает гемолиз, значительно меньший, чем гемолиз, возникающий в процессе следующего за этой экспозицией охлаждения до температуры ниже 13-8°C; 2) эритроциты человека не повреждаются в изотонической среде при охлаждении в области положительных температур; 3) эритроциты человека становятся чувствительными к охлаждению до температуры ниже 13-8°C, если охлаждению предшествует экспозиция клеток в гипертоническом растворе не проникающего через клеточные мембраны вещества, осмолярность которого превышает определенное критическое значение (1200-1400 миллиосмолей); 4) более высокая скорость охлаждения приводит к большему гемолизу; 5) гемолиз начинается, когда температура суспензии эритроцитов падает ниже 13°C. До сих пор, однако, нет удовлетворительной биофизической модели явления ГК. В данной работе кратко сформулирована физическая модель ГК, объясняющая указанные закономерности.

Как известно, в области температур 8-13°C в мембране эритроцитов наблюдается термотропное превращение мембраны из жидкокристаллического в твердое гелеобразное состояние [2]. Если это превращение сопровождается уменьшением площади мембраны в $s_t/s_{ж}$ раз (s_t и $s_{ж}$ - средняя площадь на молекулу в мембране в твердом и жидком состояниях), то в мембране создается однородное тангенциальное натяжение $s = \Gamma(s_{ж} - s_t)/s_{ж}$, где Γ - модуль растяжения мембраны эритроцита. При этом на мембрану в нормальном к ней направлении начинает действовать сила, равная $\Delta p = 2\sigma/r$, где r - локальный радиус кривизны мембраны. Поскольку радиус кривизны мембраны эритроцита как в обычном, так и в обезвоженном состояниях меняет свой знак при переходе от одного участка мембраны к другому, возникающие в результате фазового превращения силы Δp стремятся сдвинуть разные слои внутриклеточного раствора друг относительно друга и изменить форму клетки таким образом, чтобы натяжение мембраны обратилось в нуль. В необезвоженном или слабо обезвоженном состоянии внутриклеточный раствор гемоглобина в эритроците имеет сравнительно небольшую вязкость (меньше 0,1 Па [3]) и поэтому слабо сопротивляется изменению формы, что характерно для любой жидкости. За сравнительно короткое время порядка $\tau = \eta R/\Gamma$ (η - вязкость внутриклеточного белкового раствора в эритроците, R - характерный размер эритроцита) натяжение падает до нуля. Однако, в том случае, когда за счет контакта с гипертоническим внеклеточным раствором с концентрацией выше 1,2М клетка обезвоживается примерно на 40%, объемная доля белковых глобул во внеклеточном растворе достигает значения около 0,5, которое, как известно [4], соответствует плотности случайно упакованных сфер. При этом эффективная вязкость $\eta_{эфф}$ внутриклеточного раствора очень быстро возрастает, например, в соответствии с функциональным соотношением Мори, Ототакэ [4]

$$\eta_{эфф} = \eta(1 + 3/(1/\alpha - 1/0,52))$$

Поэтому внутриклеточный раствор гемоглобина в сильно обезвоженном эритроците начинает вести себя как вязкоупругое тело, которое имеет промежуточное между твердым и жидким телом свойства: оно значительно сопротивляется изменению формы при быстрых воздействиях и

значительно слабее - при малых воздействиях на него. Характерное время τ , разделяющее такие быстрые и медленные воздействия при $\alpha \geq 0,5$ может возрастать в сотни и более раз. Если в нормальном эритроците $\tau = 0,1$ с, то при $\alpha \geq 0,5$ это время может достигать 50с и более.

С учетом выдвинутых представлений в первом приближении натяжение, которое возникает в мембране эритроцита при фазовом превращении в ней, можно описать следующим образом:

$$\begin{aligned} \sigma(t) &= -\Gamma((s_{\text{ж}} - s_{\text{т}})/s_{\text{ж}})(Tt/\Delta T) \exp(-t/\tau) \text{ при } 0 \leq t \leq -\Delta T/T \\ \sigma(t) &= \sigma(-\Delta T/T) \exp(-t/\tau) \text{ при } t > -\Delta T/T \end{aligned} \quad (1)$$

где T - скорость охлаждения, ΔT - интервал температур, в котором происходит фазовый переход мембраны из жидкого в твердое состояние, t - время.

Эксперименты и теория показывают [5,6], что среднее время $\langle t_r \rangle$ гемолиза эритроцита зависит от изотропного натяжения его мембраны σ как

$$\langle t_r \rangle = 0,01 \sigma^{-1/2} \exp(0,08034/\sigma) \quad (2)$$

График этой функции представлен на рис.1, а также на рис. 2 и 3 (кривые 1). Таким образом,

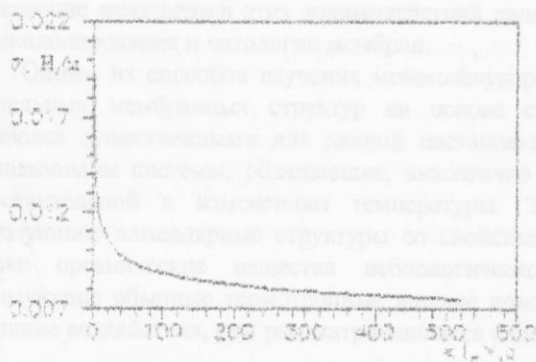


Рис.1 Зависимость среднего времени гемолиза $\langle t_r \rangle$ эритроцита человека от изотропного натяжения мембраны.

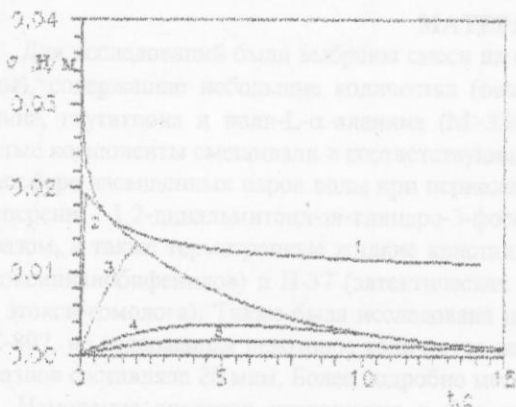


Рис. 2 Зависимость изотропного натяжения, возникающего в мембране эритроцита при фазовом превращении из жидкого в твердое, от времени

$$\tau = 5; (s_{\text{ж}} - s_{\text{т}})/s_{\text{ж}} = 0,05; \Delta T = 1;$$

$$T = 5(2); 0,5(3); 0,1(4); 0,05(5)$$

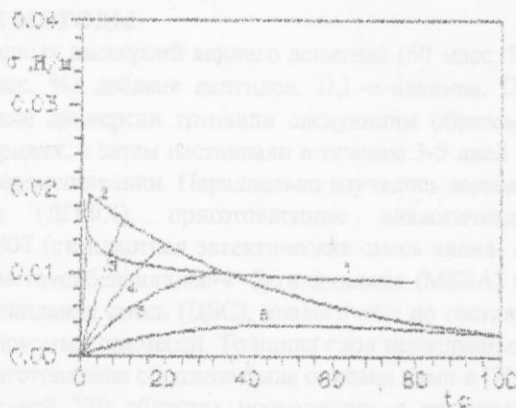


Рис. 3 Зависимость изотропного натяжения, возникающего в мембране эритроцита при фазовом превращении из жидкого в твердое, от времени

$$\tau = 50; (s_{\text{ж}} - s_{\text{т}})/s_{\text{ж}} = 0,05; \Delta T = 1;$$

$$T = 0,5(2); 0,1(3); 0,05(4); 0,03(5); 0,01(6)$$

даже небольшое натяжение мембраны, если оно действует достаточно долго, приводит к гемолизу, тогда как при сравнительно большом, но краткосрочном натяжении мембраны гемолиз может не произойти. Зависимости (1) и (2) при некоторых значениях фигурирующих в модели ГК

параметров представлены на рис.2 и 3. Как видно, при $\tau = 5\text{с}$, которое в соответствии с описанными выше представлениями, отвечает незначительному обезвоживанию эритроцита, натяжение мембраны оказывается недостаточным для гемолиза. Но уже при значении $\tau = 50\text{с}$, которое соответствует более значительному обезвоживанию эритроцита до охлаждения, возникающие в результате фазового превращения в мембране натяжения достаточны для гемолиза. При этом с увеличением (по абсолютной величине) скорости охлаждения вероятность гемолиза, очевидно, возрастает. Таким образом, на основе построенной нами физической модели находят простое объяснение сформулированные выше закономерности явления ГК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Гордиенко Е.А., Коваленко С.Е.//Проблемы криобиологии.-1997.-N3.-С.3-7.
- 2.Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M.//J.Cell.Biochem.-25,1984, p.61-72.
- 3.Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран.-М.:Мир,1982.-304с.
- 4.Хаппель Дж., Бреннер Г.Гидродинамика при малых числах Рейнольдса.-М.:Мир,1976.-630с.
- 5.Гордиенко Е.А.,Гордиенко О.И.//Криобиология.-1986.-N2.-С.23-25.
- 6.Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е.//Вест.ХГУ.-1998.-N410.-С.79-85.

УДК 577.352.24:532.783

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

**УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН И ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ
БИОЭКВИВАЛЕНТНЫХ СИСТЕМ**

О.В. Корзовская, Л.Н. Лисецкий, В.Д. Паникарская

Институт монокристаллов НАН Украины,

310001, г. Харьков, пр. Ленина, 60, E-mail: lisetski@steri.kharkov.ua

Поступила в редакцию 3 августа 1998 г.

Исследованы температурные зависимости УФ-спектров поглощения в лиотропных системах на основе гидратированных фосфолипидов. Параллельно в аналогичных условиях получены УФ-спектры термотропных жидкокристаллических систем, используемых в качестве чувствительных материалов для биоэквивалентных сенсоров. Сравнительный анализ результатов позволяет четко различить эффекты, связанные с поглощением на молекулярном уровне, и обусловленные особенностями фазового состояния и надмолекулярной структуры. В последнем случае температурные зависимости оптической плотности четко коррелируют с ДСК-термограммами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: УФ-спектры, модельные мембраны, фазовые переходы, жидкие кристаллы, гидратированные фосфолипиды, пептидные добавки.

Настоящая работа является результатом очередного этапа исследований, начатых нами в [1, 2] и посвященных изучению межмолекулярных взаимодействий компонентов биологических мембран. Выяснение механизмов этих взаимодействий является ключом к пониманию многих проблем синтеза, функционирования и патологии мембран.

Одним из способов изучения межмолекулярных взаимодействий в мембранах является создание модельных мембранных структур на основе специально подобранных компонентов, обладающих наиболее существенными для данной постановки задачи свойствами. В развиваемом нами подходе использованы системы, обладающие, аналогично нативным мембранам, надмолекулярной структурой, чувствительной к изменениям температуры. Это, в частности, гидратированные фосфолипиды, образующие ламеллярные структуры со свойствами лиотропных жидкокристаллических фаз [3, 4], а также органические вещества небиологического происхождения (азометины, цианобифенилы), образующие обычные термотропные жидкие кристаллы и по ряду свойств, связанных с откликом на внешние воздействия, уже рассматривавшиеся ранее как биоэквивалентные [5, 6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований были выбраны смеси на основе водных дисперсий яичного лецитина (60 масс. % воды), содержащие небольшие количества (около 10 масс. %) добавок пептидов: D,L- α -аланина, D-валина, глутатиона и поли-L- α -аланина ($M > 3500$). Водные дисперсии готовили следующим образом: чистые компоненты смешивали в соответствующих пропорциях, а затем настаивали в течение 3-5 дней в атмосфере насыщенных паров воды при периодическом перемешивании. Параллельно изучались водные дисперсии 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ДПФХ), приготовленные аналогичным образом, а также термотропные жидкие кристаллы: ЖК-807 (стандартная эвтектическая смесь алкил- и алкоксидицианобифенилов) и Н-37 (эвтектическая смесь 4-метоксибензилиден-4'-бутиланилина (МББА) и его этокси-гомолога). Также была исследована цианобифенильная смесь (ЦБС), аналогичная по составу ЖК-807, но содержащая некоторое количество неконтролируемых примесей. Толщина слоя исследуемых образцов составляла 20 мкм. Более подробно методика приготовления образцов была описана нами в [7].

Изменения спектров поглощения в ближней и средней УФ областях проводились с помощью спектрофотометра "Hitachi-330" (Япония) в широком интервале температур, содержащем области фазовых переходов. Кроме того, для всех исследованных образцов были получены термограммы методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью термоаналитической системы "Mettler TA 3000" (Швейцария). Погрешность измерения температуры в термостатируемой ячейке спектрофотометра составляла $\pm 0,5$ °C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Типичный вид получаемых температурных зависимостей спектров поглощения показан на рис. 1. Для всех образцов характерен немонотонный ход зависимости оптической плотности от температуры во всем исследованном диапазоне длин волн, причем точки излома полученных зависимостей $D(T)$,

определяемые по максимумам второй производной, с достаточной точностью ($\pm 1^\circ\text{C}$) совпадали с положением соответствующих калориметрических пиков.

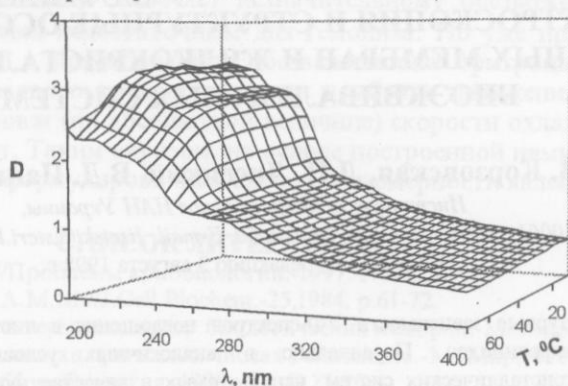


Рис. 1. Зависимость спектров поглощения водной дисперсии яичного лецитина от температуры.

На рис. 2 представлены температурные зависимости оптической плотности при разных длинах волн, полученные для ЦБС. Как можно видеть из графиков, вдали от области собственного поглощения (малые значения оптической плотности) в области мезофазы $\frac{dD}{dT} < 0$; при температуре перехода в изотропную фазу (T_i) происходит скачкообразное уменьшение оптической плотности. В области собственного поглощения ЦБС наблюдается обратный ход $D(T)$ в мезофазе ($\frac{dD}{dT} > 0$) и при T_i происходит скачкообразное увеличение оптической плотности, что, по всей видимости, связано с поглощением дихроичных хромофорных групп, которое возрастает при повышении температуры из-за разупорядочения ориентации молекул. С этим же, вероятно, связано и сравнительно большое абсолютное значение оптической плотности при малых длинах волн ($D=4\div 6$), характерное для всех исследованных образцов жидких кристаллов.

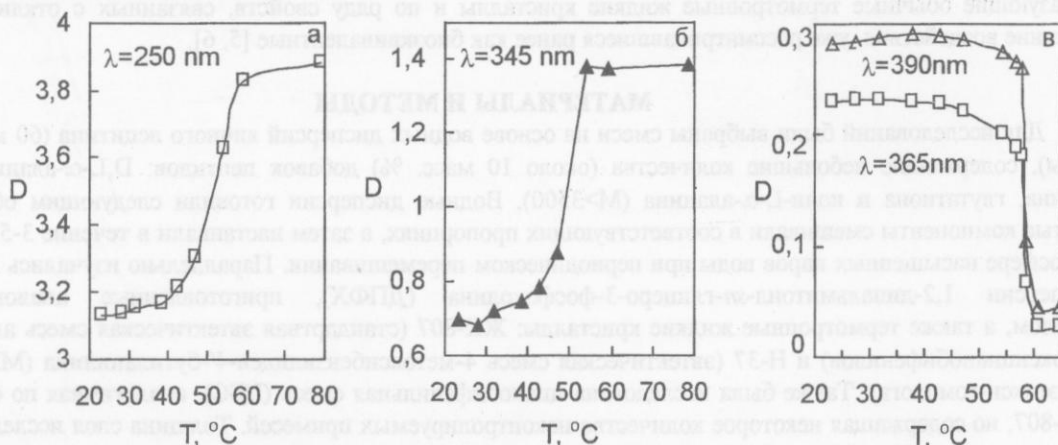


Рис. 2. Температурные зависимости оптической плотности для цианобифенильной смеси (ЦБС) в области собственного поглощения (а, б) и за ее пределами (в).

Из сравнения спектров ЦБС и ЖК-807 (рис. 3) можно видеть, что в первом случае эффекты собственного поглощения выражены гораздо более сильно. Вероятно, примеси в ЦБС играют роль дополнительных дихроичных красителей, вносящих дополнительный вклад в суммарную величину оптической плотности.

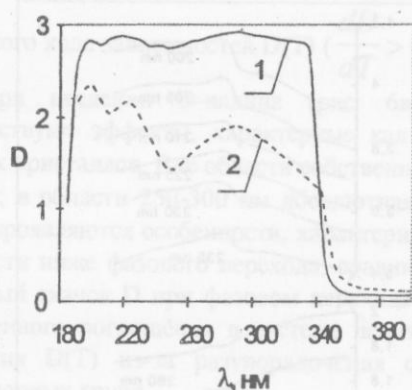


Рис. 3. Сравнение УФ-спектров жидких кристаллов: 1- ЦБС, $T=23,3\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2 - ЖК-807, $T=23,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

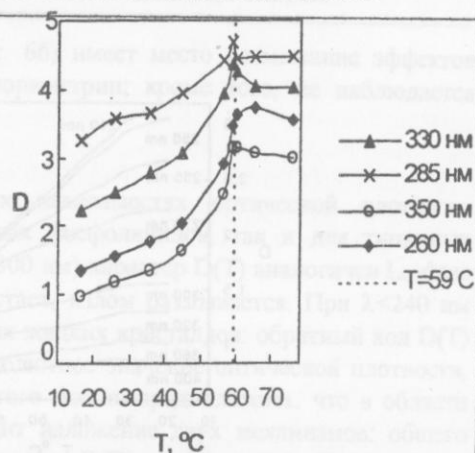


Рис. 4. Температурные зависимости оптической плотности Н-37 в области собственного поглощения (пунктиром обозначена температура фазового перехода в Н-37 по данным ДСК).

Зависимости $D(T)$ для жидкого кристалла Н-37 аналогичны полученным для ЦБС и ЖК-807 за исключением того, что область собственного поглощения Н-37 начинается при более высоких длинах волн (рис. 4). Следовательно, можно предполагать связь указанных особенностей температурных изменений в спектрах поглощения именно с надмолекулярной структурой образцов, т.е. с жидкокристаллическим ориентационным упорядочением, а не со строением конкретных молекул. Отметим, что скачкообразное изменение интенсивности пиков поглощения при фазовых переходах в термотропных жидких кристаллах отмечалось ранее для ИК-области [8].

На рис. 5 представлены зависимости оптической плотности от температуры для ДПФХ. Можно видеть, что во всей исследованной области длин волн отмечается снижение оптической плотности при

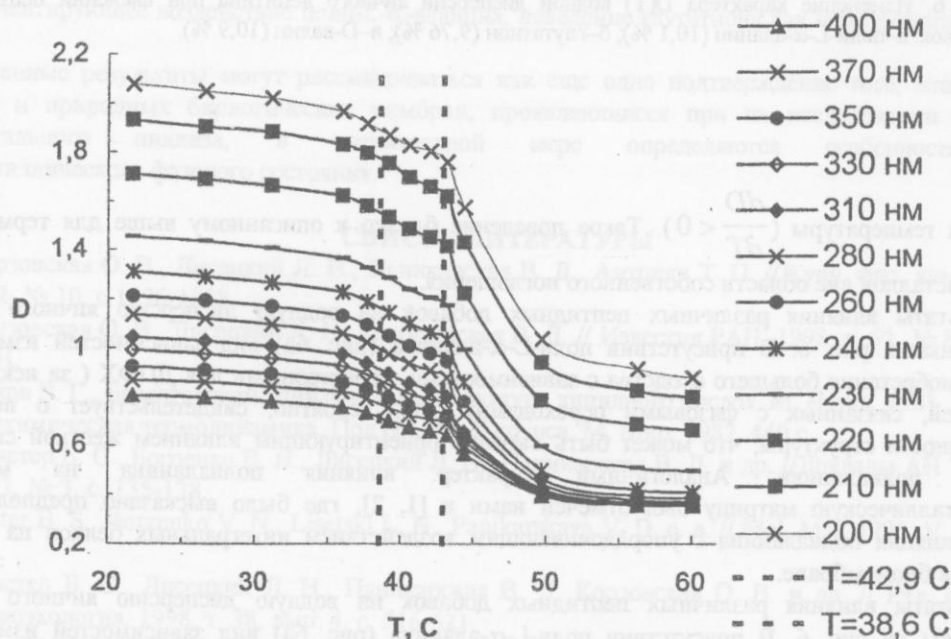


Рис. 5. Температурные зависимости оптической плотности водной дисперсии ДПФХ внутри и вне полосы поглощения (пунктирами обозначены температуры фазовых переходов в ДПФХ по данным ДСК).

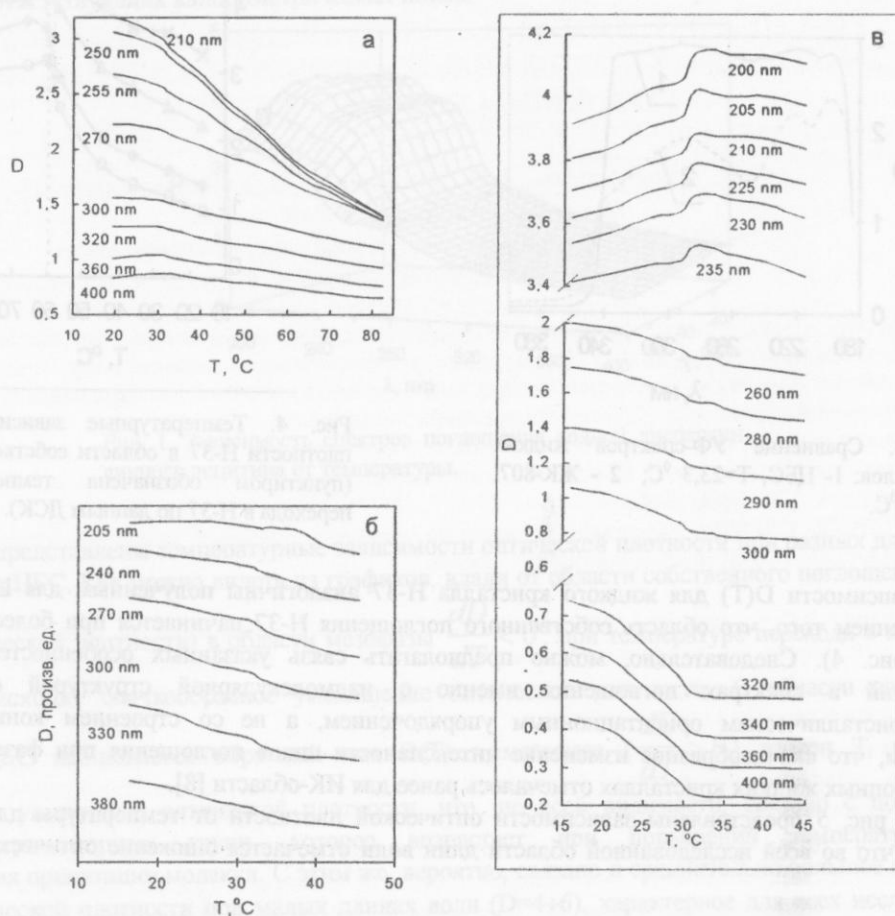


Рис. 6. Изменение характера $D(T)$ водной дисперсии яичного лецитина при введении пептидных добавок: а–поли-L- α -аланин (10,1 %); б–глутатион (9,76 %); в–D-валин (10,9 %).

повышении температуры ($\frac{dD}{dT} < 0$). Такое поведение близко к описанному выше для термотропных жидких кристаллов вне области собственного поглощения.

Результаты влияния различных пептидных добавок на водную дисперсию яичного лецитина представлены на рис. 6. В присутствии поли-L- α -аланина (рис. 6а) вид зависимостей изменяется в сторону приобретения большего сходства с зависимостями, характерными для ДПФХ (за исключением особенностей, связанных с фазовыми переходами). Это, вероятно, свидетельствует о повышении упорядоченности структуры, что может быть вызвано ориентирующим влиянием жесткой спиральной структуры полиаланина. Аналогичный характер влияния полиаланина на модельную жидкокристаллическую матрицу был отмечен нами в [1, 2], где было высказано предположение о сходстве влияния полиаланина с упорядочивающим воздействием интегральных белков на липидное окружение в биомембране.

Результаты влияния различных пептидных добавок на водную дисперсию яичного лецитина представлены на рис. 6. В присутствии поли-L- α -аланина (рис. 6а) вид зависимостей изменяется в сторону приобретения большего сходства с зависимостями, характерными для ДПФХ (за исключением особенностей, связанных с фазовыми переходами). Это, вероятно, свидетельствует о повышении упорядоченности структуры, что может быть вызвано ориентирующим влиянием жесткой спиральной структуры полиаланина. Аналогичный характер влияния полиаланина на модельную жидкокристаллическую матрицу был отмечен нами в [1, 2], где было высказано предположение о сходстве влияния полиаланина с упорядочивающим воздействием интегральных белков на липидное окружение в биомембране.

При использовании в качестве добавки глутатиона (рис. 6б) имеет место размывание эффектов перехода (вблизи 30 °C), что подтверждается данными калориметрии; кроме того, не наблюдается обратного хода зависимостей $D(T)$ ($\frac{dD}{dT} > 0$).

При введении D-валина (рис. 6в) в температурных зависимостях оптической плотности присутствуют эффекты, характерные как для гидратированных фосфолипидов, так и для типичных жидких кристаллов. Вне области собственного поглощения ($\lambda > 300$ нм) характер $D(T)$ аналогичен L_α -фазе ДПФХ; в области 250-300 нм абсолютная величина D возрастает, излом размывается. При $\lambda < 240$ нм четко проявляются особенности, характерные для термотропных жидких кристаллов: обратный ход $D(T)$ в области ниже фазового перехода, сравнительно большое абсолютное значение оптической плотности, заметный скачок D при фазовом переходе и т.д. Исходя из этого можно предположить, что в области собственного поглощения в системе лецитин-валин происходит наложение двух механизмов: общего снижения $D(T)$ из-за разупорядочения структуры и повышения $D(T)$ из-за дихроичных свойств хромофорных групп.

ВЫВОДЫ

Показано, что температурные зависимости оптической плотности $D(T)$ вдали от области собственного поглощения качественно аналогичны для всех типов исследованных систем (термотропные азометины и цианобифенилы; лиотропные фазы гидратированных фосфолипидов – насыщенного ДПФХ и ненасыщенного яичного лецитина), а именно: имеется общая тенденция к снижению D с температурой, а наблюдаемые при этом скачки (изломы) зависимостей соответствуют калориметрически определяемым точкам фазовых переходов.

В области интенсивного собственного поглощения ($D=3\div 5$) характер зависимости $D(T)$ в области фазовых переходов, как правило, обратный ($\frac{dD}{dT} > 0$). Это отмечается как для термотропных, так и для лиотропных систем (лецитин-валин). Возможная интерпретация может быть проведена в терминах возрастания поглощения вследствие разупорядочения дихроичных хромофорных групп.

Влияние пептидных компонентов на характер температурных зависимостей УФ-спектров лецитина согласуется с ранее предположенным нами механизмом их влияния на ДСК-термограммы гидратированных фосфолипидов и спектры селективного пропускания модельных холестерических систем (ориентирующее воздействие поли-L- α -аланина, поведение глутатиона как немезогенной добавки и т.д.).

Полученные результаты могут рассматриваться как еще одно подтверждение того, что свойства модельных и природных биологических мембран, проявляющиеся при их исследовании методами инструментального анализа, в значительной мере определяются особенностями их жидкокристаллического фазового состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корзовская О. В., Лисецкий Л. Н., Паникарская В. Д., Антонян Т. П. // Журн. физ. химии. 1998, т. 72, № 10, с. 1896-1898.
2. Корзовская О. В., Лисецкий Л. Н., Паникарская В. Д. // Известия РАН. 1998, т. 62, № 8, с. 1699-1701.
3. Ивков В. Г., Берестовский. Динамическая структура липидного бислоя. М. Наука, 1981. 296 с.
4. Биохимическая термодинамика. Под ред. М. Джоунса. М. Мир, 1982. 440 с.
5. Пристер Б. С., Борзенко В. Н., Лисецкий Л. Н., Паникарская В. Д. и др. // Доклады АН Украины. 1993, № 3, с. 135-138.
6. Prister B. S., Borzenko V. N., Lisetski L. N., Panikarskaya V. D. et al. // Mol. Mat. 1995, V. 5, P 175-179.
7. Пристер Б. С., Лисецкий Л. Н., Паникарская В. Д., Корзовская О. В. и др. // Рад. биология. Радиоэкология. 1998, т. 38, вып. 4, с. 516-521.
8. Kirov N., Simova P. // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1975, V. 30, P. 59-71.

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 57.043

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ КРИОПРОТЕКТОРОВ МЕТОДОМ ТЕРМОПЛАСТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ.

А.И. Осецкий

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

Поступила в редакцию 31 августа 1998 г.

В данной работе методом термопластической деформации изучены особенности кристаллизации водных растворов глицерина и обсуждается отличие реальной диаграммы фазово-структурных состояний этого раствора от равновесной.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кристаллизация, термопластическая деформация, водный раствор криопротектора.

Известно, что клетки в процессе замораживания клеточной суспензии, как правило, вытесняются в жидкие каналы, расположенные между кристаллами льда, то есть вплоть до эвтектической области находятся в жидкой фазе, которая представляет собой жидкий гипертонический раствор. Концентрация этого раствора по мере охлаждения от температуры, соответствующей началу кристаллизации до эвтектической температуры повышается примерно в соответствии с диаграммой плавления внеклеточного криозащитного раствора. Если бы охлаждение клеточной суспензии осуществлялось бесконечно медленно, то при эвтектической температуре и соответствующей ей эвтектической концентрации внеклеточного раствора должно было бы происходить полное затвердевание образца и исчезновение жидкой фазы. При реальных же скоростях охлаждения, которые с практической точки зрения являются сравнительно небольшими, полного затвердевания жидкой фазы не происходит - эвтектическая смесь склонна к сильному переохлаждению из-за ее высокой вязкости и низкой температуры. Кинетика перехода эвтектического раствора в твердофазное состояние при температурах ниже эвтектической, очевидно, играет важную роль в повреждении клеток при их низкотемпературном консервировании, поскольку клетки непосредственно контактируют именно с этой эвтектической смесью, а не с кристаллами льда, которые образовались при температурах, превышающих эвтектическую, применяя разработанные нами [1,2] методы прецизионной дилатометрии и термопластической деформации, мы изучали зависимость изменения объема и линейной деформации ряда водных растворов криопротекторов (ПЭГ-1500, глицерин, диметилсульфоксид) с целью уточнения кинетики затвердевания их эвтектических смесей и других характеристик фазово-структурного состояния замороженных растворов.

На рис. 1 показана полученная с помощью термопластических кривых концентрационная зави-

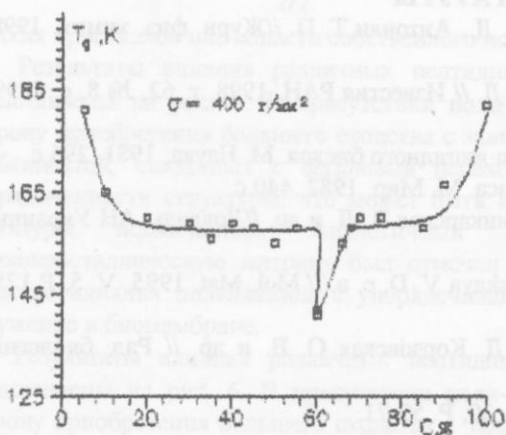


Рис.1 Зависимость температуры стеклования водного раствора глицерина от исходной массовой концентрации.

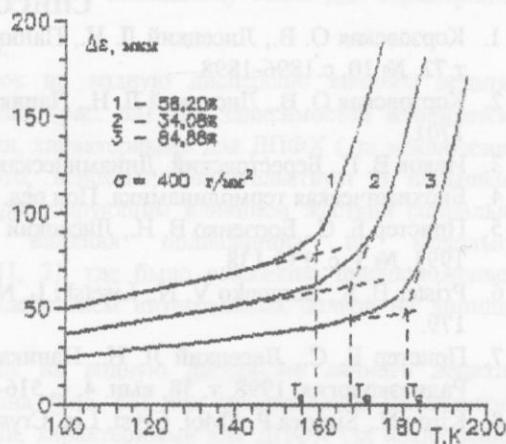


Рис.2 Термопластические кривые водного раствора глицерина разных массовых концентраций

симость температуры расстеклования T_g водных растворов глицерина. Термопластические кривые получены для водных растворов глицерина различной концентрации, замороженных со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{мин}$, стабилизированных при конечной температуре -170°C в течение 10 минут, а затем отогретых со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ при постоянной внешней нагрузке $\sigma = 400 \text{ г}/\text{мм}^2$. Серия таких кривых доэвтектической, близкой к эвтектической и заэвтектической концентраций показана на рис. 2. Температура расстеклования раствора T_g определялась как точка пересечения двух касательных, к тем участкам термопластической кривой, где скорость нарастания пластической деформации постоянна (рис. 2). Полученные результаты хорошо согласуются с известными по литературе данными и демонстрируют большие возможности разработанного метода термопластической деформации замороженных растворов и биообъектов для определения температуры их стеклования - очень важного с точки зрения криобиологии параметра.

Реальные диаграммы состояния водных растворов основных криопротекторных веществ имеют существенное отличие от их теоретических образов, построенных в соответствии с теорией фазовых превращений. Отличие связано с отсутствием в реальных условиях эвтектической кристаллизации криопротекторных растворов. В обычных растворах веществ, полностью растворимых в жидком и нерастворимых в твердом состояниях, такая кристаллизация определяется скоростью образования эвтектических кристаллов одного из компонентов. Поскольку этот процесс является термоактивируемым, его скорость зависит от величины эффективной энергии активации зародышеобразования новой фазы Q^*_η , которая может резко возрастать за счет диссипативной составляющей [3,4]. Можно рассчитать величину ΔQ^*_η для охлаждаемых водных растворов глицерина, 1,2-пропандиола, этиленгликоля, ПЭО-400, ПЭО-1500 и др. Оценки показывают, что при охлаждении этих растворов от 290 К до 240 К величина ΔQ^*_η может составлять $8 \div 15 \text{ ккал}/\text{моль}$ в зависимости от пространственной структуры молекул криопротектора. Если учесть, что для рассматриваемых водных растворов классическая энергия активации зародышеобразования обеих фаз лежит в пределах $0,5 \div 4 \text{ ккал}/\text{моль}$, можно предположить, что столь сильное увеличение эффективной энергии активации за счет слагаемого ΔQ^*_η способно резко затормозить не диффузионно-контролируемые кристаллизационные процессы в этих системах.

Нами экспериментально обнаружен эффект замедления не диффузионно-контролируемой эвтектической кристаллизации водных растворов глицерина, 1,2-пропандиола, этиленгликоля, полиэтиленоксидов (ПЭО-400, ПЭО-1500). Суть этого эффекта наглядно показана на рис. 3, где (линия 2) изображена классическая равновесная фазовая диаграмма системы "вода-глицерин", а (линия 1) - фазовая диаграмма для этой же системы, построенная на основании полученных нами экспериментальных данных. Основные особенности экспериментально полученной диаграммы состоят в следующем:

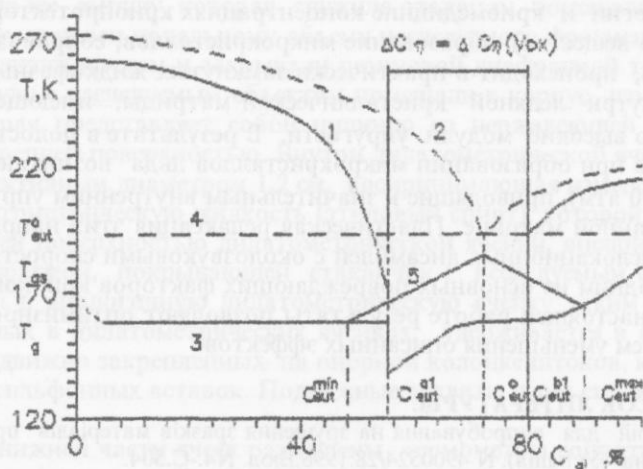


Рис.3 Реальная диаграмма фазово-структурных состояний водного раствора глицерина.

1) Из-за резкого увеличения эффективной энергии активации зародышеобразования кристаллической фазы вследствие флуктуационно-диссипативных эффектов, обычная кристаллизация обоих компонентов не идет до конца, т.е. до достижения в остающейся жидкой фракции концентрации $C = C^0_{\text{eut}}$. В результате на диаграмме должны обозначаться предельные концентрации $C^{\text{min}}_{\text{eut}}$ и $C^{\text{max}}_{\text{eut}}$, достигаемые в охлаждаемом со скоростью $V_{\text{охл}}$ растворе в процессе кристаллизации компонентов А и В соответственно. Таким образом, линии ликвидуса 1 на истинной диаграмме не сходятся в одной точке, соответствующей эвтектической концентрации C^0_{eut} , а ока-

зываются разнесенными на некоторый интервал концентраций ΔC_{η} , ширина которого является функцией скорости охлаждения раствора $V_{охл}$ (чем выше $V_{охл}$, тем шире ΔC_{η});

2) В силу того, что при кристаллизации растворов с концентрациями $C < C^{al}_{eut}$ или $C > C^{bl}_{eut}$ эвтектическая концентрация в жидкой фракции не достигается, в них не происходит эвтектическая кристаллизация этих фракций при достижении температуры равновесной эвтектики T^{o}_{eut} . Начало эвтектического расслоения происходит в этих растворах при более низких температурах $T < T_{as}$ и носит необычный с точки зрения классической термодинамики характер. В связи с заторможенностью активируемых процессов в этих системах, в них не происходит обычной эвтектической кристаллизации, заканчивающейся выпадением кристаллов обеих фаз при строго постоянной температуре T^{o}_{eut} . Процесс расслоения раствора протекает в широком температурном интервале $T_{as} \div T_g$, где T_g - температура стеклования, и не идет до конца. В этом интервале происходит образование ассоциатов из молекул криопротекторных веществ, что вызывает уменьшение гидратационных чисел молекул криопротекторов. Поэтому в растворах доэвтектической концентрации наблюдается сопровождающее процесс ассоциации образование микрокристаллов льда за счет появляющихся вблизи ассоциатов свободных молекул воды. В результате явление ассоциации молекул полиолов или олигомеров в этой области концентраций сопровождается характерными объемными эффектами, что позволяет исследовать его кинетику с помощью микрообъемной сканирующей дилатометрии. В растворах заэвтектической концентрации в интервале $-40^{\circ}\text{C} \div -100^{\circ}\text{C}$ наблюдается специфическое расслоение раствора, сопровождающееся повышением его вязкости за счет образования рассматриваемых ассоциатов. Данный эффект позволяет изучать кинетику процесса ассоциации в этом интервале концентраций с помощью метода термопластической деформации.

3) На истинной диаграмме состояний существует интервал концентраций $C^{al}_{eut} \div C^{bl}_{eut}$, в котором не идут процессы обычной кристаллизации. В охлаждаемых растворах этих концентраций ниже температуры T_{as} (линия 5) начинается заторможенное эвтектическое расслоение раствора, заключающееся в образовании ассоциатов молекул криопротекторов. При этом в интервале концентраций $C^{al}_{eut} \div C^{bl}_{eut}$ в растворе выпадают только микрокристаллы льда за счет уменьшения гидратационных чисел молекул криопротекторов, которые входят в кластеры или ассоциаты.

4) Ниже температуры T_g (линия 3) в охлаждаемых образцах происходит стеклование расслаивающихся жидких фракций. При последующем отогреве в исследуемых образцах выше температуры T_g вновь начинаются процессы эвтектического расслоения системы, продолжающиеся до температуры T_{as} . Выше этой температуры происходит распад ассоциатов и плавление образовавшихся микрокристаллов льда.

Обнаруженный эффект замедления эвтектического расслоения криопротекторных растворов имеет большое значение для экспериментальной и практической криобиологии. Это связано с тем, что при обычно применяемых в криобиологии и криомедицине концентрациях криопротекторных растворов (до 30% криопротекторного вещества), образование микрокристаллов, сопровождающее процесс эвтектического расслоения, происходит в практически замкнутых жидкофазных включениях. Эти включения находятся внутри ледяной кристаллической матрицы, имеющей при температурах $-40^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$ достаточно высокие модули упругости. В результате в полости этих включений за счет объемных эффектов при образовании микрокристаллов льда возникают высокие избыточные давления (до $100 \div 200$ атм), приводящие к значительным внутренним упругим напряжениям в ранее закристаллизованной матрице. Пластическая релаксация этих напряжений, реализующаяся за счет движения дислокационных ансамблей с околосвуковыми скоростями и образования микротрещин, является одним из основных повреждающих факторов криоконсервируемых биосистем. Полученные в настоящей работе результаты позволяют оптимизировать технологии криоконсервирования путем уменьшения описанных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Пат. 11107. Україна. МКІ G01N 3/18. Пристрій для випробування на зрушення зразків матеріалів при низьких температурах/О.І. Осецький, Т.М. Гурина (Україна). N 4900524/28.1996.Бюл. N4.-С.504.
2. Осецкий А.И., Гурина Т.М.//Проблемы криобиологии.1992.N2.С.24-29.
3. Осецкий А.И.//Криобиология.1986.N2.С.14-20.
4. Осецкий А.И.//Сб.научн.тр. Химия низких температур и криохимическая технология.М.МГУ. 1987.С.147-162.

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 57.043

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ 5%-НОГО И 10%-НОГО РАСТВОРОВ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА НА СРЕДЕ ХЕНКСА МЕТОДОМ ТЕНЗОДИЛАТОМЕТРИИ

В.И. Грищенко, В.А. Керос

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 310015
Поступила в редакцию 31 августа 1998 г.

В работе исследовано изменение объема фрагментов ткани тестиса в процессе их охлаждения до -80°C со скоростью $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и последующего отогрева со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. На основании полученных данных рекомендуется использование для криоконсервации указанного биологического объекта 5%-ной концентрации диметилсульфоксида и тридцатиминутной экспозиции консервируемого образца в криозащитной среде до начала охлаждения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тестис, кристаллизация, плавление, диметилсульфоксид, тензодилатометрия.

Одной из ведущих причин повреждения фрагментов тканей, имеющих сравнительно большие размеры, при низкотемпературном консервировании является их растрескивание, которое возникает из-за увеличения объема консервируемого образца при фазовом превращении воды в лед. Поэтому изучение объемных эффектов, имеющих место в процессе замораживания-оттаивания тканевых объектов, может служить важным звеном для подбора оптимальных условий их криоконсервирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фрагменты ткани тестиса забирали у плодов после аборта позднего срока (16-24 недель) в условиях гинекологического стационара. До начала исследования материал хранили в растворе Хенкса при $+4^{\circ}\text{C}$ до 12 часов.

Изменение объема фрагментов ткани тестиса в процессе их замораживания до -80°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и последующего отогрева со скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ измеряли методом дифференциальной тензодилатометрии [1]. Исследуемый фрагмент помещали в стаканчик из нержавеющей стали с начальным объемом $0,115-0,130\text{ см}^3$. Остаточный объем ампулы заполняли чистым минеральным маслом, после чего ампулу герметически закрывалась сверху резиновой диафрагмой. В такую же ампулу, которая служила эталоном, помещали кварцевые шарики, суммарный объем которых равен начальному объему исследуемого фрагмента ткани. Остаточный объем в эталоне заполняли маслом и закрывали резиновой диафрагмой так же, как в измерительном стаканчике. Ампулу с исследуемым объектом помещали в корпус измерительной дилатометрической ячейки, которая представляет собой цилиндр из нержавеющей стали со тщательно отполированной внутренней поверхностью. Внутри дилатометрической ячейки расположена сильфонная вставка с эффективным диаметром $1,2\text{ см}$, воспринимающая изменение объема в исследуемом образце через дилатометрическую жидкость (этиловый спирт), которой заполняется объем ограниченный внутренней поверхностью дилатометрической ячейки, внешней поверхностью сильфона и резиновой диафрагмой, покрывающей стаканчик с исследуемым образцом. Стаканчик с эталоном помещали в аналогичную дилатометрическую ячейку таким же образом. Дно сильфонов, расположенных в дилатометрических ячейках, удерживается в одном и том же положении с помощью неподвижно закрепленных на опорной колонке штоков, которые нижними концами упираются в дно сильфонных вставок. Подвижные захваты через силовую тягу связаны с механизмом нагружения.

В нижней части ячеек размещены термометры сопротивления, которые служат для измерения температуры в ячейках и являются датчиками системы терморегулирования, обеспечивающей заданную скорость охлаждения и отогрева исследуемого объекта и эталона. Измерение объема осуществляется с помощью дифференциально включенного датчика перемещений, корпус которого связан с эталонной тягой, а подвижный элемент (сердечник) - с измерительной тягой.

На один из входов двухкоординатного графопостроителя подается сигнал с датчика перемещения, а на второй - с термометра сопротивления. Изменения относительного объема исследуемого фрагмента ткани, очевидно, равно произведению разности линейных перемещений эталонной и измерительной тяг на эффективное сечение сильфона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1-4 представлены несколько типичных дилатограмм. Как следует из полученных результатов, кристаллизация 5%-ного (рис.1) и 10%-ного растворов диметилсульфоксида на среде Хенкса начинается при значительном переохлаждении (от 18 до 11°C), в среднем при температуре -15,2°C в 5%-ном растворе и при -15°C - в 10%-ном. Выделяющаяся при этом скрытая теплота кристаллизации при реализующихся в эксперименте условиях, как правило, достаточно быстро удаляется в холодагент, и поэтому кристаллизация обычно не приводит к увеличению температуры исследуемого фрагмента ткани. Таким образом, в момент начала кристаллизации

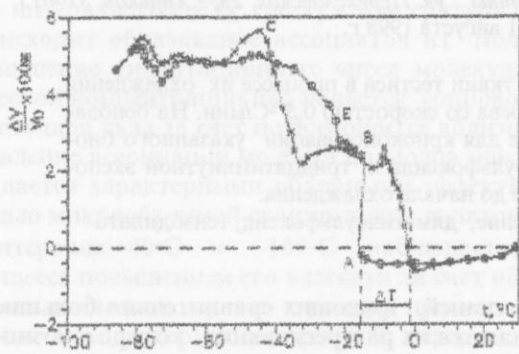


Рис.1. Изменение относительного объема 5%-ного раствора диметилсульфоксида на растворе Хенкса в зависимости от температуры (ooo - охлаждение со скоростью 1°C/мин, xxx - отогрев со скоростью 0,5°C/мин)

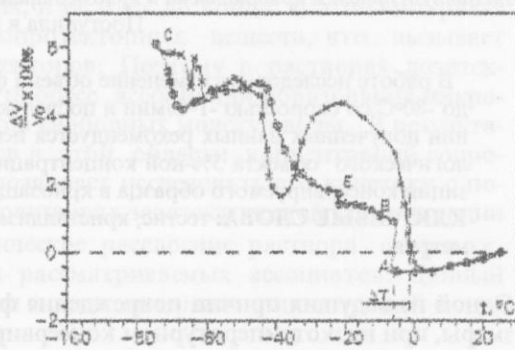


Рис.2. Изменение относительного объема фрагмента тестиса, предварительно проэкспонированного в 5%-ном растворе диметилсульфоксида на растворе Хенкса в течение 15 минут, от температуры (ooo - охлаждение со скоростью 1°C/мин, xxx - отогрев со скоростью 0,5°C/мин)

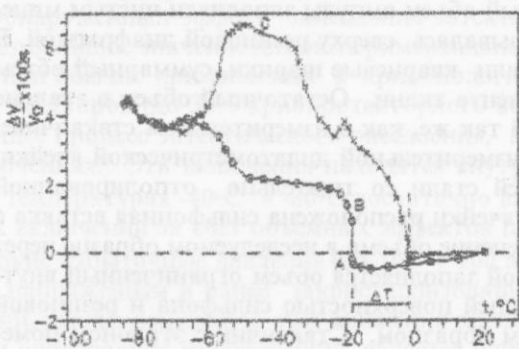


Рис.3. Зависимость относительного объема фрагмента тестиса, предварительно экспонированного в 5%-ном растворе диметилсульфоксида на среде Хенкса в течение 30 минут, от температуры (ooo - охлаждение со скоростью 1°C/мин, xxx - отогрев со скоростью 0,5°C/мин)

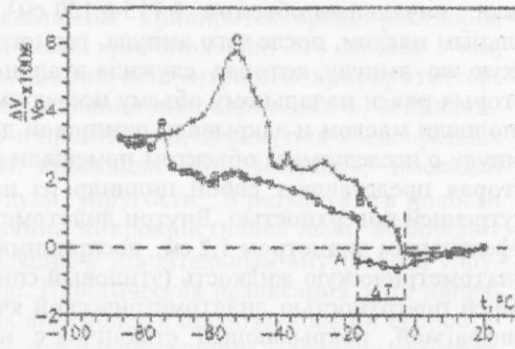


Рис.4. Зависимость относительного объема фрагмента тестиса, предварительно экспонированного в 10%-ном растворе диметилсульфоксида на среде Хенкса в течение 30 минут, от температуры (ooo - охлаждение со скоростью 1°C/мин, xxx - отогрев со скоростью 0,5°C/мин)

переохлажденного образца за счет образования в исследуемом объекте льда, плотность которого примерно на 10% меньше плотности воды, объем образца скачкообразно увеличивается на 2,6% для 5%-ного раствора диметилсульфоксида на растворе Хенкса (скачек АВ на рис.1) и на 2,7% для 10%-ного раствора, что соответствует вымораживанию около 26-27% содержащейся в исследуемых растворах воды при температуре, при которой начинается кристаллизация. Аналогичные скачки объема (АВ, рис.2-4) за счет первичной кристаллизации во фрагментах ткани имеют значительно меньшие значения и составляют $1,1 \pm 0,4\%$ для фрагмента ткани тестиса, который предварительно экспонировался в 5%-ном растворе диметилсульфоксида на среде Хенкса в

течение 15 минут, $1,15 \pm 0,35\%$ после экспозиции фрагмента ткани в 5%-ном растворе в течение 30 минут и $1,5 \pm 0,3\%$ после экспозиции исследуемого фрагмента ткани в 10%-ном растворе в течение 30 минут. Значительное снижение роста объема ткани в момент первичной кристаллизации по сравнению с кристаллизацией равного объема раствора криопротектора, прежде всего, обусловлено существенно меньшим содержанием воды в ткани по сравнению с указанным выше раствором. Если пренебречь различными эффектами неравновесности и неоднородности, неизбежно возникающими при кристаллизации гетерогенной, имеющей сложную пространственную структуру ткани, можно заключить, что содержание воды в последней составляет около 60%. Реально, по видимому, в ткани тестиса содержится несколько большее количество воды, а остальной объем в основном приходится на водонерастворимые структуры.

Сопоставление дилатограмм с имеющимися в литературе данными о фазовой диаграмме тройного раствора диметилсульфоксид-NaCl-вода [2] позволяет заключить, что излом или скачек в точках E на дилатограммах при охлаждении связан с образованием кристаллогидрата $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Как видно из представленных на рис.1-4 дилатограмм, в случае чистого раствора и после 15-минутной экспозиции фрагмента ткани в криозащитном растворе выпадение кристаллогидрата, в основном, происходит на этапе охлаждения (скачки E на рис.1 и 2). Плавление же указанного выше кристаллогидрата отмечается как соответствующий излом на дилатограмме при отогреве. После 30-минутной экспозиции в растворах криопротекторов, напротив, выпадение кристаллогидрата $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ не успевает произойти в полном объеме при замораживании (здесь отмечается только излом на дилатограмме при охлаждении), а завершается лишь на этапе отогрева, что проявляется в виде соответствующих пиков E на дилатограммах при отогреве.

Характерные изломы D и следующие за ним при более низких температурах эффекты на дилатограммах при охлаждении, как следует из сопоставления с данными работы [2], соответствуют выпадению из растворов гидратов диметилсульфоксида и так называемым эвтектическим реакциям. Последние в наименьшей степени проявляются при замораживании фрагментов тестиса после экспозиции в 5%-ном растворе диметилсульфоксида на среде Хенкса.

Как видно из дилатограмм, во всех случаях максимальное относительное увеличение объема ткани достигает примерно 6% от исходного объема исследуемого образца. В том случае, когда фрагменты ткани экспонируются в 5%-ном растворе в течение 15 минут, как и в чистом растворе, это увеличение объема достигается уже на этапе охлаждения. В 10%-ном растворе и более длительной (15 мин) экспозиции ткани в 5%-ном растворе криопротектора увеличение объема при замораживании оказывается значительно меньшим, хотя при последующем отогреве за счет эффекта докристаллизации при отогреве (C) объем образца продолжает расти и достигает того же уровня (~6%).

Очевидно, что чем больше увеличивается объем ткани при замораживании, тем большие внутренние напряжения возникают в образце и тем больше вероятность повреждения замораживаемого объекта за счет растрескивания. Поскольку процесс докристаллизации при отогреве является кинетическим, увеличения объема при докристаллизации можно избежать за счет повышения скорости отогрева. С этой точки зрения предпочтительным является использование более длительной (30 мин) экспозиции ткани в криозащитной среде до замораживания. Однако при этом скорость отогрева образца должна быть по возможности более высокой.

Увеличение объема в момент первичной кристаллизации, хотя и является сравнительно небольшим на фоне общего увеличения объема в процессе замораживания-оттаивания, также может привести к возникновению значительных напряжений в образце, поскольку происходит очень быстро и поэтому не успевает релаксировать. С этой точки зрения наиболее безопасным для фрагментов ткани является экспозиция в 5%-ном растворе диметилсульфоксида на среде Хенкса в течение 15 минут.

ВЫВОДЫ

Оптимальное компромиссное решение с учетом обоих указанных эффектов состоит в применении 30-минутной экспозиции фрагментов ткани тестиса в 5%-ном растворе диметилсульфоксида до начала замораживания и последующего быстрого отогрева замороженной ткани. Эти же условия охлаждения, как видно из сравнения представленных выше дилатограмм, обеспечивают наименьшую интенсивность эвтектических реакций, то есть, по всей видимости, более благоприятны для низкотемпературного консервирования фрагментов исследуемой ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осецкий А.И., Аненко В.И.//Труды П Всесоюзной конференции по криобиологии и криомедицине. Харьков, 1984, с.245.
2. Cocks F.H., Brower W.E.// Cryobiology. 1974, v.11, p.340-358.

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 577.3

ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРУЖИНЫ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ПРИ ПРОТЕЗИРОВАНИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

В.Е. Шеханин

Харьковский центр сердечно-сосудистой хирургии

Поступила в редакцию 27 октября 1998 г.

В статье разработан алгоритм вычисления механических свойств пружины для дистанционного протезирования кровеносных сосудов и экспериментально подтверждена его адекватность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дистанционное протезирование кровеносных сосудов, физико-математический анализ, механические свойства пружины.

Одной из составных частей протеза, разработанного нами для реконструктивной хирургии крупных кровеносных сосудов методом дистанционного протезирования [1], является металлическая пружина, которая изготавливается из упругой проволоки кругового сечения с диаметром d . В недеформированном состоянии форма этой пружины в плоскости $y-x$ описывается функцией $y = \tilde{y}(x)$. Зависимость $y = \tilde{y}(x)$ в пределах одного периода $x = L$ показана на рис. 1. Ширина пружины равна $2BK = 2FL = H$ и определяется длиной реконструируемого участка кровеносного сосуда. Участки пружины OA , CD , DE и MP являются дугами окружности радиуса $O'O = R$, участки ABC , EFM - полуокружностями радиуса $AO'' = BO'' = CO'' = r$. Центры всех указанных выше окружностей O и O' имеют ординаты $(H/2 - r)$. Число шагов пружины N подбирается так, чтобы ее длина NL в 1,2 - 1,4 раза превышала диаметр реконструируемой части сосуда. Из простых геометрических соображений следует, что $L/4 = R + r - R\cos(\theta)$, $\theta = \arcsin[(H - 2r)/2R]$, $R = (4Hr + 2Lr - H^2 - 8r^2 - L^2/4)/(8r - 2L)$. Изготовленная таким образом пружина, форма которой в недеформированном состоянии описывается частью функции $y = \tilde{y}(x)$, содержащей N периодов, изгибается на цилиндрической поверхности так, как схематически показано на рис.2, и специальным образом сваривается начало $(0,0)$ с концом пружины $(0,L)$. Диаметр полученной таким образом пружины обозначим через D . Будучи вставленной в упругий заменитель кровеносного сосуда цилиндрической формы с диаметром, $D < D_0$, пружина будет оказывать радиальное давление на его стенки, поддерживая просвет сосуда в необходимом для нормального функционирования протезируемого участка кровеносной системы состоянии.

Цель этой работы состоит в теоретическом и экспериментальном исследовании зависимости радиальной силы, действующей на стенки цилиндрического сосуда, в котором размещена пружина, от диаметра этого сосуда. Для теоретического определения искомой зависимости рассмотрим деформацию изображенного на рис.1 элемента пружины под действием двух сосредоточенных в точках $(0,0)$ и $(0,L)$ сил F , направленных вдоль оси x и сжимающих пружину. Форма деформированной указанным образом пружины описывается функцией $y = \tilde{y}(x)$. Уравнения равновесия деформированной пружины на участке между точками приложения сил имеют вид [2]:

$$\frac{d}{ds} EI \left(\frac{1}{\rho} - \frac{1}{\tilde{\rho}} \right) = F \sin \theta, \quad F = \text{const}, \quad (1)$$

где s - длина дуги кривой, описывающей форму пружины, отсчитываемая от точки $(y=0, x=0)$, F - сила внутренних напряжений, приложенных к площади поперечного сечения деформированной пружины, E - модуль Юнга металла, из которого изготовлена пружина, $I = \pi d^4/64$ - момент инерции относительно произвольной оси, проходящей в плоскости сечения пружины через его центр, ρ и $\tilde{\rho}$ - локальные радиусы кривизны пружины соответственно в деформированном и недеформированном состояниях. С учетом очевидного соотношения $\sin \theta = dy/ds$ из (1) получаем:

$$\frac{1}{\rho} - \frac{1}{\tilde{\rho}} - \frac{F}{EI} y = C. \quad (2)$$

Поскольку в недеформированном состоянии внутренние напряжения отсутствуют ($F = 0$) и $1/\rho = 1/\tilde{\rho}$, то $C = 0$. С учетом определения кривизны плоской кривой $y = y(x)$ и условия $C = 0$, находим

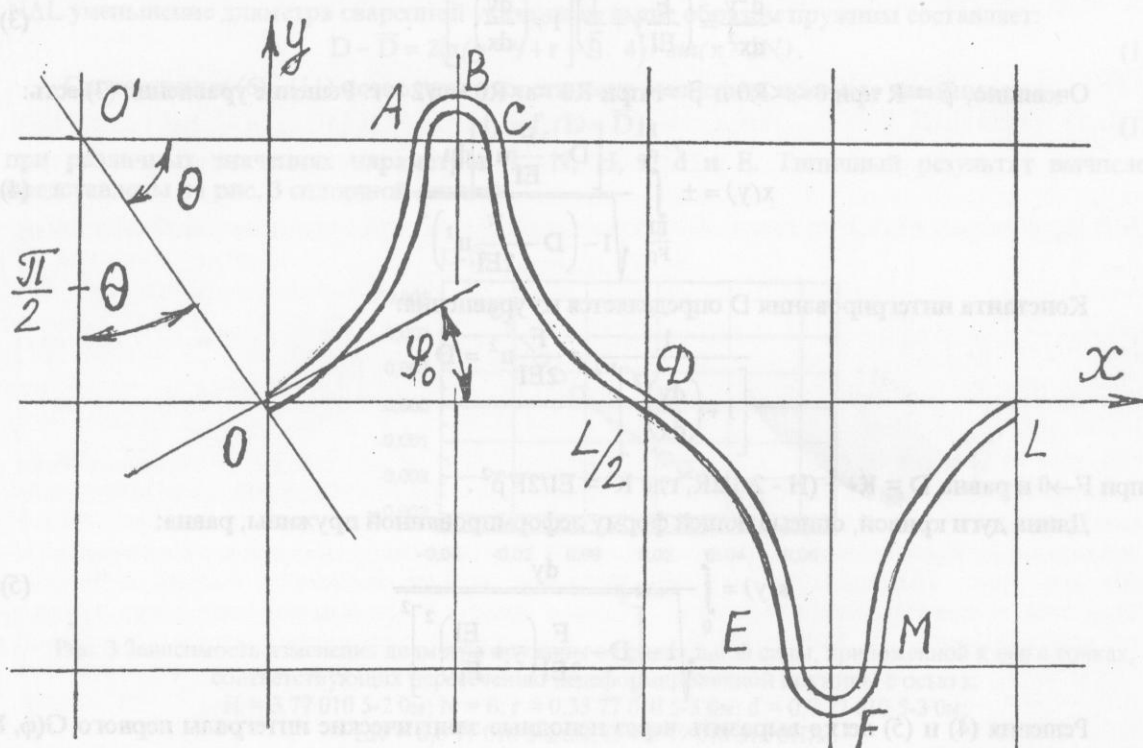


Рис.1. Фрагмент плоской пружины, используемой как заготовка для радиальной пружины в протезе кровеносного сосуда.

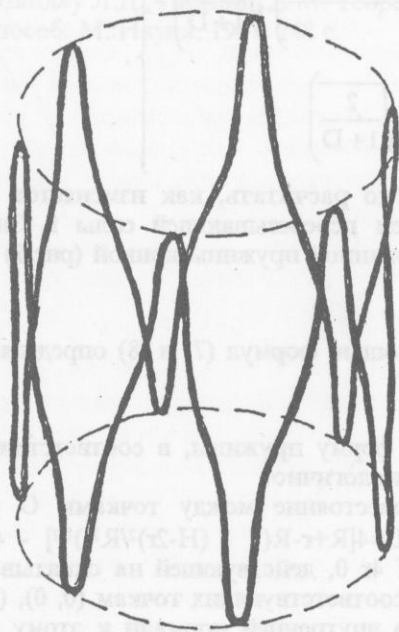


Рис.2. Схема изготовления радиальной пружины из плоской заготовки.

$$\frac{d^2y}{dx^2} = \left(\frac{F}{EI}y + \frac{1}{\tilde{\rho}} \right) \left[1 + \left(\frac{dy}{dx} \right)^2 \right]^{3/2}. \quad (3)$$

Очевидно, $\tilde{\rho} = -R$ при $0 < s < R\theta$ и $\tilde{\rho} = r$ при $R\theta < s < R\theta + \pi/2 = r$. Решение уравнения (3) есть:

$$x(y) = \pm \int_{\frac{EI}{F\rho}}^{y + \frac{EI}{F\rho}} \frac{\left[D - \frac{F}{EI}u^2 \right] du}{\sqrt{1 - \left(D - \frac{F}{2EI}u^2 \right)^2}}. \quad (4)$$

Константа интегрирования D определяется из уравнения:

$$\frac{1}{\left[1 + \left(\frac{dy}{dx} \right)^2 \right]^{1/2}} + \frac{F}{2EI}u^2 = D,$$

при $F \rightarrow 0$ и равна $D = K^2 + (H - 2r)/2R$, где $K^2 = EI/2F\tilde{\rho}^2$.

Длина дуги кривой, описывающей форму деформированной пружины, равна:

$$s(y) = \int_0^y \frac{dy}{\sqrt{1 - \left[D - \frac{F}{2EI} \left(y + \frac{EI}{F\rho} \right)^2 \right]^2}}. \quad (5)$$

Решения (4) и (5) легко выразить через неполные эллиптические интегралы первого $G(\varphi, k)$ и второго $H(\varphi, k)$ рода:

$$x(y) = Ds(y) - 2RK\sqrt{1+D} \left\{ \begin{aligned} &H \left(\arccos \left(\sqrt{\frac{1+D-K^2}{2}} \right), \sqrt{\frac{2}{1+D}} \right) - \\ &H \left(\arccos \left(\sqrt{\frac{1+D-(K-y/2RK)^2}{2}} \right), \sqrt{\frac{2}{1+D}} \right) \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

и

$$s(y) = 2RK(1+D)^{-1/2} - \left\{ \begin{aligned} &G \left(\arccos \left(\sqrt{\frac{1+D-(K-y/2RK)^2}{2}} \right), \sqrt{\frac{2}{1+D}} \right) - \\ &G \left(\arccos \left(\sqrt{\frac{1+D-K^2}{2}} \right), \sqrt{\frac{2}{1+D}} \right) \end{aligned} \right\}. \quad (7)$$

С помощью формул (6) и (7), используя ЭВМ, легко рассчитать, как изменяется период функции, описывающей форму пружины, под действием перерезывающей силы f . Значение ординаты y^* точки А на описывающей форму деформированной пружины кривой (рис.1) можно определить из условия:

$$s(y^*) = R\theta. \quad (8)$$

Аналогично, значение ординаты y^{**} точки В с помощью формул (7) и (8) определяется из условия:

$$s(y^{**}) - s(y^*) = \pi/2. \quad (9)$$

Далее абсциссу точки А на кривой, описывающей форму пружины, в соответствии с (6) определяем как $x = x(y^*)$. Абсцисса точки В определяется аналогично.

Очевидно, что при внутренних напряжениях F расстояние между точками О и Р в деформируемой пружине укорачивается на величину $\Delta L = 4[R + r - R(1 - (H - 2r)^2/R^2)^{1/2}] - 4x(y^{**})$. Внутреннее напряжение F связано с радиальной силой f 4π 0, действующей на охватывающий пружину цилиндрический сосуд в материальных точках, соответствующих точкам (0, 0), (0, L/2), (0, L), ..., (0, L(N-1/2)) недеформированной пружины по внутренней нормали к этому сосуду, соотношением:

$$F = 2f_r \sin(\pi/N) / (2\pi + 4R\theta). \quad (10)$$

Нетрудно определить, что эквивалентное укорачиванию длины плоской пружины (рис.1) на $N\Delta L$ уменьшение диаметра сваренной указанным выше образом пружины составляет:

$$D - \bar{D} = 2(x(y^{**}) + r - L/4) / \sin(\pi/2N). \quad (11)$$

Соотношения (6) - (11) позволяют теоретически вычислить искомую зависимость:

$$f_r = f_r(D - \bar{D}) \quad (12)$$

при различных значениях параметров L , N , H , r , d и E . Типичный результат вычислений представлены на рис. 3 сплошной линией.

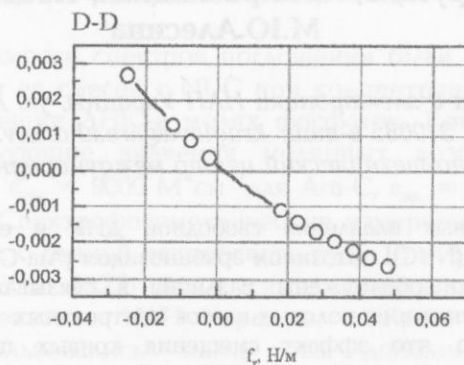


Рис. 3 Зависимость изменения диаметра пружины от радиальной силы, приложенной к ней в точках, соответствующих пересечению недеформированной пружины с осью x .

$H = 3\,77\,010\,5\text{-}2\,0\text{м}$; $N = 6$; $r = 0,35\,77\,010\,5\text{-}3\,0\text{м}$; $d = 0,7\,77\,010\,5\text{-}3\,0\text{м}$;

$LN = 6,6\,77\,010\,5\text{-}2\,0\text{м}$; $E = 2\,77\,010\,511\,0\text{Н/м}$.

Та же зависимость (12) определялась экспериментально. Полученная в опыте зависимость изменения диаметра пружины от величины радиальных сил, сжимающих или растягивающих ее, представлена на рис. 3 кружками.

Вполне удовлетворительное соответствие между теоретическими и экспериментальными данными позволяет утверждать, что полученные нами теоретические соотношения могут быть использованы для прогнозирования механических свойств и разработки алгоритма структурно-параметрического синтеза протезов кровеносных сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Володось Н.Л., Шеханин В.Е., Карпович И.Н. и др. //Тез. докл. Всесоюз. научн. конф. "Применение медицинской техники в хирургии", Иркутск, 1985. Т.II. С.163.
2. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. В 10-ти т. Т.VII. Теория упругости: Учеб. пособ. М.:Наука, 1987. 248 с.

УДК 577.32:[577.2:539.1.04]+577.346

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООБ'ЄКТИ

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ГОНАД ОБЛУЧЕННЫХ КРЫС, НА СВЯЗЫВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ**Е.Б.Круглова, Н.А.Крутько, А.А.Красницкая, Н.А.Карпенко*, В.Я.Малеев., М.Ю.Алесина****Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г.Харьков, 310085 e-mail: kruglova@ire.kharkov.ua***Чернобыльский научно-технический центр международных исследований, г.Киев*

Методом сравнения кривых плавления свободной ДНК и ее смесей с терапевтически активными нуклеозидами (NUC): цитозином арабинозидом (Ara-C), 6-азацитидином (6AZC) и 6-азауридином (6AZU) были обнаружены различия в связывании рассмотренных NUC с молекулами ДНК, выделенными из половых клеток контрольных и облученных в интервале (2-57) сГр крыс. Показано, что эффект смещения кривых плавления смесей ДНК-NUC относительно кривой плавления свободной ДНК в область более высоких температур зависит от дозы облучения и используемого NUC. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении связывания рассмотренных NUC с ДНК из облученных тканей, что позволяет использовать их в качестве маркеров структурных изменений в молекулах ДНК при низких дозах облучения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ионизирующая радиация, низкие дозы облучения, кривые плавления, УФ спектрофотометрия, цитозин арабинозид, 6-азацитидин, 6-азауридин

Изучению механизмов терапевтического действия пиримидиновых нуклеозидов и их аналогов в последнее время уделяется большое внимание. Из литературных данных следует, что активность некоторых из них обусловлена включением в молекулу ДНК в процессе репликативного или репаративного синтезов [1-3]. Тем не менее в этих работах не рассматривается возможность прямого связывания таких нуклеозидов с молекулами ДНК в зависимости от степени деградации генома при трансформации клеток под действием различных повреждающих факторов. В наших недавних исследованиях было показано, что биологически активный нуклеозид цитозин арабинозид по-разному связывается с контрольными и деградированными в процессе облучения животных молекулами ДНК [4]. Известно также, что при взаимодействии ряда биологически активных препаратов с молекулами ДНК из нормальных и трансформированных тканей, наблюдается некоторая избирательность в связывании лигандов, зависящая от уровня деградации хроматина [5-8]. Целью настоящей работы является сравнение связывания трех аналогов пиримидиновых нуклеозидов (NUC) - противолейкемийного препарата цитозина арабинозида (Ara-C), противоопухолевого - 6-азацитидина (6AZC), и препарата с широким спектром действия - 6-азауридина (6AZU) с молекулами ДНК, выделенными из половых клеток крыс, подвергавшихся длительному воздействию ионизирующей радиации в низких дозах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рассмотренные образцы ДНК были выделены стандартным детергентным методом [9] из придатков семенников крыс популяции Вистар (пул из 5-6 животных), подвергавшихся хроническому облучению в течение 360 дней инкорпорированными $\text{Cs}^{134+137}$ и Sr^{90} , поступающими с пищей и водой и внешнему облучению 40-60 мкР/час. При моделировании дозовых нагрузок на все тело животных использовали питьевую воду из пруда-распределителя 4-го блока Чернобыльской АЭС с известной радиоактивностью и типом содержащихся в ней радионуклидов [10]. В качестве контрольных животных использовали крыс того же возраста, получающих чистый корм в виварии г. Киева. Исследовали влияние трех дозовых нагрузок, составивших в пересчете на гонады

Влияние структурных изменений в ДНК из гонад облученных крыс ...

величины суммарных поглощенных доз (ПД) 1,9, 5,7 и 56,8 сГр (расчет доз проведен в Институте экспериментальной онкологии, патологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев).

Количество примесей белка и РНК в выделенных образцах ДНК составляло менее 1%. Качество препаратов ДНК контролировалось также методом электрофореза в 1% нейтральном агарозном геле. Анализ полученных электрофореграмм не зафиксировал заметного количества низкомолекулярных фрагментов в исследуемых образцах ДНК. Средняя молекулярная масса всех выделенных образцов ДНК составила 25-30 МДа, а величины гиперхромных эффектов находились в интервале (38-40)%, что свидетельствовало об их нативном состоянии.

Температурные зависимости спектров поглощения были получены для растворов свободной ДНК ($C_{\text{NUC}}/C_p=0$) и ее смесей с NUC при концентрациях $C_{\text{NUC}}=10^{-4}$ М и $C_p=(7-10)\times 10^{-5}$ М, где C_p - концентрация ДНК в молях фосфатов. Концентрацию ДНК и NUC рассчитывали используя следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: $\varepsilon_{260}(\text{P})=6400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для ДНК, $\varepsilon_{270}=9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Ага-С, $\varepsilon_{260}=10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 6AZU и $\varepsilon_{260}=8900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 6AZC. Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевых термостатированных кюветах с длиной оптического пути 10 и 2 мм на спектрофотометре "Specord M40". Ага-С, 6AZC и 6AZU были синтезированы сотрудниками Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, под руководством к.х.н. Шаламая А.И. и использовались нами без дополнительной очистки. Все спектрофотометрические измерения были проведены в 0,01 SSC (1SSC - 0,15 М NaCl + 0,015 М цитрат Na, pH 7,2) буферном растворе.

Величины гиперхромных эффектов смесей ДНК-NUC были рассчитаны как $H(\%) = (A_{\text{max}} - A_{\text{min}})/A_{\text{ДНК}} \times 100$, где A_{max} , A_{min} и $A_{\text{ДНК}}$ - поглощения смесей ДНК-NUC в $\lambda = 260$ нм при температурах конца и начала плавления, соответственно, и поглощение ДНК при комнатной температуре в отсутствие NUC. Величины ΔT_m , равные разности T_m и T_m° , характеризуют смещение температуры плавления смеси ДНК-NUC (T_m) относительно температуры плавления свободной ДНК (T_m°), где T_m и T_m° выбираются как точки, соответствующие значению $(1-\theta) = 0,5$, а $(1-\theta)$ - доля денатурированных пар оснований в двойной спирали ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При тестировании конформационных изменений в выделенных образцах ДНК был использован метод сравнения кривых плавления для свободной ДНК и ее смесей с рассматриваемыми нуклеозидами

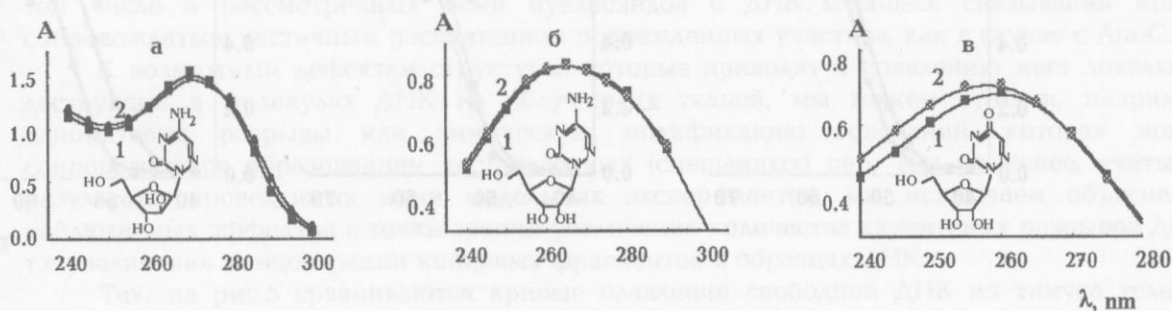


Рис.1. Спектры поглощения и структурные формулы исследуемых нуклеозидов в 0,01 SSC буферном растворе при температурах $T=40^\circ\text{C}$ (1) и $T=70^\circ\text{C}$ (2) для: Ага-С (а), 6AZC (б) и 6AZU (в).

Из рис.1 видно, что в области температур (40-70) $^\circ\text{C}$ спектры поглощения исследуемых нуклеозидов в 0,01 М SSC буферном растворе, в том числе при $\lambda=260$ нм, практически неизменны, что позволяет следить за температурными зависимостями в поглощении смесей ДНК-NUC не вводя поправок на изменения в поглощении свободного лиганда.

На рис.2 - рис.4 приведены наблюдаемые изменения кривых плавления для образцов ДНК, выделенных из придатков семенников крыс, облучаемых в течение 360 дней, с добавками и без добавок биологически активных нуклеозидов. Анализируя

данные, приведенные на этих рисунках, можно заключить, что кривые плавления свободной контрольной ДНК практически совпадают с кривыми плавления ее смесей с NUC для всех рассмотренных нуклеозидов. Тот же эффект мы фиксируем для образцов ДНК, выделенных из гонад крыс, облученных в течение 45 и 120 дней в очень низких дозах (до 2 сГр) (данные только для Ага-С [1]).

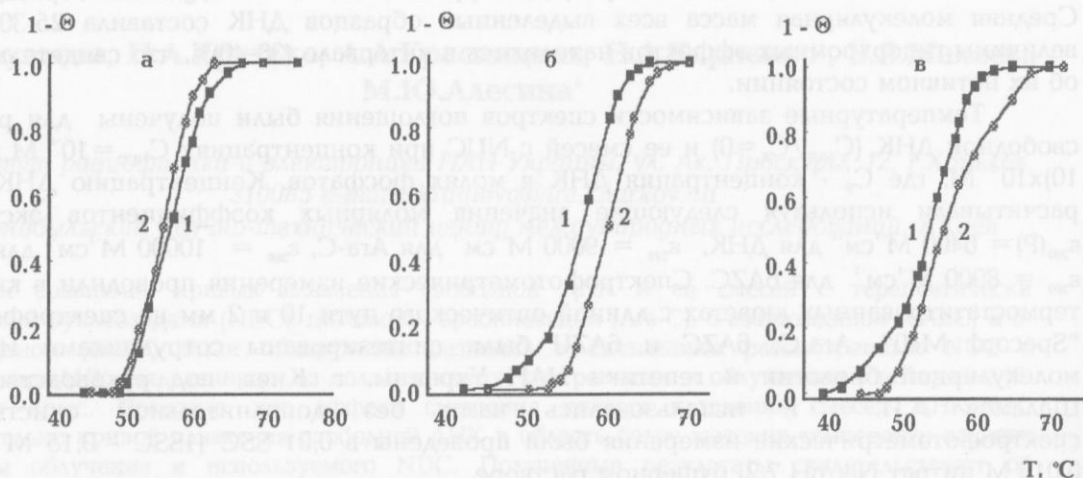


Рис.2. Зависимость кривых плавления контрольной ДНК (а) и ДНК из облученных животных с ПД = 5.7 сГр (б) и ПД = 56.7 сГр (в) в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ага-С

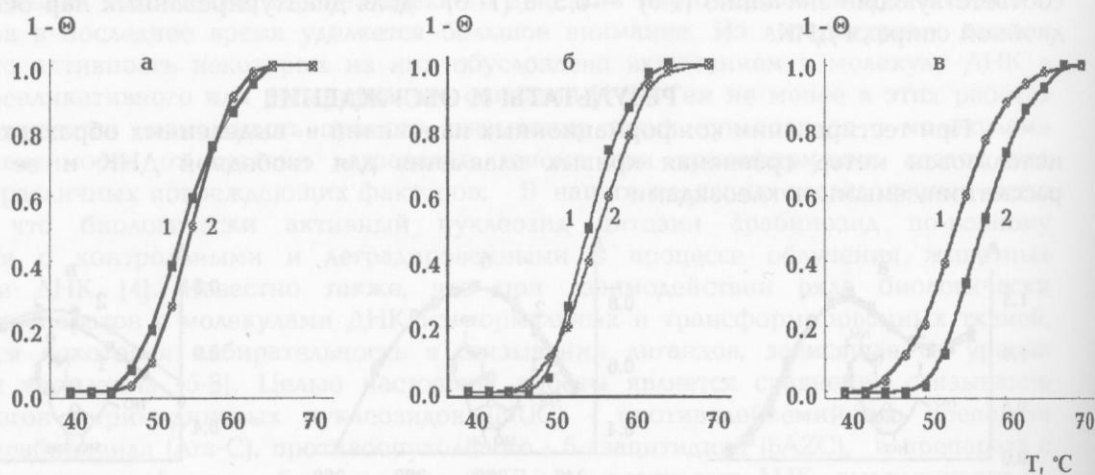


Рис.3. То же самое для 6AZC

По сравнению с этим, для образцов ДНК, выделенных из половых клеток крыс с большими дозами облучения (Рис. 2-4, б, в), существуют значительные различия между кривыми плавления свободной ДНК и ДНК в смеси с рассматриваемыми нуклеозидами, как в величинах ΔT_m , так и в величинах гиперхромных эффектов. Так, для Ага-С и 6AZU уже при ПД=5,7 сГр мы фиксируем изменения ΔT_m порядка 2-3 $^{\circ}\text{C}$. Смещение кривых плавления смесей в высокотемпературную область сопровождается изменением величин гиперхромных эффектов, причем в случае Ага-С величина $H=(29-32)\%$ смеси понижается относительно величины гиперхромного эффекта свободной ДНК, а в случае 6AZU и 6AZC, наоборот, возрастает ($H=53-56\%$). Наименее чувствительным к конформационным

Влияние структурных изменений в ДНК из гонад облученных крыс ...

изменениям ДНК оказался 6AZC, для которого смещение кривых плавления наблюдалось только при максимальных дозах: в случае 360 дней облучения при ПД = 56.8 сГр (рис. 3, в) и в случае 120 дней облучения животных при ПД = 25 сГр (данные не приведены).

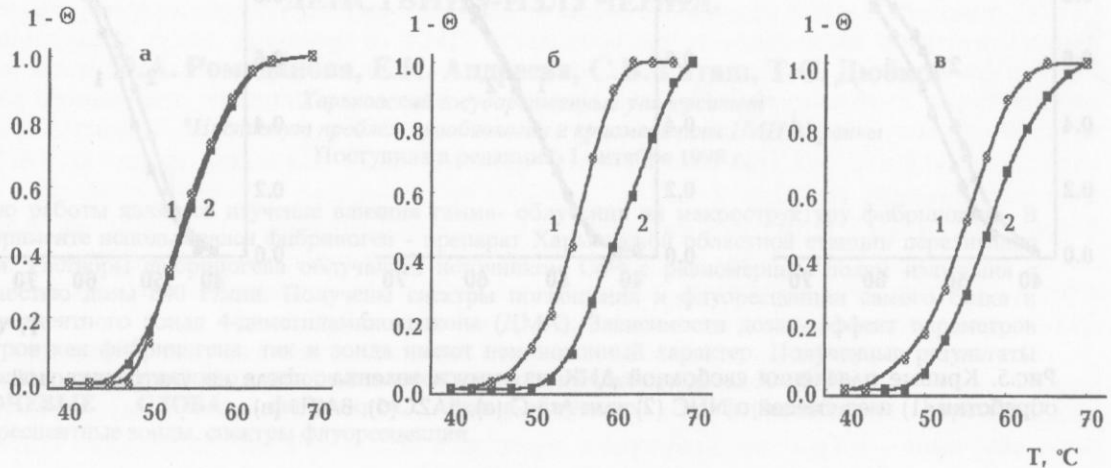


Рис.4. То же самое для 6AZU

Смещение кривых плавления смесей ДНК-лиганд в высокотемпературную область обычно связывают с образованием комплексов и стабилизацией вторичной структуры молекул ДНК по теории скрепок [11]. Тем не менее, поскольку для контрольных образцов ДНК и образцов ДНК при низких дозах облучения мы не фиксируем заметных изменений в профилях кривых плавления, величинах ΔT_m и гиперхромных эффектов, то можно предположить, что неповрежденные молекулы ДНК в исследованной области концентраций не образуют комплексов с рассмотренными NUC. Ситуация, однако, меняется для молекул ДНК, выделенных из половых клеток крыс, облученных в дозах около и более 2 сГр. Наблюдаемые в этом случае изменения в кривых плавления мы связываем с изменениями в конформационном состоянии поврежденных молекул ДНК и появлением мест локальной дестабилизации отдельных пар нуклеотидов в ДНК. Такие участки, вероятно, становятся более доступными для связывания различных лигандов, в том числе и рассмотренных нами нуклеозидов с ДНК. Процесс связывания может сопровождаться частичным расплетением поврежденных участков, как в случае с Ага-С.

К возможным дефектам структуры, которые приводят к появлению мест локальной деструкции в молекулах ДНК из облученных тканей, мы можем отнести, например, одонитевые разрывы или химическую модификацию оснований, которая может сопровождаться образованием нестандартных (смешанных) пар. Тем не менее, учитывая результаты проведенных нами модельных экспериментов, мы исключаем объяснение наблюдаемых эффектов с точки зрения увеличения количества двунитевых разрывов ДНК, т.е. увеличения концентрации концевых фрагментов в образцах ДНК.

Так, на рис.5 сравниваются кривые плавления свободной ДНК из тимуса теленка ("Serva"), обработанной ультразвуком, и ее комплексов с рассмотренными NUC. Необработанная ультразвуком тимусная ДНК ведет себя аналогично контрольному образцу ДНК, как описано выше (данные не приведены). При УЗ-обработке в молекулах ДНК появляется значительное количество двунитевых разрывов (низкомолекулярных фрагментов). Как видно из рис.5, при связывании NUC с такой ДНК наблюдается либо обратный эффект, т.е. T_m для ДНК-NUC смещается в низкотемпературную область по сравнению с температурой плавления свободной ДНК, как в случае с Ага-С (рис.5,а), либо эти кривые плавления малоразличимы, что характерно для 6AZC и 6AZU (рис.5, б, в).

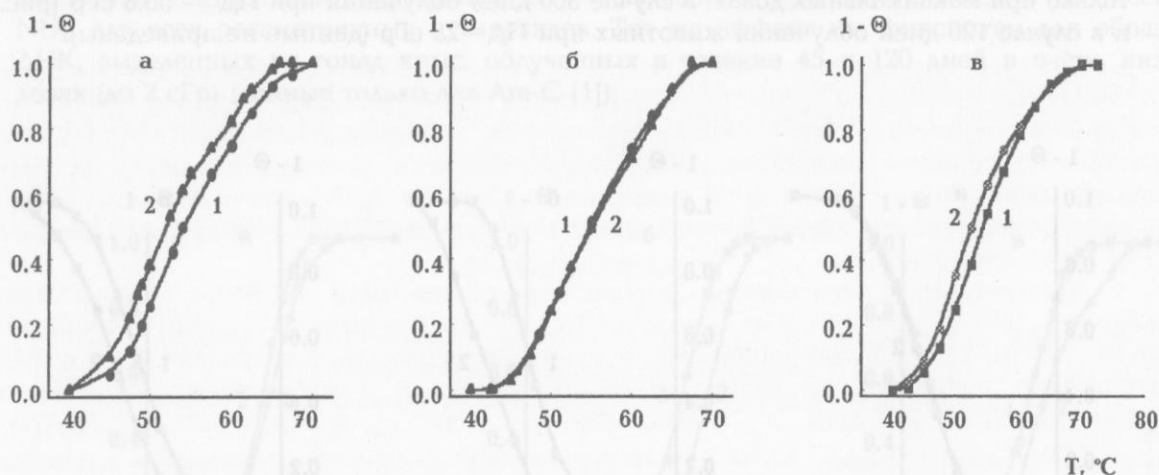


Рис.5. Кривые плавления свободной ДНК из тимуса теленка после ее ультразвуковой обработки (1) и ее смесей с NUC (2) для: Ara-C (а), 6AZC(б), 6AZU (в).

ВЫВОДЫ

1. Предлагаемый метод сравнительного анализа кривых плавления свободной ДНК и ее смесей с аналогами нуклеозидов Ara-C, 6AZU и 6AZC позволяет обнаружить различия в конформационном состоянии молекул ДНК, выделенных из половых клеток крыс, подвергавшихся пролонгированному облучению в интервале малых суммарных поглощенных доз (5-57) сГр.

2. Показано, что наблюдаемые эффекты различаются по величине ΔT_m и H в зависимости от дозы и типа использованного для такого тестирования нуклеозида.

3. Можно предположить, что увеличение терапевтического действия рассматриваемых нуклеозидов при их использовании в комплексе с деградирующими ДНК лекарственными препаратами или при дополнительном облучении, связан не только с возможной активацией клеток, но и с увеличением связывания таких нуклеозидов с поврежденными участками молекул ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Iwasaki H., Huang P., Keating M.J., Plunkett W.//Blood.1997.V.90.P.270-278
2. Wotring L.L., Townsend L.B.//Cancer Res. 1989. V.49. P.289-294.
3. Gandhi V., Huang P., Chapman A.J., Chen F., Plunkett W.//Clin. Cancer Res. 1997. V.3. 1347-1355.
4. Kruglova E.B., Krasnitskaya A.A., Maleev V.Ya., Alesina M.Yu., and Karpenko N.A. 2-nd International conference: Long-term health consequences of the chernobyl disaster, Kiev. 1998. P.262-263.
5. Круглова Е.Б., Красницкая А.А., Малеев В.Я.//Молекуляр. биология. 1995. Т.29. С.125-134.
6. Бабаян Ю.С., Карапетян А.Г., Казарян Р.С., Худавердян Н.В.//Биофизика. 1997. Т.42. С.367-371.
7. Эренпрейса Е.А. Организация хроматина в ядре интерфазной клетки. Рига. Зинатне, 1990. 115 С.
8. Носач Л.Н., Дяченко Н.С.б Шаламай А.С. и др.//Биополимеры и клетка. 1996. Т.12. С.75-85.
9. Химия и биохимия нуклеиновых кислот/Под ред. Збарского И.Б., Дебова С.С. А. Медицина, 1968. 429 С.
10. Alesina M.Yu. 2-nd International conference: Long-term health consequences of the chernobyl disaster, Kiev. 1998. P.164-165.
11. Франк-Каменецкий М.Д.//Молекуляр. биология. 1968. Т.2. С.408-419.

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

УДК 577.32

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ФИБРИНОГЕНА ПРИ
ДЕЙСТВИИ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ.

Э.А. Ромоданова, Е.К. Андреева, С.В. Гаташ, Т.С. Дюбко*

Харьковский государственный университет

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Поступила в редакцию 1 октября 1998 г.

Целью работы являлось изучение влияния гамма-облучения на макроструктуру фибриногена. В эксперименте использовался фибриноген - препарат Харьковской областной станции переливания крови. Растворы фибриногена облучались источником Co^{60} с равномерным полем излучения с мощностью дозы 840 Р/мин. Получены спектры поглощения и флуоресценции самого белка и флуоресцентного зонда 4-диметиламинохалкона (ДМХ). Зависимости доза - эффект параметров спектров как фибриногена, так и зонда имеют немонотонный характер. Полученные результаты позволяют сделать вывод о конформационном переходе в белке при дозах 30 - 60 Гр.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, гамма-облучение, конформационные переходы, флуоресцентные зонды, спектры флуоресценции.

В радиобиологических исследованиях значительное внимание уделяется нарушению свертывания крови [1]. Сложность самого процесса и сложность строения обеспечивающих его структур определяют интерес к работам, выполненным на молекулярном уровне. Фибриноген, играющий важную роль в процессе свертывания крови, является одним из самых крупных белков плазмы крови и известен гетерогенностью своей структуры [2]. Свойства фибриногена изменяются как при действии радиации на целостный организм [3], так и на его растворы [4]. Для изучения радиолитического фибриногена применяли различные методы. Целью данной работы было изучение конформационных переходов фибриногена, вызванных действием гамма-облучения, спектральными методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В эксперименте использовались сухие препараты фибриногена. Белок растворяли в дистиллированной воде и физиологическом растворе (0,25 М NaCl). Степень очистки фибриногена (0,94%) определялась по количеству белка, осаждаемого тромбином. Фибриноген и тромбин - препараты Харьковской областной станции переливания крови. Концентрация белка в растворах соответствовала физиологическим значениям (2-4 мг/мл). Спектры поглощения измерялись на спектрофотометре «Hitachi-3210», спектры флуоресценции - на спектрофлуориметре «Hitachi-F4010» при возбуждении светом с длинами волн 296 и 280 нм. Анализ спектров проводили с помощью двухволновых параметров $A = (I_{320}/I_{365})_{296}$ и

$B = (I_{320}/I_{365})_{280}$ [5]. Для оценки изменений макроструктуры белка был использован флуоресцентный зонд 4-диметиламинохалкон (ДМХ) [8]. Растворы фибриногена облучались источником Co^{60} в дозах от 30 до 150 Гр с равномерным полем излучения мощностью 840 Р/мин на установке типа «Исследователь».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Фибриноген относится к белкам со спектром поглощения в коротковолновой области ($\lambda_{\text{max}}=338$ нм). Действие радиации не оказывает влияния на положение спектра поглощения, но меняет его интенсивность [1,10,11]. Более информативными являются спектры флуоресценции. На рис.1 приведена зависимость доза-эффект для интенсивности флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) растворов фибриногена. Как видно из рисунка, для контрольных образцов присутствие NaCl в растворе приводит к увеличению $I_{\text{фл}}$, что свидетельствует о влиянии электростатического взаимодействия на состояние хромофоров белка. Независимо от длины волны возбуждающего света кривая доза-эффект имеет минимум при малых дозах. Этот минимум для водных растворов является более глубоким и сдвинут в область больших доз.

На рис.2 приведены зависимости параметров A и B спектров флуоресценции от дозы γ -облучения. Для физиологического раствора параметры A и B после облучения увеличиваются и имеют плавный характер изменения. Для водных растворов в области изменения интенсивности флуоресценции фибриногена наблюдается резкий скачок изменения параметра B. Характер

изменения I_{fl} и B для водного раствора аналогичен эффекту, приводимому в работе [12]. Это дает возможность сделать вывод, что при радиоллизе нарушения макроструктуры фибриногена могут затрагивать не только домен E, но и более упорядоченный домен D.

Изменения собственных спектральных свойств белка могут определяться двумя причинами: действием радиации как на основные хромофоры фибриногена так и на его макроструктуру [10, 12]. Для выяснения характера изменения спектров фибриногена применяли флуоресцентный зонд (ДМХ), чувствительный к полярности среды и разнообразным структурным перестройкам белка. Анализ изменения интенсивности флуоресценции ДМХ со временем, после добавления его в раствор фибриногена, показал, что в начале наблюдается некоторое уменьшение интенсивности спектра (через 20-30 мин) с последующим ее увеличением и достижением постоянного значения после 90 мин инкубации. Максимум полосы поглощения ДМХ в растворе наблюдается при длине волны $\lambda_{max}=413$ нм. Эта величина является промежуточным значением между $\lambda_{max}=417$ нм в диметилформамиде ($D=37,6$; $Z=68$) и $\lambda_{max}=406$ нм в ацетоне ($D=20,7$; $Z=66$) [8]. Спектр флуоресценции ДМХ в растворе фибриногена имеет максимум при $\lambda_{max}^*=548$ нм, что близко по своему значению к $\lambda_{max}^*=547$ нм в метаноле ($Z=66$). Положение максимумов спектров поглощения и флуоресценции дает возможность сделать вывод о том, что при взаимодействии с фибриногеном ДМХ встраивается в область белка, полярность которой близка к $Z \approx 67$.

Как видно из рис.3, изменения интенсивностей как поглощения, так и флуоресценции ДМХ в водном растворе фибриногена имеют более резкий характер изменения зависимостей доза-эффект, чем в физиологическом растворе. Это может объясняться тем, что в водных растворах при дозах облучения ~ 60 Гр конформационные переходы в белковой молекуле приводят к тому, что поверхность белка становится более гидрофобной и увеличивается число связанных белком молекул ДМХ [6,7].

В зависимости от дозы облучения изменяется и ширина спектра флуоресценции ДМХ на полувысоте от 96 нм до 99 нм. Такого рода уширения спектров могут определяться гетерогенностью центров связывания зонда [8]. Обычно это проявляется в изменении формы спектральной линии. Анализ формы спектра флуоресценции ДМХ разложением ее на гауссовы составляющие с использованием программы «Reakfit» выявляет три компоненты. Самая длинноволновая полоса принадлежит зонду в водной фазе, а две других определяются гетерогенностью связывающих зонд центров. Для количественной оценки связывания было проведено титрование зонда белком и определены параметры связывания K . Результаты такой оценки приведены в табл.1.

Таблица 1. Параметры связывания зонда с облученным и необлученным фибриногеном

$\lambda_{max}^*, \text{нм}$	$K \cdot 10^{-5}, \text{M}^{-1}$	
	Необлученный	Облученный ($D=60$ Гр)
486 ± 1	1,25	0,60
543 ± 1	0,50	0,30

Полученные результаты можно объяснить тем, что при действии γ -облучения на раствор фибриногена изменяется механизм конкуренции связывающих зонд центров за молекулы ДМХ.

В необлученной молекуле фибриногена один тип центров связывания имеет значительно большую величину K и насыщение центров связывания с $\lambda_{max}^*=543$ нм будет происходить значительно медленнее, чем центров с $\lambda_{max}^*=486$ нм.

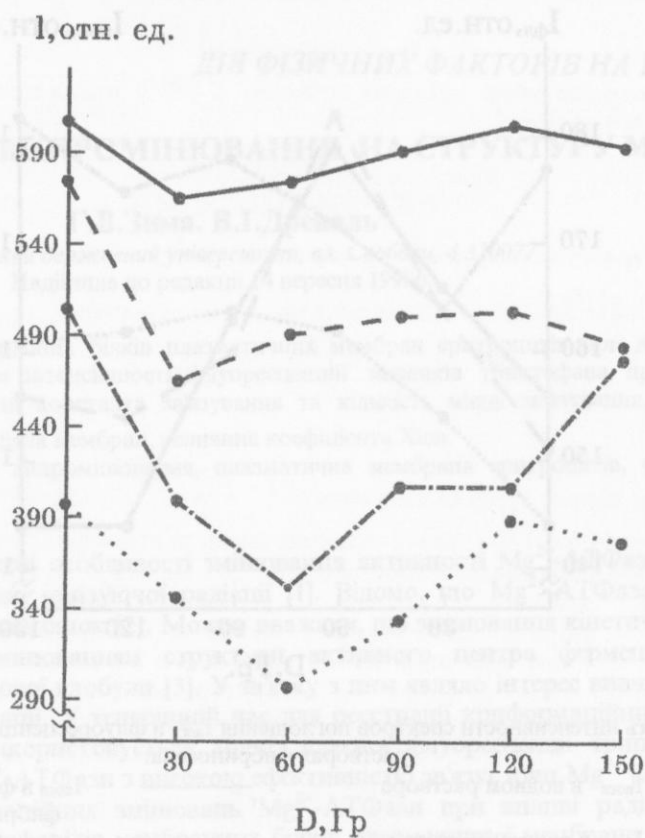


Рис.1. Зависимость интенсивности флуоресценции фибриногена от дозы облучения

при λ^*_{296} H_2O при λ^*_{280} - · - · H_2O
 при λ^*_{296} - - - $H_2O + NaCl$ при λ^*_{280} — $H_2O + NaCl$

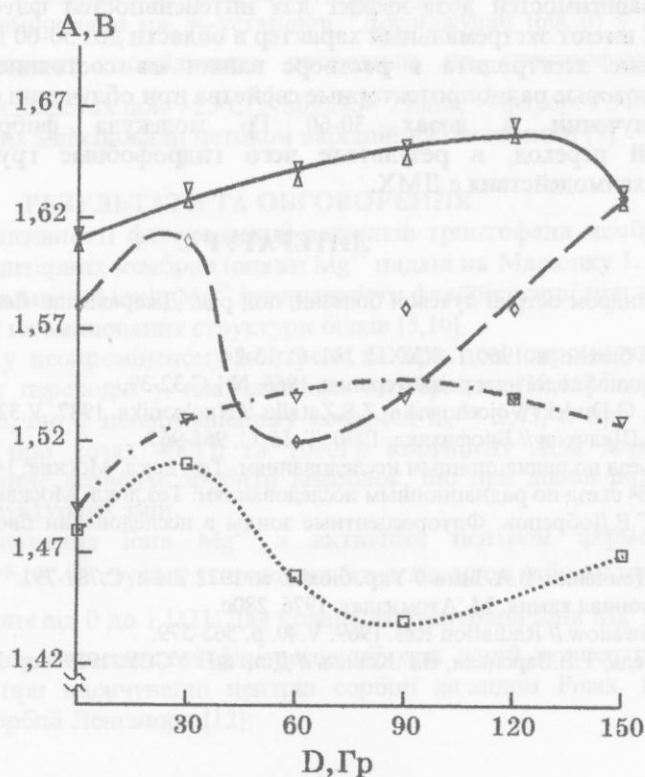


Рис.2. Зависимость двухволновых параметров А и В от дозы:

..... А1 - - - В в H_2O
 - · - А2 — В в $H_2O + NaCl$

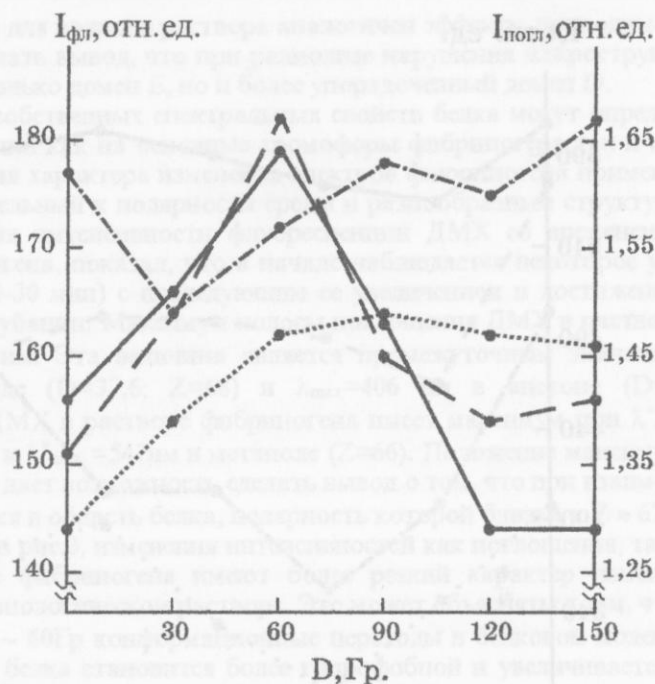


Рис.3. Зависимость интенсивности спектров поглощения $I_{\text{погл}}$ и флуоресценции $I_{\text{фл}}$ ДМХ в облученных растворах фибриногена:

----- $I_{\text{погл}}$ в водном растворе $I_{\text{погл}}$ в физиологическом растворе фибриногена
 ————— $I_{\text{фл}}$ в водном растворе - · - · - $I_{\text{фл}}$ в физиологическом растворе фибриногена

ВЫВОДЫ.

1. Кривые зависимостей доза-эффект для интенсивностей флуоресценции как самого белка, так и ДМХ имеют экстремальный характер в области доз 30-60 Гр.
2. Присутствие электролита в растворе влияет на состояние хромофоров белка и обнаруживает некоторые радиопротекторные свойства при облучении фибриногена.
3. При облучении в дозах 30-60 Гр молекула фибриногена претерпевает конформационный переход, в результате чего гидрофобные группы становятся более доступными для взаимодействия с ДМХ.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Геморрагический синдром острой лучевой болезни, под ред. Джаракьяна. Ленинград. Медицина, 1976. 168с.
2. Т.В.Варецька // Укр. біохім. ж. 1960. Т. XXXII. №1. С. 13-24.
3. Ю.Т.Пономарев // Радиобиология и радиотерапия. 1966. №1. С.32-39.
4. М.Корес, А.Gorska, G.Dudek-Wojcehowska, Z.S.Zatallo // Nucleonika. 1987. V.32. №1-3. p.29-47.
5. К.К.Туроверов, Б.В.Щелчков // Биофизика. 1970. Т. 15. С. 965-967.
6. А.А.Конрадов. 3^й съезд по радиационным исследованиям. Тез. докл. Москва. 14-17 окт. 1997. С.128.
7. И.К.Коломийцева. 3^й съезд по радиационным исследованиям. Тез. докл. Москва. 14-17 окт. 1997. Т.3. С.113.
8. Ю.А.Владимиров, Г.Е.Добрецов. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М. Наука, 1980. 320 с.
9. Т.В.Варецька, О.П.Демченко, В.А.Зима // Укр. біохім. ж. 1972. Т.44. С.787-791.
10. А.Своллоу. Радиационная химия. М. Атомиздат, 1976. 280с.
11. R.S.Armstrong, A.I.Swallow // Radiation Res. 1969. V.40. p. 563-579.
12. В.Л.Зима, А.В.Медведь, Т.В.Варецька, В.Г.Коваль // Доп. АН УССР. 1979. сер. Б. №5. С. 377-380.

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІООБ'ЄКТИ

УДК 577.391; 611.783

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА СТРУКТУРУ Mg^{2+} -АТФази.

Г.В.Зима. В.І.Древаль

Харківський державний університет, пл. Свободи, 4, 310077

Надійшла до редакції 14 вересня 1998р.

Вивчені структурні зміни мембранних білків плазматичних мембран еритроцитів при діянні радіації, шляхом визначення змінювання інтенсивності флуоресценції залишків триптофана при титруванні мембран іонами Mg^{2+} . Визначені константа зв'язування та кількість місць зв'язування, розраховано змінювання поверхневого потенціала мембран, величина коефіцієнта Хіла.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: іонізуюче випромінювання, плазматична мембрана еритроцитів, флуоресценція білків, спектроскопія.

Раніше нами були встановлені особливості змінювання активності Mg^{2+} -АТФази плазматичної мембрани еритроцитів при діянні іонізуючої радіації [1]. Відомо, що Mg^{2+} -АТФаза плазматичних мембран являє собою інтегральний білок [2]. Можна вважати, що змінювання кінетичних параметрів Mg^{2+} -АТФази [1] зумовлені змінюванням структури активного центра ферменту за рахунок конформаційних перебудов білкової глобули [3]. У зв'язку з цим являло інтерес вивчити змінювання структури білка при діянні радіації. У теперішній час для реєстрації конформаційних змінювань та структурної динаміки білків використовується аналіз власної флуоресценції триптофанілів [4-7]. Відомо, що активний центр Mg^{2+} -АТФази з високою ефективністю зв'язує іони Mg^{2+} [2]. Тому у нашій роботі для реєстрації конформаційних змінювань Mg^{2+} -АТФази при впливі радіації досліджено визначення флуоресценції триптофанілів мембранних білків плазматичної мембрани при титруванні іонами Mg^{2+} .

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.

Тіні еритроцитів виділені з донорської крові за методом [8]. Суспензію плазматичних мембран еритроцитів (5,06 мг/мл) опромінювали на γ -установці "Досліджувач" (60Co) у дозах 1Гр, 400Гр, 10^3 Гр [1]. Спектрофлуориметричні дослідження проводили на спектрофлуориметрі "Hitachi-850" (Японія) у термостатуємих кюветах при $+25^\circ\text{C}$ (λ збудж. = 290нм, λ флуор. = 340нм).

Статистичну обробку даних здійснювали методом варіаційної статистики [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

Дані по визначенню інтенсивності флуоресценції залишків триптофана мембранних білків при титруванні препарату еритроцитарних мембран іонами Mg^{2+} надані на Малюнку 1.

Можна бачити, що при додаванні іонів Mg^{2+} інтенсивність флуоресценції при всіх досліджуваних дозах збільшується, що указує на змінювання структури білків [5,10].

Сигмоїдальність кривих у неопроміненому контролі та при дозі опромінення 1Гр указує на кооперативність структурних переходів у плазматичних мембранах [10,11]. Розрахунок величини коефіцієнта Хіла (n_H) показав, що у неопроміненому контролі $n_H = 1,43$, а при дозі 1Гр $n_H = 0,14$ (Таблиця 1). У той же час при дозах 400Гр та 1000Гр коефіцієнт Хіла дорівнює 1,00, тобто кооперативність зникає. Останнє дозволяє зробити висновок, що при діянні радіації плазматична мембрана зазнає глибоких структурних змін.

Якщо припустити, що зв'язування іона Mg^{2+} з активним центром фермента протікає як біомолекулярна реакція $L+B \leftrightarrow LB$, то ступінь заповнення білка лігандом (або ступінь насичення місць зв'язування) у пробігає значення від 0 до 1 [11]. Для кожної концентрації іона Mg^{2+} це значення може бути обчислене як відношення інтенсивності флуоресценції при даній концентрації іона $F_{Mg^{2+}}$ до інтенсивності флуоресценції при насичуванні центрів сорбції лігандом F_{max} . F_{max} визначали з рівняння мономолекулярної сорбції Ленгмюра [12]:

$$\bar{y} = F_{Mg^{2+}} / F_{max} = [BL] / [B_0]$$

Тут $[BL]$ - концентрація місць зайнятих лігандом, а $[B_0]$ - повна концентрація ділянок зв'язування. Величина константи асоціації

$$K_A = \frac{[BL]}{([B_0] - [BL])([L_0] - [BL])}$$

Тут $[L_0]$ - концентрація ліганду, якого було додано

Але так як $[BL] = \bar{y}[B]$, то після відповідних перетворень маємо:

$$\frac{1}{1 - \bar{y}} = \frac{K_A [L_0]}{\bar{y}} - K_A [B_0]$$

Тоді тангенс кута нахилу графіка залежності $\frac{1}{1 - \bar{y}}$ від $\frac{[L_0]}{\bar{y}}$ дорівнює K_A , а відрізок, який графік відсікає на осі абсцис дає $[B_0]$, тобто кількість місць зв'язування. Величини K_A та N розраховували графічно за методом найменших квадратів [11].

Результати надані у Таблиці 1.

Слід зауважити, що при збільшенні дози радіації до 103 Гр спостерігається тенденція зменшення кількості місць зв'язування, при одночасному збільшенні константи асоціації, що дозволяє зробити висновок про суттєві зміни структури Mg^{2+} -зв'язуючих мембранних білків. Очевидно, що внаслідок зарядової неоднорідності поверхні плазматичної мембрани [13] взаємодія іонів Mg^{2+} з активним центром також може залежати від поверхневого потенціала мембрани [10, 14, 15].

Якщо:

$$K_A = K_{A0} \exp\left(\frac{-z\varepsilon\varphi}{kT}\right), \text{ де}$$

K_A - константа асоціації для незарядженої молекули

z - кратність заряду ліганду

ε - заряд електрона

k - константа Больцмана

T - абсолютна температура

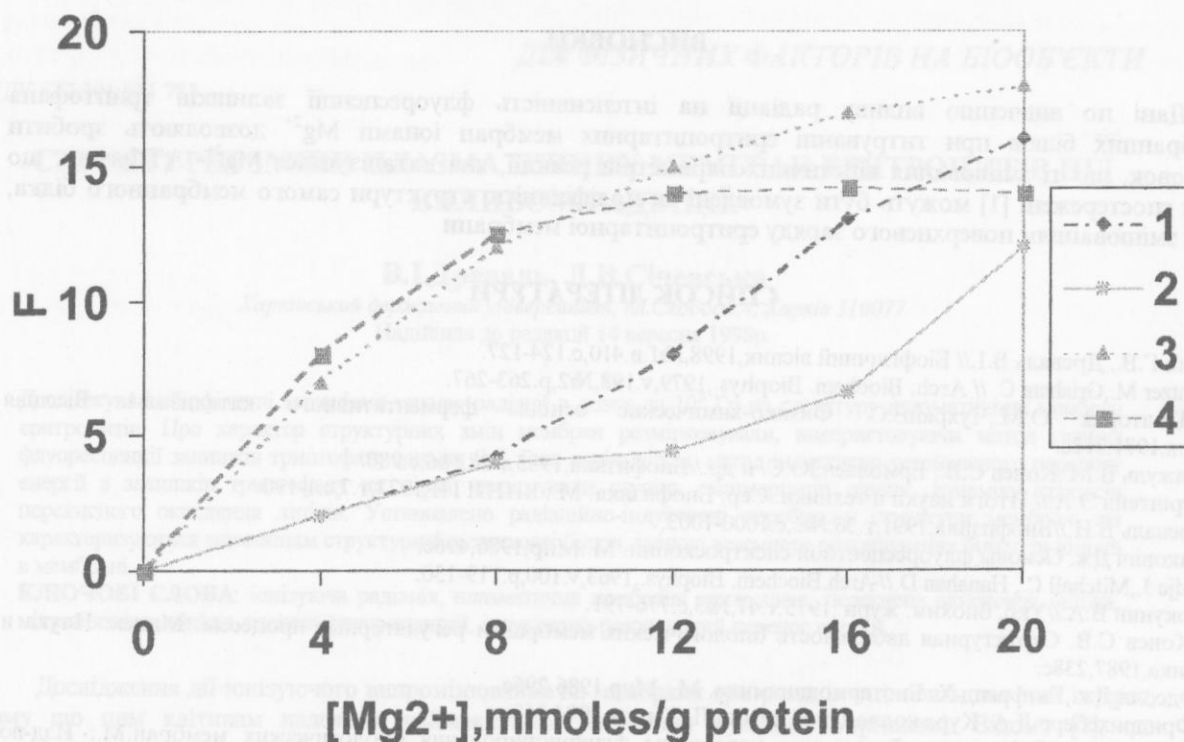
Тоді, для двох різних значень поверхневих потенціалів φ_1 та φ_2 ($\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$) отримувем:

$$\frac{K_{A1}}{K_{A2}} = \exp\left(\frac{z\varepsilon\Delta\varphi}{kT}\right)$$

$$\Delta\varphi = \frac{kT}{z\varepsilon} \ln \frac{K_{A1}}{K_{A2}}$$

Розрахунки змінювання величини поверхневого потенціала відносно неопроміненого контролю надані у Табл. 1.

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що із збільшенням дози радіації збільшується величина негативного заряду поверхні плазматичної мембрани еритроцитів. Тому що активність мембранозв'язаних ферментів може моделюватися величиною мембранного потенціала [14], можна вважати, що змінювання активності Mg^{2+} -АТФази при діянні радіації, які спостерігалися [1] можуть бути зумовлені змінюванням заряду еритроцитарної мембрани.



Мал.1. Залежність інтенсивності флуоресценції триптофанових залишків білків плазматичної мембрани еритроцитів від концентрації іонів Mg^{2+} .

Позначення: F- інтенсивність флуоресценції, відн. одн.

1 – 0Гр, 2 – 1Гр, 3 – 400Гр, 4 – 10³Гр.

Таблиця 1. Параметри зв'язування іонів Mg^{2+} із препаратом плазматичної мембрани еритроцитів при діянні різних доз іонізуючого випромінювання.

Доза, Гр	N, mmoles/g protein	K_A , M ⁻¹	$\Delta\varphi$, mV	пн
0	215	1,32	-	1,43
1	164	1,84	-4,3	0,14
400	6	24,90	-38,0	1,00
1000	24	35,60	-43,0	1,00

Позначення: N- кількість місць зв'язування

K_A - константа асоціації

$\Delta\varphi$ - змінювання мембранного потенціала при опроміненні (відносно неопроміненого контролю)

пн - коефіцієнт Хіла.

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

УДК 577.391:611.783

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ПІД ВПЛИВОМ РАДІАЦІЇ.

В.І.Древаль, Л.В.Січевська

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

Надійшла до редакції 14 вересня 1998р.

Досліджували біофізичні механізми впливу радіації в дозах до 10^3 Гр на структуру плазматичних мембран еритроцитів. Про характер структурних змін мембран розмірковували, використовуючи метод гасіння флуоресценції залишків триптофану іонами Cs^+ , Γ та акріламідом, метод індуктивно-резонансного переносу енергії з залишків триптофану на пірен, реєстрували ступінь ексімеризації пірену, динаміку процесів перекисного окислення ліпідів. Установлено радіаційно-індуковані перебудови структури мембран, які характеризуються зниженням структурної рухливості білків, зміною взаємного розташування білків та ліпідів в мембрані.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: іонізуюча радіація, плазматична мембрана еритроцита, перекисне окислення ліпідів, мікров'язкість ліпідів, гасіння флуоресценції, індуктивно-резонансний перенос енергії.

Дослідження дії іонізуючого випромінювання на мембрани еритроцитів становить значний інтерес, тому що цим клітинам належить найважливіша біологічна функція в організмі. Відомо [1], що еритроцити є відносно радіорезистентними клітинами, але роль плазматичної мембрани при цьому залишається нез'ясованою. Вважається, що характер радіаційного пошкодження еритроцитарних мембран [2,3] зумовлений особливостями побудови самих мембран, які відрізняються високим вмістом білку [4], а молекулярна організація в значній мірі зумовлена білок-білковими взаємодіями [5]. Фізико-хімічні модифікації, індуковані радіацією в біомембранах, інтенсивно вивчаються різними методами [6,7]. Метою нашої роботи стало дослідження структури білкового і ліпідного компонентів мембран еритроцитів під впливом радіації флуоресцентними методами.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Тіні еритроцитів виділяли з донорської крові за методом [8].

Флуоресцентні дослідження проводили на спектрофлуориметрі «Hitachi-850» (Японія) при 25°C в кварцових термостатованих кюветах 10×10 мм.

З метою роздільного визначення мікров'язкості вільних та зв'язаних з інтегральними білками ліпідів визначали ступінь ексімеризації пірену (Fluka), Швейцарія) F_m/F_e (де F_m - інтенсивність флуоресценції мономерів, F_e - інтенсивність флуоресценції ексімерів пірену) за методом [9].

Про характер структурних змін мембранних білків розмірковували, використовуючи метод гасіння флуоресценції залишків триптофану ($\lambda_{\text{буд}}=295\text{nm}$, $\lambda_{\text{фл}}=330\text{nm}$) іонами Cs^+ та Γ , акріламідом [10].

З метою дослідження просторової організації білок-ліпідних комплексів мембран визначали ефективність індуктивно-резонансного переносу енергії в донорно-акцепторній парі триптофан-пірен [11].

Про інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) розмірковували, визначаючи вміст малонового діальдегіду (МДА) за методом [12]. Концентрацію білку визначали за методом Лоурі та співавт. [13]. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням t-критерія Стьюдента [14], коефіцієнт кореляції (r) визначали за методом [15]. γ -Опромінення мембран здійснювали на ізотопній установці «Исследователь» (^{60}Co , потужність 5Гр/хв) в дозах 10 , 10^2 , $5 \cdot 10^2$, 10^3 . Поглинену дозу оцінювали за методом термолюмінесцентної дозиметрії на основі бората магнію (тип ДПГ-03) та феросульфатним методом [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Експериментальні дані (рис.1) свідчать, що вплив іонізуючої радіації на плазматичні мембрани еритроцитів спричиняє зростання процесів ліпоперексидації, що добре узгоджується з даними, які отримані раніше [17]. При цьому відбувається зростання мікров'язкості анулярних та вільних ліпідів (рис.1) на 13% ($p<0,05$) і 15% ($p<0,05$), відповідно, при опроміненні в дозі 10 Гр. Збільшення дози до 10^2 Гр не спричиняє значних змін мікров'язкості ліпідної компоненти мембран. Але подальше підвищення дози радіації до 10^3 Гр сприяє зростанню мікров'язкості анулярних ліпідів на 35% ($p<0,05$), а вільних ліпідів на 22% порівняно з неопроміненим контролем. Визначення коефіцієнту

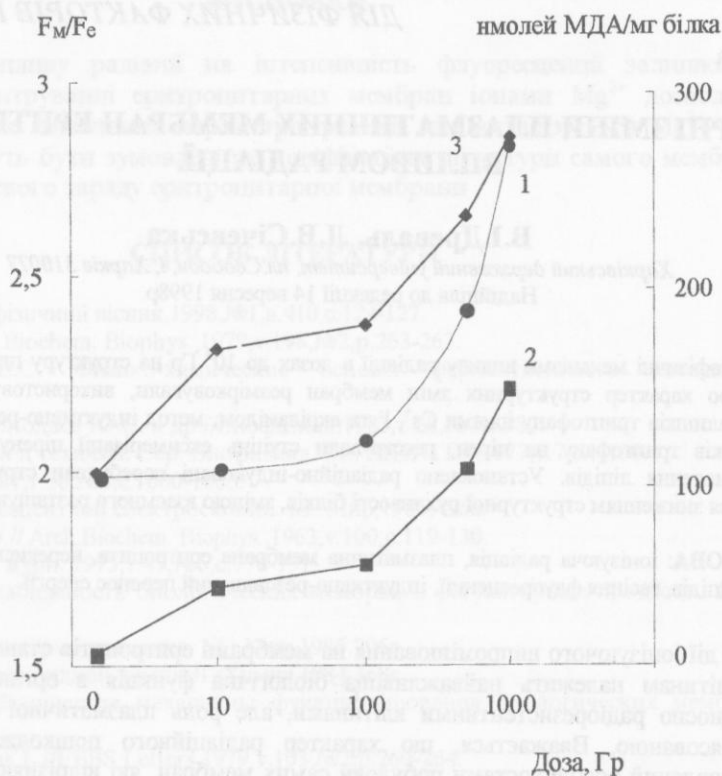


Рис.1. Вплив іонізуючої радіації на вміст МДА (1) та мікрів'язкість вільних (2) і анулярних (3) ліпідів еритроцитарних мембран.

кореляції між вмістом МДА та мікрів'язкістю анулярних ($\Gamma=0,910$) і вільних ліпідів ($\Gamma=0,960$) вказує на взаємозумовленість інтенсивності радіаційно-індукованого ПОЛ та зміни в'язкості ліпідного компоненту еритроцитарних мембран, що підтверджує літературні дані [18].

Важливу роль в стабілізації структури плазматичної мембрани еритроцита виконують білки [19]. Тому неабияку цікавість викликав характер змін структури мембранних білків під впливом радіації. З цієї метою був використаний метод дослідження гасіння триптофанової флуоресценції білків, який дозволяє отримати цінну інформацію про динаміку структури молекул білків [10]. Прямолинійна залежність в координатах Штерна-Фольмера при гасінні триптофанової флуоресценції білків катіонами Cs^+ (рис.2) описується рівнянням Штерна-Фольмера [20]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

де: F_0 та F - інтенсивність флуоресценції в присутності та в відсутності гасія, відповідно; $[Q]$ - концентрація гасія; K_{sv} - константа Штерна-Фольмера.

Табл.1. Параметри гасіння триптофанової флуоресценції мембранних білків іонами Cs^+ , Γ та акріламідом та індуктивно-резонансного переносу енергії з триптофанілів на пірен.

Доза, Гр	Досліджувані параметри					
	Гасіння Cs^+ , K_{sv}, M^{-1}	Гасіння Γ		Гасіння акріл-амідом K_{sv}, M^{-1}	$\bar{X}, \text{nm}$ $1-\beta$	
		f	K_{sv}, M^{-1}			
0	11.35	0.303	3.33	1.79	-1.29	0.25
10	10.89	0.303	2.63	1.65	-1.27	0.26
10^2	9.98	0.303	2.13	1.47	-0.90	0.35
$5 \cdot 10^2$	7.94	0.167	1.93	1.27	-2.25	0.17
10^3	6.36	0.115	1.87	1.02	-2.46	0.12

Структурні зміни плазматичних мембран ...

Наведені результати (Табл.1) свідчать, що величина K_{sv} знижується на 78% ($p < 0,05$) в умовах радіаційного впливу в дозі 10^3 Гр, порівняно з неопроміненим контролем, що вказує на значні зміни структури білків під впливом радіації.

В якості аніонного гасія використовували Γ . Той факт, що графіки гасіння триптофанової флуоресценції мембранних білків іонами Γ відхиляються до осі абсцис (рис.3), вказує на існування двох типів флуорофорів, один з яких не доступний для гасія, що зумовлює необхідність використання модифікованої форми рівняння Штерна-Фольмера [21]:

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

де: f - доля початкової флуоресценції, яка доступна для гасіння.

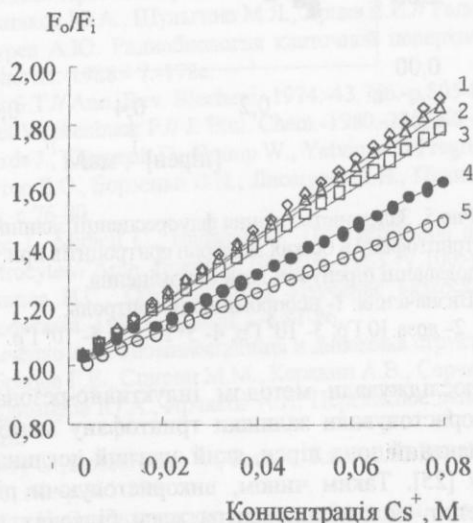


Рис.2. Графіки Штерна-Фольмера для гасіння триптофанової флуоресценції білків еритроцитарної мембрани іонами Cs^+ . Визначення: 1- неопромінений контроль; 2- доза 10^1 Гр; 3- 10^2 Гр; 4- $5 \cdot 10^2$ Гр; 5- 10^3 Гр.

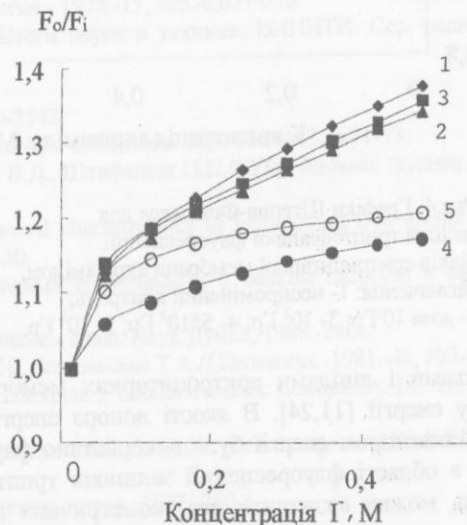


Рис.3. Графіки Штерна-Фольмера для гасіння триптофанової флуоресценції білків еритроцитарної мембрани іонами Γ . Визначення: 1- неопромінений контроль; 2- доза 10^1 Гр; 3- 10^2 Гр; 4- $5 \cdot 10^2$ Гр; 5- 10^3 Гр.

Із даних наведених в таблиці добре видно, що величина K_{sv} зменшується на 78% ($p < 0,05$), а f - на 163% ($p < 0,05$) під дією радіації в дозі 10^3 Гр, порівняно з неопроміненим контролем. Таким чином, дані по гасінню триптофанової флуоресценції іонами Γ вказують на значні зміни поверхневої структури мембранних білків, хоча можна припустити, що в зниження величини f , особливо при дозах 10^2 та 10^3 Гр, певний внесок має ефект окислення триптофанілів вільними радикалами води.

Але триптофанові залишки, які локалізовані в неполярній внутрішній області білків, недоступні для іонів Cs^+ та Γ . Проте нейтральний гасій акріламід здатний гасити флуоресценцію скритих залишків триптофану в білках [22]. На рис.4 приведені дані по гасінню триптофанової флуоресценції білків акріламідом, які аналізували відповідно з рівнянням 1. Результати розрахунків (Табл.1) показали, що під дією радіації в дозі 10^3 Гр величина K_{sv} зменшується на 75% ($p < 0,05$) порівняно з неопроміненим контролем. Таким чином, дані по дослідженню гасіння власної флуоресценції мембранних білків вказують на те, що іонізуюча радіація спричиняє значні зміни структури білків, які стосуються як поверхні білкових глобул, так і внутрішнього гідрофобного ядра молекул білків.

Зниження величини константи Штерна-Фольмера, що спостерігається для всіх використаних гасій, свідчить про зменшення структурної рухливості мембранних білків. Відомо [23], що структурна динаміка мембранних білків тісно пов'язана із зв'язком ліпідного компонента мембрани. Розрахунки коефіцієнта кореляції змінювання величини K_{sv} при гасінні триптофанової флуоресценції іонами Cs^+ та мікров'язкості анулярних (-0,962) та вільних ліпідів (-0,989), K_{sv} при гасінні іонами Γ (-0,924; -0,875) та K_{sv} при гасінні акріламідом (-0,980; -0,991) вказують на тісний взаємозв'язок між збільшенням мікров'язкості ліпідного компонента мембран та зменшенням структурної динаміки білкових молекул під впливом радіації на еритроцитарні мембрани.

Структурною основою біомембран є білок-ліпідні комплекси і можна припустити, що зміни структури ліпідного бішару та мембранних білків, які спостерігаються, можуть генерувати зміни просторової структури білкового і ліпідного компонентів мембрани. Просторові взаємовідносини

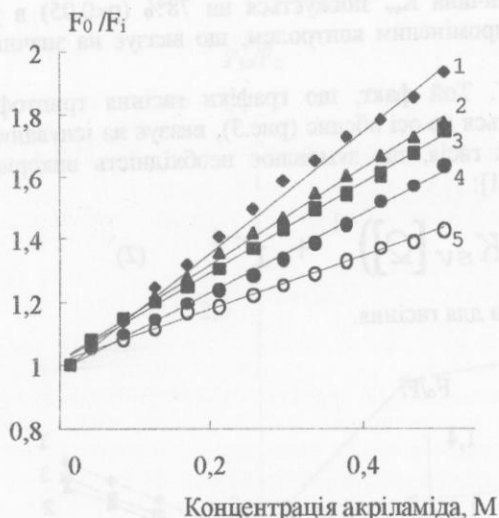


Рис. 4. Графіки Штерна-Фольмера для гасіння триптофаної флуоресценції білків еритроцитарної мембрани акріламідом. Визначення: 1- неопромінений контроль; 2- доза 10 Гр; 3- 10^2 Гр; 4- $5 \cdot 10^2$ Гр; 5- 10^3 Гр.

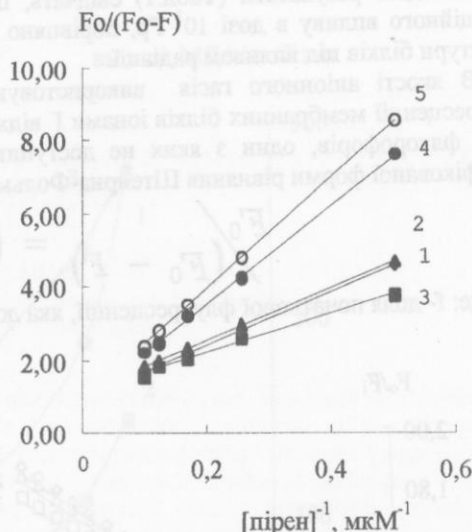


Рис. 5. Залежність гасіння флуоресценції залишків триптофану в білках мембран еритроцитів при додаванні пірену від дози опромінення. Визначення: 1- неопромінений контроль; 2- доза 10 Гр; 3- 10^2 Гр; 4- $5 \cdot 10^2$ Гр; 5- 10^3 Гр.

між білками і ліпідами еритроцитарних мембран досліджували методом індуктивно-резонансного переносу енергії [11,24]. В якості донора енергії використовували залишки триптофану мембранних білків. Акцептором енергії було використано флуоресцентний зонд пірен, який здатний поглинати при 345 нм в області флуоресценції залишків триптофану [25]. Таким чином, використовуючи пірен як акцептор, можна визначити два геометричних параметри: положення центра маси білкових донорів флуоресценції ($\bar{X}$) та їх долю $(1-\beta)$, віддалену від ліпідного бішару більш ніж на 3,2 нм [26]:

$$\frac{F}{F_0} \approx \exp\left[-\alpha B(\bar{X}) C_a N_A 4\pi R_0^3 / 3V\right]$$

$$\frac{F}{F_0} \approx (1 - \beta) + \beta \exp(-\alpha P C_a)$$

(3)

де: F та F_0 - інтенсивність флуоресценції залишків триптофану у відсутності і після додавання пірену, відповідно; N_A - число Авогадро; V - об'єм мембрани; B - коефіцієнт доступності; R_0 - критична відстань переносу енергії, яка для пари триптофан-пірен становить 2,66 нм [9]; C_a - концентрація пірену; параметр P залежить від геометрії мембрани, а параметр α - від обертальної рухливості і взаємної орієнтації донорів та акцепторів [3].

При додаванні пірену до суспензії еритроцитарних мембран відбувається гасіння флуоресценції триптофанових залишків (рис.5), що дозволяє розрахувати як $(\bar{X})$, так і $(1-\beta)$ за методом [24,26]. Результати свідчать (Табл.1), що під дією радіації в дозі 10^3 Гр відбувається переміщення мембранних білків на 1,17 нм, а доля віддалених від ліпідного бішару білків зменшується в 2,1 рази ($p < 0,05$) порівняно з неопроміненим контролем.

Таким чином, використання флуоресцентних методів дозволило одержати нові дані про характер структурних змін плазматичної мембрани еритроцита під дією радіації. Отримані результати вказують на зростання мікров'язкості як анулярних, так і вільних ліпідів мембран в результаті радіаційно-індукованого перекисного окислення ліпідів. Цей процес тісно пов'язаний зі структурними перебудовами мембранних білків, які характеризуються зниженням структурної рухливості білків під дією радіації. Дані зміни обумовлюють процес зміни взаємного розташування мембранних білків і ліпідів в еритроцитарній мембрані. Очевидно, структурні перебудови білків і ліпідів, що спостерігаються, лежать в основі змін проникності еритроцитарної мембрани і активності мембранних ферментів під дією радіації [27,28]. Привертає до себе увагу той факт, що більшість параметрів, які досліджували, і які характеризують структурний стан мембран, зазнають різких змін в дозі 10^2 Гр. Це

підтверджує отримані раніше дані [29] про наявність екстремумів в структурно-функціональних властивостях мембран під дією радіації.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що під дією радіації відбуваються значні зміни структури еритроцитарних мембран, які характеризуються глибокими структурними змінами білків, мікров'язкості ліпідів та зміною просторової організації білок-ліпідних комплексів. Очевидно, радіційно-індуковані перебудови плазматичних мембран еритроцитів спричиняють зміни проникності мембрани та активності мембранних ферментів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Токин И.Б. Проблемы радиационной цитологии.-М.: Медицина, 1974.-319с.
2. Колесников Ю.А., Шульгина М.Я., Ярцев Е.И.// Радиобиология.- 1975.-15, №5.-с.671-675.
3. Сунгурев А.Ю. Радиобиология клеточной поверхности// Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. радиационная биология.-1988.- 7.-178с.
4. Singer S.T.// Ann. Rev. Biochem.-1974.-43, №6.-p.805-833.
5. Bennet V., Stenbuck P.// J. Biol. Chem.-1980.-225, №6.- p.2540-2548.
6. Edwards J., Chapman D., Cramp W., Yatvin M.// Progress in biophys. and Molec. Biol.-1984.-43.-p.71-93.
7. Пристер Б.С., Борзенко В.Н., Лисецкий Л.Н., Паникарская В.Д., Штифанюк П.П.// Укр. биохим. журнал.-1996.-68, №6.-с.76-80.
8. 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.
9. Литвинов И.С., Образцов В.В. Изучение вязкости свободных и связанных с белком липидов в мембранах// Биофизика.-1982.- 27, вып.1.-с.81-86.
10. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков.- Киев: Наук.Думка, 1988.-280с.
11. Добрецов Г.Е., Спириин М.М., Корякин А.В., Серчаков А.И., Борщевская Т.А.// Биохимия.-1981.-46, №3.-с.504-511.
12. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.-М.: Наука, 1972.-252с.
13. Lowry O., Rosebrough W., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent// J.Biol.Chem.- 1951.-193, N2.-p.265-279.
14. Бейли Н. Статистические методы в биологии.-М.: Изд. Иностран. литер., 1962.-260 с.
15. Закс Л. Статистическое оценивание.-М.: Статистика, 1976.- 598 с.
16. Law J. The consistency of FeSO₄ dosimetry// Phys. Med. Biol. 1970, v.15, N2, 301-305.
17. Древаль В.И.// Радиобиология.-1993.-33, №1.-с.45-48.
18. Nakazawa T., Nagatsuka S.// Int. j. Radiat. Biol.-1980.-38, N3.-p.537-544.
19. Черницкий Е.А. Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.-Минск: Наука и техника, 1981.-215с.
20. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.-М.: Мир, 1986.-496с.
21. Lehrer S.S., Leavis P.C. Solute quenching of protein fluorescence // Meth. Enzymol.-1977.-49, N2.-p.222-236.
22. Eftink M.R., Jameson D.M.// Biochemistry.-1982.-21, N18.-p.443-450.
23. Курський Н.Д., Кучеренко С.М. Біомембранологія. К., Вища школа, 1993, 266с.
24. Добрецов Г.Е.// Украинский биохимический журнал, 1984, т.56, №2, с.211-222
25. Добрецов Г.Е., Спириин М.М., Карманский И.М.// Биохимия.- 1980.-45, №4.-с.622-628.
26. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов.-М.: Наука, 1989.- 277с.
27. Фоменко Б.С., Акаев И.Г.// Успех современной биологии.- 1984, т.97, №1.- с.146-158.
28. Рыскулова С.Г. Радиационная биология плазматических мембран. М., Энергоатомиздат, 1986, 128с.
29. Поливода Б.И., Конев В.В., Попов Г.А. Биофизические аспекты радиационного поражения биомембран.-М.: Энергоатомиздат, 1990.-160с.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОБ'ЄКТИ

УДК 537. 868 + 577. 352. 868

НИЗКОИНТЕНСИВНЫЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЕ МИКРОВОЛНЫ И
БИООБЪЕКТЫ: ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ И БИОФИЗИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ

Б. Г. Емец

Харьковский государственный университет, 310077, Харьков, пл. Свободы, 4
Поступила в редакцию 14 сентября 1998 г.

Рассмотрены биологические эффекты действия низкоинтенсивных уровней излучения электромагнитных микроволн. Показано, что, несмотря на низкие уровни излучения, микроволновое загрязнение среды представляет собой экологически значимый фактор. Предложен механизм влияния микроволн на биобъекты, в основе которого лежит преобразование электромагнитной энергии в тепловую с последующими эффектами движения элементов межклеточной жидкости (включая содержащийся в ней воздух) в поле температурного градиента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биологические клетки, биологические мембраны, перемешиваемый примембранный слой воды, конвективное движение, электромагнитное поле, микроволны, ближняя зона излучателя.

Широкое развитие радио- и телекоммуникаций, других электронных средств обусловило присутствие в настоящее время на Земле большого числа искусственных источников электромагнитного поля (ЭМП), что вызвало значительное "электромагнитное загрязнение" среды обитания человека. С каждым годом повышается уровень электромагнитного фона; возрастает и число публикаций о неблагоприятном воздействии на человека и биосреду микроволн не только больших мощностей, но и низкоинтенсивных, фоновых ЭМ полей. Имеются убедительные данные о биологическом влиянии микроволн сверхвысокочастотного (СВЧ) и крайне высокочастотного (КВЧ) диапазонов, плотность потока мощности (ППМ) которых лежит в пределах $0,01 - 10 \text{ мВт/см}^2$ [1 - 3]. Верхний предел указанной интенсивности таков, что не обеспечивает при облучении человека местного нагрева тканей выше $0,1^\circ\text{C}$. Считается [4], что при любых других способах теплового воздействия такой нагрев не вызывает явлений, подобных наблюдаемым в случае микроволнового облучения. Поэтому в литературе установилась тенденция называть соответствующие эффекты действия столь низкоинтенсивных микроволн нетепловыми. (По нашему мнению, такое название не вполне соответствует истине). Именно с низкими интенсивностями микроволнового излучения могут столкнуться (и уже сталкиваются) определенные категории населения; именно поэтому необходимо рассмотреть, имеются ли объективные обоснования потенциальной опасности низкоинтенсивных излучений для живых систем. Это, безусловно, важно, поскольку необходимо помнить о возможных перспективных применениях ЭМ излучений и внимательно подходить к интерпретации биологических эффектов влияния микроволн с тем, чтобы, с одной стороны, и персонал, по долгу службы работающий с соответствующими полями, и широкие массы людей не подвергались неоправданно высоким дозам облучения, а с другой, - чтобы исследования и разработки в области микроволновой техники и ее возможных практических применений не подвергались необоснованному сдерживанию или ограничению.

С этой целью в настоящей работе, в пределах доступной нам литературы, рассмотрено современное состояние исследований по биологическому действию низкоинтенсивных микроволн; предложен механизм их взаимодействия с биосредами.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ МИКРОВОЛН

Влияние на нервную систему

Установлено, что изменения биоэлектрической активности головного мозга людей служит одним из характерных проявлений реакций центральной нервной системы на воздействие ЭМП. В электроэнцефалограмме профессионалов, длительное время подвергавшихся воздействию микроволн низкой интенсивности регистрируются различные формы судорожной активности, часто возникающие при сенсорных провокациях [2]. Наблюдены изменения биоэлектрической активности отдельных структур мозга под влиянием модулированного микроволнового излучения малой мощности [5,6].

Важная роль в поддержании надежности и стабильности функционирования мозга, а, следовательно, и дееспособности человека принадлежит гематоэнцефалическому барьеру (ГЭБ).

Низкоинтенсивные электромагнитные микроволны и биообъекты ...

Облучение микроволнами способствует увеличению проницаемости ГЭБ, а, значит, повышает вероятность проникновения в ликвор ряда биологически активных веществ, нежелательных для нормальной деятельности мозга [7,8]. Влияние низкоинтенсивных микроволн на мозговое кровообращение, как отмечается в [7], может явиться причиной мозгового инсульта.

Кожная рецепция низкоинтенсивных микроволн отмечается в [9]. В этой работе указано, что при облучении ладони человека волнами длиной 5 – 7 миллиметров испытуемые сообщали об ощущениях ими покалывания, легкого нагревания. В [10] отмечается сравнительно большая продолжительность латентного периода кожных сенсорных реакций на СВЧ- и КВЧ-воздействия. Этот период на три порядка превышает время реакции в зрительной, слуховой, сенсорных системах. Авторы [10] наблюдали сокращение на 10 % времени простой двигательной реакции на предъявление звукового стимула, если рука испытуемого предварительно подвергалась 20-минутному облучению волной 7 мм.

Влияние на иммунную систему

Результаты исследований влияния микроволнового облучения дают основание считать, что в организме при таком воздействии угнетаются процессы иммуногенеза [11 – 16]. СВЧ-облучение отягощает течение инфекционного процесса [17].

В опытах на животных получено, что микроволновое облучение (ППМ равна 0,05 – 0,5 мВт/см²) обуславливает развитие специфических явлений аутоиммунитета [18 – 20]. Суть аутоиммунитета состоит в том, что в организме образуются антитела или сенсибилизированные лимфоциты, направленные против собственных тканей. Известно, что иммунная система в норме обеспечивает постоянное функционирование естественной иммунологической толерантности, - это является одним из основных условий существования организма как единой целостной системы. Нарушение функции защиты приводит к тому, что специфическая иммунная реакция направляется против собственных тканей, клеток и их составных частей. В соответствии с концепцией аутоиммунитета, основу всех аутоиммунных состояний составляет, в первую очередь, иммунодефицит по тимус-зависимой клеточной популяции лимфоцитов. Установлено, что низкоинтенсивные микроволны (ППМ равна 0,05 мВт/см²) приводят к угнетению Т-лимфоцитов [16]. Облучение стимулирует розеткообразование, которое в период последствия сменяется угнетением. Эти результаты заставляют пересмотреть устоявшиеся представления о влиянии ЭМП на иммунную систему организма, согласно которым их действие сводится только к влиянию на факторы неспецифической защиты [3]. Обнаружение стимулирующего действия микроволн на процесс развития аутоиммунитета заставляет согласиться, что ранее степень вредного влияния ЭМП на иммунную систему недооценивалась.

Влияние на эндокринную и нейрогуморальную реакции

Микроволны, как правило, стимулируют гипофизарно-адреналовую систему, что сопровождается увеличением содержания адреналина в крови, активацией процессов свертывания крови [21]. Считается установленным, что одной из систем, участвующих в ответной реакции организма на воздействие факторов внешней среды, является система гипоталамус - гипофиз – кора надпочечников. Это подтверждено в случае микроволн в [22]. В работе [23] обнаружено кратковременное повышение уровня тироксина в сыворотке крови у крыс после их облучения микроволнами с ППМ, равной 1 мВт/см².

В [24] показано, что при воздействии нетепловых уровней ЭМП на животных, адаптированных к другим физическим факторам среды (высокая температура, гипоксия и др.), особи теряют приобретенную устойчивость, т.е. происходит декомпенсация.

Нарушения репродуктивной функции обычно связаны с изменением регуляторных параметров со стороны нервной и нейроэндокринной систем. Результаты экспериментальных исследований [25] указывают на наличие риска для здоровья женщин, подвергающихся микроволновому облучению. Авторами [26] выявлено угнетение гормональной функции гонад у регулировщиков СВЧ-аппаратуры. Уровень тестостерона в крови у лиц обследованной группы был гораздо ниже, чем в контроле.

Биологические эффекты модулированных микроволн

Экспериментально показано, что воздействие на организм микроволн, модулированных частотами мозга (альфа-диапазон электроэнцефалограммы человека) вызывает значительный биологический эффект. Продемонстрировано наличие амплитудных и частотных “окон” в реакциях биосистемы на меняющееся ЭМП [27,28].

Роль амплитудной модуляции в реакциях центральной нервной системы кролика на микроволны низкой интенсивности (ППМ равна $0,3 \text{ мВт/см}^2$) отмечена в [29]. Эффект наблюдался при импульсном режиме облучения и отсутствовал при непрерывном режиме.

Так называемый “слуховой эффект на СВЧ” получен при облучении людей-добровольцев в импульсном режиме [30]. В [31 – 34] рассмотрена физическая природа эффекта, состоящая в поглощении энергии ЭМ излучения и преобразовании ее в механическую в тканях головы, обладающей свойствами акустического резонатора, и передаче механических колебаний к улитке органа слуха посредством костной проводимости.

При совпадении частоты следования низкоинтенсивных СВЧ-импульсов с частотой сердечного цикла нарушается ритм сердцебиений [35].

Принимая во внимание важность результатов работ по изучению эффектов биологического влияния модулированных ЭМ полей, правительство США уменьшило нормативные уровни в гигиеническом стандарте страны в пять раз по сравнению с предыдущим стандартом (действовавшим до 1995 г.), для случаев, когда несущая частота модулирована с глубиной 50 % или более, а частота модуляции находится в пределах 3-100 Гц.

Влияние на микроорганизмы, клетки, и мембранные структуры

Изучение первичных звеньев реакции живых организмов на ЭМ облучение удобно проводить на одноклеточных организмах и изолированных клетках, поскольку у этих живых систем реакция к внешним воздействиям не опосредована рецепторными механизмами, прежде всего, нервной системой. Сравнительно большое число работ на таких объектах выполнено в миллиметровом диапазоне длин волн. В 70-х годах появилась серия публикаций, объединенных идеей о резонансном взаимодействии миллиметрового излучения с собственными когерентными колебаниями в живых системах. Обнаружено частотно-селективное влияние миллиметровых волн. Подробный обзор работ представлен в монографии [4].

Спустя несколько лет в печати появились работы [36,37], ставящие под сомнение достоверность результатов, приведенных в упомянутых выше публикациях. Например, в [38] сообщалось о наблюдении индукции колицина, характеризующейся резкой зависимостью от частоты миллиметрового облучения. Однако, в [39] другой автор пишет о безрезультатности своих попыток воспроизвести, замеченное в [38], частотно-селективное влияние микроволн. (Обсуждение вопроса будет проведено далее).

Бактерицидное действие низкоинтенсивных миллиметровых волн (ППМ равна $4,5 \text{ мВт/см}^2$) зафиксировано при облучении кишечной палочки и золотистого стафилококка [40].

Влияние миллиметрового облучения на скорость деления клеток наблюдало в экспериментах с культурой кишечной палочки (длина волны 2,2 мм, интенсивность $0,007 \text{ мВт}$). Процесс размножения клеток сильно ингибировался [41].

Общепринятыми являются соображения относительно решающей роли мембран в формировании биологического ответа, согласно которым, именно они определяют, в основном, реакцию клетки на внешнее физическое воздействие. Эта роль биомембран в функционировании клеток различного типа и специализации осуществляется благодаря способности встраивать белки-рецепторы в оболочку клетки, организовывать водное пространство внутри и снаружи клетки, а также регулировать энергетические и биохимические процессы в клетке путем изменения диффузионных ограничений для ионов и других клеточных субстратов. Имеются публикации об увеличении после СВЧ-облучения проницаемости эритроцитарных мембран для ионов калия [36], для диффузионного водного транспорта [42] и др.

Комбинированное действие на живой организм микроволн и других внешних факторов

Низкоинтенсивные ЭМ поля СВЧ и КВЧ диапазонов могут выступать как защитный фактор от воздействия другого физико-химического фактора. Первые работы в этом направлении были выполнены в комбинации “ионизирующее и неионизирующее излучение”. У крыс, облучавшихся в течение 25 дней по 30 минут микроволнами (длина волны 10,7 см, ППМ 10 мВт/см^2) в три раза против обычного понизилась смертность от последующего воздействия (гамма-лучи, 600 рентген) [43]. Противолучевой защитный эффект в различных условиях применения микроволн получен в [44 – 47]. Ослабление острого летального радиационного поражения путем применения “качания” частоты низкоинтенсивного генератора (5 мкВт/см^2) сантиметрового диапазона (частота 2 – 8 ГГц) получена в [48,49].

Исследовались и другие сочетания факторов: микроволны и инфразвук [50, 51], микроволны и ультразвук [52], микроволны и гипероксия или гипоксия [53 – 55], микроволны и перегрузки [56],

Низкоинтенсивные электромагнитные микроволны и биообъекты ...

микроволны и ультрафиолет [57, 58], микроволны и химические препараты [59 – 61], микроволны и аллергены [62].

В ряде работ показано усугубляющее влияние комбинированного действия микроволн и ионизирующего излучения – например, на импринтинг у цыплят, облученных в раннем эмбриогенезе [63], на репродуктивную функцию у мышей [64], на гематоэнцефалический барьер [65,66], на головной мозг [67], на поведенческие реакции [68].

В работе [69] показано, что даже однократное воздействие СВЧ-поля (9,8 ГГц; 10 мкВт/см²) может модифицировать эффект продолжительного приема известного адаптогена - элеутерококка, вплоть до инвертирования его влияния.

Показательны результаты применения миллиметровых волн. При комбинированном действии ЭМ поля КВЧ диапазона с рентгеновским облучением или противоопухолевыми препаратами получено снижение на 25 % поражающего влияния на костный мозг [70]. Исследования гемопоза при комбинированном действии показало, что используемое мм излучение избирательно влияет на отдельные ростки кроветворной системы. Защищенными от повреждающего действия рентгеновского излучения или противоопухолевых препаратов при помощи мм излучения оказываются клетки эритроидного и миелоидного рядов; клетки лимфоидного ряда не защищаются [71,72]. Общий митотический индекс при комбинации мм волн с рентгеновским излучением или противоопухолевыми препаратами всегда оставался на уровне контроля [71].

Для получения биологического эффекта немаловажным является последовательность воздействия. В случае, когда животное облучалось мм волнами перед рентгеновским облучением, поражающий эффект от ионизирующего излучения понижался на 25 %, т.е. мм излучение выступало в качестве сенситизатора рентгеновского облучения, значительно подавляя костно-мозговое кроветворение [73]. Для получения максимального биологического эффекта требовалось облучение с пороговой интенсивностью выше 9 мВт/см², экспозиция 1 час и частота излучения, по словам авторов [74], соответствующая “резонансной”, т.к. при изменении длины волны на 0,1 мм биологический эффект исчезал. Частотно-селективный характер биологического действия мм волн проявлялся при облучении различных участков тела животного (бедро, бок, затылок). Автор [75] считает, что мм излучение изменяет характер иммунного ответа организма; этим и обусловлен наблюдаемый защитный эффект. Для проверки этого предположения использовался тест аллогенного ингибирования лимфоцитами несингенных стволовых клеток. Соответствующие исследования показали, что при предварительном микроволновом облучении восстановление цитотоксической функции лимфоцитов в лимфоузлах мышей протекает почти в два раза быстрее, чем при действии только рентгеновского излучения. Миграция лимфоцитов в узлы происходит при комбинированном облучении в три раза быстрее, чем при действии только ионизирующей радиации.

Исследование комбинированного действия мм волн в сочетании с противоопухолевым препаратом циклофосфаном выявило усиление торможения роста опухолей вплоть до их полного рассасывания при почти стопроцентной выживаемости животных. В то же время, при действии одного препарата наблюдалась гибель животных за счет токсичности циклофосфана [76].

Результаты исследования биологического воздействия микроволновых ЭМП на биологические объекты свидетельствуют о возможности отрицательного влияния мощностей сравнительно малых уровней, характерных для большинства случаев облучения как для основного населения, так и для профессионалов, по долгу службы работающих с ЭМ колебаниями. Наиболее чувствительными к ЭМ полям являются нервная, иммунная, эндокринная и репродуктивная системы организма. При модулированных излучениях особую значимость, очевидно, приобретает уже не только уровень интенсивности поля, а сам факт сложного режима воздействия. В этих случаях даже при кратковременных облучениях у человека может возникнуть целый комплекс неврологических и психосоматических реакций, а также тяжелые патологические проявления в условиях сенситизации к ЭМ полям отдельных систем организма другими факторами среды. Возможны и другие проявления неблагоприятного воздействия ЭМ полей на организм.

Для правильного выбора средств защиты живого организма от неблагоприятного действия ЭМ полей необходимо исследовать первичные физико-химические механизмы процесса, уточнить подробности влияния на мембранные структуры клетки. На этой основе появится возможность понять биологическую роль модуляции поля, рассмотреть ход системных реакций, в результате которых формируется окончательный биологический ответ организма.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ МИКРОВОЛН

Рассмотрение биофизических механизмов влияния микроволн необходимо не только для создания более эффективных средств защиты живых организмов, но и для понимания процессов, обеспечивающих полезные лечебные результаты, о которых сообщено в [4, 77-93]. Как нам представляется, целесообразно вначале рассмотреть механизм влияния микроволн с основным

компонентом живых систем – с водой. Затем следует перейти к модельным системам – водным растворам с диэлектрическими включениями; после чего рассмотреть суспензии клеток в растворе. Далее – проанализировать жидкие среды с микроорганизмами, чтобы затем приступить к рассмотрению процессов, происходящих при взаимодействии СВЧ- и КВЧ-полей с организмами человека и животных.

Механизм взаимодействия микроволн с водой

Вода, как известно, сильно поглощает энергию СВЧ- и КВЧ-диапазонов. Толщина скин-слоя при облучении на длине волны 3 см составляет 0,34 см [94], а на длине волны 2 мм – 0,1 мм [95]. Из этого следует, что, поскольку вся падающая мощность таких микроволн рассеивается в тепло в достаточно тонком слое воды, то объем жидкости становится неравномерно нагретым. В неравномерно нагретой жидкости при определенных условиях возможно механическое равновесие. Если облучаемая жидкость не выведена из состояния механического равновесия (например, при низких ППМ ЭМ излучения), то реализуется чисто теплопроводный режим переноса. Если в жидкости содержатся воздушные пузырьки, то они будут перемещаться в поле температурного градиента за счет термокапиллярного эффекта [96]. Из [97,98] следует, что в стоксовском режиме воздушный пузырек радиуса R движется со скоростью

$$V = -\nabla T \cdot d\sigma/dT \cdot R/3\eta, \quad (1)$$

где T – температура; ∇T – температурный градиент, поддерживаемый вдали от пузырька; σ – коэффициент поверхностного натяжения; η – динамическая вязкость жидкости. (В воде, помимо растворенного воздуха, всегда присутствует воздух в свободном состоянии – микропузырьки. Окончательно удалить воздушные пузырьки не удастся, даже приняв специальные меры по дегазации [99]. Следует учесть, что в нагретом слое воды растворимость газа понижается; это способствует образованию здесь новых микропузырьков). Движущиеся в поле температурного градиента пузырьки сталкиваются между собой и объединяются (коалесцируют). На укрупненные пузырьки действует большая подъемная сила, поэтому они быстрее всплывают и покидают жидкость. Так осуществляется дегазация воды по пузырьковому механизму.

Если же в объеме реализуется конвективное движение, иначе говоря, происходят крупномасштабные перемещения масс жидкости, то последние активно выносятся на свободную поверхность; из-за этого свободный воздух получает благоприятную возможность покинуть жидкость, – в результате, дегазация идет гораздо быстрее. (Эффективная дегазация воды, обусловленная низкоинтенсивным микроволновым облучением наблюдается в [100]). Из курса гидромеханики [101] известно, что появление конвективной составляющей теплового потока, нарушающей чисто теплопроводный механизм переноса тепла, происходит при достижении критического числа Рэлея

$$Ra = g \cdot \beta \cdot \Delta T \cdot L^3 \cdot \rho / (\eta \cdot k), \quad (2)$$

здесь g – ускорение свободного падения; β – коэффициент теплового расширения; L – характерная длина полости; ΔT – характерная разность температур; ρ – плотность жидкости; η – динамическая вязкость; k – коэффициент теплопроводности. Для воды критическое число Рэлея определено в [102]: $Ra = 1700 \pm 51$. Оценка показывает, что в случае образца воды в форме куба с ребром, равным 1 см, конвективный режим наступает при разности температур на его гранях не менее 0,3 °C.

Рассмотрим, как будет происходить нагрев воды при помещении образца в ближней зоне микроволнового излучателя. В случае излучения из открытого конца волновода эта зона простирается по направлению излучения на расстояние, равное нескольким длинам волн. Отметим, что согласно электродинамике антенн, ближняя зона характеризуется наличием нерегулярностей в распределении многочисленных амплитуд напряженности ЭМ поля вдоль направления распространения волны [103]. Это значит, что в объеме жидкого образца, находящегося в ближней зоне, из-за наличия указанных нерегулярностей возникают фрагменты более нагретой жидкости, чередующиеся с менее нагретыми ее участками. Из-за этого разность температур на границах кубического образца будет меньше, чем в случае, когда нагревается только одна передняя грань водного “куба” (как это происходит при помещении образца в промежуточной или в дальней зонах излучения). Поэтому, может оказаться, что при одинаковой небольшой интенсивности в волноводном тракте излучателя для образца, размещенного в промежуточной или в дальней зонах, выполняется условие Рэлея (2) и наблюдается конвекция, а в образце, находящемся в ближней зоне – конвекция отсутствует. В последнем случае реализуется режим механического равновесия; воздушные микропузырьки дрейфуют по направлению к “теплым” фрагментам; в самих “теплых”

фрагментах из-за повышенной температуры возникают новые воздушные пузырьки (т.к. уменьшается растворимость газа).

Изложенные соображения были проверены нами экспериментально. Облучение низкоинтенсивными микроволнами ($\lambda = 3,2$ см; ППМ около 1 мВт/см²) ампулы с водой, помещенной в промежуточной зоне обеспечивало конвекцию и, как следствие, эффективно дегазировало жидкость, понижало количество воздушных пузырьков в ней. Экспонирование указанной ампулы в ближней зоне воду не дегазировало, количество же воздушных пузырьков увеличивалось. Облучение воды миллиметровыми волнами с длинами 4 мм, 6 мм, 7 мм, и 8 мм (ППМ равна 1 мВт/см²) мы осуществляли путем погружения диэлектрического волновода в жидкость. В этом случае, конечно, реализовался режим облучения в ближней зоне; как следствие, получено возрастание количества воздушных микропузырьков в воде.

На возможность возникновения конвекции в облучаемой жидкости указывалось в ряде работ. В [104] наблюдается конвекция в воде, налитой в кювету сечением 1 см $\times$ 1 см, при погружении в нее тefлонового излучателя специальной формы – в виде “вилки”. (Длина волны – 8 мм, мощность в волноводном тракте – 15 мВт). Возникновение конвекции регистрировалось по изменению светорассеяния на частицах туши, предварительно введенной шприцом на дно кюветы.

Экспериментально показано, что при фиксированной температуре и давлении в воде имеется равновесное соотношение между количеством растворенного воздуха и воздуха в свободном состоянии. Если изменить температуру, например, резко охладив жидкий образец, то новое равновесное соотношение будет устанавливаться сравнительно медленно, поскольку осуществляется по диффузионному механизму. Такое медленное восстановление равновесия принято называть проявлением “памяти” жидкости о полученном ранее воздействии. Низкоинтенсивное микроволновое облучение воды приводит к смещению равновесия между количествами растворенного и свободного воздуха в ней [105].

Суммируя вышеизложенное, следует сказать, что в основе влияния низкоинтенсивных микроволн на воду лежит преобразование их электромагнитной энергии в тепловую и соответствующие эффекты поведения растворенного и свободного воздуха (пузырьки) в поле температурного градиента.

Механизм взаимодействия ЭМ излучения с образцами воды, содержащими диэлектрические включения

Вода в мм диапазоне длин волн, конкретно, при $\lambda = 8$ мм имеет следующие значения компонент комплексной диэлектрической проницаемости: $\epsilon' \approx 20$; $\epsilon'' \approx 30$. При помещении в воду макромолекул, например, биополимеров, последние окружаются гидратной “оболочкой”, т.н. связанной водой. Поскольку для связанной воды при этой длине волны $\epsilon' \approx 5$; $\epsilon'' \approx 0$, а для типичных макромолекул $\epsilon' \approx 2$, $\epsilon'' \approx 0$, то комплекс “макромолекула – связанная вода” следует считать диэлектрическим включением. Опытная проверка подтвердила, что раствор биополимера имеет диэлектрическую проницаемость, сниженную по сравнению с диэлектрической проницаемостью воды [106, 107]. В [107] указывается, что поглощение ЭМ энергии водой, безусловно, влияет на характер гидратации и, следовательно, может привести к изменению диэлектрической проницаемости суспензии. Однако, при низкоинтенсивных уровнях падающей мощности эти изменения столь незначительны, что экспериментально не зафиксированы. В [108] проанализированы данные о механизмах поглощения излучения мм диапазона важнейшими биополимерами (белками и нуклеиновыми кислотами) и их компонентами. Показано, что в случае глобулярных белков в таком механизме могут участвовать нормальные колебания, отвечающие коллективным движениям всей макромолекулы или отдельных доменов. Особенности микроволнового поглощения в гемоглобине, лизоциме и некоторых полипептидах указывают также на возможность проявления дипольных релаксационных процессов и низкочастотного края полосы поглощения, связанной с растяжением и изгибом водородных связей в цепи пептидного остова. Акцентируется, что отмеченные колебательные состояния могут играть значительную роль в передаче биологической информации на молекулярном уровне, а также в процессах конформационных переходов и кооперативного связывания с лигандами. При рассмотрении ДНК в [108] обращено внимание на проявляющиеся в диапазоне СВЧ низкочастотные колебания, соответствующие различным коллективным модам – дыхательные движения сахарофосфатного остова, связанные колебания оснований нуклеиновых кислот, продольные акустические колебания, частота которых зависит от длины цепи ДНК и может соответствовать мм диапазону.

В [109] получено, что пятичасовое облучение 5 %-го водного раствора нативного гемоглобина ($\lambda = 7,35$ мм, ППМ = 1 мВт/см², температура опыта 37 °С) увеличивает прочность связи между гемом и белком. Мы предположили, что этот факт может найти отражение в изменении числа гидратации гемоглобина и поставили соответствующий эксперимент. Аппаратура ядерного магнитного резонанса (ЯМР), примененная нами, оказалась недостаточно чувствительной для этой

цели. Что касается изменения соотношения “растворенный воздух – свободный воздух” в растворе гемоглобина, то СВЧ-облучение низкой интенсивности (в ближней зоне) повысило концентрацию свободного воздуха в пробе, причем прирост числа пузырьков оказался тем меньшим, чем выше содержание гемоглобина в образце.

В литературе время от времени выдвигаются соображения о возможности “специфического” нагрева части облучаемой системы относительно всего объема среды (например, повышение температуры включений в суспензии без заметного нагрева всей взвеси). В [110, 111] показано, что избирательное повышение температуры ΔT зависит от квадрата диаметра частицы: $\Delta T = K \cdot N \cdot d^2 / C$, где N – удельная поглощенная мощность облучения, d – диаметр частицы, C – теплопроводность системы. Оценка показывает, что объекты размером 0,1 мм и меньше нагреваются не более чем на 0,001 °C.

Механизм взаимодействия микроволн с суспензиями липосом, клеток и микроорганизмов в водных средах

Авторы [112] облучали ($\lambda = 4,25$ мм) тонкий слой (1,5 мм) суспензии липосом, наблюдая за уровнем продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Они получили при увеличении ППМ от нуля до 0,5 мВт/см² подъем уровня ПОЛ. Авторы объяснили это уменьшением толщины т.н. неперемешиваемого примембранного слоя воды [113] за счет возникшего в ходе облучения конвективного движения. Они правы, считая, что в их эксперименте толщина неперемешиваемого слоя воды уменьшилась, однако, объяснять этот факт наличием конвекции, как нам представляется, нельзя. Возражение следует из рассмотрения условия Рэлея (2), согласно которому для возникновения конвекции в слое толщиной 1,5 мм необходимы перегревы ΔT , превышающие на несколько порядков те, которые реализованы при использовании примененных в [112] ППМ мм излучения. Следовательно, в рассматриваемом опыте конвективное движение отсутствовало. Здесь, по нашему мнению действовал другой, “пузырьковый” механизм перемешивания, суть которого состоит в следующем. Как отмечалось выше, в воде всегда присутствуют воздушные микропузырьки; при определенной температуре и давлении имеется вполне определенная равновесная функция распределения этих пузырьков по размерам. Плотность размещения пузырьков в объеме межклеточной жидкости является более-менее равномерной. При наличии температурного градиента пузырьки перемещаются по направлению к “теплому” полюсу, причем, согласно (1), скорость перемещения конкретного пузырька пропорциональна его радиусу. Это приводит к тому, что пузырьки большего размера догоняют более мелкие, сталкиваются с ними, в результате чего может произойти коалесценция. Теперь реализуется новая функция распределения ансамбля пузырьков по размерам, отличная от равновесной функции, соответствующей температуре и давлению, при которой находится образец. Следовательно, после снятия температурного градиента равновесное распределение пузырьков по размерам будет восстанавливаться. (Укрупненные пузырьки будут уменьшаться; излишки газа будут уходить из них в жидкость, растворяясь. Из растворенного газа будут формироваться новые пузырьки). Также будет восстанавливаться равномерное размещение пузырьков по объему межклеточной жидкости. Очевидно, и движение пузырьков в поле температурного градиента, и последующее, после его выключения, восстановление равновесной функции распределения по размерам, и восстановление равномерного размещения по объему – все эти три процесса обеспечивают перемещение молекул межклеточной жидкости, т.е. ее перемешивание. Отметим, что последние два процесса идут по диффузионным механизмам, т.е. сравнительно медленно.

Нами выполнено исследование по влиянию мм облучения на суспензию клеток крови человека (эритроциты). Контролируемым параметром, по которому определяли уровень биологического ответа на воздействие ЭМ поля являлась величина энергии активации Cl^-/OH^- - обмена (антипорта ионов) через эритроцитарную мембрану, т.е. высота энергетического барьера. (Подробно методика эксперимента изложена в [114]). Получено, что мм облучение ($\lambda = 8$ мм, ППМ = 0,4 мВт/см²) приводит к понижению энергии активации антипорта ионов. Эффект проявлялся тем сильнее, чем продолжительнее было облучение: 15-минутная экспозиция снижала высоту энергетического барьера на 19 %, 30-минутная – на 30 %, а 45-минутная – на 36 %. Эти результаты объясняются уменьшением толщины примембранного слоя воды за счет перемешивания его воздушными пузырьками, перемещающимися в поле температурного градиента. Подтверждением действия “пузырькового” механизма является наблюдение восстановления, предварительно сниженного 30-минутным облучением, энергетического барьера, спустя 6 часов после прекращения облучения. (За эти 6 часов восстановилось равновесное распределение пузырьков, и, следовательно, восстановилась толщина неперемешиваемого примембранного слоя воды).

Опубликовано большое количество работ, где рассмотрено влияние микроволн на клетки, например, [115-121]. В них отмечается облегчение переноса веществ через плазматическую мембрану; во многих случаях замечено восстановление параметров мембран, измененных

микроволновым воздействием, к исходным значениям. Например, в [121] зафиксировано восстановление, вызванных облучением ($\lambda = 6,5$ мм), морфологических изменений клетки. Результаты этих работ могут быть объяснены на основе “пузырькового” механизма уменьшения примембранного слоя воды.

Отдельно следует сказать о т.н. “резонансных” эффектах при КВЧ-облучении суспензий микроорганизмов и др. биологических объектов, подробно описанных в [4]. Как сообщалось выше, интенсивность КВЧ- волн уже на глубине 1 мм водного образца за счет поглощения уменьшается на 2-3 порядка [95]; поэтому, если генератор излучает ППМ “нетепловой” интенсивности, следует исключить возможность эффективного прямого действия этих волн на нижележащие живые клетки. Тем не менее, в [4] утверждается, что это возможно в случае, если излучение попадает в резонанс с биологическими мембранами. При этом авторы [4] ссылаются на теоретическую работу Г.Фрелиха, показавшего, исходя из скорости звука в мембране и ее толщины, что мембранные резонансные частоты лежат в миллиметровом диапазоне длин волн [122]. Отметим, что гипотетическое размещение таких мембран (клеток) в жидкой среде (водный раствор) создает систему, настолько сильно демпфированную, что избирательный резонанс не может наступить. Высокая вязкость взвеси биообъектов обеспечивает сильное затухание, вследствие чего теоретически возможные резонансы вырождаются в сглаженную характеристику релаксационного типа. На это обстоятельство указано в [123]. Поэтому авторы [124] считают, что эффекты влияния низкоинтенсивных микроволн пренебрежимо малы и сравнимы с мембранным шумом. Как уже отмечалось выше, примеры, приведенные в [4] по наблюдению частотно-селективного действия мм волн на биообъекты были поставлены под сомнение в [36, 37]. На возможную причину наблюдения “резонансов”, о которых сообщено в [4], указано в [125]. Здесь обращено внимание на то, что обсуждаемые эффекты наблюдаются в тонкослойных биосредах, размещенных в ближней зоне излучателя. Ближняя зона, как отмечалось выше, характеризуется наличием нерегулярностей в распределении многочисленных амплитуд напряженности ЭМ поля вдоль направления распространения волны. Перестройка частоты генератора влечет за собой перемещение указанных амплитуд вдоль этого направления. Из-за этого на определенной частоте генератора на тонкослойный образец попадает один из максимумов нерегулярного распределения (и нагревает его), а при другой частоте генератора – попадает минимум (и нагрев отсутствует). Поэтому биологический ответ, обусловленный, как было показано выше, возникновением температурного градиента в образце, фиксируется лишь на конкретных частотах излучателя. Этот “размерный эффект” ближней зоны, безусловно, не может быть интерпретирован как наблюдение резонанса. Хотя все известные нам работы, в которых сообщается о наблюдении резонанса, выполнены при облучении в ближней зоне, нельзя не сказать об одной-единственной, известной нам работе, где был наблюден резонансный биологический эффект при размещении образца в дальней зоне [126].

Влиянием на примембранный водный слой компонент клеток микроорганизмов по пузырьковому механизму, на наш взгляд, можно объяснить наблюденное бактерицидное действие нетепловых интенсивностей микроволн на кишечную палочку, золотистый стафилококк [40], изменение фибринолитической активности спор плесневых грибов и др. [127].

Из вышеизложенного следует, что в основе влияния низкоинтенсивных микроволн на суспензии липосом, клеток и микроорганизмов лежит преобразование электромагнитной энергии в тепловую. В результате возникает температурный градиент, двигаясь в поле которого воздушные пузырьки перемешивают примембранные водные слои. Итогом является изменение режима функционирования липосом, клеток и микроорганизмов, т.е. биологический ответ на облучение.

Механизмы влияния микроволн на уровне целостного организма

Действие микроволн на функцию нервной системы проявляется в двух основных формах – в виде реакций, свидетельствующих о функциональных изменениях в парасимпатическом отделе вегетативной нервной системы и в виде нарушений функционального состояния структур головного мозга. Степень выраженности наблюдаемых изменений зависит от частоты ЭМП: нарушения функции головного мозга усиливаются с возрастанием длины волны, а ваготонические реакции, наоборот, уменьшаются. Эта зависимость согласуется с увеличением глубины проникновения микроволн в ткани по мере увеличения длины волны [94]: при облучении животных миллиметровыми волнами наиболее выраженные морфологические изменения отмечены в кожных рецепторах; при облучении сантиметровыми волнами выявлены нарушения межнейронных связей в коре головного мозга [128-130].

Миллиметровые волны эффективны при терапии путем воздействия на микрозоны т.н. “активных точек” на теле человека. Согласно [131,132], физиологический режим указанных микрозон, с одной стороны, определяется ходом физиологических процессов и характером поражения сопряженных внутренних органов, а с другой стороны, раздражение указанных точек

сопровождается изменением физиологических характеристик этих внутренних органов. Для эффективного раздражения “активных точек” с лечебной целью применяются уколы специальными иглами, прижигание и прогревание точек, прессура и массаж, воздействие слабым электрическим током, а также лазерным лучом, влияние путем наложения микромагнитов (поле, порядка 50 мТ), стимуляция ультразвуком. Терапевтическая эффективность перечисленных факторов воздействия, безусловно, предполагает отличие физических свойств ткани в ареале “активной точки” от окружающей ткани. Действительно, микрозона “активной точки” насыщена рецепторами типа телец Мейснера, Пачини, Меркеля, колб Краузе, многочисленными аксонами; для такой микрозоны характерна также относительная рыхлость соединительной ткани [132]. Отсюда следует, что ареал “точки” богаче насыщен тканевой жидкостью, чем его окружение; иначе говоря, его оводненность выше. Поскольку СВЧ- и КВЧ-микроволны хорошо поглощаются водой, то, следовательно, ареал “точки” при облучении достаточно эффективно нагревается.

Опыт применения миллиметровой пунктурной рефлексотерапии показывает, что наилучший лечебный эффект достигается при локальном облучении микрозон указанных “активных точек”. (Размер облучаемого участка на коже задается диафрагмой (0,5 – 1,5 см) из углеткани; среднее время воздействия – 30 минут [93]). По-видимому, миллиметровые волны влияют на чувствительные элементы микрозоны “активной точки” путем создания температурного градиента с последующим включением пузырькового механизма перемешивания примембранных водных слоев соответствующих клеток. Оценим, какой необходимо создать температурный градиент, чтобы за время терапевтического воздействия (30 минут) воздушный пузырек средних размеров ($R = 2 \cdot 10^{-8}$ м; [134]) мог пройти в межклеточной среде путь, равный толщине непремешиваемого примембранного водного слоя и, следовательно, перемешать его. В [113] сообщается, что толщина этого слоя для биомембран имеет величину порядка 1 мкм. Подставив скорость перемещения пузырька в выражение (1) и, учтя, что в системе воздух – вода $\sigma = 10^{-3}$ Па · с, $d\sigma/dT = 1,5 \cdot 10^{-4}$ Н/(м · К), находим величину необходимого температурного градиента $\nabla T = 0,5$ К/м. В [100] отмечено, что облучение образца воды, имеющего форму куба с ребром 1 см, СВЧ-волнами интенсивностью 0,1 мВт создает в воде градиент 0,8 К/м. Следовательно, судя по выполненной оценке, интенсивности 0,1 мВт вполне достаточно для обеспечения перемешивания примембранного водного слоя. Поскольку при лечении людей в [92, 93] применялись почти на два порядка большие интенсивности (8 мВт), то можно с уверенностью утверждать, что в этих случаях примембранные слои биоткани в зоне облучения перемешивались пузырьковым движением достаточно эффективно.

(О том, что при низкоинтенсивном КВЧ-облучении создаются биологически значимые температурные градиенты, свидетельствуют результаты по стимуляции микроволнами т.н. неощутимой перспирации (испарения воды) через роговой слой эпидермиса (РСЭ) кожи человека [134]. Измеряя электропроводность РСЭ авторы определили пороговую ППМ, оказавшуюся порядка 0,1 мВт/см² при наблюдении в течение 100 секунд для длин волн в диапазоне 6 – 12 мм. Механизм стимуляции перспирации имеет тепловую природу. Это подтверждается двумя обстоятельствами: во-первых, показано, что перспирацию может стимулировать также инфракрасное излучение ($\lambda = 10$ мкм) с примерно такой же пороговой ППМ, как и в микроволновом случае, а во-вторых, интервал времени между началом облучения и изменением электропроводности РСЭ уменьшается с ростом длины волны, т.е. с увеличением глубины проникновения ЭМП в ткань [135].

Безусловно, пузырьковый механизм изменения проницаемости примембранного слоя воды обладает определенной инерционностью. В этой связи неудивительно наблюдение довольно продолжительного латентного периода (20-60 секунд) между началом облучения низкоинтенсивными микроволнами участков кисти рук испытуемых добровольцев и их реакцией, о чем сообщено в [10, 136].

В коже имеются рецепторы, реагирующие на разные характеристики воздействия. Тельца Пачини, например, чувствительны к раздражению с частотой 100 – 400 Гц. Тельца Меркеля никак себя не проявляют, если нет никакого смещения кожи, но реагируют как во время акта ее деформации, так и при состоянии деформации. Окончаниям Руффини свойственно наличие спонтанной и импульсной активности, которая усиливается при надавливании на кожу или ее растяжении. Вообще, воспринимающая способность механорецепторов колеблется от 1 до 1000 Гц [136]. Учитывая перечисленное, а также то, что человек субъективно может заметить изменение температуры кожи на 0,001 градуса в секунду [138], становится неудивительным факт реакции людей на СВЧ-поля, модулированные инфранизкими колебаниями [29]. Сказанное позволяет утверждать, что энергия микроволн, преобразуясь в тепло на коже, обеспечивает реакции чувствительных элементов организма, то ли путем деформирования соответствующих участков тканей, то ли путем изменения проницаемости примембранных слоев межклеточной жидкости.

В работе [132] показано, что если во время гипнотического сна путем внушения возбудить какой-либо внутренний орган человека, то при этом значительные изменения электрического

Низкоинтенсивные электромагнитные микроволны и биообъекты ...

потенциала наблюдаются в микрозоне только той "активной точки", которая связана с возбуждаемым органом. Этим примером продемонстрирована связь "активных точек" с головным мозгом. Поскольку, как было показано выше, эти точки реагируют на СВЧ-поле, вполне ожидаемой становится повышенная чувствительность человека к микроволновому излучению, модулированному на частотах альфа-ритма его мозга.

Известно, что одним из разрушающих следствий гамма-облучения организма является активизация процессов ПОЛ биомембран, в результате чего поражаются клетки [139]. Если уменьшить количество растворенного в межклеточной среде кислорода, то процессы ПОЛ замедляются. Низкоинтенсивное микроволновое облучение способствует этому, поскольку при движении воздушных пузырьков в поле температурного градиента, как уже упоминалось, более крупные из них догоняют мелкие, сталкиваются с ними и коалесцируют. В тонком слое воды, примыкающем к собственно пузырьку имеется повышенная концентрация растворенного воздуха. Количество этого воздуха (и кислорода) пропорционально площади поверхности пузырька. Вследствие коалесценции суммарная площадь поверхностей всех пузырьков в ансамбле уменьшается, и, следовательно, уменьшается и концентрация растворенного кислорода. Этим может быть объяснен наблюдаемый противолучевой защитный эффект микроволнового воздействия [43-49].

Изложенные выше соображения относительно биологического влияния микроволн на организм можно суммировать следующим образом. Низкоинтенсивные микроволны, проникая на сравнительно небольшую глубину в кожу, нагревают ее. Сильнее нагреваются микрозоны "активных точек", вследствие их повышенной проводимости. Хотя нагревание сравнительно слабое, тем не менее, в поле температурного градиента, благодаря пузырьковому механизму, осуществляется изменение режима функционирования мембран чувствительных клеток указанных микрозон. Таким образом реализуется раздражение этих клеток, которые, в свою очередь, вызывают изменения физиологических характеристик сопряженных с ними внутренних органов. Первичным этапом всего многоступенчатого процесса является преобразование энергии ЭМ волны в тепло.

ВЫВОДЫ

1. Электромагнитное загрязнение среды микроволнами даже в случае низкоинтенсивных, т.н. "нетепловых" уровней излучений следует признать серьезным экологически значимым фактором.
2. Биологическое влияние низкоинтенсивных микроволн обусловлено преобразованием их ЭМ энергии в тепловую с последующими эффектами движения элементов межклеточной жидкости (включая и содержащийся в ней воздух) в поле температурного градиента. Эти движения изменяют условия функционирования клеток живых организмов, обеспечивают формирование физиологических ответов внутренних органов.
3. Учитывая вышеизложенное, употребляемое специалистами словосочетание "нетепловое воздействие микроволн", повидимому, целесообразно заменить более корректным термином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Минин Б. А. СВЧ и безопасность человека. М. Сов. Радио, 1974. 352 с.
2. Гордон З. В. Вопросы гигиены труда и биологического действия электромагнитных полей сверхвысоких частот. М. Медицина, 1966. 265 с.
3. Michaelson S. M. // Proc. IEEE. 1980. V. 68. N. 1. P. 40-49
4. Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М. Радио и связь, 1991. 168 с.
5. Григорьев Ю. Г., Лукьянова С. Н., Макаров В. П. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. № 1. С. 157-165
6. Лукьянова С. Н., Макаров В. П., Рыжков В. В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 5. С. 706-709
7. Justesen D. R. // Proc. IEEE. 1980. V. 80. N. 1. P. 60-67
8. Зуев В. Г., Ушаков И. Б. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1993. Т. 33. № 3. С. 739-747
9. Холодов Ю. А. Влияние электромагнитных и магнитных полей на центральную нервную систему. М. Наука, 1966. 284 с.
10. Холодов Ю. А., Лебедева Н. Н. Реакции нервной системы человека на электромагнитные поля. М. Наука, 1992. 135 с.
11. Рудаков И. А., Виноградов Г. И., Руднев М. И. и др. // Врачебное дело. 1985. № 4. С. 96-99
12. Боголюбов В. М., Френкель И. Д., Першин С. Б. и др. // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. 1987. № 1. С. 12-14
13. Першин С. Б., Френкель И. Д. // Иммунодефицит и аллергия. М. Медицина. 1986. С. 12-14

14. Косова И. П., Дорогун В. И. // Гигиеническая оценка и биологическое действие прерывистых микроволновых облучений. М. Медицина, 1984. С. 93-96
15. Виноградов Г. И., Науменко Г. М., Винарская Е. И. и др. // Гигиена населенных мест. Респ. межведом. сб. Киев. 1983. Вып. 22. С. 31-33
16. Шандала М. Г., Виноградов Г. И., Руднев М. И. и др. // Радиобиология. 1983. № 4. С. 544-546
17. Мамыкина В. М., Гузев В. В. // Актуальные вопросы постреанимационного периода. Саранск. Изд-во Мордовск. мед. ин-та, 1982. С. 70-72
18. Шандала М. Г., Виноградов Г. И. // Вестник АН СССР. 1982. № 10. С. 13-16
19. Виноградов Г. И., Батанов Г. В., Науменко Г. М. и др. // Радиобиология. 1985. Т. 25. № 6. С. 840-843
20. Виноградов Г. И., Андриенко Л. Г., Науменко Г. М. // Радиобиология. 1991. № 5. С. 718-721
21. Michaelson S. M., Lin I. C. Biological effects and health implications of radiofrequency radiation. N. -Y., London. Plenum Press, 1987. 675 p.
22. Новицкий А. А., Мурашов Б. Ф., Краснобаев П. Е. и др. // Военно-медицинский журнал. 1977. № 8. С. 53-57
23. Lu S. T., Lebl N., Michaelson S. et al. // Radio Science. 1977. V. 12. Suppl. P. 147-156
24. Суббота Л. Г. // Тезисы докл. 4-й Рос. научн.-техн. конф. "Электромагнитная совместимость технических средств и биологических объектов. ЭМС-96". Санкт-Петербург. 1996. С. 501-505
25. Козарян И. П., Швайко Н. И. // Гигиена и санитария. 1988. № 7. С. 11-13
26. Никитина В. Н., Устинкина Т. И., Шапошникова Е. С. // Материалы 1-й Рос. конф. "Проблемы электромагнитной безопасности человека. Фундаментальные и прикладные исследования". М. 1996. С. 36
27. Эйди У. Р. // Физиология человека. 1975. Т. 1. № 1. С. 59-67
28. Adey W. R. // Proc. IEEE. 1980. V. 68. N. 1. P. 119-125
29. Григорьев Ю. Г., Григорьев О. А., Степанов В. С., Пальцев Ю. П. // Электромагнитное загрязнение окружающей среды и здоровье населения России. М. 1997. С. 9-76
30. Frey A. // J. Applied Physiology. 1967. V. 23. N. 6. P. 67-73
31. Lin J. C. // Proc. IEEE. 1980. V. 68. N. 1. P. 67-73
32. Тигранян Р. Э., Шорохов В. В. // Биофизика. 1985. Т. 30. № 5. С. 894-899
33. Тигранян Р. Э., Шорохов В. В. // Биологические эффекты электромагнитных полей. Вопросы их использования. Пушкино. ОНТИ НЦБИ, 1986. С. 68-75
34. Тигранян Р. Э., Шорохов В. В. // Биофизика. 1988. Т. 33. № 2. С. 349-350
35. Африканова Л. А., Григорьев Ю. Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 5. С. 691-699
36. Jaggard D. L., Lords J. L. // Proc. IEEE. 1980. V. 68. N. P. 114-119
37. Gandhi O. P. // J. Microwave Power. 1983. V. 18. N. 3. P. 295-304
38. Смолянская А. З., Виленская Р. Л. // УФН. 1973. Т. 110. № 3. С. 458-460
39. Arber S. L. // Physiol. Chem. And Med. 1986. V. 18. N. 1. P. 49-50
40. Кондратьева В. Ф., Чистякова Е. Н., Иванова И. Б., Казанская А. Д. // Труды Ленинградского хим.-фарм. Института. 1967. Т. 20. № 1. С. 83-87
41. Webb S. J., Dodds D. D. // Nature. 1968. V. 218. P. 374-375
42. Емец Б. Г. // Тезисы докладов 6-го Всес. семинара "Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине". М. ИРЭ АН СССР, 1986. С. 51
43. Пресман А. С., Левитина Н. А. // Радиобиология. 1962. Т. 2. № 1. С. 170-171
44. Rotkowska D., Vacek A. // J. Microwave Power. 1977. V. 12. N. 2. P. 119-123
45. Ротковская Д., Вацек А., Бартоничкова А. // Радиобиология. 1981. Т. 21. № 4. С. 558-562
46. Губина Е. А., Кушнир А. Е., Березюк С. И. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1996. Т. 36. № 5. С. 722-725
47. Григорьев Ю. Г., Степанов В. С., Батанов С. И. и др. // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1987. № 4. С. 4-9
48. Акоев И. Г., Мельников В. М., Усачев А. В. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34. № 4-5. С. 671-674
49. Акоев И. Г., Кожокару А. Ф., Мельников В. М. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34. № 4-5. С. 675-677
50. Григорьев Ю. Г., Батанов Г. В., Степанов В. С. // Радиобиология. 1983. Т. 23. № 3. С. 406-409
51. Габович Р. Д., Шутенко О. И., Козарин И. П. и др. // Гигиена и санитария. 1979. № 10. С. 10-14
52. Спиридонова Н. З., Тен Ю. В., Шафранов В. В. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1988. Т. 106. № 12. С. 767
53. Мясников А. М., Ломовцев Е. И. // Военно-медицинский журнал. 1977. № 5. С. 61-65
54. Дегтярь В. Н. // Физиология. 1979. Т. 25. № 4. С. 448-450
55. Колдаев В. М. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1972. № 2. С. 72-73
56. Тихончук В. С. // Космические исследования. 1979. Т. 17. № 4. С. 636-638
57. Габович Р. Д., Шутенко О. И. // Гигиена труда. 1977. № 9. С. 31-37
58. Шутенко О. И., Виноградов Г. И., Ужва Н. Ф. // Гигиена и санитария. 1977. № 8. С. 48-50
59. Колдаев В. М. // Фармакология и токсикология. 1972. № 4. С. 505-507
60. Виноградов Г. И., Антомонов М. Ю. // Методологические аспекты гигиенического исследования сочетанных и комбинированных воздействий. М. 1986. С. 206-210
61. Белкин В. И., Тихончук В. С. // Радиобиология. 1980. Т. 20. № 4. С. 623-624
62. Виноградов Г. И. // Гигиена населенных мест. Респ. межведом. сб. Киев. 1977. № 16. С. 47-50
63. Григорьев Ю. Г., Бесхлебнова Л. И., Митяева З. Я. и др. // Радиобиология. 1984. Т. 24. № 2. С. 204-207

64. Оробей В. В., Бронштейн И. Э., Либерман А. Н. // Методологические аспекты гигиенического исследования сочетанного и комбинированного воздействий. М. 1986. С. 201-206
65. Файтельберг-Бланк В. Р., Перевалов Г. И. // ДАН СССР. 1978. Т. 239. № 1. С. 242-244
66. Ушаков И. Б., Зуев В. Г. // Известия АН СССР. Сер. биол. 1984. № 5. С. 795-797
67. Федоров В. П., Зуев В. Г., Пахунова Л. В. и др. // Радиация и организм. Обнинск. 1984. С. 26-27
68. Григорьев Ю. Г., Батанов Г. В., Степанов В. С. и др. // Тезисы докладов Всес. симп. "Биологическое действие электромагнитных полей. Пушино. 1982. С. 133-134
69. Пичугин С. Л., Энговатов В. В., Агнаев А. К., Козлов А. А. // Материалы 1-й Рос. конф. "Проблемы электромагнитной безопасности человека. Фундаментальные и прикладные исследования". М. 1996. С. 135-136
70. Потапов С. Л., Севастьянова Л. А. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1974. № 3. С. 46-52
71. Севастьянова Л. А., Потапов С. Л., Васильева Н. Н. и др. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1976. № 7. С. 36-39
72. Севастьянова Л. А., Потапов С. Л., Васильева Н. Н. и др. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1976. № 12. С. 27-31
73. Севастьянова Л. А., Потапов С. Л., Адамченко В. Г. и др. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1969. № 6. С. 30-33
74. Севастьянова Л. А. // Вестник АМН СССР. 1979. № 2. С. 65-68
75. Севастьянова Л. А. // Эффекты нетеплового воздействия мм излучения на биологические объекты. М. ИРЭ АН СССР, 1983. С. 48-62
76. Севастьянова Л., Зубенкова Э. С., Бородкина А. Г. и др. // Тезисы докладов Всес. симп. "Биологическое действие электромагнитных полей. Пушино. 1982. С. 131-132
77. Балакирева Л. З., Голант М. Б., Головатюк А. А. и др. // Электронная промышленность. 1985. № 1. С. 9-10
78. Голант М. Б., Севастьянова Л. А., Фасахов И. Н. // Электронная промышленность. 1985. № 1. С. 10-11
79. Балакирева Л. З., Баринов В. В., Бородкина А. Г. и др. // Электронная промышленность. 1985. № 1. С. 11-13
80. Девятков Н. Д., Севастьянова Л. А., Зубенкова Э. С. и др. // Радиобиология. 1988. Т. 28. № 3. С. 361-364
81. Алексеев А. А., Самойлович Э. Ф., Голант М. Б. // Медико-биологические аспекты миллиметрового излучения. М. ИРЭ АН СССР, 1987. С. 56-60
82. Девятков Н. Д. // Миллиметровые волны в медицине и биологии. М. ИРЭ АН СССР, 1989. С. 10-15
83. Запорожан В. Н., Реброва Т. Б., Хаит О. В. и др. // Медико-биологические аспекты мм излучения. М. ИРЭ АН СССР, 1987. С. 21-34
84. Родштат И. В. // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1996. № 7. С. 35-40
85. Гассанов Л. Г., Зелинский В. А., Писанко О. И. и др. // Электронная промышленность. 1987. № 1. С. 31-33
86. Ганелина И. Е., Степанова Т. А., Корнеев В. А. // Миллиметровые волны в медицине. Сб. статей. М. ИРЭ АН СССР, 1991. Т. 1. С. 40-47
87. Карлов В. А., Родштат И. В., Калашников Ю. Д. и др. // Миллиметровые волны в медицине. Сб. статей. М. ИРЭ АН СССР, 1991. Т. 1. С. 82-91
88. Девятков Н. Д., Белый Ю. Н., Василенко А. М. и др. // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1996. № 8. С. 5-12
89. Лоран О. Б., Вишневский А. Е., Дунаевский Я. Л. и др. // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1996. № 8. С. 13-15
90. Шевченко С. Д., Маколинцев В. И., Грунтовский Г. Х. и др. // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1996. № 8. С. 69-70
91. Дремучев В. А., Гедымин Л. Е., Королев Л. С. и др. // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 1996. № 8. С. 71-72
92. Андреев Е. А., Белый М. У., Ситько С. П. // Доклады АН УССР. Сер. Б. 1984. № 10. С. 60-63
93. Андреев Е. А., Белый М. У., Ситько С. П. // Вестник АН СССР. 1985. № 1. С. 24-32
94. Johnson C. C., Guy A. W. // Proc. IEEE. 1972. V. 60. N. 6. P. 692-718
95. Chamberlain J. E., Chantry G. W., Gebbie N. A., Stone N. W. B., Taylor T. B., Wyllie G. // Nature. 1966. V. 210. N. 5038. P. 790-791
96. Левич В. Г. Физико-химическая гидродинамика. М. Физматгиз, 1959. 699 с.
97. Кузнецов В. М., Луговцов Б. А., Шер Е. И. // Журнал прикладной математики и технической физики. 1966. № 1. С. 124-126
98. Гегузин Я. Е., Дзюба А. С., Кагановский Ю. С. // ДАН СССР. 1981. Т. 260. № 4. С. 876-880
99. Сиротюк М. Г. // Акустический журнал. 1970. Т. 14. № 2. С. 286-290
100. Емец Б. Г. // Письма в ЖТФ. 1996. Т. 22. № 8. С. 22-24
101. Гершуни Г. З., Жуховицкий Е. М. Конвективная устойчивость несжимаемой жидкости. М. Наука, 1972. 392 с.
102. Silveston P. L. // Forsch. Ing. Wes. 1958. V. 24. N. 29. P. 59-64
103. Уолтер К. Антенны бегущей волны. М. Энергия, 1970. 392 с.
104. Полников И. Г., Казаринов К. Д., Шаров В. С., Путвинский А. В., Бецкий О. В. // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. М. ИРЭ АН СССР, 1985. С. 180-193
105. Емец Б. Г. // Журнал физической химии. 1997. Т. 71. С. 1143-1145
106. Малеев В. Я., Кашпур В. А., Щеголева Т. Ю. // Нетепловые эффекты миллиметрового излучения. М. ИРЭ АН СССР, 1981. С. 26-41

107. Малеев В. Я., Кашпур В. А. // Эффекты нетеплового воздействия мм излучения на биологические объекты. М. ИРЭ АН СССР, 1983. С. 163-171
108. Малеев В. Я., Кашпур В. А. // Тезисы докладов 6-го Всес. семинара "Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине". М. ИРЭ АН СССР, 1986. С. 75
109. Гайдук В. И., Хургин Ю. И., Кудряшова В. А. // УФН. 1973. Т. 110. № 3. С. 466-468
110. Schaefer H., Schwan H. P. // Ann. Physic. 1943. V. 43. P. 99-104
111. Schaefer H., Schwan H. P. // Strahlentherapie. 1947. V. 77. P. 123-128
112. Бецкий О. В., Казаринов К. Д., Путвинский А. В., Шаров В. С. // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты. М. ИРЭ АН СССР, 1983. С. 97-115
113. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М. Мир, 1980. 341 с.
114. Емец Б. Г., Кондратенко С. И., Древаль В. И. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1990. № 11. С. 43-47
115. Исмаилов Э. Ш. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1971. № 3. С. 18-21
116. Исмаилов Э. Ш., Зубкова С. М. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1977. № 6. С. 5-17
117. Казаринов К. Д. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М. ВИНТИ, 1990. Т. 27. С. 1-104
118. Мирутенко В. И., Богач П. Г. // Гигиена труда и биологическое действие ЭМ волн радиочастот. Материалы 6-го симпозиума. М. 1972. С. 60-61
119. Мирутенко В. И., Богач П. Г. // Молекулярная генетика и биофизика. 1977. № 2. С. 102-105
120. Мирутенко В. И., Богач П. Г. // Физиологический журнал. 1975. Т. 21. № 4. С. 528-530
121. Залюбовская Н. П., Киселев Р. И. // Цитология и генетика. 1978. Т. 12. № 3. С. 232-235
122. Frohlich H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. N. 11. P. 4211-4215
123. Schwan H. P. // Microwave power engineering (ed. Okress E.). V. 2. Application. N. -Y., London. Acad. Press., 1968. P. 150-192
124. Schwan H. P., Foster K. R. // Proc. IEEE. 1980. V. 68. N. 1. P. 104-113
125. Емец Б. Г. // Вісник Харківського університету. № 410. 1998. Біофізичний вісник. № 1. С. 133-137
126. Гапеев А. Б., Якушина В. С., Чемерис Н. К., Фесенко Е. Е. // Биофизика. 1997. Т. 42. № 5. С. 1125-1134
127. Голант М. Б., Брюхова А. К., Двадцатова Е. А. и др. // Эффекты нетеплового воздействия мм излучения на биологические объекты. М. ИРЭ АН СССР, 1983. С. 115-122
128. Пресман А. С. // УФН. 1965. Т. 86. № 2. С. 163-298
129. Пресман А. С. Электромагнитные поля и живая природа. М. Наука, 1968. 288 с.
130. Толгская М. С., Гордон З. В. Морфологические изменения под действием электромагнитных волн радиочастот. М. Медицина, 1971. 135 с.
131. Подшибякин А. К. // Физиологический журнал СССР. 1955. Т. 41. № 3. С. 357-362
132. Подшибякин А. К. Значение активных точек кожи для эксперимента и клиники. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Киев. 1960. 31 с.
133. Вогралик В. Г., Вогралик М. В. Пунктурная рефлексотерапия. Горький. Волго-Вятское кн. изд-во, 1988. 335 с.
134. Емец Б. Г. // Доповіді НАН України. 1998. № 5. С. 75-78
135. Гуляев Ю. В., Годик Э. Э., Валиев И. В., Мусин Р. Ф., Морозов В. А., Шаров В. С. // 6-й Всес. семинар "Применение мм излучения низкой интенсивности в биологии и медицине". Тезисы докладов. М. ИРЭ АН СССР, С. 12
136. Лебедева Н. Н., Сулимов А. В. // Миллиметровые волны в медицине и биологии. М. ИРЭ АН СССР, 1989. С. 176-182
137. Отелин А. А., Машанский В. Ф., Миркин А. С. Тельце Фатер-Пачини. Ленинград. Наука (Л. О.), 1976. 176 с.
138. Мусин Р. Ф., Иванова Н. Ю., Мартынов В. А., Морозов В. А., Годик Э. Э., Гуляев Ю. В. // ДАН СССР. 1986. Т. 289. № 3. С. 718-720
139. Ку драшов Ю. Б., Беренфельд Б. С. Основы радиационной биофизики. М. Изд-во Московск. ун-та, 1982. 304 с.

II З'ЇЗД УКРАЇНСЬКОГО БІОФІЗИЧНОГО ТОВАРИСТВА

29 червня - 3 липня 1998 року в м. Харкові відбувся II з'їзд Українського біофізичного товариства (УБФТ), організований Харківським відділенням УБФТ і Харківським державним університетом за участю Інституту радіофізики та електроніки і Фізико-технічного інституту низьких температур НАН України. У роботі з'їзду взяли участь вчені з 11 міст України, де проводяться біофізичні дослідження, насамперед, з Харкова та Києва (39 і 38% від усіх учасників, відповідно), а також з Дніпропетровська, Донецька, Львова, Севастополя, Сум, Ужгорода, Чернівців, Калуша, Мерефи.

На першому пленарному засіданні виступили: президент УБФТ академік НАН України М.Ф.Шуба зі звітом про роботу Українського біофізичного товариства за період від першого з'їзду (Київ, 1994) до другого; голова Харківського відділення УБФТ професор В.Я.Малеев з доповіддю про історичні передумови та сучасні тенденції розвитку біофізики в Харкові.

У програмі з'їзду було заявлено 262 наукові доповіді (з них 81 усна) більш ніж 500 авторів, які представляли 16 університетів і 34 науково-дослідних установ України (Національної академії наук, Академії медичних наук, Української академії аграрних наук). Робота з'їзду проходила на 4 наукових секціях (молекулярної біофізики, біофізики клітини, біофізики складних систем, впливу фізичних факторів на біосистеми) і на "круглому столі" з біофізичної освіти. На 12 засіданнях секцій було розглянуто актуальні проблеми біофізики, які досліджуються в Україні: структура і динаміка нуклеїнових кислот (16 доповідей), взаємодія нуклеїнових кислот з водою, іонами і біологічно активними речовинами (16), фізичні властивості білків і малих біомолекул (27), мембранний транспорт іонів (19), біофізика мембран (24), біофізика м'язового скорочення (23), фізико-математичні моделі біосистем (25), проблеми медичної біофізики (22), проблеми кріобіофізики (15), дія світла та електромагнітних полів на біологічні об'єкти (25), радіаційна біофізика (30). Окреме засідання було присвячене проблемам біофізичної освіти в Україні (5 доповідей).

З'їзд продемонстрував чималі наукові досягнення українських біофізиків і, разом з тим, показав деякі негативні загальні особливості розвитку біофізичної науки в Україні в наш час. Можна констатувати, що тематика біофізичних досліджень відповідає сучасному світовому рівню, але важкі економічні умови, що зараз існують в Україні, заважають нормальному розвитку науки. Це відбивається, насамперед, у погіршенні умов для розвитку фундаментальної науки, бо держава пріоритетно підтримує тільки такі прикладні дослідження, які можуть дати негайний економічний ефект. У самій фундаментальній науці спостерігається суттєвий зріст відносної частини теоретичних та розрахункових досліджень у порівнянні з експериментальними у зв'язку з тим, що сучасні біофізичні експерименти стають все дорожчими, а фінансування досліджень, навпаки, з кожним роком скорочується. Найбільш тривожною тенденцією сучасного стану біофізики і взагалі української науки є різке зменшення припливу в науку молоді, що веде до руйнування існуючих наукових шкіл. У зв'язку з цим слід високо оцінити міжнародну підтримку української науки, особливо наукової молоді, у вигляді різних конкурсів, спільних наукових проектів, стажування в закордонних наукових установах, участі у міжнародних фахових з'їздах, конференціях, школах тощо.

На заключному пленарному засіданні, після обговорення підсумків роботи з'їзду та загальної дискусії, було прийняте

РІШЕННЯ ІІ З'ЇЗДУ УБФТ

1. Оцінити роботу ради УБФТ за період 1994-1998 рр., як задовільну.
2. Запропонувати провести конференцію з біофізики у 2000 р. під гаслом "Біофізика України у ХХІ столітті".
3. Наступний з'їзд УБФТ провести у 2002 р. у м. Львові.
4. Ввести в УБФТ секцію математичної та теоретичної біофізики та біоінженерії, враховуючі численні праці українських біофізиків в цих напрямках.
5. Створити періодичний Український біофізичний журнал для консолідації досліджень та висвітлення інформації про досягнення біофізиків України та СНД.
6. Активізувати науково-організаційну роботу в обласних відділеннях УБФТ, та в найближчий час ліквідувати заборгованість по членських внесках.
7. Висловити керівництву ХДУ та правлінню Харківського відділення УБФТ подяку за добре проведення ІІ з'їзду УБФТ.
8. Вважати за доцільне розширити повноваження спецради Д 64.051.13 проводити захист дисертацій з спеціальності "Біофізика" з фізико-математичних та біологічних наук.
9. Клопотати перед Міністерством освіти про посилення рівня біофізичної освіти для сільськогосподарських вищих навчальних закладів.

Відкритим поіменним голосуванням на з'їзді було обрано:

президента УБФТ, вдруге, академіка НАН України Шубу М.Ф. (Київ), віце-президентів - проф. Малєєва В.Я. (Харків) та Санагурського Д.І. (Львів), вченого секретаря - проф. Мірошніченко М.С. (Київ), скарбника - Ужвана В.О. (Київ); а також

Раду УБФТ у складі:

Благой Ю.П. (Харків), Веселков О.Н. (Севастополь), Волков С.Н. (Київ), Гаташ С.В. (Харків), Горго Ю.П. (Київ), Зима В.Л. (Київ), Костерін С.О. (Київ), Костюк П.Г. (Київ), Лях Ю.Є. (Донецьк), Малєєв В.Я. (Харків), Мірошніченко М.С. (Київ), Осецький О.І. (Харків), Санагурський Д.І. (Львів), Сітько С.П. (Київ), Суховія М.І. (Ужгород), Суходуб Л.Ф. (Суми), Ужван В.О. (Київ), Шуба М.Ф. (Київ), Шугуров О.О. (Дніпропетровськ).

Незважаючи на всі труднощі ми сподіваємось, що Українське біофізичне товариство посідає чинне місце серед членів Європейської асоціації біофізичних товариств (EBSA) і Міжнародного союзу фундаментальної та прикладної біофізики (IUPAB).

Малєєв В.Я., Гаташ С.В.

ABSTRACTS

OBSERVATION OF HYDRATION-CONNECTED EFFECTS IN COOLED AND FROZEN SOLUTIONS BY MEANS OF SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY**M.V.Kosevich***B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Lenin ave., Kharkov 310164, Ukraine; e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua*

Analysis of possibilities of low temperature mass spectrometry with fast atom or ion bombardment in the study of hydration-related phenomena in the frozen solutions is presented. A model of formation of low temperature mass spectra is described and some parameters of the mass spectra, which provide information on the types of intermolecular interactions, aggregate state and phase transitions in the samples with temperature variations are defined. A possibility of production of hydrate clusters from the liquid phase, present in the water-alcohol and formalin samples in a rather narrow temperature range under low pressure conditions inherent of mass spectrometric experiment, is demonstrated. In the case of the solid sample sputtering of ions is hampered for solids with network of hydrogen bonds, but is possible in the case of domination of van-der-waals interactions.

The last occurs with oligomers of polyoxymethylene, which are formed due to polymerization in formaline; namely this type of samples allowed to record for the first time the presence of the strongly bound water in the solid state by means of low temperature mass spectrometry. Examples connected with crystalline hydrates of inorganic salts are also presented. Correlations between hydration and cryoprotector properties of some compounds are discussed.

KEY WORDS: low temperature mass spectrometry, hydrates, crystalline hydrates, cryoprotectors, alcohols, polyoxymethylene, clusters

STABILITY OF DICATION OF DECAMETHOXINUM AS REVEALED BY SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY**M.V.Kosevich¹, V.A. Pashinskaya¹, Z. Szilagyi², K. Vekey², V.S. Shelkovsky¹, Yu.P. Blagoy¹***¹ B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov 310164, Ukraine; ² Institute of Chemistry Hungarian Academy of Sciences, Pustaszeri ut 59-67, H-1025 Budapest 11., Hungary*

Stability of the dication of an antimicrobial drug decamethoxinum under the influence of various physical factors was studied. Significant differences in the pathways of transformation of decamethoxinum under the influence of heating and upon long-term storage were revealed. By means of the secondary ion mass spectrometry it was shown that the changes in the medicine with time upon neglect of storage rules are connected, obviously, with the deleting of chlorine counterions from the crystalline sample with preservation of the structure of the dication, while upon thermal treatment a dequaternization of the quaternary nitrogens of decamethoxinum with formation of tertiary amines takes place.

KEY WORDS: decamethoxinum, secondary ion mass spectrometry, thermal degradation

SURFACE DIFFUSION OF BOUND WATER IN HYDRATE SURROUNDINGS OF DNA**K.M. Virnik, M.Ye. Tolstorukov¹, and V.Ya. Maleev***Institute of Radiophysics and Electronics, 12 Ak. Proskura St., Kharkov 310085, Ukraine (e-mail: virnik@ire.kharkov.ua.); ¹ Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine (e-mail: tolstor@ktu.kharkov.ua).*

Diffusion of water bound to a DNA molecule along its surface has been studied. A lattice model has been proposed to describe this process. The DNA sorbing surface has been considered as a fractal one. The values of the water diffusion coefficient, which depend on relative humidity of environment, have been estimated in the framework of the model within each interval of the ambient relative humidity where the DNA restores its conformation. They increase monotonously within each interval involved to about 5×10^{-11} , 1.7×10^{-10} and 3.5×10^{-10} m²/s for partly disordered form of DNA, A- and B-DNA, respectively. Also, we estimated values of longitudinal diffusion coefficient, i.e. the diffusion directed along the helix axis, which for conformational states considered run into about 9×10^{-11} , 3.8×10^{-10} and 7×10^{-10} m²/s. At the highest relative humidities the diffusion coefficient values tend to the values of the water self-diffusion coefficient for DNA solutions. We consider this fact as a result of increasing the number of the water molecules indirectly bound to the DNA binding sites.

KEY WORDS: DNA molecule, water sorption, bound water, surface diffusion, fractal dimension

IR-SPECTROSCOPY AND QUANTUM-CHEMICAL STUDY OF HYDRATION OF DISODIUM RIBOGUANOSINE 5'- MONOPHOSPHATE

E.G.Bereznyak, M.A.Semenov, E.B.Starikov¹, Yu.F.Pedash², T.V.Bolbukh, D.V.Matveev, V.Ya.Maleev

Institute of Radiophysics and Electronics, 12 Ak. Proskura St., Kharkov 310085, Ukraine; ¹Institut für Kristallographic, Universität Berlin; ²Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine

IR-spectra of disodium riboguanosine 5'-monophosphate (5'-GMP-2Na⁺) films in 900-1800 cm⁻¹ range at 0-96% relative humidity are obtained. The centres and the hydrational level of the nucleotide are determined by analysis of frequencies and intensities of the absorption bands. The sorption of about 8 water molecules is found to lead to crystallization of 5'-GMP-2Na⁺. The calculation of resonance interactions showed that the crystal structure corresponds to the tetramer model. The quantum-chemical calculation of electronic density evidences that observed spectral changes at wetting of 5'-GMP-2Na⁺ films can be explained qualitatively by the effect of hydration and influence of cations.

KEY WORDS: disodium riboguanosine 5'-monophosphate, IR-spectroscopy, hydration, resonance interactions, quantum-chemical calculations, influence of cations.

BINDING ENERGY DIFFERENTIATION OF WATER MOLECULES IN DNA HYDRATION SHELL

K.M. Virnik, M.E. Tolstorukov¹

Institute of Radiophysics and Electronics, 12 Ak. Proskura St., Kharkov 310085, Ukraine; ¹Radiophysics Department, Kharkov State University, Svobody Sq. 4, Kharkov 310077, Ukraine

An energetics study of water molecule binding to a DNA matrix has been performed. Bound water molecules have been differentiated according to their binding energies, the water molecules being supposed to participate in three types of sorption (hydration): sorption by Langmuir's binding centers, sorption by Henry's ones and multilayer sorption. It has been found that waters of the different sorption types take part in stabilizing a certain DNA conformation to a different degree. Consideration of the obtained values of free binding energies within each sorption type has shown that waters bound to Langmuir's centers mainly advantage A-DNA stabilization while ones bound to Henry's centers facilitate B-DNA stabilization. The water molecules bound in multilayer are more important for stabilization of both A- and B-form in comparison with unordered state, but largely for B-form. This is due to occurring the basic formation of multilayer part of hydration surroundings at high water content in DNA.

KEY WORDS: DNA, conformations, hydration, sorption, binding energy

UREA EFFECT ON DNA TRANSITION INTO COMPACT STATE ON Cu²⁺ ION BINDING

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; E-mail: hackl@ilt.kharkov.ua

By IR-spectroscopy, the study of Cu²⁺ ion interaction with DNA in aqueous solutions containing urea additions (0.17 ÷ 5 M) was carried out. In all solutions studied the Cu²⁺-induced DNA transition into compact state occurred and, as in aqueous solution, the transition was of the cooperative character. Urea added to the DNA aqueous solution is shown to decrease the Cu²⁺ ion concentration required to induce DNA compactisation. This is connected with increase of the screening effect of counterions due to their dehydration in the presence of urea. Perhaps, the DNA transition into the compact state under the action of copper ions is conditioned not only by effects of dielectric permeability of the solution on the Cu²⁺ binding to the biopolymer but those of solvation, at that effects would predominate with small changes in ϵ .

Besides, urea added to the DNA solution decreases the cooperativity of the compactisation process under the Cu²⁺ ions action. Perhaps, the cooperativity of the DNA transition into the compact state is partially conditioned at least by that of changes in the water structure. With the increase of sodium ion concentration in solution the DNA transition in the compact state becomes much less cooperative and requires the higher concentration of Cu²⁺ ions that can be explained with the competition of Na⁺ and Cu²⁺ ions for the binding sites on DNA. Thus, the Cu²⁺ binding to DNA condition the DNA transition into the compact state even in solutions of the changed water structure.

KEY WORDS: DNA, IR-spectroscopy, Cu²⁺ ions, urea, DNA condensation

UV-SPECTROSCOPY STUDY OF THE EFFECT OF TEMPERATURE ON HUMAN BLOOD PLATELETS

V.P. Berest, T.F. Morozova¹, S.V. Gatash

Kharkov State University, 4 Smbody Sq., Kharkov 310077, Ukraine; ¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine

The structural changes of human blood platelet proteins at temperatures from 6 to 40°C have been studied by using UV-spectroscopy method. The change of platelet shape has been found at 14-18 °C when heated. This fact is probably connected to a rearrangement of the cytoskeleton and actin polymerisation. The structural changes of ADP and fibrinogen receptors of the platelet plasma membrane have been observed at 18-20°C and 30-32°C, as well. It has been supposed that these changes determine the features of the dependence of ADP-induced platelet aggregation on temperature.

KEY WORDS: platelet, aggregation, receptors, temperature, UV-spectroscopy

RIBONUCLEASE INTERACTION WITH LIPOSOMES

G.P. Gorbenko

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

The interaction of the cationic protein ribonuclease with negatively charged liposomes composed of phosphatidylcholine and diphosphatidylglycerol has been studied. In terms of the lattice and continual models of large ligand adsorption on the surface parameters of the protein-lipid complex formation have been estimated. Positive cooperativity of the ribonuclease binding to lipid bilayer has been found. It was assumed that the bound protein self-association enhanced upon increasing surface charge of the lipid bilayer.

KEY WORDS: ribonuclease, liposomes, adsorption models, binding parameters, cooperativity, protein self-association

THE PHYSICO-MATHEMATICAL MODEL OF HYPOTONIC HEMOLYSIS OF HUMAN ERYTHROCYTES BEHAVIOURE. II. STAGE OF HEMOLYSIS

E.A. Gordienko, Yu.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 at hemolysis stage.

KEY WORDS: human erythrocyte, physico-mathematical model, hypotonic gemolysis, pore.

DETERMINATION OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE PERMEABILITY COEFFICIENTS TO CRYOPROTECTANTS.

O.I. Gordienko, Y.E. Panina, I.F. Kovalenko

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

Donor and cord blood erythrocyte permeability coefficients to dimethylsulfoxide, glycerol and other cryoprotectants were determined by the small angular light scattering method using the physico-mathematical theory of the hypotonic hemolysis phenomenon developed previously.

KEY WORDS: erythrocyte, permeability coefficient, dimethylsulfoxide, glycerol, light scattering

THE INFLUENCE OF THE GRAMICIDIN S ON HUMAN PLATELETS

E.V. Hackl¹, S.V. Gatash, V.P. Berest

¹Institute for Low Temperature Physics and Engineering, National Academy of Science of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov 310164, Ukraine; Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine

The influence of the polypeptide antibiotic gramicidin S (GS) on human platelets was studied in vitro by optical method. It was shown, that GS induce the platelet aggregates disintegration. The dependence of the degree and velocity of platelet aggregates disintegration under the GS influence on temperature were obtained in temperature interval 4-45°C. It was shown that the membranes of platelets forming aggregates preserve their integrity. We suggest that platelet aggregates formed at 33-37°C have a heightened strength.

The possibility to test the phase transitions of membrane lipids by optical method with the help of GS was shown. We propose a method of examination of the state of membrane lipid bilayer with the help of antibiotic GS.

KEY WORDS: platelets, gramicidin S, aggregates disintegration, membranes, temperature

CYTOCHROME C BINDING TO MODEL PHOSPHOLIPID MEMBRANES

G.P.Gorbenko

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

Cytochrome C interaction with model phospholipid membranes composed of phosphatidylcholine mixtures with phosphatidylserine or diphosphatidylglycerol has been studied. The binding isotherms have been analyzed in terms of two-dimensional lattice models of large ligand adsorption to membranes. Binding parameters including association constant, binding stoichiometry, enthalpy and entropy changes upon the formation of protein - lipid complexes have been estimated.

KEY WORDS: cytochrome C, liposomes, binding isotherms, lattice adsorption models, parameters of the complex formation

THEORETICAL DEPENDENCE OF PHOSPHATE POTENTIAL ON MAGNITUDE OF PROTONMOTIVE FORCE FOR MODEL OF TWO-ELECTRONIC PROTON-CHEMICAL COUPLING POINT.

A.G. Anishkin, V.V. Lemesko

Biology Research Institute of Kharkov State University, 4 Svobody sq., Kharkov 310077, Ukraine

The model of a two-electronic proton-chemical coupling point is considered. Computer analysis of the model shows that the phosphate to membrane potential ratio of mitochondria, being in the state 4 (by Chance), is increased under rising of the uncoupler concentration in the medium. The obtained theoretical dependence is in qualitative accordance with the experimental data, contradicting chemiosmotic hypothesis.

KEY WORDS: respiration, oxidative phosphorylation, coupling mechanism, mathematical modeling.

EFFECT OF RHODIOLA ROSEA L. PREPARATION ON THE INTEGRITY OF THE MEMBRANES IN THE ISCHEMIC HEART

T.N.Ovsyannikova, Yu.V.Nikitchenko, V.V.Lemesko

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

The membranes-protective and antioxidant property of Rhodiola rosea L. alcohol tincture during myocardial ischemia was proved in this article. It was shown that the rate of enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation as well as output of lactat dehydrogenase to the perfusion liquid from isolated hearts of the rats, which got Rhodiola rosea L. tincture, have decreased more than the same characteristics of the hearts of the control rats and rats, which got the vitamin E as the comparative preparation.

KEY WORDS: myocardial ischemia, membranes, lipid peroxidation, Rhodiola rosea L., vitamin E, lactat dehydrogenase.

PHYSICAL MODEL OF THE HYPERTONIC CRYOHEMOLYSIS PHENOMENON

S.E.Kovalenko

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

Physical model of the hypertonic cryohemolysis phenomenon is briefly stated in this article. It explains basic regularities of this phenomenon.

KEY WORDS: human erythrocyte, physical model, hypertonic cryohemolysis

UV-SPECTROSCOPY AND STRUCTURAL FEATURES OF MODEL MEMBRANES AND LIQUID CRYSTALLINE BIOEQUIVALENT SYSTEMS

O.V. Korzovskaya, L. N. Lisetski, V. D. Panikarskaya

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

Temperature-dependent UV spectra were measured for lyotropic systems based on hydrated

phospholipids. Similar studies were carried out for thermotropic liquid crystalline (LC) systems used as sensitive materials for bioequivalent sensors. Comparative analysis of the data obtained for both types of systems allowed to clearly distinguish between the effects on molecular level typical for conventional electronic absorption spectra, and specific affects related to changes of the phase state and supramolecular structure on the level of short- and long-range LC ordering. In the latter case, temperature dependences of the optical density of the respective systems.

KEY WORDS: UV-spectra, model membranes, phase transitions, liquid crystals, hydrated phospholipids, peptide dopants.

THE STUDY OF CRYOPROTECTANT WATER SOLUTIONS BY METHOD OF THERMOPLASTIC DEFORMATION

A.I. Osetsky

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

In the present work the peculiarities of glycerol water solution crystallization have been studied by the method of thermoplastic deformation and the difference of real diagram of this solution phase-structural states from equilibrium one has been discussed.

KEY WORDS: crystallization, thermoplastic deformation, cryoprotectant water solution.

THE ANALYSIS OF THE FREEZING-THAWING PROCESS OF THE 5% AND 10% DIMETHYLSULFOXIDE ON THE HENKS MEDIUM BY THE THERMODYNAMOMETRY METHOD

V.I. Grischenko, V.A. Keros

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

Volume change of the testis tissue fragments was studied while cooling them to -80°C with the rate of $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and its following thawing with the rate of $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. For cryopreservation of this object 5% concentration of dimethylsulfoxide and 30 min exposition of the cryopreserved sample in the cryoprotective media before cooling are recommended basing on the data obtained.

KEY WORDS: testis, crystallization, melting, dimethylsulfoxide.

PHYSICAL AND MATHEMATICAL ANALYSIS AND EXPERIMENTAL STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF SPRING, WHICH IS USED TO EQUIP WITH PROSTHETIC APPLIANCE BLOOD VESSELS

V.Ye. Shekhanin

Kharkov Center for Cardiac and Vessel Surgery

The algorithm for calculation of mechanical properties of a spring to equip distanationally the with prosthetic appliance blood vessels has been worked out in this paper, the algorithm has been proved experimentally.

KEY WORDS: physical and mathematical analysis, mechanical properties of a spring.

INFLUENCE OF THE CHANGES IN THE DNA STRUCTURE ON THE BINDING OF BIOLOGICALLY ACTIVE NUCLEOSIDES WITH DNA EXTRACTED FROM SEX CELLS OF IRRADIATED RATS

E.B. Kruglova, N.A. Krutko, A.A. Krasnitskaya, N.A. Karpenko¹, M.Yu. Alesina¹, V.Ya. Maleev

*Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine, 12 Acad. Proskura St., Kharkov
310085, Ukraine: ¹Chernobyl Scientific and Technical Center for International Research, 6 Shkolnaya St., Chernobyl
255620, Ukraine*

Using the comparison of the thermal denaturation profiles of the pure DNA and its mixtures with biologically nucleosides (NUC): cytosine arabinoside, 6-azacytidine and 6-azauridine, the differences in the binding of the observed NUC with DNA molecules from the control and irradiated rats with total doses from 2 to 57 cGy were found. It was shown that the shift of the melting curves of DNA-NUC mixtures relatively to the melting curves of the pure DNA to the higher temperature region depended on

the irradiation dose and the used NUC. The obtained indicate that: (1) the binding of the NUC with DNA from the irradiated tissue increases; (2) these NUC can be used as the markers of the changes in the structure of DNA irradiated with very low doses.

KEY WORDS: ionizing radiation, low doses, DNA melting curves, UV-spectrophotometry, cytosine arabinoside, 6-azacytidine, 6-azauridine.

THE CHANGES IN THE SPECTRAL PROPERTIES OF FIBRINOGEN INDUCED WITH X-RAYS

E.A. Romodanova, H.K. Andreeva, S.V. Gatash, T.S. Dyubko¹

Kharkov State University, 4 Svobody Sq., Kharkov 310077, Ukraine; ¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., Kharkov 310015, Ukraine

The influence of X-rays on the fibrinogen macrostructure was studied. In the experiment fibrinogen obtained from the Kharkov Blood Transfusion Station was used. The fibrinogen solutions were irradiated by Co⁶⁰ source with homogenous field of radiation with dose power 840 R/min. The absorption and fluorescence spectra of protein and fluorescence probe 4-dimethylaminohalkon (DMH) was obtained. The dose-effect dependencies for fluorescence intensity of both probe and protein are nonmonotonous. The results obtained allow us to conclude that after irradiation by 30-60 Gy dose the conformational transition in protein molecule takes place.

KEY WORDS: fibrinogen, X-rays, conformational transitions, fluorescence probes, fluorescence spectra.

THE INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON THE Mg ATPase STRUCTURE

G.V.Zima, V.I.Dreval

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

Structural changes of membrane proteins of the erythrocyte plasma membrane under the influence of ionizing radiation have been investigated. Fluorescence intensity changes of membrane proteins triptophane residues during titration the membrane by ions Mg were studied. An association constant and an association place number have been determined. Changing of membrane surface potential and value of Hill coefficient were calculated.

KEY WORDS: ionizing radiation, erythrocyte plasma membrane, fluorescence of protein, spectroscopy.

STRUCTURE CHANGES OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE UPON INFLUENCE OF GAMMA-RADIATION

V.I.Dreval, L.V.Sichevska

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

It has been observed that influence of radiation within dosages 10, 10², 5*10² and 10³ Gr on the erythrocyte membrane causes the structure changes of membrane's protein component. It was determined changes of surface protein globules and internal hydrophobic nuclear of molecules of protein, change in the space structure of the protein-lipid complexes. It was determined interconnection POL and change of viscosity lipid component of the erythrocyte membrane upon influence of gamma-radiation.

KEY WORDS: radiation, erythrocyte membrane, lipid peroxidation, microviscosity of lipids.

LOW - INTENSE ELECTROMAGNETIC MICROWAVES AND BIOLOGICAL OBJECTS : ACTION EFFECTS AND BIOPHYSICAL MECHANISMS

B.G. Yemets

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

Biological action effects of the low-intense radiation levels of electromagnetic microwaves are considered. It is shown that in spite of the low radiation levels, microwave polluting of the medium is an ecologically-significant factor. A mechanism of microwaves having effects on the biological objects, based on transforming of electromagnetic energy into thermal one, resulting in subsequent motion effects of the intercellular liquid elements (including air present in the liquid) in the field of a temperature gradient is suggested.

KEY WORDS: biological cells, biological membranes, unmixed near-membrane layer of water, convective motion, electromagnetic field, microwaves, near zone of radiator.

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.

У роботі представлені результати експериментальної перевірки адекватності існуючих моделей взаємодії біологічно активних речовин з ...

КЛЮЧОВІ СЛОВА: об'єкт, метод, область дослідження, специфіка даної роботи

У 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.

Підписано до друку 16.11.98. Формат 60x84. 1/8. Умов. друк.
арк. 8,03. Облік.-вид. арк. 11,5. Тираж 200.

310077, Харків, пл. Свободи, 4, Харківський державний
університет. Видавничий центр ХДУ. 4-20