

Задачи Спецпрактикума

Задачи спецпрактикума выполняются студентами 4 курса. Длительность каждой задачи – 1 учебная неделя.

Задачи разработаны специально для НОЦ

Список задач спецпрактикума.

1. Модификация активности антиоксидантных ферментов крови наночастицами серебра *in vitro*
2. Влияние наночастиц серебра на структуру и функционирование нервных волокон
3. «Современные методы моделирования белок-белковых взаимодействий
4. Транспорт неэлектролитов через природные мембранные нанопоры
5. Методы модификации состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов
6. Определение эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET), фёрстеровского радиуса и константы скорости переноса энергии от квантовых точек к биологическим акцепторам
7. Молекулярно-механическое моделирование свойств углеродных нанотрубок
8. Изучение токсичности наноматериалов с использованием флуоресценции микроводорослей
9. Методы приготовления и анализа моноламеллярных липосом
10. Диссипативные структуры в реакции Белоусова-Жаботинского с реагентами, диспергированными в обращенной АОТ микроэмульсии
11. Методы комплексного исследования действия нанообъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов

«Модификация активности антиоксидантных ферментов крови наночастицами серебра *in vitro*», Байжуманов А.А., Паршина Е.Ю.

Аннотация задачи

В последнее время в медицине и биологии возник интерес к использованию наночастиц серебра из-за их более широких физико-химических свойств и биологической активности по сравнению с серебром в обычном физико-химическом состоянии. Спектр их применения возрос и в потребительской продукции, начиная от дезинфекции медицинской техники до бытовой техники по очистке воды. Однако при употреблении препаратов содержащих наночастицы серебра - часть из них может попасть в кровь. Ряд современных исследований убедительно доказывает негативные цитотоксические эффекты наночастиц серебра, при этом механизм их цитотоксичности не ясен. Предполагают, что в основе этих эффектов может лежать вызываемый наночастицами серебра окислительный стресс. Основными антиоксидантными ферментами крови являются супероксиддисмутаза и каталаза. Супероксиддисмутаза (СОД) катализирует дисмутацию супероксидных анион-радикалов. В крови млекопитающих Cu,Zn -содержащая СОД расположена в основном в эритроцитах, где присутствуют в виде димеров Mg 31300; каждая субъединица содержит один атом меди и один атом цинка. Каталаза катализирует окислительно-восстановительную реакцию, в ходе которой из 2 молекул перекиси водорода образуются вода и кислород. Каталаза (Mg 250000) относится к хромопротеидам, имеющим в качестве простетической (небелковой) группы окисленный гем. Активности каталазы и СОД коррелируют между собой, что возможно связано с переключением потока электронов с одной цепи транспорта на другую. Сдвиг в работе антиоксидантных ферментов (АФ) приводят к увеличению или снижению активных форм кислорода, что соответственно приводит в итоге к изменениям в содержании конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Цель работы: изучить, влияние наночастиц серебра на СОД и каталазную активности и структуру плазматической мембраны эритроцитов.

Объекты исследования: гемолизаты крови, плазма крови, наночастицы серебра, эритроциты млекопитающих.

Используемые методы: метод золь-гель*; метод поверхностного плазмонного резонанса*; метод динамического светорассеяния*; спектрофотометрический метод

определения активности супероксиддисмутазы; спектрофотометрический метод определения активности каталазы; гемихромный метод определения концентрации гемоглобина, метод ЭПР.

План работы:

Получить коллоидные растворы серебра с разными размерами наночастиц*.

Оценить размеры наночастиц по положению пика плазмонного резонанса на спектрах поглощения и при помощи метода динамического светорассеяния*.

Выделить кровь, получить эритроцитарную массу, гемолизаты крови.

Освоить методику определения супероксиддисмутазной активности гемолизатов крови

Освоить методику определения каталазной активности гемолизатов крови

Освоить гемихромный метод определения концентрации гемоглобина.

Инкубация крови с коллоидными растворами серебра и определение модифицированной активности АФ.

Оценить методом ЭПР с использованием спиновых зондов 5 и 16ДС изменение микровязкости мембраны эритроцитов после инкубации их с наночастицами серебра.

Предполагаемые результаты:

В процессе работы студенты освоят методы получения коллоидных растворов с разным размером наночастиц серебра, получать эритроцитарную массу и гемолизаты крови, определять активности АФ. На примере конкретного исследования смогут выяснить, что может лежать в основе цитотоксических эффектов наночастиц серебра. В частности определять в экспериментах *in vitro*, как влияют нанобъекты на антиоксидантный статус крови млекопитающих. Получат навыки статистической обработки полученных результатов и подготовки отчета с представлением полученных результатов.

* В случае, если не выполняется задача “Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра”.

Оценка итогов проведенного практикума

По окончании прохождения практикума студенты пишут самостоятельный отчет по задаче с описанием полученных результатов. Отчет студенты сдают на проверку руководителю задачи. В установленный срок отчет возвращается студенту с оценкой.

Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

В ходе выполнения работы использовалось следующее оборудование:

- 1) центрифуга Laborfuge 400R производства фирмы «Thermo Scientific»
- 2) вортекс «Bio Vortex V1» производства фирмы «Biosan»
- 3) магнитная мешалка MSH 300 производства фирмы «Biosan»
- 4) водяная баня WB-4MS производства фирмы «Biosan»
- 5) pH-метр pH410 производства фирмы «Аквилон»
- 6) спектрофотометр Hitachi 556 с термостатируемым кюветным отделением
- 7) ЭПР-спектрометр РЭ 1307, Россия

Описание задачи

Введение

Известно, что одними из веществ индуцирующими цитотоксичность являются активные формы кислорода, которые в умеренных количествах стимулируют защитные силы организма за счет увеличения скорости метаболических процессов. Окислительный стресс есть нарушение нормального физиологического баланса, когда количество образовавшихся активных форм кислорода больше, чем способны инактивировать антиоксиданты. Активные формы кислорода – определение, которое включает ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси. Это – супероксиданионрадикал $O^{\cdot-}$, перекись водорода H_2O_2 , радикал гидроксила $OH^{\cdot}$, пергидроксид $HO_2^{\cdot}$, синглетный кислород 1O_2 , гипохлорит $ClO^{\cdot-}$. Активные формы азота: $NO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot-}$. К АФК можно отнести и другие соединения, легко продуцирующие свободные радикалы - озон - O_3 , пероксинитрит - $ONOOH$, гидроперекись - $ROOH$, органическая перекись $ROOR$, а также монооксид углерода - CO .

В работе [Kim S. et all, 2009] в экспериментах *in vitro* было показано, что одним из механизмов цитотоксичности наночастиц серебра при инкубации их с культурой клеток человеческой гепатомы является индукция внутриклеточного окислительного стресса.

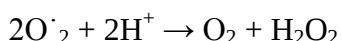
Авторы предполагают, что в основе цитотоксичности наночастиц серебра лежит вызываемый ими окислительный стресс, и она не связана с токсичностью ионов серебра. Показано, что токсические эффекты, вызванные наночастицами серебра, были снижены при использовании такого антиоксиданта, как N-ацетилцистеин.

При исследовании механизмов цитотоксичности наночастиц серебра [Park E., et al., 2009] было показано, что инкубация их с культурой клеток RAW264,7 приводит к апоптозу. Наночастицы серебра приводили к снижению уровня внутриклеточного глутатиона, увеличению концентрации NO, увеличению концентрации цитокинов TNF-alpha и генной экспрессии матричных металлопротеиназ.

Для выявления возможных физиологических, биофизических и биохимических эффектов наночастиц серебра и выяснение того, что лежит в основе их цитотоксических эффектов, представляется актуальным исследовать влияние препаратов их содержащих на антиоксидантную систему крови, так как состояние крови является интегральным показателем и позволит оценить протекание процессов в масштабах всего организма.

Обзор изучаемых ферментов

Супероксиддисмутаза (superoxide dismutase, $2O_2^{\cdot-}$ -оксидоредуктаза, COD, СОД, КФ 1.15.1.1) представлены семейством металлоферментов из класса оксидоредуктаз, катализирующих диспропорционирование (дисмутацию) супероксидных анион-радикалов:



В цитоплазме эукариот супероксиддисмутаза присутствует в виде димеров молекулярной массой 31300; каждая субъединица содержит один атом меди и один атом цинка. Предполагается, что медь связана с тремя атомами азота имидазольной группы и подвергается последовательному окислению и восстановлению в реакции с перекисными радикалами. СОД присутствуют во всех тканях аэробиионтов.



Рис.1. Схематическое изображение структуры СОД.

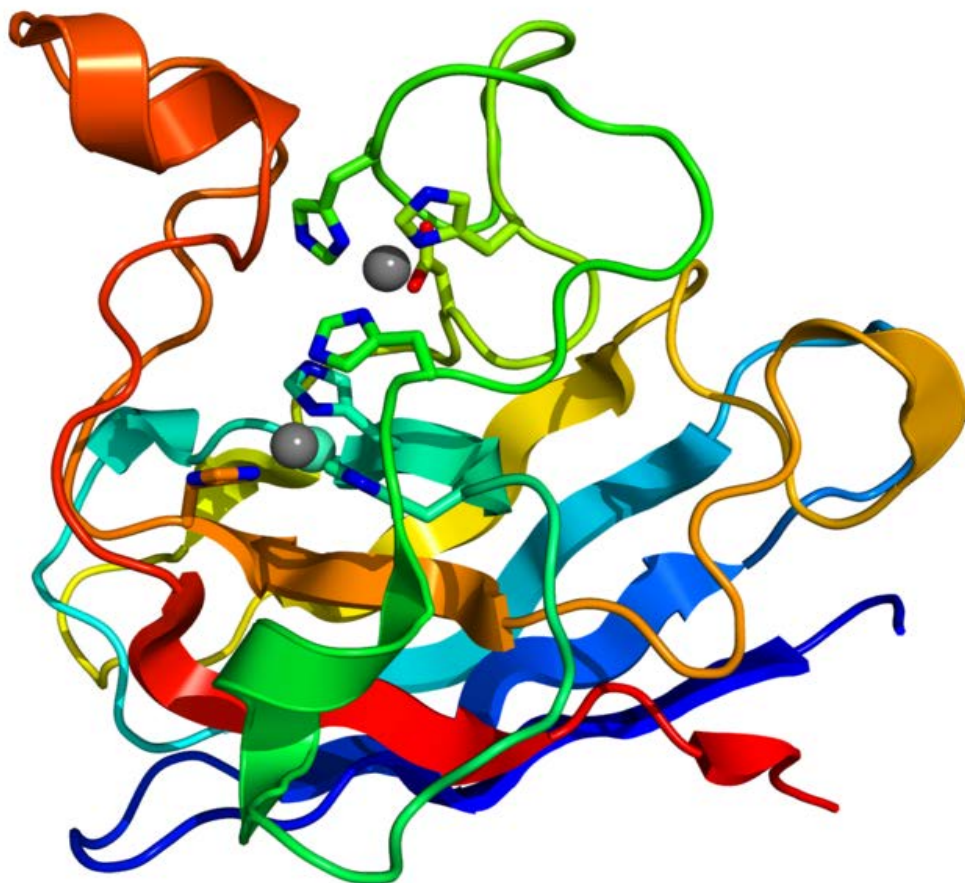


Рис. 2 Кристаллографическая структура супероксиддисмутазы I человека, полипептидная цепь изображена радужными цветами (N-конец обозначен синим, С-конец красным) в комплексе с медью (сине-зеленый шар) и цинком (серый шар) [Cao X, et al., 2008]

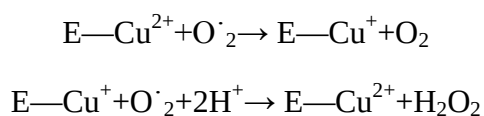
Было показано, что организмы различной степени сложности, утилизирующие кислород в процессах обмена, содержат ферменты, обладающие СОД-активностью. Ферменты различаются по первичной структуре и по природе металлов, входящих в активный центр. Cu,Zn-СОД можно рассматривать как эукариотический цитозольный фермент, Fe-СОД и Mn-СОД - как прокариотические ферменты, однако Mn-СОД содержится в митохондриальном матриксе эукариот; в ряде бактерий обнаружена Cu,Zn-СОД, а в некоторых растениях - Fe-СОД.

По активности СОД органы млекопитающих различаются в десятки раз. Наивысшая активность Cu,Zn- и Mn-СОД обнаружена в печени. Высокой активностью Cu,Zn-СОД отличаются эритроциты что позволяет использовать кровь как источник для выделения и очистки фермента.

Cu,Zn-СОД обладает наибольшей активностью среди СОД. Константа скорости реакции составляет 2^{10} мс, что близко к величине константы скорости реакций, контролируемых диффузией [Karlsson K., Marklund St., 1988].

В клетках млекопитающих супероксиддисмутаза, в основном, локализованы в цитозоле; около 10% фермента (по массе) находится в митохондриальных мембранах.

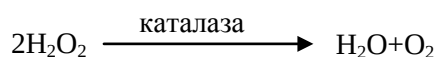
Механизм действия СОД можно представить схемой (E—Cu²⁺-фермент):



Донором протонов, вероятно, является имидазольное кольцо остатка гистидина, связывающее ионы металлов. СОД, содержащие Cu²⁺ и Zn²⁺, инактивируются H₂O₂ из-за образования комплексов ионов этих металлов с OH[·].

СОД характеризуется необычайной структурной стабильностью и является одним из наиболее термостабильных глобулярных белков. Cu(II) и Zn(II) расположены на дне глубокого, узкого канала на расстоянии 6,3 Å: Zn погружен полностью, Cu более открыта и доступна для растворителя.

Каталаза (CAT; EC 1.11.1.6) – фермент из группы гидропероксидаз, катализирующий окислительно-восстановительную реакцию, в ходе которой из 2 молекул перекиси водорода образуются вода и кислород:



Каталаза (молекулярная масса 250 кДа) относится к хромопротеинам, имеющим в качестве простетической (небелковой) группы окисленный гем. Специфичность каталазы в отношении к субстрату-восстановителю невелика, поэтому каталаза может катализировать не только разложение H₂O₂, но и окисление низших спиртов. Функция каталазы сводится к разрушению токсической перекиси водорода, образующейся в ходе различных окислительных процессов в организме. Одна молекула каталазы может разлагать до миллиона молекул перекиси водорода в воду и кислород в секунду. Неконкурентными ингибиторами каталазы являются катионы тяжелых металлов, такие как, например, медь в сульфате меди, а цианиды являются конкурентными ингибиторами каталазы. В клетках каталаза содержится в пероксисомах [Azevedo-Martins A.K., Curi R., 2007].

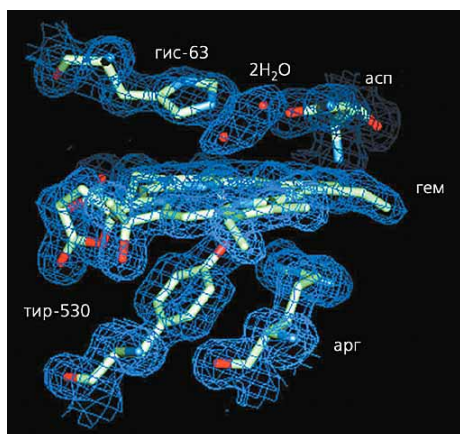


Рис.3. Активный центр каталазы *Penicillium vitale* с двумя молекулами воды, включающий гем (плоская группа в центре рисунка), аминокислотные остатки гистидина и аспарагина (вверху), и аминокислотные остатки тирозина и аргинина (внизу) [Владимиров Ю.А., 2003]

Материалы и методы

Материалы используемые в задаче

1. Адреналин, (ICN, USA).
2. ЭДТА, додецилсульфат натрия (Serva, Germany).
3. NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , NHCl (Sigma-Aldrich, Germany)
4. Na_2CO_3 , NaHCO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 , ледяная уксусная кислота, CH_3COONa , H_2O_2 , HCl , NaOH , хлороформ, гепарин, отечественного производства, градации не ниже ч.д.а.
5. Спиновые зонды 5 и 16 ДС (Sigma, USA)

Приготовление растворов

Приготовление коллоидного раствора серебра, приготовление изотонического буфера Алена (мМ) и приготовление гипертонического буфера Алена, было таким же, как в задаче «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в intactных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра»

Приготовление 3 мМ раствора NaCl

58,5 мг NaCl разбавляем в 10 мл дистиллированной воды, получаем 0,1 М раствор NaCl. Затем к 1 мл 0,1 М раствора NaCl добавляем 32,3 мл дистиллированной воды и получаем гипоосмолярный раствор NaCl.

Приготовление 0,05 М калий-фосфатного буфера с pH 7.0

Реактив А. 6,805 г KH_2PO_4 разбавляют в 47,71 мл H_2O - 1 М раствор.

Реактив Б. 57,05 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ в 250 мл H_2O - 1 М раствор.

Реактив А и Б с концентрацией 1 М разводим до 0,05 М. Для этого к 5 мл 1 М раствора доливаем 95 мл H_2O . Доводим pH 0,05 М реактива Б добавлением 0,05 М реактива А.

Приготовление 0,05М бикарбонатного буфера pH 10,0

Готовим 275 мл 0,1 М раствора Na_2CO_3 (2,9 г разбавляем в 275 мл) и 225 мл NaHCO_3 (1,89 г в 225 мл воды). Смешиваем растворы, добавляем в них 23,4 мг ЭДТА. Доводим pH до 10,0 2 N соляной кислотой или 1 NaOH.

Приготовление стокового раствора адреналина

Готовим 0,05 М раствор адреналина: 22,9 мг адреналина (Мг 183,2) в 2,5 мл в 2N HCl.

Храним в пробирках Эппендорфа при -20 по 0,2 мл. Перед измерением добавляем в пробирки Эппендорфа 1 мл воды (получаем концентрацию адреналина 8,3 мМ). Конечная концентрация адреналина в 2, 075 мл - 0.2мМ.

Приготовление 0,06% раствора додецилсульфата натрия

60 мг растворяют в 100 мл дистиллированной воды

Методика забора крови

Крыс усыпляют хлороформом. Забор крови (около 10 мл) производят из венозного синуса и собирают в гепаринизированные пробирки (10 ед. на 1 мл крови). Кровь после выделения сразу охлаждают и хранят при +4°C.

Получение эритроцитарной массы методом центрифугирования

Клетки крови осаждаются в центробежном поле. Скорость седиментации зависит от плотности раствора, массы клеток, их размеров и формы, а также от ускорения силы тяжести и действующих на клетки центробежных сил. Гепаринизированную кровь разливают в центрифужные пробирки, уравнивают их на весах. Устанавливают в противоположные бакет-роторы. Центрифугируют кровь при 2000 об/мин, 10 минут, при +4⁰С на центрифуге.

По окончании центрифугирования при полной остановке ротора достают пробирки и аккуратно отбирают плазму. Взамен плазмы наливают равное ей количество изотонического буфера Алена, аккуратно перемешивают клетки крови с буфером. Снова уравнивают пробирки на весах и повторно центрифугируют при тех же условиях. Повторяют эти процедуры еще 2 раза.

Супернатант полученный при последнем центрифугировании сливают, а выделенную в конечном итоге эритроцитарную массу используют в дальнейших экспериментах.

Инкубация эритроцитов с коллоидными растворами серебра

Так как коллоидные растворы серебра являются гипоосмолярными то, для того, чтобы эритроциты находились в физиологических условиях, мы сначала помещаем разбавленные эритроциты в гиперосмолярный буфер Алена, а затем быстро добавляем коллоидный раствор серебра.

Сначала эритроцитарную массу разбавляем в 10 раз изотоническим раствором буфера Алена. И так к 0,1 мл эритроцитарной массы добавляем 0,9 мл изотонического буфера Алена.

Затем быстро разбавляем их в 100 раз в гиперосмолярном буфере Алена.

То есть к 120 мкл (разбавленной в 10 раз) эритроцитарной массы добавляем 11.88 мл гиперосмолярного буфера Алена. И также быстро к 12 мл раствора эритроцитов (разведение в 1000 раз, гиперосмолярный буфер) добавляем 8 мл коллоидного раствора. Процедуры перемешивания не должна занять больше 30 секунд для того, чтобы как можно меньше подвергать клетки осмотическому шоку. Инкубируем эритроциты 30 минут в темноте при комнатной температуре.

В качестве контроля к 12 мл аналогичным образом разбавленным эритроцитам добавляем 8 мл раствора 3 мМ NaCl, так как его гипоосмолярность соответствует гипоосмолярности

раствора коллоидного серебра, для того чтобы эритроциты в контрольной пробе подвергались таким же осмотическим условиям.

По окончании инкубирования переливаем контрольные и опытные пробы в центрифужные пробирки по 10 мл в каждую. Центрифугируем 10 минут при 4°C и 2000 об/мин. После центрифугирования аккуратно сливаем супернатант. Оставшийся осадок переносим в пробирки Эппендорфа. Разбавляем осадки в 1 мл воды.

Для того чтобы осадить серебро и тени эритроцитов центрифугируем пробирки Эппендорфа при комнатной температуре при 3000 об/мин 10 минут.

Переливаем супернатант в новые пробирки и используем этот гемолизат для дальнейших экспериментов.

Сначала определяем концентрацию гемоглобина в полученных контрольных и опытных гемолизатах.

Определение концентрации гемоглобина в гемолизате [по методу Ахрем и др., 1989]

Готовят 0,06 % водный раствор додецилсульфата натрия. Разливаем по 1,96 мл этого раствора в пробирки. Добавляем по 40 мкл гемолизата в опытные пробы и по 40 мкл воды в контрольные. Перемешиваем на вортексе. Измеряем оптическую плотность раствора при 540 нм на спектрофотометре. В кювете сравнения 0,06% раствор додецилсульфата натрия.

Концентрацию рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{\Delta D \times n \times M_{\text{гемоглобина}}}{\epsilon \times l}$$

где $n=50$ – разведение гемолизата,

$M_{\text{гемоглобина}}$ равен 16114,

ϵ – молярная экстинкция гемоглобина при 540 нм ($10140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),

l – длина оптического пути (1 см)

После измерения концентрации гемоглобина в пробах - разводят гемолизаты водой так, чтобы концентрация в контрольном и опытном образцах была одинаковой.

Определение СОД активности гемолизата крови

Метод [Sung M., Zigman S., 1978] основан на измерении количества продукта окисления адреналина - адренохрома, поглощающего при 320 нм, образование которого происходит в отсутствие дополнительных источников генерации супероксида. Активность СОД оценивалась по ингибированию аутоокисления адреналина (в 0,05 М бикарбонатном буфере при рН 10.0) при добавлении образцов гемолизата крови в термостатируемых кюветах при 25С.

Для измерения аутоокисления адреналина в холостую пробу вносят 2,05 мл бикарбонатного буфера, в опытную – 2 мл буфера и 0,05 мл 0,2 мМ раствора адреналина. Оптическую плотность регистрируют через минуту (А) и через 5 минут (В) после внесения адреналина. Относительная скорость аутоокисления: $V = B - A$.

Для измерения ингибирования аутоокисления адреналина в контрольную кювету наливают 2,05 мл буфера, в опытную - 2 мл буфера, гемолизат крови в объеме 20 мкл и 0,05 мл раствора адреналина. Также измеряют оптическую плотность через 1 (A_i) и 5 (B_i) минут после добавления адреналина. Относительная скорость аутоокисления адреналина в присутствии биообразца: $V_i = B_i - A_i$.

Степень ингибирования скорости аутоокисления адреналина СОД рассчитывают по формуле:

$$I = \frac{(V - V_i)}{V} \cdot 100\%,$$

СОД-активность в пробе считают прямо пропорциональным степени ингибирования.

СОД -активность рассчитывают по формуле

$$СОД - \text{подобная активность} = \frac{I * \text{разведение}}{50 * C}$$

где С – концентрация гемоглобина в крови, а n - разведение гемолизата; и выражают в у.е. на грамм гемоглобина, где за одну условную единицу активности фермента принимали такое его количество, которое необходимо для ингибирования скорости аутоокисления на 50 %.

Определение каталазной активности гемолизата крови

Определение активности каталазы проводилось [Aebi H., 1984] в гемолизатах крови. Принцип метода основан на том, что каталаза разрушает H_2O_2 . Измеряют уменьшение оптической плотности образца при 240 нм в термостатируемых кюветах при 37°C.

Добавляем в пробирку 4,9 мл буфера (0,05 М KH_2PO_4 , pH 7,0). Прогреваем на водяной бане 5 минут при 37°C. Добавляют 0,2 мл гемолизата крови. Перемешиваем на вортексе. Вносим в каждую кювету по 2 мл этого раствора. В контрольную кювету добавляют 1 мл буфера, а в опытную – 1 мл 0,03 М раствора H_2O_2 , прогретого до 37°C. Регистрируют оптическую плотность через 10 и через 20 секунд после добавления перекиси водорода.

Одна единица каталазной активности была определена, как количество фермента необходимое, чтобы переработать 1 мМ H_2O_2 / мин. Количество израсходованной H_2O_2 / мин вычислялось с учетом коэффициента экстинкции.

Активность фермента пересчитывалась на 1 грамм гемоглобина.

Активность фермента (А) выражалась в килоединицах каталазной активности на грамм гемоглобина в минуту по формуле

$$\text{Каталазная активность} = \frac{\Delta D_{\text{мин}} * N * 1000}{C * \epsilon},$$

где С – концентрация гемоглобина в гемолизате крови;

ϵ - коэффициент экстинкции перекиси водорода ($46,3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

$\Delta D_{\text{мин}}$ - изменение оптической плотности за минуту;

N- разведение гемолизата (38,25)

Изучение влияния наночастиц серебра на микровязкость мембраны эритроцитов методом спиновых зондов

Для исследования влияния наночастиц серебра на микровязкость мембраны эритроцитов эритроцитарную массу инкубируют с наночастицами серебра как описано в разделе «Инкубация эритроцитов с коллоидными растворами серебра», для исследования используют образовавшийся после инкубации и центрифугирования осадок. Для исследования методом спиновых зондов необходим объем эритроцитарной массы равный 125 мкл для контрольных и опытных проб, поэтому для получения нужного количества осадка необходимо проводить инкубацию с наночастицами серебра и контрольных проб

как минимум в 10 пробирках в каждом случае. После инкубации и центрифугирования осадок опытных и контрольных проб, соответственно, собирают вместе и перемешивают.

Для корректной интерпретации спектров спиновых зондов исходная эритроцитарная масса должна иметь одинаковую концентрацию эритроцитов в опыте и контроле, соответственно, приблизительно 7×10^6 кл./мкл³. Подсчет клеток производится в камере Горяева. Для этого эритроцитарную массу разводят изотоническим буфером Алена в 200 раз. Камеру Горяева и покровное стекло протирают сухой тканью и притирают покровное стекло к краям камеры таким образом, чтобы появились радужные полосы. Суспензию эритроцитов, разведенную в 200 раз, тщательно перемешивают и вносят в камеру микропипеткой и оставляют на 2-3 мин для осаждения клеток. Подсчет клеток осуществляют под световым микроскопом с 10 или 20-кратным объективом. Считают количество клеток в 24 малых квадратах, расположенных по диагонали поля. Количество эритроцитов в 1 мкл³ рассчитывают по формуле:

$$N = (a \times 4000 \times 200) / 24,$$

где a – общее количество клеток в 24 малых квадратах, N – количество клеток в 1 мкл³. Суспензию эритроцитов в опыте и контроле разводят таким образом, чтобы получить одинаковую концентрацию клеток.

Вязкость мембраны эритроцитов определяют методом ЭПР (методом спиновых зондов). Стеариновую кислоту с парамагнитными фрагментами у разных углеродных атомов (5 и 16 – для 5 и 16ДС, соответственно) встраивают в мембрану эритроцитов.

Более подробно метод спиновых зондов и метод спектроскопии ЭПР описан в задаче «Методы модификации состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов». Дополнительную информацию можно получить из методических указаний к малому практикуму по биофизике, а также из источников (Современные методы биофизических исследований, 1988, Кузнецов, 1976).

Для регистрации спектров ЭПР спиновых зондов, встроенных в мембраны эритроцитов пробы готовят следующим образом. В пробирку Эппендорфа объемом 0.5 мл вносят 125 мкл суспензии эритроцитов и добавляют 0.5 мкл спиртового раствора зондов 5 или 16ДС в концентрации $2,5 \times 10^{-2}$ М, при этом конечная концентрация зонда в пробе составляет 1×10^{-4} М. Сразу после внесения зонда пробу следует быстро и тщательно перемешать. Измерение спектров можно осуществлять через 5 мин после добавления зонда в эритроцитарную массу, за это время произойдет встраивание зонда в мембрану эритроцитов. После перемешивания и инкубации в течение 5 мин пробу набирают в

пластиковый капилляр, который герметизируют (пластилином), тщательно протирают снаружи и помещают в резонатор прибора. Для записи спектра подбирают подходящие значения усиления, значение постоянной времени составляет 0.1 с, ослабление мощности СВЧ 12.5 Дб. По полученным спектрам определяют время вращательной корреляции τ_c в случае зонда 16 ДС и 2А' и S в случае зонда 5 ДС.

Статистическая обработка результатов

Достоверность различий в результатах между опытом и контролем оценивали по критерию Стьюдента в программе GraphPad Prism 5.

Требования к отчету о проделанной работе

Отчет должен содержать:

- Введение, в котором студенты должны дать характеристику объектов исследования - наночастиц серебра и АФ крови.
- Цель и основные задачи данного практикума.
- Описать ход работы, материалы и методы, используемые в практикуме.
- Представить в виде таблиц или графиков полученные результаты.
- Заключение, в котором студенты должны объяснить полученные результаты. и написать краткие выводы по задаче.

Контрольные вопросы к задаче

1. В каких пределах колеблется размер наночастиц серебра в коллоидных растворах?
2. Как зависит положение максимума на спектре поглощения коллоидного серебра от размеров наночастиц серебра в растворе?
3. Что выпадает в осадок при снижении температуры раствора коллоидного серебра до 4⁰С?
4. Предложите гипотезу, объясняющую ингибирующее действие наночастиц серебра на активности АФ крови.
5. Что в настоящее время считают основным механизмом, лежащим в основе цитотоксичности наночастиц серебра?

6. Какой из антиоксидантных ферментов по экспериментальным данным оказался более чувствителен к модифицирующему действию наночастиц серебра?
7. Каким образом инкубация с наночастицами серебра повлияла на микровязкость мембраны эритроцитов и как вы можете объяснить полученные результаты?

Список литературы

1. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселева С.И. Определение концентрации гемоглобина в крови с помощью додецилсульфата натрия.// Лаб.дело, 1989, №5, с.13-15.
2. Владимиров Ю.А. Зачем нужна белковая кристаллография.// Природа, 2003, №11, стр. 26-34
3. Кузнецов А.Н. Метод спинного зонда (основы и применение). М.: Наука, 1976.
4. Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике. Под ред. А.Б. Рубина. М.: Высш. шк., 1988. стр. 226-258.
5. Aebi H. Catalase in vitro. Method. Enzymol., 1984, v. 105, p.121-126.
6. Azevedo-Martins A.K., Curi R. Fatty acids decrease catalase activity in human leukaemia cell lines.// Cell Biochemistry and Function. 2007, Vol.26, Is.1, p.87-94.
7. Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, Strange RW, Doucette PA, Valentine JS, Tiwari A, Hayward LJ, Padua S, Cohlberg JA, Hasnain SS, Hart PJ (June 2008). "[Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis](#)". *J. Biol. Chem.* **283** (23): 16169–77.
8. Karlsson K., Marklund St. Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of Mammals.// Biochem. J. 1988, Vol. 255, p. 223-228.
9. Kim S., Choi J.E., Chung K.H., Park K., Yi J., Ryu D.Y. Oxidative stress-depend toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells.// Toxicology in Vitro. 2009, Vol.23(6), p.1078-1084.
10. Leopold, N., and B. Lendl. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *J. Phys. Chem.* 2003, B 107: 5723–5727.
11. Park E.J., Yi J., Choi K., Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism.// Toxicology in Vitro. Dec. 4. 2009
12. Sung M., Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation.// Analytical biochemistry. 1978, Vol.90, pp. 81-89.

«Влияние наночастиц серебра на структуру и функционирование нервных волокон», Браже А. Р.

Аннотация

Препарат седалищных нервов лягушки и отдельных миелинизированных нервных волокон представляет собой удобную тестовую систему. С одной стороны, он относительно стабилен и прост в приготовлении, а с другой — позволяет выявить влияние различных агентов на работоспособность нервной ткани.

Наиболее чувствительным элементом миелинизированных нервных волокон является паранодально-нодальный комплекс, т.е. перехват Ранвье, окружающие его ламеллы шванновских клеток и близлежащие области, образующие плотный контакт мембран шванновской клетки с мембраной аксона. Ряд внешних факторов приводит к динамическим структурным изменениям паранодального комплекса, в том числе к патологическому состоянию т.н. фокальной демиелинизации, которая сопровождается локальным расслоением миелина и потерей способности к нормальному проведению нервных импульсов.

Цель работы:

Исследовать влияние коллоидных наночастиц серебра на функциональные характеристики нервных волокон, такие как порог возбуждения, форму потенциалов действия и устойчивость проведения ритмического возбуждения, а также на структуру нервных волокон.

Объект исследований:

Препарат седалищных нервов и одиночных нервных волокон травяной лягушки *Rana temporaria*.

Методы исследования:

Экстраклеточная регистрация электрической активности тонких веток нервного ствола и отдельных нервных волокон при помощи подсасывающих электродов. Лазерная интерференционная микроскопия одиночных нервных волокон.

План работы:

- Приготовление препаратов нервных волокон

- Регистрация потенциалов действия, определение основных физиологических параметров возбуждения в норме и при действии наночастиц серебра
- Исследование структуры одиночных нервных волокон при помощи микроинтерферометрии.

Предполагаемые результаты:

- Изменения возбудимости нервных волокон и формы потенциалов действия после инкубации нерва с наночастицами
- Структурные изменения в паранодальной области нервных волокон: расслоение основных линий миелина, набухание паранодальных петель Шванновских клеток, увеличение линейных размеров перехватов Ранвье

Введение

Миелинизированное нервное волокно — сложная и высокоспециализированная структура, функции которой обеспечиваются согласованным взаимодействием двух типов клеток: аксона нейрона и глиальной клетки. Нарушения в структуре или динамике этого взаимодействия приводят к патологическим состояниям нервного волокна и потере им способности выполнять свои проводящие функции. Это сопровождается блоком проведения, парестезией, фасцикуляцией и болевыми синдромами.

Особенности структуры нервного волокна

Глиальная клетка (в периферической нервной системе — Шванновская клетка (ШК), а в центральной — олигодендроцит) образует изолирующую оболочку, многократно оборачиваясь вокруг аксона. Таким образом, основная часть миелиновой оболочки состоит из множества плотно упакованных концентрических слоев клеточных мембран, при этом основная часть цитоплазмы глиальной клетки вытесняется на периферию. Благодаря такому строению, миелин обладает низкой электрической емкостью и высоким сопротивлением, что улучшает проведение потенциалов действия по нервному волокну. Структура миелина, однако, неоднородна вдоль длины аксона.

Участки, свободные от миелиновой оболочки называются перехватами Ранвье. В непосредственной близости от перехватов Ранвье мембраны ШК (или олигодендроцита в ЦНС) образуют контакты с мембраной аксона. В образовании этих контактов участвует

комплекс специальных белков: нейрофасцинов, контактинов и каспринов (подробнее, см. Scherer & Arago, 2002). В этом т.н. *паранодальном* участке мембраны глиальной клетки и аксона находятся на расстоянии около 2 нм. Глиальная клетка в паранодальной области образует петли, заполненные цитоплазмой и богатые митохондриями, что указывает на активное участие глиальных клеток в обеспечении условий, необходимых для проведения потенциалов действия. Петли двух соседних ШК, разделенных перехватом Ранвье, смыкаются, образуя между собой плотные контакты. Периаксональное пространство в области перехвата, таким образом, оказывается достаточно ограниченным, хоть и не изолированным электрически. Ионные токи, проходящие через мембрану аксона при проведении потенциалов действия приводят к неравновесному распределению ряда ионов в этом объеме, в первую очередь, ионов K^+ . Комплекс петель ШК принимает активное участие в регуляции концентрации ионов в периаксональном пространстве и его объема.

К паранодальным участкам примыкают т.н. юстапаранодальные области нервного волокна, уже покрытые слоем миелина. Участок перехвата, паранодальный и юстапаранодальный участок вместе образуют т.н. паранодально-нодальный комплекс. Межперехватные участки, разделяющие паранодально-нодальные комплексы покрыты, в основном, плотным миелином. Участки плотного миелина прерываются т.н. насечками Шмидта-Лантермана, которые представляют собой заполненные цитоплазмой структуры ШК, создающие единый цитоплазматический канал сквозь миелиновую оболочку за счет плотных контактов между мембранами отдельных слоев миелина. Электрическое сопротивление миелина в этих участках ниже, кроме того, по насечкам осуществляется обмен ионами между периаксональным пространством и средой снаружи от миелиновой оболочки. Расстояние между аксональной и глиальной мембранами в межперехватных участках составляет около 10 нм.

Область прикрепления миелина осложняет латеральную диффузию ионных каналов аксональной мембраны. Вследствие этого наблюдается сегрегация отдельных типов ионных каналов: в области перехвата сконцентрированы потенциал-зависимые Na^+ -каналы, тогда как потенциал-зависимые K^+ -каналы сосредоточены под миелином, в юстапаранодальной области. Области повышенной концентрации K^+ -каналов наблюдаются также под насечками Шмидта-Лантермана.

Описанная структура, схематично изображенная на рис. 1, однако, довольно лабильна. Одним из неспецифических ответов нервного волокна на внешнее раздражение является т.н. функциональная демиелинизация (Сотников, 1976; Сотников 1985). К примеру, в режиме длительного проведения нервным волокном потенциалов действия происходит накопление ионов K^+ в периаксональном пространстве под миелином и в области перехвата. ШК обеспечивает удаление избыточного K за счет работы Na/K -насоса. При этом происходят изменения в структуре миелиновой оболочки: набухают паранодальные петли и насечки, происходит видимое удлинение перехватов Ранвье и сжатие аксона под набухшими областями. Однако паранодальный контакт между мембранами аксона и ШК при этом не разрушается. Фактически, такие структурные перестройки приводят к потере участками миелина его изолирующих свойств, т.е. демиелинизации. Такой ответ нервного волокна неспецифичен, и развивается при длительной стимуляции, ишемическом состоянии нерва, действии гипоосмотических растворов и т.п.

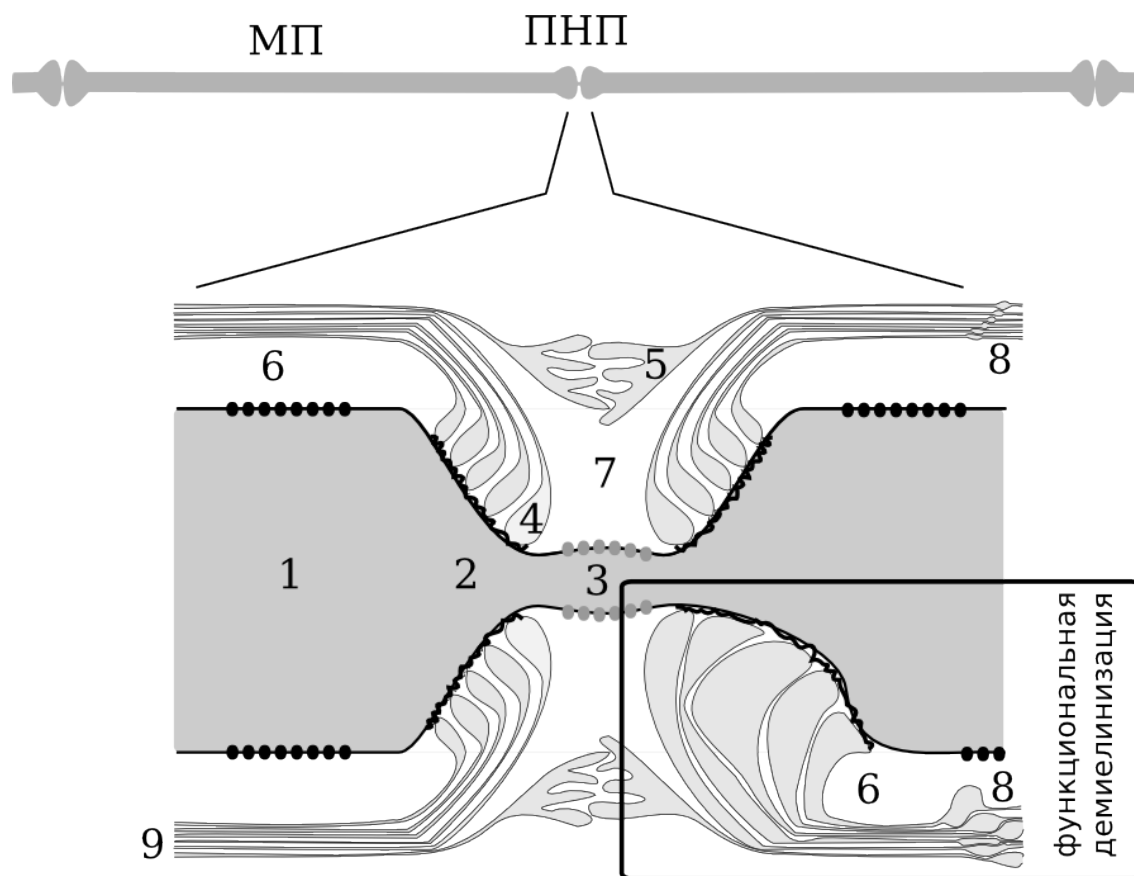


Рис.1.
Схематическое изображение миелинизации нервного волокна.

МП, межперехватный участок; ПНП, паранодально-нодальный комплекс; 1, юкстапаранодальный участок аксона; 2, паранодальный; 3, перехват Ранвье; 4,5, петли ШК; 6, скопление K -каналов в юкстапаранодальной области; 7 периаксональное пространство; 8 насечки Шмидта-Лантермана; 9, слои миелина.

Использование наночастиц

В настоящее время, различные наночастицы и их производные применяются для решения широкого круга экспериментальных и медицинских задач. К примеру, парамагнитные частицы оксида железа используются в качестве контрастирующего агента, в том числе для визуализации очагов повреждения и воспаления в нервной ткани (Stoll & Bendszus 2009, Bendszus and Stoll 2005, Petry et al 2007) а квантовые точки используются для флуоресцентной визуализации цитоскелета в функционирующих аксонах (Mudrakola et al. 2009). Водорастворимые производные фуллеренов, связанные с антагонистами NMDA-рецепторов предложено использовать в лечении рассеянного склероза в качестве нейропротектора (Basso et al. 2008). При помощи кремниевых наночастиц, покрытых химически модифицированной галактозой исследуется роль гликопротеинов глиальной мембраны в регуляции функционирования миелина (Boggs et al. 2010).

Важным вопросом при этом является возможная нейротоксичность используемых наноматериалов и их воздействие на нервную ткань. Миелиновое нервное волокно, и прежде всего паранодально-нодальный комплекс являются лабильной системой, которая позволяет оценить действие внешних факторов на функциональное состояние клеток и межклеточных связей.

Организация задачи

Оборудование

В ходе выполнения задачи используется следующее оборудование.

Оборудование для регистрации электрической активности

- Усилитель переменного тока для экстраклеточной регистрации
- Генератор импульсов (возможна замена ЦАП)
- Линейный изолятор стимулов
- Аналого-цифровой преобразователь (АЦП) в виде отдельного устройства или платы расширения для компьютера
- Осциллограф
- Стандартный персональный компьютер

Оборудование для интерференционной микроскопии

Лазерный интерференционный микроскоп, разработанный в институте ВНИИОФИ, (Москва, Россия) на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия). Используется объектив 30 с апертурой 0,65. Размеры регистрируемого кадра составляют 195 145 мкм. Для получения кадров используют специальное программное обеспечение. Время сохранения изображения составляет менее 2 секунд, общее время получения фазового изображения составляла около 10 секунд (на стандартном PC Pentium IV, 3.2 GHz, 1 Гб RAM, OSrussian Windowsrussian XPB качестве источника света используется полупроводниковый лазер с длиной волны 650 нм и мощностью 5 мВ (мощность излучения на объекте менее 2 мВт).

Материалы

Камера для возбуждения и регистрации электрической активности нервов

В работе используется простая система подсасывающих экстраклеточных электродов, доступная для изготовления в любой лаборатории. В камере максимально используются одноразовые компоненты из распространенного лабораторного пластика.

Сама камера изготавливается из пластиковой чашки Петри диаметром 3–4 см. К бортику камеры термоклеем приклеивается 3 стандартных кончика для автоматических пипеток, они служат держателями для заземляющего электрода и электродов сравнения (рис. 2). Электроды — хлорсеребрянные, вводятся в соответствующие направляющие.

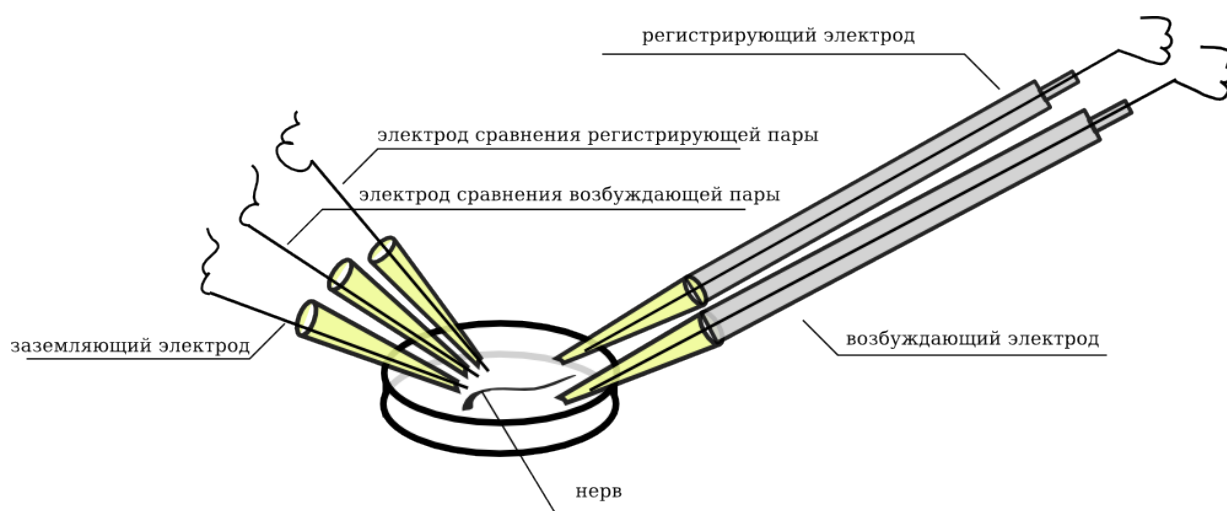


Рис. 2: Схема камеры для регистрации электрической активности нерва.

Возбуждающий и отводящий электроды изготавливаются на основе одноразовых инсулиновых шприцев. Поршень шприца заменяется на подходящую по размеру пластиковую трубку достаточной жесткости. К одному из концов трубки приклеивается

резиновый уплотнитель от оригинального поршня. Сквозь трубку проходит серебряная проволока, один из концов которой выходит через отверстие шприца и хлорирован, а ко второму припаивается разъем для подключения к выходу стимулятора либо усилителя. Возбуждающий и отводящий электроды крепятся на штативе или микроманипуляторе.

В камеру, заполненную физиологическим раствором, помещают выделенный нерв. На шприцы, служащие возбуждающим и отводящим электродом вместо иглы прикрепляют стандартные кончики для автоматических пипеток, также заполненные физиологическим раствором. Кончики возбуждающего и отводящего электродов, позиционируются относительно нерва так, чтобы возбуждение происходило в проксимальной части нерва, а регистрация велась от одной из боковых ветвей дистальной части нерва. Нерв аккуратно подсасывается к электродам при помощи поршней. После окончания эксперимента камера и наконечники электродов утилизируются.

Растворы

1. физиологический раствор Рингера для холоднокровных позвоночных (мМ: 100 NaCl, 2 KCl, 1,08 CaCl₂, 10 HEPES (Sigma), pH 7,4)
2. Раствор коллоидов, полученный в ходе выполнения задачи «Исследование свойств мембранносвязанного гемоглобина в эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра» либо отдельно (методика приготовления коллоидного раствора наночастиц серебра приводится в упомянутой задаче).

Приготовление препарата седалищного нерва лягушки

В работе используются взрослые лягушки *Rana temporaria* среднего размера. При помощи зонда разрушают ЦНС животного, после чего отделяют пояс нижних конечностей, с которого удаляют кожный покров и уростиль. После этого разрезают хрящевые соединения костей таза, разделяя правую и левую конечность. К основанию седалищных нервов привязывают лигатуру, после чего нерв вместе с окружающими его мягкими тканями отделяют от бедренных и берцовых костей. Далее пинцетом аккуратно снимают с нерва мышечную ткань. Выделенные нервы выдерживают в физиологическом растворе Рингера для холоднокровных позвоночных на 30 мин.

Приготовление препарата нервного волокна

Для приготовления препаратов отдельных нервных волокон используются выделенные седалищные нервы. С боковых веточек нерва препаровальными иглами снимают соединительнотканную оболочку и выделяют одиночные нервные волокна, аккуратно распусая нерв тонкими препаровальными иглами или оттянутыми стеклянными капиллярами на зеркале. Тонкие ветки нерва с распушенными участками укладываются на зеркальное стекло для камеры лазерного интерференционного микроскопа в капле раствора Рингера.

Ход работы

Исследование возбудимости нерва

Раствор Рингера в камере заземляют хлорсеребряным электродом. Нервное волокно помещается в камеру для регистрации и подсасывается к возбуждающему и отводящему электродам. Возбуждающий электрод подключается к «+» выходу линейного изолятора стимулов. Выход «-» стимулятора подключается к электроду сравнения для возбуждающего электрода, размещенного в одном из подводов для хлорсеребряных электродов. Отводящий электрод подключается к неинвертирующему входу выносной головки-повторителя усилителя биопотенциалов. Инвертирующий вход подключают ко второму хлорсеребряному электроду сравнения.

Порог возбуждения

Определяют порог возбуждения и регистрируют составные потенциалы действия (ПД). Сначала определяют т.н. минимальный порог возбуждения — минимальную амплитуду возбуждающего стимула, при котором нерв начинает генерировать ПД и т.н. максимальный порог возбуждения, т.е. минимальную амплитуду стимула при которой амплитуда ПД перестает расти с увеличением стимула. Стимуляция производится в режиме прямоугольных импульсов тока, ширина импульса — 0.3 мс. Частота следования стимулирующих импульсов при определении порога — 40 Гц. Полученные значения записывают. Регистрируют и сохраняют записи потенциалов для последующего анализа формы ПД.

Форма ПД

В отчете приводится пример регистрируемых ПД. Оцениваются амплитуда и ширина ПД, а также наличие дополнительных максимумов, плечей и др.

Трансформация ритма возбуждения

При увеличении частоты возбуждения часть волокон уже не может давать ПД в ответ на каждый возбуждающий импульс. Это приводит к осцилляциям амплитуд регистрируемых составных потенциалов действия. Оцениваются период и амплитуда осцилляций составных потенциалов действия при нескольких выбранных амплитудах возбуждения (в % от порога возбуждения, например, 90, 100 и 120%).

Влияние наночастиц

Вариант 1:

После измерения параметров, опытный нерв инкубируют в растворе Рингера с добавлением концентрированного раствора наночастиц серебра, а контрольный — в обычном растворе Рингера в течение 30 мин. После инкубации сравнивают произошедшие изменения в значениях порогов, форме ПД и трансформации ритма возбуждения для контрольного и опытного нервов.

Вариант 2:

В опытную камеру добавляют концентрированный раствор наночастиц серебра и производят длительное ритмическое возбуждение течение 30 мин (супрамаксимальное возбуждение, частота возбуждения Hz), непрерывно производя запись данных на компьютер при помощи АЦП. То же повторяют и для контрольного нерва, но без добавления наночастиц. Сравнивают динамику изменения амплитуды и формы ПД для опытного и контрольного нервов.

Структурные ответы нервного волокна

Приготавливают препараты одиночных нервных волокон в контроле и при инкубации в растворе Рингера с добавлением наночастиц серебра. Регистрируют интерференционные изображения отдельных нервных волокон в области перехватов Ранвье и интернодальной области для опытных и контрольных нервов. Особое внимание уделяется структурам паранодально-нодального комплекса и насечкам Шмидта-Лантермана в интернодальной области.

Оценивают следующие параметры: длину перехватов Ранвье, выраженность лукович перехвата, плотность миелина в паранодальной области, ширину насечек миелина и диаметр нервного волокна, в том числе его однородность вдоль волокна.

Оформление результатов

Результаты оформляются в виде письменного отчета, который строится по следующей схеме:

- 1) Теоретическое введение
- 2) Цель и задачи работы
- 3) Методическая часть
- 4) Описание результатов и их обсуждение
- 5) Выводы по проделанной работе
- 6) Обзор литературы

После представления отчета преподаватель проводит со студентами беседу, в которой контролируется понимание студентами теоретической основы выполненной задачи и интерпретации полученных результатов. Возможно представление результатов в виде устного доклада с презентацией по полученным в ходе работы результатам.

Литература

1. Сотников О.С., Функциональная морфология живого мякотного нервного волокна // Л.: Наука, 1976.
2. Сотников О.С. Динамика структуры живого нейрона // Л.: Наука, 1985
3. Basso A.S., et al. *The Journal of Clinical Investigation*, **118** (4): 1532-1543, 2008
4. Bendszus M, Stoll G., *Nat Clin Pract Neurol.*; **1**(1):45-53, 2005
5. Boggs et al., *FEBS Lett*; **584**(9): 1771-1778, 2010
6. Petry et al., *Neurotherapeutics*; **4**(3):434-442, 2007
7. Sherer, S.S. Arroyo, E.J., *Journal of Peripheral Nervous System*, **7**:1-12, 2002
8. Stoll G, Bendszus M., *Neuroscience*. 2009 Feb 6;**158**(3):1151-60. Epub 2008 Jun 26.

«Современные методы моделирования белок-белковых взаимодействий», Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б.

Аннотация задачи

Методы компьютерного моделирования находят широкое применение для моделирования наноструктур. В данной работе предлагается освоить метод многочастичной броуновской динамики на примере моделирования связывания белков электрон-транспортной цепи фотосинтеза.

Поведение частиц нано-размера в ансамбле отличается от поведения отдельных атомов и от поведения макротел. В предлагаемой модели описывается взаимодействие сотен частиц, учитываются электростатические взаимодействия, форма частиц и реакционного пространства. Частицы рассматриваются как твердые тела, для описания их движения используется уравнение Ланжевена, для расчета электростатического потенциала - уравнения Пуассона-Больцмана.

Метод много частичной броуновской динамики позволяет изучать влияние формы частиц, их количества, распределения зарядов на частицах, формы реакционного пространства на процесс связывания частиц.

Цель работы: освоение метода и изучение возможностей многочастичной броуновской динамики в применении к описанию кинетики связывания белков.

Объекты исследования: PDB структуры белков пластоцианина и цитохрома f.

Методы: многочастичная броуновская динамика.

План работы:

1. Изучение основ метода многочастичной броуновской динамики.
2. Нахождение структуры белков пластоцианина и цитохрома f в базе данных PDB (www.pdb.org).
3. Ручная обработка загруженного файла с целью получения отдельного PDB-файла для каждого белка.
4. Расчет эллипсоидов вращения для молекул белков в пакете MatLab*.
5. Визуализация трехмерной структуры белков.
6. Расчет зарядов на аминокислотных остатках.
7. Формирование конфигурационного файла для расчета кинетики в программе ProKS.
8. Визуализация молекул белков и эквипотенциальных поверхностей в пакете MatLab.
9. Моделирование кинетики взаимодействия белков в программе ProKS при разных значениях параметра вероятности докинга p .
10. Построение кинетических кривых реакции белков в пакете Origin. Фитинг полученных кривых.
11. Нахождение констант скорости второго порядка реакции в единицах $M^{-1}s^{-1}$.
12. Написание отчета.

Предполагаемые результаты и навыки:

– Освоение метода многочастичной броуновской динамики в применении к описанию кинетики образования белок-белковых комплексов.

- Приобретение навыков визуализации трехмерной структуры белков и электростатического потенциала, анализа кинетических кривых.
- Данная задача продемонстрирует студентам возможность использования метода многочастичной броуновской динамики для изучения процесса связывания белков.

Отчет по задаче должен содержать:

1. Краткое теоретическое введение в задачу и метод исследования.
2. Цели и задачи исследования.
3. ID PDB-файла комплекса пластоцианина и цитохрома f.
4. Рисунки молекул белков и потенциальных поверхностей. Качественное описание электрического поля белков.
5. Пример кинетической кривой и ее аппроксимации.
6. Таблица с полученными значениями кинетических констант при различных значениях вероятности докинга p . Анализ полученных результатов и выбор подходящих значений параметров.
7. Выводы.

Введение. Описание системы

Пластоцианин – небольшой водорастворимый белок, основная функция которого заключается в переносе электронов от цитохромного b_6/f комплекса к фотосистеме 1. Пластоцианин диффундирует в замкнутом внутреннем объеме (люмене) тилакоидов хлоропластов зеленых растений (рис. 1).

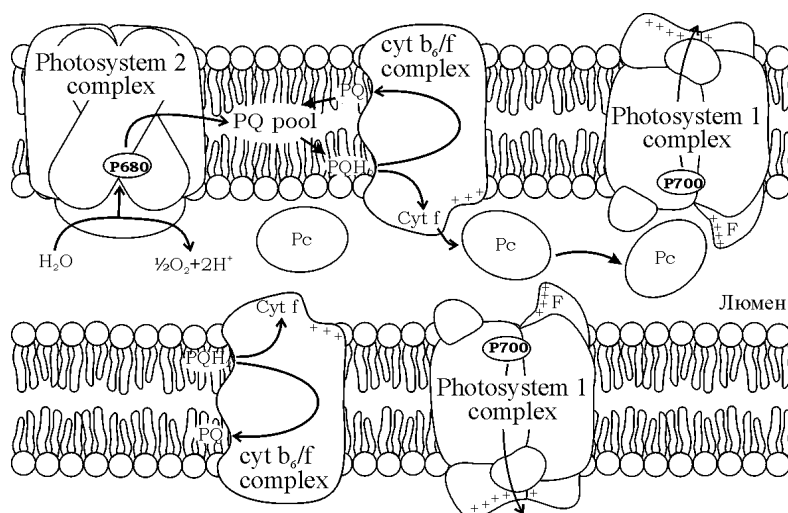


Рис. 1. Схема фотосинтетического электронного транспорта. Показаны две тилакоидные мембраны и люменальное пространство между ними. В мембраны встроены мультиферментные комплексы фотосистема 1, фотосистема 2, цитохромный b_6/f комплекс. В люминальном пространстве диффундирует подвижный переносчик – белок пластоцианин (Pc). Стрелками изображен транспорт электронов.

Молекулы пластоцианина окисляют цитохром *f* и восстанавливают реакционный центр фотосистемы 1, диффундируя в люминальном пространстве на довольно большие расстояния (сотни нм), перенося электроны между гранальными и стромальными областями в тилакоидах. В нативном хлоропласте толщина люмена (40-100 Å) сравнима с размерами пластоцианина (40x28x30 Å). Поэтому в люмене диффузия пластоцианина сильно затруднена выступающими частями трансмембранных мультиферментных комплексов и скорость диффузии и электронного транспорта зависит от ширины люмена, расстояния диффузии и структуры люминального пространства.

Известно, что электростатические взаимодействия играют ключевую роль при связывании пластоцианина с мультиферментными комплексами: благодаря наличию электростатических сил притяжения и отталкивания диффузия пластоцианина к сайту связывания с белковым комплексом имеет направленный характер, а молекула пластоцианина ориентируется в электрическом поле комплекса.

Нами построена модель переноса электрона пластоцианином в люмене, которая, с одной стороны, учитывает сложную геометрию люминального пространства, а с другой стороны достаточно подробно описывает электростатические взаимодействия белков – участников электронного транспорта. В данной задаче предлагается с помощью компьютерной модели исследовать процесс докинга белков пластоцианина и цитохрома *f*.

Для передачи электрона от цитохрома *f* на пластоцианин необходимо, чтобы пластоцианин подошел близко к цитохрому *f* и образовался комплекс Pс-Cyt *f*. Физическими механизмами, благодаря которым происходит перемещение и образование комплексов, являются диффузия и электростатические взаимодействия. Сам процесс формирования комплекса белков может быть условно разделен на несколько этапов: (1) броуновскую диффузию белков к месту докинга; (2) их сближение за счет действия электростатических сил притяжения между молекулами, взаимную ориентацию молекул в пространстве и формирование предварительного комплекса; (3) образование финального комплекса и перенос электрона в нем.

В качестве редокс центра в пластоцианине выступает атом меди, он связан с четырьмя лигандами – His37, Cys84, His87 и Met92 (рис. 2). Несмотря на то, что атом меди закрыт от молекул растворителя, лиганд His87 выступает на поверхность белка и окружен гидрофобными остатками. Этот гидрофобный участок считают основным сайтом связывания с PSI и cyt *f*. На поверхности пластоцианина находится два отрицательно заряженных патча. Один из патчей расположен около Tyr83, рядом с лигандом Cys84, и образован Asp42, Glu43, Asp44 и Asp51, второй патч находится на противоположном участке молекулы и образован Glu59, Glu60, Asp61, and Glu68.

Сейчас известны структуры пластоцианинов из многих организмов (тополь, петрушка, шпинат и др.) в окисленном и восстановленном состояниях (на атоме Cu заряд +2e и +1e, соответственно) и при разных pH.



Рис. 2. Структура молекулы пластоцианина из *Spinacia Oleracea* (в Protein Data Bank структура 1AG6). Рисунок получен с помощью программы Swiss-PdbViewer. На рисунке зеленым цветом обозначены аминокислоты, которые являются лигандами к атому Cu (показан в виде желтой сферы).

Цитохром *f* – самая крупная субъединица цитохромного b_6f комплекса, является терминальным акцептором цитохромного b_6f комплекса и передает электроны на пластоцианин. Единственная α -спираль цитохрома *f* пронизывает мембрану и держит белок заякоренным, однако большая часть белка находится в люмене. Люминальная часть цит *f* состоит из двух доменов. Большой домен расположен ближе к мембране и состоит из антипараллельного β -сэндвича, образованного двумя β -листами, и небольшого гем-связывающего пептида. Малый домен имеет смешанную укладку бочонок-сэндвич и встроен между двумя β -тяжами большого домена. На большем домене между двумя короткими спиралями на N-конце белка находится гем. Гем ковалентно связан с двумя консервативными аминокислотными остатками из второй спирали – Cys21 и Cys24. Пятый лиганд атома железа в геме – His25, шестой – α -аминогруппа N-терминального аминокислотного остатка тирозина 1.

В настоящее время известны структуры люминальной части цит *f* из турнепса (PDB структуры 1CTM, 1HCZ), зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (PDB структуры 1CFM, 1EWH) и цианобактерии *Phormidium laminosum* (PDB структура 1CI3).

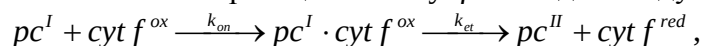
Цитохром *f* из турнепса, несмотря на суммарный отрицательный заряд, имеет обширную область положительного электростатического потенциала, сформированную положительно заряженными аминокислотными остатками большого (Lys58, Lys65, Lys66) и малого (Lys185, Lys187, Arg209) доменов. Исследование ЯМР структуры комплекса, образованного пластоцианином из шпината и цитохрома *f* из турнепса (PDB структура 2PCF), показало, что данные остатки расположены в комплексе рядом с отрицательно заряженными остатками пластоцианина – Asp 42, 43, 44 и Glu 59, 60.

Для регистрации изменения концентрации окисленных и восстановленных форм цит *f* и Рс при их реакции в растворе используют методы быстрого смешения Rapid Mix, остановки потока stopped-flow.

Кривые восстановления Рс (или окисления цит *f*) являются однофазными. С помощью метода ЯМР спектроскопии определены константы скорости второго порядка для различных мутантов пластоцианина в зависимости от ионной силы и pH раствора. С

увеличением ионной силы константа скорости падает, это говорит о том, что в связывании Рс и *cyt f* определяющую роль играет электростатическое притяжение между молекулами.

Простейшая кинетическая схема реакций Рс и *cyt f* выглядит следующим образом:



где k_{on} – константа связывания белков, k_{et} – константа скорости транспорта электрона в комплексе, pc^I – восстановленный Рс (с Cu^+), pc^{II} – окисленный Рс (с Cu^{2+}), $cyt f^{red}$ – восстановленный *cyt f*, $cyt f^{ox}$ – окисленный *cyt f*.

Согласно (Kaant, Young et al. 1996) при ионной силе 100 мМ минимальное значение для константы скорости транспорта электрона k_{et} с *cyt f* на Рс – $26 \cdot 10^3 c^{-1}$, константа связывания k_{on} – $18 \cdot 10^7 (M \cdot c)^{-1}$, согласно (Modi, He et al. 1991) для реакции *cyt f* из семян капусты и Рс из гороха k_{et} равна $62 \cdot 10^3 c^{-1}$, а k_{on} равна $4.35 \cdot 10^7 (M \cdot c)^{-1}$. Различия в константах связаны с разными видами *cyt f*.

Броуновское движение и диффузия

Броуновское движение было открыто шотландским ботаником Робертом Брауном в 1827 году, когда он наблюдал под микроскопом движение цветочной пыльцы в воде. Под броуновским движением понимают случайное перемещение маленьких частиц, взвешенных в жидкости или газе, или математический аппарат для описания такого рода случайных движений. Броуновское движение происходит из-за того, что все жидкости и газы состоят из атомов или молекул, которые находятся в постоянном хаотическом тепловом движении, и потому непрерывно толкают броуновскую частицу с разных сторон. В случае крупного тела толчки молекул среды усредняются, и формируется постоянное давление. Если крупное тело окружено средой со всех сторон, то давление уравнивается, и тело всплывает или тонет за счет силы Архимеда. Если же тело маленькое, как броуновская частица, то толчки никогда не уравниваются друг друга, и создается случайно изменяющаяся сила. Поэтому, под влиянием ударов молекул окружающей среды скорость броуновской частицы непрерывно и беспорядочно меняется по величине и направлению. Броуновские частицы обычно не тонут и не всплывают, а находятся в среде во взвешенном состоянии. Иногда под броуновским движением неправильно понимают само тепловое движение атомов и молекул.

Броуновское движение справедливо для отдельной частицы. Когда же частиц много, их совместное движение описывается в терминах диффузии (то есть направленного движения молекул из области с высокой концентрацией в область с низкой концентрацией за счет случайного движения). Эйнштейн в 1905 году написал статью «О движении взвешенных в покоящейся жидкости частиц, требуемом молекулярно-кинетической теорией теплоты», где показал, что диффузия и броуновское движение, по сути, представляют собой одно и то же явление, и описывать их можно одними и теми же уравнениями. Также Эйнштейн в этой работе предложил формулу для расчета среднего расстояния, пройденного частицей за определенный промежуток времени:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt,$$

где $\langle x^2 \rangle$ – среднее значение квадрата расстояния, D – коэффициент диффузии, t – время.

Коэффициент диффузии сферической частицы можно определить при помощи следующего уравнения:

$$D = \frac{RT}{6\pi N_A \eta r},$$

где R – газовая постоянная, T – температура, N_A – число Авогадро, η – вязкость растворителя, r – радиус молекулы или частицы.

Уравнение Ланжевена

Для описания поступательного движения броуновских частиц под действием электростатических сил в физике используют уравнение Ланжевена:

$$m \frac{d\vec{v}}{dt} = f_x(t) + F_x - \xi_x^{tr} \frac{dx}{dt},$$

где x – координата, вдоль которой рассматривается движение, t – время, ξ_x^{tr} – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты, $f_x(t)$ и F_x – проекции случайной и электростатической сил на ось x , соответственно.

В модели молекулы белков совершают поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной и электростатической сил. Молекулы растворителя являются источником случайной броуновской силы и силы трения. Из-за малого ускорения частиц в вязкой среде, когда времена релаксации инерции малы по сравнению с интересующим масштабом времени, инерцией пренебрегают. Это означает, что суммарная сила, являющаяся суммой броуновской силы, случайной силы и внешних сил, равна нулю. Таким образом, получаем уравнение Ланжевена без инерционного члена для поступательного движения:

$$\xi_x^{tr} \frac{dx}{dt} = f_x(t) + F_x,$$

где x – координата, вдоль которой происходит поступательное движение, ξ_x^{tr} – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты, $f_x(t)$ и F_x – проекции случайной и электростатической сил на ось x , соответственно.

Для вращательного движения уравнение Ланжевена принимает следующий вид:

$$\xi_x^{rot} \frac{d\varphi}{dx} = m_x(t) + M_x,$$

где φ – угол поворота вокруг оси x , относительно которой рассматривается движение, ξ_x^{rot} – коэффициент вязкого трения относительно этой оси, $m_x(t)$ и M_x – моменты случайной и электростатической сил относительно оси x , соответственно.

Среднее значение и дисперсия случайной силы удовлетворяют следующим условиям:

$$\langle f_x(t) \rangle = 0,$$

$$\langle f_x^2(t) \rangle = \frac{2kT\xi_x^{tr}}{\Delta t},$$

где k – постоянная Больцмана, T – температура, Δt – шаг по времени. Аналогичные выражения справедливы и для момента случайной силы.

Электростатическую силу можно найти по формуле:

$$F_x = -q \frac{\partial U}{\partial x},$$

где q – заряд, U – электростатический потенциал.

Для расчета коэффициентов вязкого трения молекул белков, ξ_x^{tr} и ξ_x^{rot} молекулы представляются как эллипсоиды вращения с осями $2a$, $2b$ и $2c$ ($2a$ – ось вращения, $b = c$).



Рис. 3. Эллипсоид вращения.

Взаимодействие белков. Описание формы белков, столкновений

Белки рассматриваются как твердые тела. Они диффундируют в виртуальном реакционном объеме и могут приблизиться друг к другу на малое расстояние без перекрывания их поверхностей. Модельная сцена представляет собой трехмерный реакционный объем, имеющий форму параллелепипеда. Перед началом моделирования молекулы белков случайным образом распределяются по этому объему.

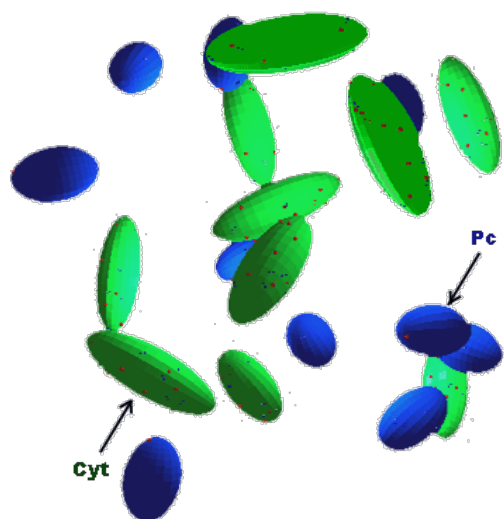


Рис. 4. Визуализация модельной сцены с белками пластоцианином (Pc) и цитохромом f (Cyt).

Взаимодействие между двумя белками можно подразделить на четыре этапа (Gross, Pearson, 2003): (1) сближение в результате диффузии и электростатического притяжения; (2) определяемое взаимной ориентацией и распределением зарядов взаимодействие отдельных частей молекул, ведущее к возможному образованию предварительного комплекса; (3) конечное связывание и формирование электрон-транспортного комплекса; (4) электронный транспорт. В нашей модели мы рассматриваем только диффузию молекул и электростатические взаимодействия (образование предварительного комплекса). Так же мы не рассматриваем гидрофобные взаимодействия, возможные перестройки комплекса и конформационные изменения белков, важные для формирования конечного комплекса.

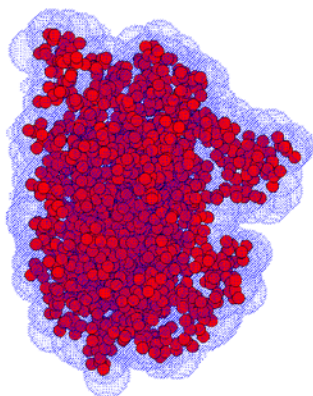


Рис.5. Интерпретация молекул пластоцианина (слева) и цитохрома *f* (справа) набором сфер. При расчете столкновений белков использовалось описание формы белков с помощью набора сфер (рис. 14). Для того чтобы проверить факт столкновения двух молекул, необходимо определить, пересекаются соответствующие им наборы сфер или нет. Геометрическая интерпретация молекулы с помощью сфер, с одной стороны, обеспечивает достаточно реалистичное представление поверхности молекулы для расчета столкновений с другими молекулами, а с другой стороны, приемлемое время счета, так как сфер в несколько раз меньше, чем атомов, и проверить столкновение двух сфер просто – достаточно знать их радиусы и координаты центров.

Параметры модели

В прямой модели молекулы белков совершают хаотическое броуновское движение. В результате броуновского движения может происходить сближение двух или большего количества белков на расстояние электростатического взаимодействия. При этом белки ориентируются в суммарном электрическом поле других белков и могут занять выгодную позицию для связывания (докинга). Занятие белком выгодной для докинга позиции означает, что расстояния между взаимодействующими частями молекул должно быть меньше некоторых расстояний (параметров модели), которые мы называем расстояниями докинга. Правильный подбор параметров модели (расстояний докинга) обеспечивает выгодную для последующего связывания взаимную ориентацию белков относительно друг друга. Таким образом, расстояниями докинга r мы называем расстояния между определенными атомами молекул пластоцианина и цитохрома *f* в комплексе. Связывание белков, занимающих выгодную взаимную ориентацию, происходит с некоторой вероятностью p , которую мы называем вероятностью докинга. После связывания восстановленная молекула цитохрома *f* передает электрон на находящуюся с ней в комплексе молекулу пластоцианина за некоторое время. При этом происходит изменение редокс-состояния молекул. Время передачи электрона в комплексе, вероятность связывания белков (докинга) и расстояния докинга являются параметрами прямой модели.

Модельные расстояния докинга и экспериментальные данные о строении комплекса пластоцианина и цитохрома *f* представлены в таблице 1.

Таблица 1. Расстояния между атомами в комплексе Pc-cyt *f*, определенные методом ЯМР в работе (Ubbink, Ejdebeck et al. 1998), и расстояния, используемые нами в модели в качестве условия образования комплекса.

Аминокислотные остатки Pc и cyt <i>f</i> , расположенные рядом в комплексе Pc-cyt <i>f</i>	Номера и названия атомов, между которыми измеряется расстояние		R, Å	R, Å
	Pc	cyt <i>f</i>	Расстояние в комплексе (Ubbink, Ejdebeck et al. 1998)	Расстояние в модели
Asp42-Arg209	591 – OD2	3278 – HH2	4.1	18
Glu43-Lys187	607 – HB	2930 – HE	1.34	18
Asp44-Lys185	618 – OD2	2895 – HZ	3.56	18
Glu60-Lys58	842 – HA	912 – HZ	4.35	25
–	1435 – Cu	3881 – Fe	10.7–11.3	40

Последующие процессы образования финального комплекса учтены в модели неявно с помощью параметра вероятности связывания белков: связывание двух белков, расстояния между которыми удовлетворяют условиям связывания, происходит с некоторой вероятностью p . Она проверяется на каждом шаге модели: генерируется случайное число от 0 до 1, если оно меньше p , то считается, что комплекс образовался, если больше – то нет. Если комплекс не образовался, то белки могут разойтись или остаться, и на следующем шаге им опять предоставляется возможность образовать комплекс с вероятностью p .

После связывания белков может происходить передача электрона внутри комплекса с восстановленной молекулы белка на окисленную за некоторое время. При этом происходит изменение редокс-состояния молекул.

Модель позволяет изучать влияние ионной силы и распределения зарядов на молекулах, pH, температуры на кинетические характеристики взаимодействия белков.

Модельными параметрами, значения которых нужно подбирать для совпадения результатов моделирования с экспериментом, являются вероятность связывания белков и расстояния связывания. Другие же параметры модели – шаг по времени и шаг сетки для расчета потенциала – оцениваются, исходя из физических принципов, и в дальнейшем не меняются.

Описание файлов PDB

Трехмерная структура белков в модели строится на основе данных PDB (Protein Data Bank). PDB является архивом экспериментально определенных трехмерных структур биологических макромолекул. Данные архива включают в себя координаты атомов, кристаллографические структурные факторы и экспериментальные данные, полученные методом ЯМР. Помимо координат, каждый файл включает в себя название молекул, информацию о первичной и вторичной структуре, ссылки на атомарную последовательность молекулы, информацию о лигандах, подробности получения данных, информацию о растворе, в котором производился эксперимент, и библиографию.

Найти нужную структуру можно либо зная ее PDB ID (уникальный идентификатор, присваиваемый каждой расшифрованной структуре), либо при помощи поиска (Search → Advanced Search → Choose a Query Type → Keyword → Advanced), позволяющего искать по организму, белку, методу и т.д.

PDB-файлы доступны для скачивания и открываются специальными программами, визуализирующими трехмерную структуру. Но само содержание файла написано при помощи кодировки ASCII и открывается «Блокнотом». В каждой строке PDB-файла содержится ровно 80 знаков (считая пробелы).

В приложении А приведена краткая характеристика разделов PDB-файла.

Подготовка PDB-файла к работе

Моделирование электростатических взаимодействий

Электростатические взаимодействия играют ключевую роль в процессах связывания многих белков. Если белок находится далеко от других белков, то его движение определяется только свободной броуновской диффузией. При приближении к другим белкам и комплексам белок ориентируется в электрическом поле, создаваемом этими белками, и может занять выгодную позицию для последующего связывания.

При значительных расстояниях между поверхностями белков (больше 35 Å) электростатические взаимодействия очень слабы из-за экранирования электрического поля молекулами воды и противоионами. На расстоянии 35 Å в растворе с ионной силой 100 мМ экранирование приводит к уменьшению электростатического потенциала в 80 раз по сравнению с раствором без ионов соли. Поэтому в модели электростатическое взаимодействие между белками учитывается только при сближении их поверхностей на расстояние менее 35 Å, которое мы назвали расстоянием электростатического взаимодействия.

Для описания электростатических взаимодействий необходимо рассчитать электростатическую силу и ее момент, действующие на белок со стороны других белков, находящихся ближе расстояния электростатического взаимодействия. Для этого перед началом моделирования движения белков вокруг каждого белка в прямоугольной трехмерной области заданного размера рассчитывается значение потенциала электрического поля для заданной ионной силы и pH раствора. Размер области зависит от расстояния взаимодействия и выбирается автоматически таким, чтобы возможно было рассчитать взаимодействие рассматриваемых белков внутри расстояния взаимодействия. Для расчета электростатической силы и момента силы, при выполнении условия, что расстояние между поверхностями двух молекул белков меньше расстояния взаимодействия, нам надо знать значение потенциала первого белка не только на расстоянии взаимодействия, но и в области, занимаемой остальными частями второго белка. Таким образом, размер области для расчета потенциала вокруг первого белка определяется максимальным его радиусом (расстоянием от центра белка до наиболее

выступающего атома), максимальным диаметром второго белка (максимальным расстоянием между атомами белка) и расстоянием взаимодействия.

В области для расчета потенциала задается прямоугольная трехмерная сетка (трехмерная матрица) с определенным шагом h (рис. 15). Величина шага является параметром модели и определяет точность расчета потенциала. В программе с уменьшением шага сетки при фиксированном значении расстояния взаимодействия увеличивается количество ячеек и соответственно увеличивается количество памяти, занимаемой потенциалом и время расчета электростатического взаимодействия белков. В наших расчетах мы брали величину шага сетки равную 2 Å. Ячейкам сетки присваиваются значения заряда, диэлектрической проницаемости и ионной силы.

Значения зарядов на атомах вычисляются по уравнению Хендерсона-Хассельбальха:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right) - \text{для кислоты}$$

$$pOH = pK_b + \log\left(\frac{[BH^+]}{[B]}\right) - \text{для основания}$$

Здесь pH – это десятичный логарифм концентрации протонов в среде со знаком минус, $pOH = 14 - pH$, K_a – константа диссоциации кислоты, $pK_a = -\log_{10}(K_a)$. K_b – константа диссоциации основания, $pK_b = 14 - pK_a$. $[A^-]$ ($[B]$) – концентрация кислоты (основания) в депротонированной форме, $[AH]$ ($[BH^+]$) – концентрация кислоты (основания) в протонированной форме.

Значения pK_a аминокислот взяты из (Dawson, Elliott et al. 1959). Если в одну ячейку попадает несколько заряженных атомов, в нашей модели заряд суммируется.

В нашей модели белок считается областью с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 2$ с пространственно-распределенными фиксированными зарядами. Раствор считается областью с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 80$ с мобильными зарядами (ионами).

Значения ϵ в каждой ячейке определяются по наличию в ней атома. Ячейкам, в которые попали атомы, присваивается значение $\epsilon = 2$. Затем определяются ячейки, находящиеся внутри белка, но в которые не попали атомы, и им тоже присваивается значение $\epsilon = 2$. Ячейкам, находящимся в непосредственном соседстве с ячейками с $\epsilon = 2$, присваивается $\epsilon = 40$. Всем остальным ячейкам присваивается $\epsilon = 80$.

Значение ионной силы для ячеек с $\epsilon = 2$ считается равным нулю. Для остальных ячеек значение ионной силы принимается равным ионной силе раствора.

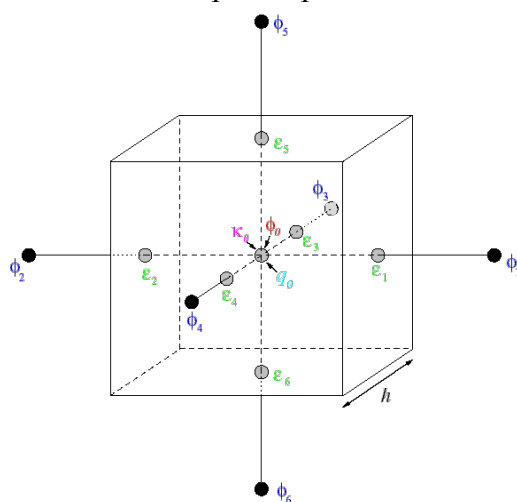
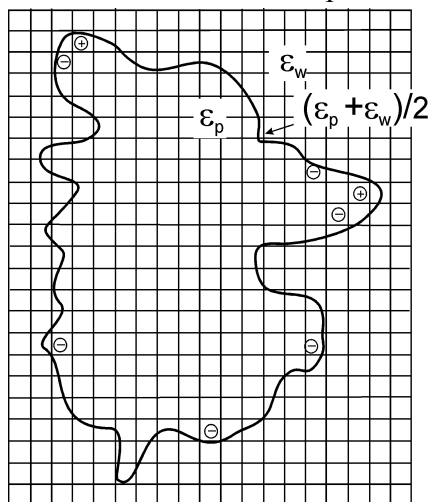


Рис. 6. Сетка для расчета электрического потенциала вокруг белка (слева) и одна ячейка (справа).

Потенциал в ячейках сетки рассчитывается по итерационной формуле (2.4), которая получена из линеаризованного уравнения Пуассона–Больцмана (2.5) (Ullmann). Потенциал в данной ячейке на данном шаге вычисляется в соответствии с потенциалами в соседних ячейках на предыдущем шаге и суммарным зарядом данной ячейки:

$$\varphi_0 = \frac{\left(\sum_{i=1}^6 h\varepsilon_i \varphi_i\right) + 4\pi q_0}{\left(\sum_{i=1}^6 h\varepsilon_i\right) + h^3 \kappa_0^2} \quad (2.4)$$

$$\kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{k_B T}, \quad I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^K c_i^{\text{bulk}} Z_i^2$$

$$\nabla \varepsilon \nabla \varphi = -4\pi \rho + \kappa^2 \varphi \quad (2.5)$$

Здесь φ – потенциал, ε – диэлектрическая проницаемость, ρ – плотность зарядов в белке, c_i^{bulk} – концентрация i -иона в растворе, Z_i – заряд i -иона, e – заряд электрона, T – температура в К, N_A – число Авогадро, I – ионная сила раствора, h – шаг сетки.

Таким образом, для каждого типа объектов (белок в восстановленном и окисленном состояниях) в некоторой области вокруг него известно значение потенциала электрического поля. Теперь для нахождения силы и ее момента, действующих на отдельный заряд в белке, необходимо вычислить градиент потенциала, создаваемого другими белками, в той точке, где находится заряд. По известному градиенту поля и величине заряда вычисляется сила, действующая на заряд. Для того чтобы рассчитать силу и момент, действующие в целом на молекулу, надо просуммировать силу и момент, действующие на каждый из зарядов данной молекулы.

Алгоритм расчета электростатического потенциала белка

Для запуска программы для расчета зарядов на белке (после задания соответствующих Path (папка, где находится программа) и Current Directory (папка, в которой находится PDB-файл белка)), нужно напечатать в рабочем окне MATLAB'a команду `calc_charges('имя_входного_файла.pdb', 'имя_выходного_файла.pdb')`. Программа позволяет рассчитывать заряды для разных значений pH. В результате, в выходном файле каждому атому присваивается значение заряда, а в рабочем окне MATLAB'a появляется величина суммарного заряда белка и модуль заряда.

Расчет потенциала производится в программе ProKS. В конфигурационном файле в разделе “Parameters of Proteins” необходимо задать названия входящих структурных файлов белков А и В (это должны быть файлы с рассчитанными зарядами) и названия файлов, в которые будет записываться потенциал; в разделе “Physical Parameters of the System” – величину ионной силы, радиус электростатического взаимодействия, диэлектрическую проницаемость и вязкость раствора и температуру; в разделе “Simulation Parameters” – шаг сетки потенциала и число итераций уравнения Пуассона–Больцмана. Для того чтобы происходил расчет только потенциала, а кинетика не считалась, нужно присвоить значение “0” параметрам `eps_file`, `pot_file` и `calc_kin`. В папке, в которой находится программа, также должны присутствовать PDB файлы белков, и текстовые файлы с координатами центра масс белков (`pc/cytaxes.txt`), длинами осей эллипсоидов (`axes.txt`) и матрицами поворота (`A1/2.txt`).

После запуска программы в рабочей папке появятся файлы `eps11.txt` и `eps22.txt`, в которых записаны значения диэлектрической проницаемости в ячейках сетки белка. Потенциалы белков записываются в текстовые файлы, названия которых задаются пользователем.

Визуализация эквипотенциальной поверхности белка

Для визуализации белка нужно напечатать в рабочем окне MATLAB'a команду `[x4,y4,z4,u1,u2]= vis_prot_3d('имя_файла.pdb','pc/cytaxes.txt','A1/2.txt');` На рисунке незаряженные атомы изображены зеленым цветом, положительно заряженные – красным, отрицательно заряженные – синим. Центр масс белка будет находиться в начале координат ($N = 0$), а сам белок будет повернут в соответствии с ориентацией описывающего его эллипсоида вращения.

Для визуализации эквипотенциальной поверхности используется написанная в MATLAB'е программа `potential_visualization`. В файле `potential_visualization.mat` нужно задать размер сетки потенциала по одной координате (N), шаг сетки (h , в Å) и значение потенциала, для которого будет нарисована эквипотенциальная поверхность (L , в вольтах). Размер сетки потенциала можно рассчитать по следующей формуле:

$$N = \frac{2(2a + b + 10 + A)}{2},$$

где a – большая полуось большего белка, b – большая полуось меньшего белка, A – радиус электростатического взаимодействия. Если после деления пополам получается нецелое число, оно округляется в меньшую сторону.

После введения в рабочем окне MATLAB'a команды `potential_visualization`, вокруг нарисованного ранее белка появится эквипотенциальная поверхность. Области положительного потенциала изображаются синим, отрицательного – красным.

Описание содержания папки программы и описание конфигурационного файла

В папке программы для расчета кинетики должны присутствовать следующие файлы.

“A1.txt” и “A2.txt” – файлы, в которых записаны матрицы поворота, позволяющие перевести координаты атомов белков в координаты эллипсоида вращения.

“axes.txt” – здесь записаны длины осей эллипсоидов вращения белков.

“matrix2.txt” – матрица поворота цитохрома f относительно мембраны.

“cyt_points.txt ” и “pc_points.txt ” – здесь указаны координаты атомов, между которыми заданы расстояния докинга, и сами расстояния докинга.

“cyt_spheres.txt” и “pc_spheres.txt” – описание наборы сфер для аппроксимации поверхностей белка.

“cytaxes.txt” и “pcaxes.txt” – координаты центров масс белков.

“cyt.pdb”, “cyt_e.pdb”, “pc.pdb” и “pc_e.pdb” – структурные файлы восстановленных и окисленных белков.

“cyt_pot.txt”, “cyt_pot_e.txt”, “pc_pot.txt”, “pc_pot_e.txt” – файлы потенциалов восстановленной и окисленной формы белков.

“eps11.txt” и “eps22.txt” – файлы с описанием диэлектрической проницаемости.

“plast.cfg” – конфигурационный файл с описанием параметров счета.

После окончания счета в папке появятся следующие файлы:

“plast.log” – файл, в котором описан ход расчета с указанием времени и действия, совершаемого программой.

“data_00X.txt” – файл с указанием шага расчета и количества образовавшихся комплексов на этом шаге. По этому файлу строится кинетика образования комплексов белков. X – номер прогона программы.

“docktest_00X.txt” – здесь указаны номер шага, номера молекул, координаты центров масс и матрицы поворота пластоцианина и цитохрома f в при их сближении на

расстояния докинга. Эти молекулы необязательно образуют комплекс, так как это зависит также от вероятности связывания p . При помощи этого файла можно оценить наиболее частую взаимную ориентацию молекул белков при их сближении.

Конфигурационный файл содержит следующие разделы

1. Реакционный объем. Концентрация молекул.

Программа позволяет моделировать процесс образования комплексов белков в растворе.

Модельный объем представляет собой параллелепипед, размеры которого можно задать в конфигурационном файле. Центр параллелепипеда имеет координаты (0, 0, 0), единица измерения длины — нм (10^{-9} метра).

В модели задаются объем и количество молекул, а не концентрация. Соответственно, для описания концентрации необходимо перевести линейные размеры параллелепипеда, в котором происходит реакция, и количество молекул (в штуках) в моль/л (М). Это можно сделать по следующей формуле:

$$c = \frac{N}{N_A \cdot V},$$

где N — число молекул, N_A — число Авагадро, V — объем, в литрах ($1 \text{ л} = 1 \text{ дм}^3$, $1 \text{ дм} = 10^8 \text{ нм}$).

2. Параметры белков

Здесь задается количество белков (т.е. их концентрация), приводятся ссылки на структурные файлы, файлы потенциалов и файлы с описанием осей эллипсоида вращения для расчета коэффициентов вязкого трения. Все файлы должны находиться в той же директории, что конфигурационный файл и сама программа. Также один из белков можно закрепить, то есть во время счета он двигаться не будет.

3. Параметры докинга

В этом разделе задаются параметры образования комплекса между белками: вероятность докинга p , а также константы электронного транспорта (k_{et}) и распада комплекса (k_{off}), если таковые рассматриваются в модели.

4. Физические параметры системы

Этот раздел характеризует свойства раствора. Ионная сила влияет на электростатические взаимодействия: экранировка зарядов на белках их ослабляет. Также здесь задаются диэлектрическая проницаемость, вязкость и температура раствора. По умолчанию стоят значения для воды.

Радиус экранировки — это расстояние, на котором потенциал белка падает в восемьдесят раз, что позволяет пренебречь электростатическими взаимодействиями белков. Таким образом, на расстояниях больших, чем радиус экранировки белки движутся только за счет диффузии.

5. Параметры расчета

Здесь вводятся параметры счета программы. Программу можно прогонять несколько раз с одними и теми же параметрами, что позволяет, например, посчитать ошибку счета.

Наша модель дискретна. Шаг по времени является параметром модели и определяет, какое расстояние пройдет молекула белка и на какой угол она повернется за один шаг программы. Число шагов подбирается таким образом, чтобы его хватило для того, чтобы прореагировали все молекулы, и кинетическая кривая вышла на плато.

В некоторых системах для того, чтобы перевести молекулу белка в реакционно-активное состояние, например, для ее восстановления, в модель вводится вспышка. Программа позволяет задавать, в какой момент времени это произойдет.

Если не учитывать поступательную и вращательную компоненты электростатической силы, молекулы белков будут двигаться исключительно за счет диффузии. Это позволяет оценить вклад электростатических сил во взаимодействие белков. Очевидно, без учета электростатики константа связывания белков будет меньше.

Шаг сетки для расчета потенциала определяет, насколько точно будет рассчитано электростатическое поле белка. Чем шаг меньше, тем более точные результаты можно получить. Но уменьшение шага приводит к тому, что файл с описанием потенциала значительно увеличивается (при шаге 2 Å файл потенциала весит несколько десятков Мб), а также увеличивается время его расчета и загрузки в программу. Число итераций также влияет на точность расчета потенциала. Этот параметр подбирается опытным путем, и после некоторого значения уже не влияет на форму потенциала. Увеличение числа итераций также увеличивает время счета.

Программа также позволяет отдельно запускать расчет потенциала, кинетики и диэлектрической проницаемости. Если в разделе «считывать потенциал из файла» ли «считывать проницаемость из файла» указать «нет», то программа для расчета кинетики загрузит находящиеся в директории файлы.

Шаг сохранения определяет, через сколько шагов программы данные о кинетике будут записываться в файл.

Расчет константы связывания белков из модельной кинетической кривой. Сравнение с экспериментальными данными

В модели на каждом шаге подсчитывается суммарное количество восстановленных и окисленных молекул пластоцианина и цитохрома f , таким образом, имеется возможность строить кинетические кривые изменения концентрации белков в окисленном или восстановленном состоянии. На рис. ... показана кривая окисления цитохрома f , полученная на прямой модели. Аппроксимируя полученную кинетическую кривую законом действующих масс, мы можем получить значение константы скорости реакции второго порядка связывания молекул пластоцианина и цитохрома f .

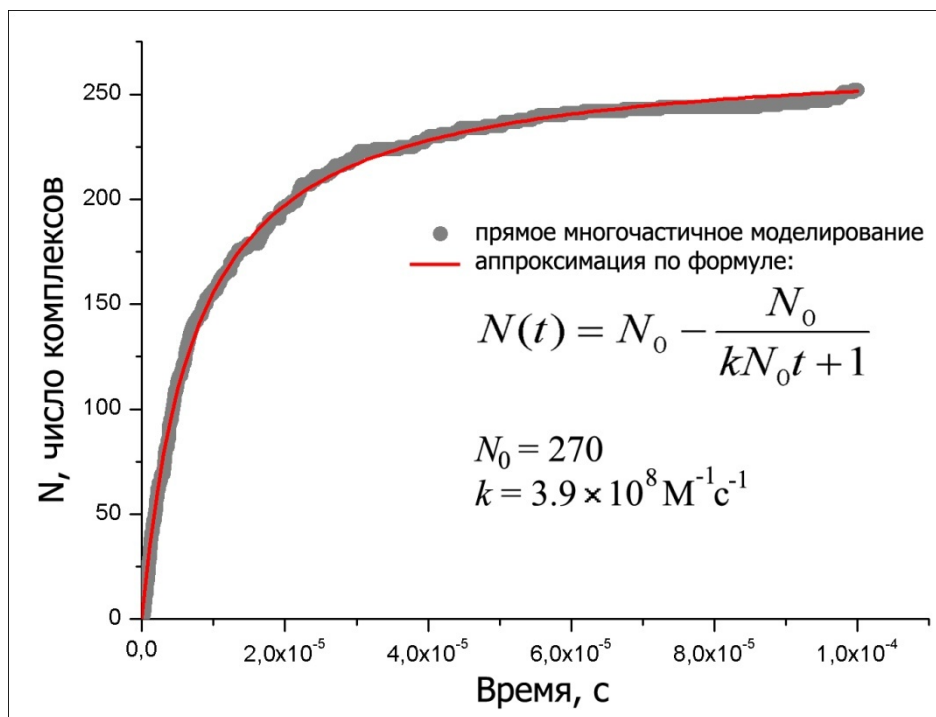


Рис. 7. Кинетическая кривая окисления цитохрома f (количество молекул указано в штуках), полученная на прямой модели, и ее аппроксимация по закону действующих масс (формула на рисунке).

В самом деле, рассмотрим окислительно-восстановительную реакцию взаимодействия двух молекул, донора D и акцептора A, в растворе. Предположим, что молекулы донора и акцептора могут находиться в двух состояниях – окисленном (обозначены D_{ox} и A_{ox}) и восстановленном (обозначены D_{red} и A_{red}). Пусть количество молекул донора и акцептора было одинаково, в начальный момент все молекулы донора восстановлены, а молекулы акцептора окислены. Будем считать, что восстановленная молекула донора D_{red} при реакции с окисленной молекулой акцептора A_{ox} может передать электрон. Процесс переноса электрона считаем быстрым по сравнению с процессами диффузии.

Кинетические характеристики исследуемой реакции $D_{red} + A_{ox} \xrightarrow{k} D_{ox} + A_{red}$ интерпретируются в рамках кинетической модели, т.е. полученная в эксперименте или модели кривая изменения редокс-состояния акцептора характеризуется константой скорости реакции k . Математически (в кинетическом подходе) исследуемая реакция описывается обыкновенным дифференциальным уравнением:

$$\frac{d[A_{ox}]}{dt} = -k[D_{red}][A_{ox}].$$

Если в начальный момент времени все молекулы донора восстановлены, а молекулы акцептора окислены, и количество молекул донора и акцептора одинаково, то решение этого уравнения:

$$[A_{ox}](t) = \frac{D_{ox}^0}{kD_{ox}^0t + 1} \quad (1)$$

где D_{ox}^0 - начальная концентрация восстановленного донора. Для нахождения константы скорости второго порядка k из регистрируемой кинетической кривой

получаемые на многочастичной модели кинетические кривые изменения редокс-состояния акцептора фитируем по формуле (1).

Расчет константы связывания в программе Origin

Для того чтобы загрузить файл с данными, необходимо открыть меню File -> Import -> Single (или Multiple) ASCII... и выбрать необходимый файл или файлы. В результате, в рабочем пространстве Book 1 появятся данные счета. В первой колонке содержится номер шага, количество образовавшихся комплексов содержится в колонке Н. Все остальные данные можно удалить. Для того чтобы построить график зависимости количества комплексов от номера шага, необходимо выделить соответствующие колонки и в меню Plot выбрать Line -> Line. Для аппроксимации кривой по закону действующих масс выбираем меню Analysis -> Fitting -> Nonlinear Curve Fit -> Open Dialog. В Category выбираем Hyperbola, в Function -> HyperbolaGen. Внизу появится изображение кривой и описывающая ее формула. Затем нужно выбрать вкладку параметры и ввести и зафиксировать известные значения, использованные во время счета. На графике появится окно, в котором будут перечислены параметры аппроксимирующей кривой. Из этих данных (а именно, параметра c) можно рассчитать константу связывания белков. Необходимо помнить, что константа должна иметь размерность $M^{-1}s^{-1}$.

Приложение А. Структура PDB-файлов

Раздел «Заголовок» (Title Section)

HEADER содержит уникальный идентификатор трехмерной структуры молекулы (PDB ID), а также ее классификацию (например, «Фотосинтез», «Электронный транспорт», «Мембранный белок, транспортный белок» и т.д.) и дату помещения в архив.

В TITLE указано название эксперимента или анализа, представленного в данной записи.

В COMPND описывается количество молекул в структуре и их основные характеристики. Этот раздел состоит из нескольких подразделов.

MOL_ID Номер компонента структуры, также используется в разделе SOURCE.

MOLECULE Название молекулы.

CHAIN Здесь перечисляются цепи молекулы, если их несколько. Для молекул, содержащих одну цепь, эта запись не делается.

FRAGMENT Здесь указаны домены или области макромолекулы. Например, если белок состоит из двух доменов, здесь приведены номера их аминокислотных остатков.

SYNONYM Список альтернативных названий молекулы.

EC Номер молекулы в соответствии с классификацией Комиссии по ферментам (Enzyme Commission).

ENGINEERED Здесь указано была ли молекула получена при помощи рекомбинантной технологии или химического синтеза.

MUTATION Здесь указывается, есть ли мутация.

OTHER_DETAILS Дополнительные комментарии.

В разделе SOURCE указываются биологические и/или химические источники получения каждой молекулы в структуре. Приводятся как научные, так и общие названия организмов. Штамм и линия клеток приводятся, если они важны для идентификации исследуемых макромолекул. Также здесь описываются системы экспрессии, в которых были получены молекулы.

В разделе KEYWDS приведены термины, связанные с данной структурой. Например, здесь могут быть указаны функция молекулы, метаболическая роль, химическая или биологическая активность, структурная классификация.

В EXPDTA указывается экспериментальный метод, которым была получена структура.

Далее следуют имена авторов записи в PDB (AUTHOR) и название журнала, в котором описан эксперимент по определению данной структуры (JRNL).

В разделе REMARKS представлены детали эксперимента, аннотации, комментарии и информация, не включенные в другие разделы. Содержащиеся здесь данные могут разъяснять приведенные выше. REMARKS имеют особую нумерацию, позволяющую определить к какому из аспектов эксперимента относятся приведенные данные (например, пространственное разрешение метода, использованное программное обеспечение и т.д.).

Раздел «Первичная структура» (Primary Structure Section)

В этом разделе приведена последовательность остатков каждой цепи макромолекулы. Указанные здесь названия цепей и номера последовательностей позволяют связать эту запись с другими базами данных.

В разделе DBREF предоставляется перекрестные ссылки для связи последовательности PDB с последовательностями других баз данных, а в разделе SEQADV — различия в этих структурах.

В разделе SEQRES приводится список последовательно и линейно расположенных химических компонентов, связанных ковалентными связями и образующих полимерную молекулу. Химическими компонентами могут быть стандартные или модифицированные аминокислоты или остатки нуклеиновых кислот. Также здесь могут быть указаны другие остатки, связанные с основной цепью. Остатки, связанные с боковыми цепями, здесь не указываются.

В разделе MODRES описываются модификации (химические или посттрансляционные) аминокислот или остатков нуклеиновых кислот.

Раздел «Гетероген» (Heterogen Section)

Здесь приводится подробная характеристика нестандартных остатков структуры, т.е. тех, которые не входят в состав цепи полимера.

В разделе HET описываются нестандартные остатки, т.е. простетические группы, ингибиторы, и молекулы растворителя, для которых в данной записи приведены координаты. Группы считаются HET, если они не являются частью биологического полимера, описанного в SEQRES, но имеют молекулярную связь с полимером, или если они представляют собой химическую молекулу, заменяющую часть полимера. При этом они не должны быть стандартными или неизвестными аминокислотами или остатками нуклеиновых кислот.

В разделе HETAM приведено химическое название гетерогена и его ID, а в HETSYN — альтернативные названия.

В разделе FORMUL указывается формула нестандартной группы и ее заряд.

Раздел «Вторичная структура» (Secondary Structure Section)

Здесь приводятся названия, нумерация и тип (если нужно) α -спиралей (HELIX), β -листов (SHEET) и поворотов (TURN), встречающихся в структуре белка или полипептида.

Раздел «Аннотация дополнительных связей» (Connectivity Annotation Section)

Этот раздел позволяет авторам указать положение дисульфидных связей и других линкерных связей в молекуле.

В разделе SSBOND указываются атомы, образующие дисульфидную связь, а в LINK — атомы, образующие другие линкерные связи.

В разделе CISPEP указываются пролины и другие пептиды, находящиеся в цис-конформации.

Раздел «Другие характеристики» (Miscellaneous Features Section)

Здесь могут быть описаны такие свойства молекул, как окружение нестандартного остатка или строение активного сайта. Также здесь могут быть приведены замечания, не входящие в классификацию REMARKS.

В разделе SITE указываются остатки, представляющие собой каталитический сайт, кофактор, антикодон или несущие другие важные функции.

Раздел «Кристаллография и трансформация координат» (Crystallographic and Coordinate Transformation Section)

Здесь описана геометрия кристаллографического эксперимента и трансформация системы координат.

Раздел «Координаты» (Coordinates Section)

В этом разделе приводятся координаты атомов, а также различные предложенные структуры для данной молекулы (MODEL), что часто бывает в случае экспериментов по ЯМР.

В разделе АТОМ записываются: порядковый номер атома (знаки 7-11), название атома (13-16), индикатор альтернативного положения атома (17), название остатка (18-20), название цепи (22), номер остатка в последовательности (23-26), код для вставки остатков (27), ортогональные координаты в ангстремах (X: 31-38, Y: 39-46, Z: 47-54), заселенность (55-60), температурный фактор (61-66), символ химического элемента (77-78), заряд атома (79-80). Точно такое же описание гетероатомов дается в разделе HETAM.

В разделе ANISOU представлены анизотропные температурные факторы.

Запись TER показывает окончание списка атомов цепи.

Раздел «Дополнительные связи» (Connectivity Section)

В CONECT при помощи порядковых номеров атомов указаны связи между ними. Этот раздел обязателен для HET-групп (но не для воды).

Раздел «Регистрация данных» (Bookkeeping Section)

Здесь представлена информация о самом файле. В разделе MASTER приведено количество строк в записи координат и других разделах. Слово END завершает PDB-файл.

«Транспорт неэлектролитов через природные мембранные нанопоры», Локтюшкин А.В.

АННОТАЦИЯ

Транспорт молекул различных веществ через наноразмерные поры – необходимое условие протекания многих биологических и технологических процессов. В биологических системах одним из важнейших транспортных процессов является перенос воды через клеточные липидные мембраны. Транспорт воды через некоторые клеточные мембраны протекает с очень высокой скоростью, кроме того, эта скорость может существенно изменяться в зависимости от физиологического состояния клетки. Высокоэффективный и регулируемый перенос воды через мембраны осуществляют специализированные интегральные мембранные белки аквапорины.

Простой моделью функционирования аквапоринов можно считать транспорт воды в углеродных нанотрубках – одном из важнейших объектов нанотехнологии. Несмотря на то, что поверхность нанотрубки гидрофобна, молекулы воды быстро заполняют её внутренний объем. Внутри трубки молекулы воды экранированы от конкурентных взаимодействий, что способствует образованию между ними долгоживущих водородных связей. При наличии между концами трубки разности химического потенциала воды, её молекулы могут синхронно перемещаться вдоль оси канала. Оказалось, что скорость этого потока исключительно высока благодаря слабому взаимодействию воды и гидрофобной поверхности нанотрубки.

Аквапорины – это семейство интегральных мембранных белков, формирующих поры, через которые проникает вода и ряд других низкомолекулярных неэлектролитов. Белки этого семейства очень широко распространены в живой природе – к настоящему времени обнаружено более 450 различных аквапоринов у представителей всех царств живых организмов от архей до животных. Сходство процессов переноса воды через углеродные нанотрубки и аквапорины обусловлено в первую очередь тем, что водный канал аквапоринов имеет преимущественно гидрофобные свойства.

Первый представитель семейства аквапоринов AQP1 был выделен в 1988 г. из мембраны эритроцитов человека. Наличие именно этого белка обуславливает весьма высокую водную проницаемость мембраны этих клеток. К настоящему моменту показано, что в эритроцитах имеется еще один представитель аквапоринов AQP3. Этот мембранный белок проницаем не только для воды, но и для глицерола.

Проницаемость клеточных мембран для воды и некоторых других незаряженных молекул можно определить, исходя из кинетической кривой изменения объема клетки, помещенной в среду соответствующего состава. В данной задаче этот подход используется для определения коэффициентов проницаемости для воды и глицерола мембраны эритроцитов.

Цель работы: исследовать влияние различных факторов (ингибиторов аквапоринов, величины pH) на проницаемость мембраны эритроцитов для воды и глицерола с помощью метода остановленной струи с фотометрической регистрацией.

Объект исследования: эритроциты позвоночных животных или человека.

План работы:

1. Знакомство с основными принципами и аппаратурой метода остановленной струи. Регистрация кинетической кривой тестовой реакции восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола аскорбиновой кислотой. Определение константы скорости реакции по кинетической кривой.
2. Получение эритроцитарной массы из цельной крови.
3. Регистрация кинетических кривых изменения объема эритроцитов в гипертонической и гипотонической среде (для контрольной суспензии клеток и для суспензии клеток, проинкубированных с ингибитором аквапоринов *лХМБ*). Определение по кинетическим кривым коэффициента осмотической водной проницаемости мембраны.
4. Регистрация кинетических кривых изменения объема эритроцитов в среде, содержащей глицерол (для контрольной суспензии клеток и для суспензии клеток, проинкубированных с ингибитором AQP3 NiCl_2). Оценка коэффициента проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола.
5. Получение зависимости проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола от величины pH среды.

Предполагаемые результаты: в ходе выполнения задачи предполагается освоение студентами основных принципов метода остановленной струи, а также некоторых приёмов анализа данных кинетического эксперимента. Полученные коэффициенты проницаемости для воды и глицерола позволят оценить вклад транспорта через липидный бислой, а также вклад транспорта, опосредованного белками, в суммарную проницаемость мембраны эритроцитов для этих соединений.

Организация задачи: задача выполняется группой студентов, состоящей из 2 – 3 человек. Задача проводится в лаборатории Общей биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Оборудование, используемое в задаче:

1. Двухволновой спектрофотометр Aminco DW-2 UV-VIS (США), оснащенный приставкой для измерений методом остановленной струи Aminco-Morrow.
2. Внешний модуль АЦП (аналогово-цифровой преобразователь) Е-14-140-М (Россия).
3. Настольная центрифуга Eppendorf 5415 R (США).
4. рН-метр Thermo Orion 250Aplus (США).

ОПИСАНИЕ ЗАДАЧИ

Введение

1. Механизмы транспорта воды через биологические мембраны.

Аквапорины

Способность контролировать перемещение воды и растворенных в ней веществ внутрь или наружу имеет для клетки огромное значение. Клеточные мембраны представляют собой чрезвычайно сложные избирательные фильтры, регулирующие транспорт целого ряда веществ. Открыты и изучены многочисленные мембранные белковые каналы, переносчики и насосы. Однако в течение длительного времени механизмы трансмембранного переноса воды оставались совершенно неясными. Водную проницаемость биологических мембран объясняли диффузией воды через липидный бислой. Известны, однако, физиологические процессы, связанные с быстрой регуляцией водной проницаемости мембран. Эти явления невозможно объяснить диффузией воды через липиды. Позже было установлено, что вода проникает через клеточные мембраны двумя различными путями:

- 1) простой диффузией через липидный бислой;
- 2) через белковые поры.

Предположение о существовании белков, которые формируют в биологических мембранах поры, специфичные для воды, было высказано впервые в 50-ые годы XX века на основе изучения мембранной проницаемости эритроцитов. Было обнаружено, что коэффициент осмотической водной проницаемости эритроцитарной мембраны в 2,5 раза выше коэффициента диффузионной водной проницаемости. Коэффициент осмотической водной проницаемости (P_f) характеризует скорость проникновения воды через мембрану при наличии разности осмотического давления. Коэффициент диффузионной водной проницаемости (P_d) определяет скорость проникновения через мембрану изотопно-меченной воды при отсутствии градиента осмотического давления. Для липидного бислоя отношение P_f/P_d близко к 1. Разницу двух коэффициентов водной проницаемости для эритроцитарной мембраны объяснили наличием в мембране клеток пор, заполненных

водой. Используя гидродинамические принципы из величины отношения P_f/P_d Соломон рассчитал радиус поры 3,5 Å (Sidel, Solomon, 1957).

Позднее было показано, что инкубация эритроцитов с сульфгидрильными реагентами HgCl_2 , *n*-хлоромеркуриобензоатом (*n*ХМБ) и *n*-хлоромеркуриобензосульфонатом (*n*ХМБС) существенно снижает осмотическую водную проницаемость мембраны (Masey, Farmer, 1970). При насыщающей концентрации ртутного ингибитора коэффициент водной проницаемости эритроцитарной мембраны приближался к коэффициенту проницаемости липидного бислоя. Эти результаты указывали на участие в транспорте воды белка, содержащего свободные SH-группы.

Белок, формирующий водную пору в эритроцитарной мембране, был выделен в 1992 году Нобелевским лауреатом Питером Эгром и назван CHIP28 (channel-like integral protein of 28 kDa --- «каналоподобный» интегральный белок с молекулярной массой 28 кДа). Позднее данный белок получил название аквапорин 1 (AQP1) (Agre *et al.*, 1993).

Окончательно функция CHIP28 как специфичной к воде поры была установлена в экспериментах на ооцитах *Xenopus laevis*. Мембрана ооцитов характеризуется весьма низкой собственной проницаемостью для воды, поэтому они могут длительное время находиться в пресной воде. Ооциты, в которые была инъецирована иРНК AQP1, быстро разбухали и лизировались в гипотонической среде, в то время как контрольные ооциты (не экспрессирующие аквапорин) оставались интактными. Кроме того, эффект экспрессии CHIP28 полностью снимался сульфгидрильным реагентом HgCl_2 (Preston *et al.*, 1992).

Аквапорины – это семейство интегральных мембранных белков, формирующих поры, через которые проникает вода и ряд других низкомолекулярных неэлектролитов. Белки этого семейства очень широко распространены в живой природе – к настоящему времени обнаружено более 450 различных аквапоринов у представителей всех царств живых организмов от архей до животных. Для девяти представителей семейства установлена атомная структура.

Несмотря на огромное разнообразие семейства аквапоринов для всех его представителей характерны некоторые общие черты молекулярной организации и функционирования.

Аквапорины образуют в мембране гомотетрамеры. Отдельные мономеры представляют собой полипептиды со средней молекулярной массой 30 кДа, состоящие в среднем из 270 аминокислотных остатков (Титовец, 2007). Каждый мономер формирует

отдельную водную пору. Проницаемость мономеров не меняется при их ассоциации в тетрамер. В центре тетрамера также имеется пора, роль которой окончательно не установлена. Имеются предположения, что пора представляет собой лиганд-зависимый ионный канал.

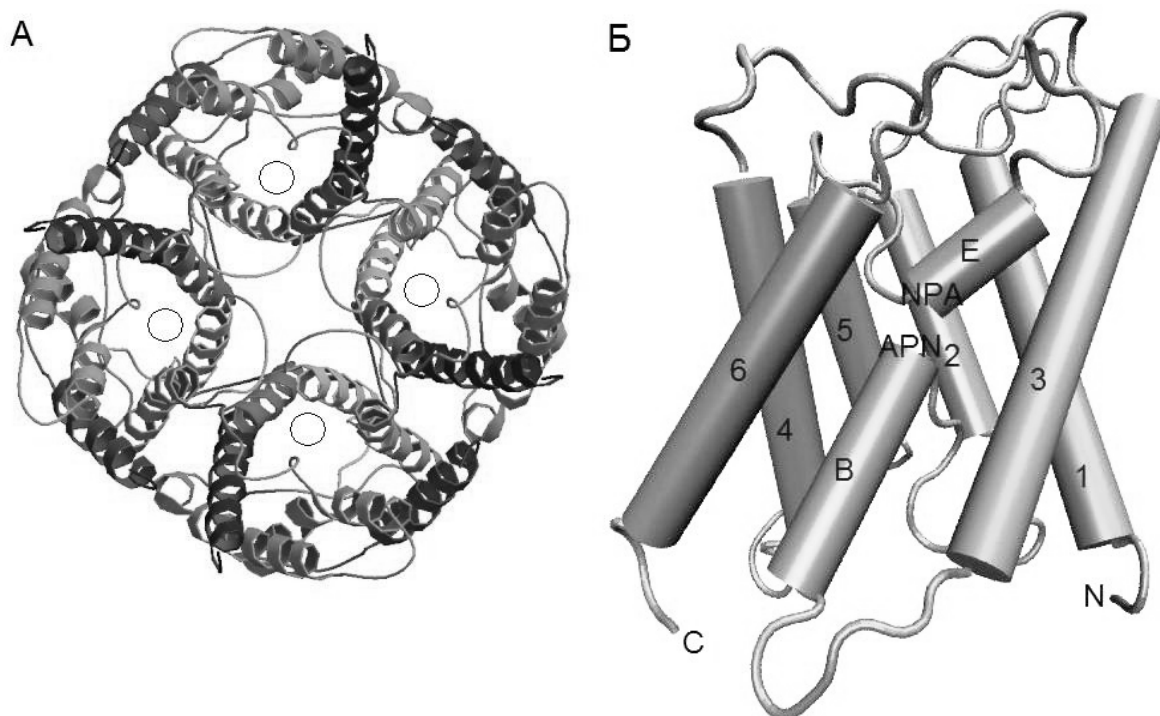


Рис. 1. Структура аквапорина AQP1 из эритроцитов человека.

А – четвертичная структура белка. Водные каналы мономеров обозначены кружками. Б – структура мономера. Пересекающие мембрану α -спирали обозначены цифрами 1-6; содержащие короткие α -спиральные домены соединительные петли обозначены буквами В и Е.

См. также в Protein Data Bank (1UHF)

Полипептидная цепь мономера пронизывает мембрану шесть раз, N- и C-концы обращены внутрь клетки. Концевые участки являются мишенями посттрансляционной модификации. Участки цепи, находящиеся в мембране образуют 6 α -спиралей, которые наклонены под углом примерно 25° по отношению к плоскости мембраны. Между N- и C-половинами молекулы наблюдается высокая степень гомологии, что может быть следствием древней дупликации аквапоринового гена (рис. 1).

На соединительных петлях В и Е практически у всех представителей семейства аквапоринов имеется консервативный мотив, состоящий из 3 аминокислот: аспарагина, пролина и аланина (NPA-мотив). Петли В и Е несут короткие α -спиральные домены, которые погружены в мембрану. Эти домены принимают участие в формировании канала для воды. Данная модель мономера аквапоринов получила название модели «песочных часов» (hourglass model).

Классификация аквапоринов основана на их специфичности по отношению к транспортируемым молекулам и аминокислотной последовательности. Первая группа включает собственно аквапорины специфичные по отношению к воде. К этой группе относятся следующие аквапорины животных AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 и AQP8. Вторая группа включает акваглицеропорины. Различные представители этой группы в разной степени проницаемы для воды, но дополнительно проницаемы для других малых неэлектролитов, в первую очередь для глицерола и мочевины. К этой группе относятся 4 аквапорина млекопитающих (AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10) (Титовец, 2007). Транспортные свойства AQP11 и AQP12 к настоящему времени исследованы недостаточно.

В отношении функциональной активности аквапоринов можно сделать следующие выводы (Шапигузов, 2004):

1. В присутствии аквапоринов скорость транспорта воды и некоторых других неэлектролитов через мембрану возрастает, а энергия активации этого процесса снижается.
2. Транспорт через аквапорины протекает с одинаковой скоростью в обоих направлениях при одинаковой разности химических потенциалов переносимого вещества по разные стороны мембраны.
3. Транспорт через аквапорины является пассивным.
4. Для аквапоринов характерна селективность. Транспорт незаряженной молекулы через пору мономера не сопровождается переносом ионов, в том числе и протонов.
5. Некоторые аквапорины ингибируются соединениями тяжелых металлов (Hg, Ag, Au, Cu, Ni).

2. Термодинамическое описание транспорта неэлектролитов через биологические мембраны

Уравнения, которые используются для описания процессов транспорта веществ через биологические мембраны, были получены в рамках термодинамического подхода в середине XX в. Термодинамический подход для описания процессов пассивного транспорта через мембраны воды и других неэлектролитов был разработан Кедем и Качальским (Kedem, Katchalsky, 1958). Этот подход основан на применении методов линейной неравновесной термодинамики.

Предположим, что в системе имеется два разделенных мембраной отсека, в которых находятся водные растворы некоторого вещества. В этой системе возможны два трансмембранных потока: поток воды J_w и поток растворенного вещества J_s (здесь и далее индексы w и s относятся к воде и растворенному веществу соответственно). Для обоих потоков выполняются линейные соотношения:

$$J_w = L_{ww}\Delta\mu_w + L_{ws}\Delta\mu_s, \quad (1)$$

$$J_s = L_{ss}\Delta\mu_s + L_{sw}\Delta\mu_w, \quad (2)$$

где $\Delta\mu_w$ и $\Delta\mu_s$ – разность химических потенциалов по разные стороны мембраны для воды и для растворенного вещества соответственно, L – феноменологические коэффициенты. Для перекрестных феноменологических коэффициентов выполняется соотношение взаимности Онзагера:

$$L_{ws} = L_{sw}.$$

Кедем и Качальский выразили уравнения (1) и (2) непосредственно через измеряемые величины – разность осмотического давления $\Delta\pi$ и разность гидростатического давления Δp в растворах по разные стороны мембраны:

$$J_V = L_p\Delta p + L_{pD}\Delta\pi, \quad (3)$$

$$J_D = L_D\Delta\pi + L_{Dp}\Delta p \quad (4).$$

Здесь определены два новых потока: объемный поток J_V

$$J_V = J_w \bar{V}_w + J_s \bar{V}_s \quad (5)$$

($\bar{V}$ – мольный объем) и обменный поток J_D , который соответствует относительному перемещению в мембране молекул растворенного вещества и воды

$$J_D = \frac{J_s}{\tilde{c}_s} - \frac{J_w}{\tilde{c}_w} \quad (6)$$

($\tilde{c}$ – средняя концентрация воды или растворенного вещества по разные стороны мембраны). Для перекрестных феноменологических коэффициентов также верно соотношение взаимности Онзагера: $L_{pD} = L_{Dp}$.

Из уравнений (3), (4), (5) и (6), используя закон Вант-Гоффа $\pi = RTc_s$, можно получить следующие соотношения:

$$J_v = L_p (\Delta p - \sigma \Delta \pi) = L_p (\Delta p - \sigma RT \Delta c_s), \quad (7)$$

$$J_s = RT \omega \Delta c_s + \tilde{c}_s (1 - \sigma) J_v. \quad (8)$$

$$\text{Здесь } \omega = \frac{L_p L_D - L_{pD}^2}{L_p} \cdot \tilde{c}_s, \quad \sigma = -\frac{L_{pD}}{L_p}.$$

Уравнения (7) и (8) полностью описывают транспорт через мембрану воды и растворенного вещества.

Рассмотрим случай идеальной полупроницаемой мембраны (проницаемой только для воды, но не для растворенного вещества) при отсутствии разности гидростатического давления ($\Delta p = 0$). В случае идеальной полупроницаемой мембраны коэффициент σ , который называется коэффициентом отражения, равен 1 (для мембран, проницаемых для растворенного вещества $0 < \sigma < 1$). Уравнение (7) для объемного потока воды в этом случае принимает вид

$$J_v = L_p \Delta \pi = L_p RT \Delta c_s \quad (9)$$

Коэффициент L_p называется гидравлической проводимостью мембраны и полностью характеризует свойства идеальной полупроницаемой мембраны. Чаще для характеристики биологических мембран и модельных мембранных систем используют коэффициент осмотической водной проницаемости, определяемый как

$$P_f = \frac{L_p RT}{\bar{V}_w}$$

Объемный поток воды J_v определяется как объем воды, переносимый через единицу площади мембраны в единицу времени: $J_v = \frac{1}{A} \cdot \frac{dV}{dt}$ (A – площадь поверхности мембраны).

Изменение объема клетки, попавшей в гипотоническую или гипертоническую среду, полностью связано с объемным потоком воды через мембрану, поэтому после несложных преобразований уравнение (9) можно переписать в виде

$$\frac{dV_r(t)}{dt} = \frac{P_f A \bar{V}_w}{V_0} \cdot \left(\frac{c_{in}}{V_r(t)} - c_{out} \right). \quad (10)$$

Здесь $V_r(t)$ – относительный объем клетки (отношение объема клетки к начальному объему); A/V_0 – отношение поверхности клетки к начальному объему; c_{in} и c_{out} – начальные концентрации внутриклеточного и наружного растворов соответственно. Это уравнение обычно используют для определения коэффициента осмотической водной проницаемости P_f из экспериментальных данных.

Материалы и методы

1. Материалы

В работе используются следующие реактивы: NaCl, Na₂HPO₄, глюкоза, сахароза, глицерол, HEPES (4-(2-гидроксиметил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), Mes (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота), ДХФИФ (2,6-дихлорофенолиндифенол), L-аскорбиновая кислота (категории не ниже ч.д.а.), NiCl₂ · 6H₂O и nГМБ (n-гидроксимеркуриобензоат) (Sigma).

Растворы ДХФИФ и L-аскорбиновой кислоты готовят на 10 мМ Na-фосфатном буфере с pH = 6,0. В экспериментах с эритроцитами используются следующие буферные растворы:

- 1) изотонический буфер А (145 мМ NaCl; 10 мМ глюкозы; 10 мМ HEPES; pH 7,4);
- 2) гипертонический буфер В (145 мМ NaCl; 200 мМ сахарозы, 10 мМ глюкозы; 10 мМ HEPES; pH 7,4);
- 3) гипотонический буфер С (45 мМ NaCl; 10 мМ глюкозы; 10 мМ HEPES; pH 7,4);
- 4) буфер D, содержащий глицерол (145 мМ NaCl; 200 мМ глицерола, 10 мМ глюкозы; 10 мМ HEPES; pH 7,4).

Для получения зависимости проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола от величины pH среды для точек с pH = 6,5 и 6,0 вместо HEPES используют MES в той же концентрации. Буферы В и D готовят путем добавления сахарозы или глицерола к буферу А.

2. Метод остановленной струи

В данной работе исследуется влияние различных факторов на проницаемость эритроцитарной мембраны для воды и глицерола. Для определения коэффициентов проницаемости используется осмотический метод. В этом методе суспензию эритроцитов помещают в среду, осмолярность которой отличается от осмолярности физиологического раствора, а затем следят за кинетикой сжатия или разбухания клеток. Изменение объема эритроцитов – быстрый процесс, требующий особых методов регистрации.

Метод остановленной струи используется для исследования кинетики быстрых процессов в растворе. Понятие «быстрого процесса» строго не определено, однако часто используется. Чтобы определить константу скорости некоторой бимолекулярной реакции, растворы реагентов смешивают и следят за составом смеси с помощью того или иного физико-химического метода. Без применения специальной техники для полного смешивания реагентов требуется несколько секунд. Если время полупревращения реакции много меньше, чем время смешивания, получение кинетической кривой реакции невозможно. Такие реакции с характерными временами < 10 с обычно называют быстрыми.

Очевидно, что для исследования быстрых химических реакций (и других быстрых процессов) необходимо быстрое смешивание растворов. Для решения этой задачи и был разработан метод остановленной струи. В этом методе растворы реагентов помещают в два шприца; на поршни шприцов подают давление, и растворы поступают в смесительную камеру. Из камеры смесь поступает в третий шприц и перемещает его поршень. Поршень третьего шприца упирается в ограничитель, в результате чего поток реагентов прекращается. Изменение состава смеси фиксируют после остановки потока с помощью методики с высоким временным разрешением.

В настоящее время метод остановленной струи широко применяется для решения многих задач химической кинетики: установления механизмов химических реакций, определения лимитирующих стадий, обнаружения промежуточных продуктов. Кроме того, с помощью этого метода решается ряд биологических задач: исследуется кинетика ферментативных реакций, изучается транспорт веществ через биологические мембраны и модельные мембранные системы, изучается фолдинг белков.

В данной задаче используется приставка для измерений методом остановленной струи Aminco-Morrow к двухволновому спектрофотометру Aminco DW-2. Схема приставки представлена на рис. 2. Поршни рабочих шприцов А и В, в которых находятся реагенты, приводятся в движение блоком (1), скользящим между направляющими.

Реагенты из шприцов А и В подаются через смесительную камеру в кювету для наблюдения за реакцией (2). Остановка потока в точке наблюдения происходит, когда поршень шприца С, приводимый в движение вытекающим смешанным раствором, доходит до механического ограничителя (5). Одновременно с остановкой потока поршень ограничителя включает выключатель (6), который запускает систему регистрации. За реакцией наблюдают при помощи фотоэлектрической фотометрии на спектрофотометре. Сигнал с выхода фотоумножителя подают на аналогово-цифровой преобразователь ЭВМ; при помощи временной развертки получают кинетическую кривую изменения пропускания или оптической плотности в результате протекания реакции. Объем раствора, проходящего через систему за один запуск, можно изменять с помощью микрометра (7), определяющего положение ограничителя (5).

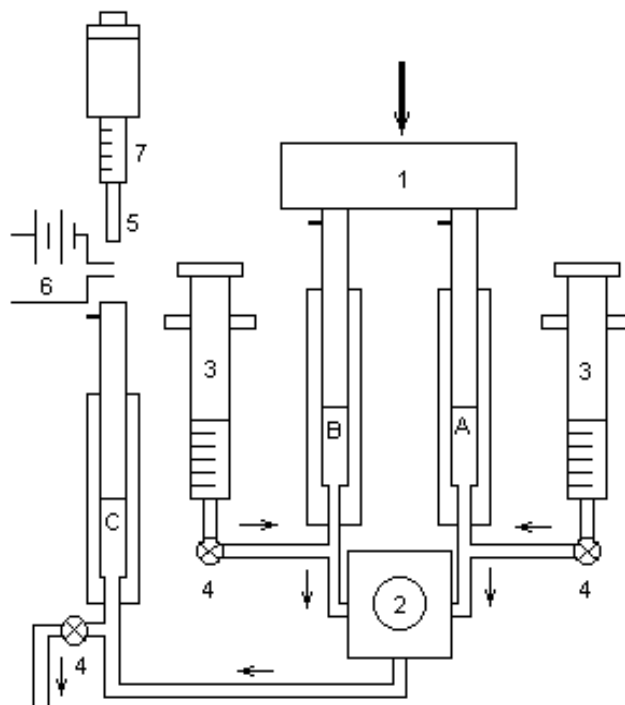


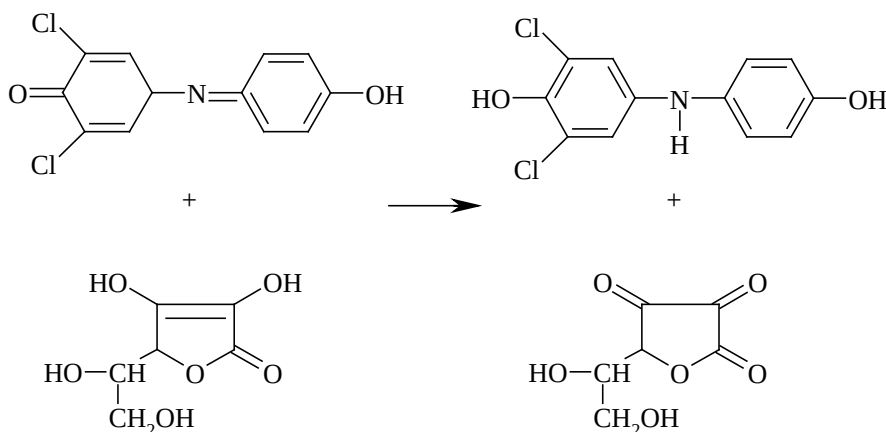
Рис. 2. Схема приставки для измерений методом остановленной струи Aminco-Morrow.

1 – подвижный блок; 2 – смесительная камера и кювета для наблюдения за реакцией; 3 – сменные шприцы для заполнения; 4 – краны; 5 – механический ограничитель; 6 – выключатель временной

Ход работы

1. Определение константы скорости реакции восстановления ДХФИФ L-аскорбиновой кислотой

Для знакомства с аппаратурой, используемой в задаче, студентам предлагается получить кинетическую кривую тестовой реакции – восстановления ДХФИФ L-аскорбиновой кислотой. При восстановлении ДХФИФ, имеющего при pH 6,0 синюю окраску, L-аскорбиновой кислотой образуется бесцветное основание ДХФИФ и L-дегидроаскорбиновая кислота



Восстановление сопровождается снижением оптической плотности раствора в максимуме поглощения ДХФИФ 600 нм.

Для получения кинетической кривой первый рабочий шприц установки заполняют 40 мкМ раствором ДХФИФ, второй рабочий шприц заполняют 2 мМ раствором аскорбиновой кислоты. На блок подают давление 0,5 МПа от газового баллона. Кинетику изменения оптической плотности при 600 нм регистрируют в течение 10 с. При одном заполнении рабочих шприцов получают 10-11 кинетических кривых, при расчете константы скорости их усредняют.

Для определения константы скорости примем, что реакция бимолекулярная и необратимая:

$$-\frac{d[\text{ДХФИФ}]}{dt} = k[L - \text{аск.}][\text{ДХФИФ}]. \quad (11)$$

Здесь $[\text{ДХФИФ}]$ и $[L - \text{аск.}]$ – концентрации реагентов, а k – константа скорости. Так как аскорбиновая кислота присутствует в избытке, можно считать её концентрацию постоянной. Решение уравнения (11):

$[\text{ДХФИФ}] = [\text{ДХФИФ}]_0 \cdot e^{-k[L - \text{аск.}]t}$ или $D_{600}(t) = D_{600}^0 \cdot e^{-k[L - \text{аск.}]t}$, где $[\text{ДХФИФ}]_0$ – начальная концентрация красителя, D_{600} – оптическая плотность раствора. Таким образом,

построив кинетическую кривую в координатах $\ln\left(\frac{D_{600}(t)}{D_{600}^0}\right) - t$ по тангенсу угла наклона ($-k[L-аск.]$) можно определить константу скорости реакции.

2. Получение эритроцитарной массы

В работе можно использовать готовую донорскую эритроцитарную массу, капиллярную кровь или кровь лабораторных животных. Если используется цельная кровь, то необходимо получить эритроцитарную массу. Для этого кровь разводят охлажденным буфером А, содержащим антикоагулянт гепарин. Разведенную кровь центрифугируют 5 мин при $1500 \times g$. Надосадочную жидкость и лейкоцитарно-тромбоцитарный слой удаляют, а осевшие эритроциты ресуспендируют в буфере А. Процедуру повторяют 3 раза. Готовую эритроцитарную массу хранят при 4°C .

3. Определение коэффициента осмотической водной проницаемости мембраны эритроцитов

Для определения коэффициента осмотической водной проницаемости (P_f) суспензию эритроцитов в изотоническом буфере А смешивают в соотношении 1 : 1 с гипертоническим (В) или гипотоническим (С) буфером. После смешивания на мембране эритроцита возникает разность осмотического давления, которая вызывает объемный поток воды из клетки или в клетку. Кинетику изменения объема регистрируют по изменению светорассеяния в проходящем свете при длине волны 590 нм.

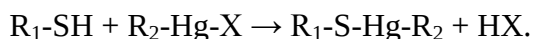
Эритроцитарную массу разводят буфером А в 200 раз. Разведенной суспензией эритроцитов заполняют рабочий шприц установки. Второй рабочий шприц заполняют буфером В. На блок подают давление 0,3 МПа. Кинетику изменения светорассеяния при смешивании суспензии клеток с гипертоническим буфером регистрируют в течение 10 с. Повторяют эксперимент, но вместо гипертонического буфера В используют гипотонический буфер С. Полученные кинетические кривые используют для определения коэффициента осмотической водной проницаемости.

Для определения коэффициента P_f используют уравнение (10). Для этого путем численного решения уравнения при начальном условии $V_r(t=0) = 1$ получают теоретические кинетические кривые при различных значениях P_f (для эритроцитов человека $A/V_0 = 13500 \text{ см}^{-1}$; $\bar{V}_w = 18 \text{ см}^3/\text{моль}$). Теоретические кривые аппроксимируют моноэкспоненциальной функцией и получают зависимость P_f от k , где k – множитель при времени в показателе экспоненты ($k = 1/\tau$; τ – характерное время экспоненты). По

теоретической зависимости P_f от k определяют P_f эритроцитарной мембраны (Roudier *et. al.*, 1998).

4. Изучение влияния ртутьсодержащих SH-реагентов на коэффициент осмотической водной проницаемости мембраны эритроцитов

Ртутьсодержащие SH-реагенты (HgCl_2 , $n\text{ГМБ}$) имеют высокое сродство к сульфгидрильным группам цистеиновых аминокислотных остатков белков. При взаимодействии этих соединений с SH-группами белка образуются соответствующие меркаптиды:



Сульфгидрильные реагенты являются ингибиторами активности многих белков для функционирования которых важны цистеиновые аминокислотные остатки. В AQP1 человека ртутные SH-реагенты взаимодействуют с Cys189, что приводит к существенному снижению потока воды через пору белка.

Коэффициент осмотической водной проницаемости эритроцитарной мембраны определяют так же, как в предыдущем пункте, но эритроциты предварительно инкубируют с $n\text{ГМБ}$ (1 мМ, 40 мин). Ингибитор добавляют в буфер А до эритроцитарной массы.

5. Изучение транспорта глицерола через мембрану эритроцитов

Описанный ранее метод определения осмотической водной проницаемости можно использовать и для определения коэффициента проницаемости мембраны для других неэлектролитов (например, мочевины и глицерола). Коэффициент проницаемости для вещества определяется как коэффициент пропорциональности между разностью концентраций вещества по разные стороны мембраны и диффузионным потоком при отсутствии объемного потока J_V (см. уравнение (8)):

$$J_s = P_s \Delta c_s;$$

$$P_s = RT\omega.$$

Основное ограничение метода регистрации изменения объема клеток в данном случае следующее: необходимо, чтобы проницаемость мембраны для вещества была ниже, чем для воды. Для эритроцитов это условие выполняется для ряда веществ из-за высокой водной проницаемости мембраны этих клеток, обусловленной наличием AQP1.

Если смешать суспензию клеток с гипертоническим раствором, содержащим изучаемое вещество, то сначала будет наблюдаться сжатие клеток из-за выхода воды во внешнюю среду. Однако вещество по градиенту концентрации будет медленно проникать в цитоплазму; вход молекул вещества вызовет обратный поток воды (внутри). Таким образом, сначала будет наблюдаться снижение объема клетки, а затем разбухание и восстановление объема до исходного (рис. 3).

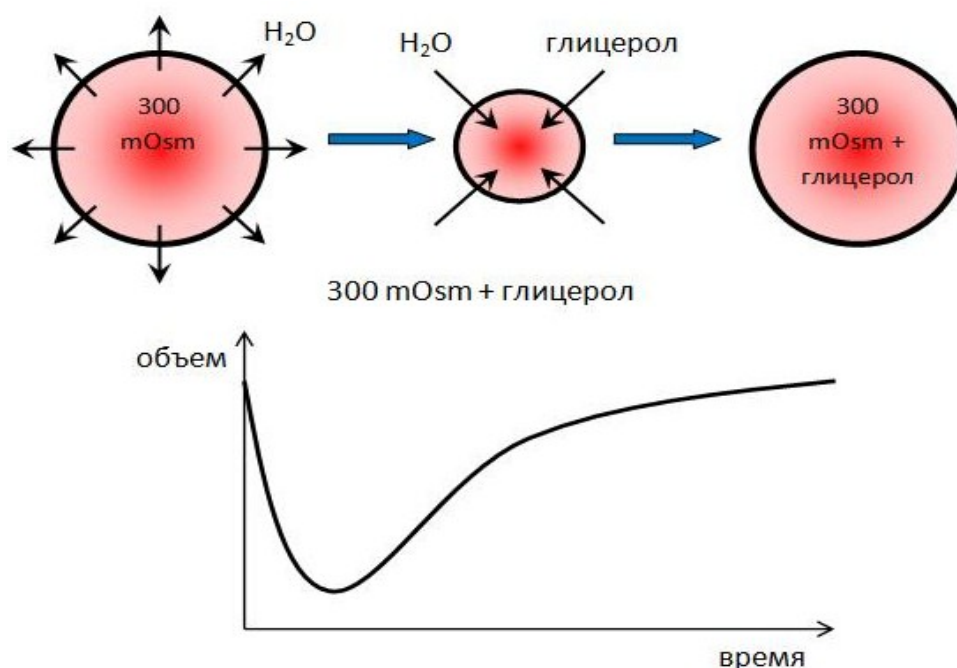


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая принцип метода измерения проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола.

Установлено, что в транспорте глицерола через мембрану эритроцитов человека также принимает участие аквапорин (AQP3) (Roudier *et. al.*, 1998). Этот белок был обнаружен также в эритроцитах крыс. В эритроцитах мышей AQP3 отсутствует, однако вместо него в мембране этих клеток имеется аквапорин AQP9 (также проницаемый для глицерола).

В отличие от AQP1 транспорт через AQP3 чувствителен к величине pH среды. Предполагается, что в процессе переноса через пору глицерол образует водородные связи с белком. При подкислении среды центры белка, образующие эти водородные связи протонируются, что приводит к снижению скорости транспорта глицерола (Zeuthen, Klaerke, 1999).

Для определения коэффициента проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола суспензию клеток в буфере А смешивают с буфером D, содержащим глицерол.

Кинетическую кривую изменения светорассеяния регистрируют в течение 30 с после смешивания. Эксперимент проводят при различных величинах pH среды (7,4; 7,0; 6,5; 6,2 и 6,0).

Вторую часть кинетической кривой изменения светорассеяния суспензии эритроцитов (соответствующую разбуханию клетки) аппроксимируют моноэкспоненциальной функцией, характерное время экспоненты τ используют для оценки коэффициента проницаемости мембраны для глицерола P . Коэффициент P оценивают по следующей формуле:

$$P \approx \frac{V_0}{A \cdot \tau}, \quad (12)$$

где V_0/A – отношение начального объема эритроцита к площади его поверхности, τ – характерное время экспоненты.

6. Изучение влияния NiCl_2 на проницаемость мембраны эритроцитов для глицерола

Коэффициент проницаемости эритроцитарной мембраны для глицерола определяют так же, как в предыдущем пункте, но эритроциты предварительно инкубируют с NiCl_2 (1 мМ, 5 мин). Ингибитор добавляют в буфер А до эритроцитарной массы. В эксперименте используют буфер с $\text{pH} = 7,4$.

После окончания работы над задачей студенты готовят отчет, который должен содержать:

1. Краткое теоретическое введение.
2. Описание целей и задач Практикума.
3. Краткое описание использованных методов.
4. Описание результатов и их обсуждение. В этом разделе отчета должны быть представлены рисунки с кинетическими кривыми, полученным при выполнении задачи, а также рассчитанные коэффициенты проницаемости.
5. Выводы по задаче.

Контрольные вопросы и задания

1. В каких единицах измеряются величины L_P и P_f ?
2. Чему равен коэффициент отражения σ для сахарозы?

3. Получите уравнение, описывающее изменение во времени объема клетки в гипертонической среде (решите уравнение (10)).
4. Эритроцитарную массу добавили к буферу D. После установления равновесия суспензию эритроцитов смешали в соотношении 1 : 1 с буфером B. Как будет изменяться объем клеток после смешивания? (Состав буферов B и D дан в разделе «Материалы и методы»).
5. Объясните, почему для оценки коэффициента проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола можно использовать уравнение (12).
6. Одним из направлений нанобиотехнологии является создание искусственных полимерных мембран, в которые встроены интегральные мембранные белки. В 2007 г. группе исследователей во главе с Мейером удалось встроить в полимерную мембрану бактериальный аквапорин AQPZ. Проницаемость для воды мембраны, содержащей аквапорин, была почти на 3 порядка выше, чем проницаемость чистой полимерной мембраны (Kumar *et al.*, 2007).

Как Вы думаете, в каком технологическом процессе можно использовать полимерные мембраны со встроенными аквапоринами? Какие свойства аквапоринов могут быть при этом использованы?

7. Используя рассчитанные из экспериментальных данных значения коэффициентов проницаемости P_f , оцените максимальное количество молекул воды, проходящих через пору аквапорина 1 в секунду. Сравните эту величину со скоростью переноса воды через углеродную нанотрубку диаметром 8,1 Å (17 молекул/нс) (Hammer *et al.*, 2001). Каковы основные сходства и различия в механизмах транспорта воды в аквапоринах и нанотрубках?

Список литературы

1. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. Москва: Мир, 1980. 341 с.
2. Титовец Э.П. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты. Минск: Белорусская наука, 2007. 239 с.
3. Шапигузов А.Ю. Аквапорины: строение, систематика и особенности регуляции // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 142 – 152.

4. *Agre P., Preston G.M., Smith B.L., Jung J.S., Raina S., Moon C., Guggino W.B., Nielsen S.* Aquaporin CHIP the archetypal molecular water channel // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 265. P. 463 – 476.
5. *Kedem O., Katchalsky A.* Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1958. V. 27. P. 229 – 246.
6. *Kumar M., Grzelakowski M., Zilles J., Clark M., Meier W.* Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. V. 104. P. 20719 – 20724.
7. *Macei R.I., Farmer R.E.* Inhibition of water and solute permeability in human red cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 1970. V. 211. P. 104 – 106.
8. *Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein // *Science.* 1992. V. 256. P. 385 – 387.
9. *Roudier N., Verbavatz J.M., Maurel C., Ripoché P., Tacnet F.* Evidence for the presence of aquaporin-3 in human red blood cells // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 8407 – 8412.
10. *Sidel V., Solomon A.K.* Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient // *J. Gen. Physiol.* 1957. V. 41. P. 243 – 257.
11. *Zelenina M., Bondar A.A., Zelenin S., Aperia A.* Nickel and extracellular acidification inhibit the water permeability of human aquaporin-3 in lung epithelial cells // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 30037 – 30043.
12. *Zeuthen T., Klaerke D.A.* Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H^+ // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 21631 – 21636.
13. *Hammer G., Rasaiah J.C., Noworyta J.P.* Water conduction through the hydrophobic channel of a carbon nanotube // *Nature.* 2001. V. 414. P. 188 – 190.

«Методы модификации состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов», Лунева О.Г., Паршина Е.Ю.

Аннотация задачи

Одним из направлений нанобиотехнологий является направленная модификация определенных свойств живой клетки (в частности, свойств липидного бислоя плазматической мембраны) с последующим использованием в практических целях или в фундаментальных исследованиях. Важными задачами такого направления являются разработка методов модификации клеток, способов контроля и отбора модифицированных клеток, а также методов для исследования клеточных процессов и отдельных молекул в живых клетках с заданной пространственной локализацией. Данная задача направлена на освоение способов модификации состава и свойств плазматической мембраны, а также связанных с мембраной белков живых клеток (на примере эритроцитов млекопитающих), методов получения используемых в нанобиотехнологических подходах для модификации состава мембран наноразмерных липосом и осуществлению контроля эффективности выполненной модификации.

Известно, что биологические мембраны представляют собой гетерогенные бислоиные наноструктуры толщиной около 8-10 нм и играют важнейшую роль в функционировании клеток. Актуальной научной задачей является изменение структуры и состава плазматической мембраны живой клетки и изучение зависимости клеточных процессов от свойств мембраны. Эритроциты млекопитающих являются ярким и удобным для исследования примером клеток, свойства которых зависят от состояния плазматической мембраны. В частности, известно, что содержание холестерина в мембране эритроцита существенно влияет на вязкость липидного матрикса мембраны (Casseraa et al., 2002), а также активность ионно-транспортных систем, например, Na/H-обменника и Ca-АТФазы, анионного обменника AE1 (белка полосы 3) (Bernhardt, Ellory, 2003). Можно предположить, что липидный состав и вязкость мембраны опосредованно через белок AE1 оказывают влияние на конформацию и O₂-связывающие свойства гемоглобина, связанного на белке AE1, а также на оксигенацию всего гемоглобина, содержащегося в эритроците, что непосредственно может оказать влияние на выполнение эритроцитами кислородтранспортной функции. Кроме того, изменение состава липидной части мембраны эритроцита может привести к изменению жесткости мембраны, что может сказаться на способности эритроцитов проходить через мелкие капилляры и повлиять на обеспечение тканей кислородом.

Для модификации липидного состава мембраны живых клеток, в частности, уменьшения содержания в мембране холестерина и разрушения липидных рафтов, значительную роль в образовании которых играет холестерин, используются вещества, экстрагирующие холестерин из

мембраны, в частности метил- β -циклодекстрин. Для насыщения мембраны холестерином используют раствор холестерина в метил- β -циклодекстрине. Кроме того, для изменения липидного состава мембран широко используются липосомы с различным липидным составом. Инкубация эритроцитов с метил- β -циклодекстрином и липосомами приводит к изменению липидного состава мембраны и, возможно, к изменению вязкости мембраны и свойств трансмембранных и связанных с ними белков. Одним из прямых методов, позволяющих контролировать эффективность произведенной модификации свойств мембраны, является метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием спиновых зондов на основе стеариновой кислоты с различным расположением парамагнитного фрагмента. В данной задаче использование двух спиновых зондов позволяет проводить контроль вязкости плазматической мембраны на глубинах 0.6 и 2.2 нм от поверхности. По изменениям в спектрах ЭПР спиновых зондов можно судить об изменении вязкости мембраны и, следовательно, встраивании или удалении холестерина из мембраны. Для оценки повреждающего воздействия производимых манипуляций на клетки необходимо использовать дополнительные микроскопические методы контроля общего состояния исходных и модифицированных клеток. В рамках данной задачи предлагается использовать световую микроскопию для исследования влияния модификации мембраны эритроцитов на их морфологию. При выполнении задачи «Методы комплексного исследования действия нанообъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов» предлагается более детальное комплексное исследование модифицированных клеток методом лазерной интерференционной микроскопии. Данные методы позволяют оценить морфологию и компартментализацию клеток и выявить наличие или отсутствие патологических изменений в структуре клеток, произошедших в результате модификации состава плазматической мембраны. Методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) можно зарегистрировать изменения конформации примембранного гемоглобина в эритроцитах и, таким образом, исследовать влияние изменения структуры мембраны на свойства примембранного гемоглобина.

Цели работы: исследовать влияния холестерина на свойства эритроцитарной мембраны методом ЭПР-спектроскопии (метод спиновых зондов), форму клеток и свойства примембранного гемоглобина, освоить методы модификации состава плазматической мембраны в живых клетках, методы приготовления наноразмерных липосом, используемых для модификации состава мембраны.

Объекты исследования: эритроциты крыс.

Используемые методы: абсорбционная спектроскопия, методы ультразвуковой обработки и экструзии (приготовление липосом), ЭПР-спектроскопия спиновых зондов 5- и 16-доксилстеариновых кислот (5-ДС и 16-ДС), встроенных в биологические мембраны, световая микроскопия, спектроскопия ГКР с использованием наночастиц серебра.

План работы:

- Выделение крови, получение суспензии эритроцитов.
- Получение эритроцитов с уменьшенным и увеличенным содержанием холестерина в составе плазматической мембраны путем инкубации эритроцитов с метил- β -циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из плазматической мембраны, и с раствором холестерина в метил- β -циклодекстрине, увеличивающем содержание холестерина в мембране, соответственно.
- Изучение общих принципов и подходов в приготовлении липосом и приготовление липосом из гомогенизированных в буфере фосфолипидов путем ультразвуковой обработки и экструзии.
- Получение эритроцитов с измененным составом плазматической мембраны путем инкубации эритроцитов с липосомами.
- Контроль целостности мембраны эритроцита (определение гемолиза) в процессе модификации мембраны и наблюдение изменений морфологии эритроцитов с разным содержанием холестерина в плазматической мембране методом световой микроскопии. Данная часть работы посвящена освоению методов контроля состояния живых клеток при направленной модификации состава клеточной мембраны.
- Регистрация спектров ЭПР 5- и 16-ДС, встроенных в плазматическую мембрану контрольных эритроцитов и эритроцитов со сниженным и повышенным содержанием холестерина. Обработка полученных спектров ЭПР, оценка микровязкости липидного матрикса различных образцов. Данная часть цикла знакомит студентов с методом контроля вязкости плазматической мембраны живых клеток, который может быть использован при биотехнологической модификации состава или структуры клеточной мембраны.
- Получение коллоидного раствора серебра путем восстановления AgNO_3 гидроксиламином гидрохлоридом.
- Определение оптимальных концентрации эритроцитов в исследуемой пробе и соотношения объемов суспензии эритроцитов и коллоидного раствора серебра для получения максимального сигнала ГКР от гемоглобина в эритроцитах. Обоснование требований к оптимальным условиям, при которых коллоидный раствор серебра не влияет на свойства эритроцитов.
- Получение спектров КР и ГКР от гемоглобина в эритроцитах с повышенным содержанием холестерина. Анализ влияния вязкости и липидного состава плазматической мембраны эритроцитов на конформацию и O_2 -связывающие свойства мембранносвязанного и цитоплазматического Гб в эритроцитах.

Предполагаемые результаты:

1. Освоение методов приготовления моноламеллярных липосом.
2. Освоение методов модификации липидного состава мембраны (на примере модификации состава мембраны с помощью метил- β -циклодекстрина и липосом)
3. Освоение методов спиновых зондов для определения и контроля вязкости плазматической мембраны живых клеток. Полученные результаты демонстрируют зависимость вязкости мембраны клеток от содержания в них холестерина, и изменение формы эритроцитов при модификации мембранного состава.
4. Освоение методов спектроскопии ГКР и КР в применении к intactным эритроцитам. Приобретение навыков оценивания изменений конформации Гб и его O_2 -связывающих свойств по спектрам КР и ГКР.
5. Данная задача позволит студентам ознакомиться с возможностью применения нанобиотехнологических приемов на примере конкретного исследования. Будут получены навыки как получения наноструктур (получение липосом), так и навыки контролируемой модификации клеток при помощи наноструктур (на примере липосом).

Оценка итогов проведенного практикума

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать краткое теоретическое введение, четко сформулированные цели и задачи исследования, основные методы исследования, корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов, четкие и логичные выводы по полученным результатам. По представленному отчету преподаватель проводит со студентами зачет, в ходе которого студенты отвечают на вопросы, как по теоретическим основам выполняемой задачи, так и по ходу выполнения работы. В качестве варианта предлагается выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет по проделанной работе студент предъявляет преподавателю и ответственному по практикуму на зачете.

В ходе выполнения работы используется следующее оборудование:

9. центрифуга Laborfuge 400R производства фирмы «Thermo Scientific» или MiniSpin Plus производства фирмы Eppendorf.
10. вортекс «Bio Vortex V1» производства фирмы «Biosan»
11. магнитная мешалка MSH 300 производства фирмы «Biosan»
12. твердотельный термостат «Термит» «НПФ ДНК-Технология», Россия
13. pH-метр pH410 производства фирмы «Аквилон»
14. Ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т, Россия
15. Мини-экструдер производства фирмы «Avanti Polar Lipids»

16. спектрофотометр Specol 11 производства фирмы «Carl Zeiss»
17. ЭПР-спектрометр РЭ 1307, Россия
18. КР-спектрометр с лазерами 473 и 532 нм (Ciel, Eurolase), системой регистрации МОРС 1/3648 (Троицк, Россия), сделанной на базе линейной ПЗС TCD1304DG (Toshiba, Япония) с фильтром LPO2-473RS-50 (Shemrock, USA);

Описание задачи

Введение

Холестерин является важным компонентом клеточных мембран, в том числе мембран эритроцитов. В мембране эритроцита содержание холестерина составляет приблизительно 25-30 % (Bernhardt, Ellory, 2003). Изменение липидного состава мембраны эритроцитов, в частности, увеличении и уменьшение содержания холестерина, приводит к изменению структуры мембраны. Увеличение содержания холестерина, как правило приводит к увеличению вязкости и упорядоченности мембраны, снижение содержания холестерина – к снижению упорядоченности и вязкости. В то же время, в различных по глубине областях мембраны эти эффекты могут быть выражены по разному, в том числе иметь обратную направленность (Casseraa et al., 2002).

Для модификации липидного состава мембраны различных клеток при сохранении их нативной формы используют метил- β -циклодекстрин (М β CD). М β CD представляет собой циклический олигосахарид, состоящий, как и все β -циклодекстрины, из семи глюкопиранозидных остатков (рис.1). Как β -циклодекстрин, так и метил- β -циклодекстрин используются для экстракции холестерина из культуры клеток, при это метилированная форма более эффективна. Гидрофобная молекула холестерина включается во внутреннюю, менее гидрофильную, чем окружающая вода, полость кольца. Внешняя поверхность М β CD достаточно гидрофильна, что позволяет молекулам М β CD растворяться в воде. Образование комплексов холестерина с М β CD повышает растворимость холестерина в водной среде. М β CD используется также для производства продуктов с пониженным содержанием холестерина: холестерин легко включается в циклодекстриновое кольцо, затем образовавшийся комплекс холестерина с М β CD удаляют. М β CD также используется для разрушения липидных рафтов, содержащих повышенное количество холестерина, путем экстрагирования холестерина из мембраны (Rodal et al., 1999).

Для модификации состава мембран широко применяют липидные наноструктуры – липосомы. Их применение позволяет включать в мембрану клеток необходимые гидрофобные соединения, нерастворимые в водной среде (Hui et al., 1980).

Липосомы – искусственные частицы, образованные одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями, ограничивающими внутреннюю водную фазу от внешней среды. Моноламеллярные липосомы состоят из одного бислоя. Различают малые

моноамеллярные (диаметр 20-50 нм) и большие моноамеллярные (диаметр 50-200 нм и выше). В бионанотехнологии наноразмерные липосомы используются в качестве средств доставки биологически активных веществ в клетки, при этом активное вещество может быть как заключено во внутреннем объеме липосомы (в водной среде), так и включено в состав липидного бислоя. Варьируя состав липосомальной мембраны можно реализовать адресную доставку содержимого липосом. Кроме того, липосомы широко используются как модельные объекты для экспериментальных исследований биологических мембран.

Существуют различные способы приготовления липосом. Для формирования наноразмерных липосом — малых и больших моноамеллярных — требуется обработка ультразвуком или экструзия.

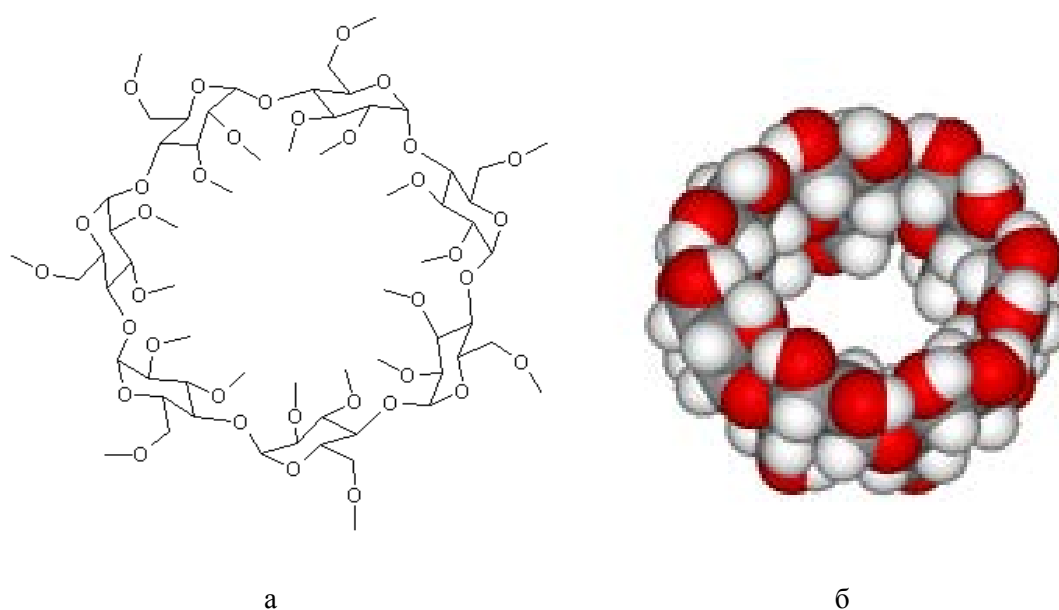


Рис. 1. Структурная формула МβCD (а) и пространственная модель βCD (б).

Предлагаемым воздействием в данной задаче является модификация содержания холестерина в плазматической мембране эритроцита при помощи метил-бета-цикладекстрина. Известно, что содержание холестерина в мембране эритроцита существенно влияет на вязкость липидного матрикса мембраны, а также активность ионно-транспортных систем, например, Na/H-обменника и Са-АТФазы. Свойства белка полосы 3 — обменника AE1 — также могут зависеть от состояния мембраны. В задаче предлагается проверить, как изменение содержания холестерина в плазматической мембране эритроцита влияет на конформацию и O₂-связывающие свойства Гб_{мс}, а также на оксигенацию всего гемоглобина, содержащегося в эритроците.

Материалы и методы

Материалы используемые в задаче

3. L- α -лецитин, холестерин, M β CD (Sigma, USA).
4. 2. NaCl, KCl, Na₂HPO₄×12H₂O, NaH₂PO₄×2H₂O (Sigma, USA).
5. CaCl₂, MgSO₄, хлороформ, глюкоза, гепарин, отечественного производства, градации не ниже ч.д.а.
6. Спиновые зонды 5 и 16 ДС (Sigma, USA)
7. AgNO₃, чистота 99,9999%, гидроксилламин гидрохлорид (NHCl) (наиболее высокая степень очистки), NaOH (Sigma, USA);
8. Деионизованная вода с сопротивлением 18 МОм×см

Приготовление растворов

Изотонический буфер Алена (mM) готовят следующим образом: 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgSO₄, 4 Na₂HPO₄×12H₂O, 1 NaH₂PO₄×2H₂O, 10 глюкоза, то есть на 100 мл раствора взвешивают: 841 мг NaCl, 37 мг KCl, 110 мкл 10 % раствора CaCl₂, 12 мг MgSO₄, 143 мг Na₂HPO₄×12H₂O, 15 мг NaH₂PO₄×2H₂O, 180 мг глюкозы, объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Добавляют по капле 1М раствор NaOH до достижения значения pH равного 7,4. Для приготовления гипертонического буфера Алена (используется при регистрации ГКР) на 120 мл раствора взвешивают 1,682 г NaCl, 74 мг KCl, 220 мкл 10 % раствора CaCl₂, 24 мг MgSO₄, 286 мг Na₂HPO₄×12H₂O, 30 мг NaH₂PO₄×2H₂O. pH доводят 1М раствором NaOH до 7,4.

Для экстракции холестерина из мембраны эритроцитов готовят 20 mM раствор M β CD в буфере Алена, который хранят при 4°C в темноте.

Для насыщения мембраны эритроцита холестерином готовят раствор холестерина в M β CD. Для этого 4 мг холестерина перемешивают в стеклянном гомогенизаторе с 3 мл раствора M β CD и обрабатывают ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при токе 8 μ A и частоте 22 кГц в течение 1 часа, затем инкубируют ночь при 37°C и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 мин в настольной центрифуге для удаления нерастворенного холестерина. В работе используют собранный супернатант. Хранят в темноте при 4°C.

Для исследования примембранного гемоглобина методом ГКР готовят коллоидный раствор серебра как описано в задаче «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра».

Методика забора крови

Объект исследования – эритроциты – выделяют из крови белых лабораторных крыс. Для этого животное наркотизируют хлороформом, проводят декапитацию и собирают кровь в лабораторный стакан, содержащий в качестве антикоагулянта (40 мкл на 8-10 мл крови). Студенты, проходящие данную задачу, не должны в обязательном порядке обладать навыками работы с лабораторными животными, выделение крови проводит преподаватель. Кровь хранят при комнатной температуре.

Получение эритроцитарной массы

Для модификации мембраны эритроциты используют в виде эритроцитарной массы. Для этого эритроциты отмывают от плазмы и других клеток крови путем 3-х кратного центрифугирования в буфере Алена (состав см. выше). В 4 микроцентрифужные пробирки Эппендорфа объемом 2 мл вносят по 700 мкл крови, разбавляют буфером Алена (1300 мкл), перемешивают, центрифугируют 5 мин при 3000 об./мин, собирают супернатант микропипеткой, затем повторяют операцию – доводят объем центрифугируемой суспензии буфером Алена до 2 мл и перемешивают. Перемешивание крови и эритроцитарной массы рекомендуется выполнять вручную, путем 3-х кратного переворачивания пробирки. При этом не происходит образования пены, и эритроциты в меньшей степени подвергаются гемолизу. При проведении центрифугирования необходимо следить за тем, чтобы пробирки, помещаемые в ротор центрифуги, были уравновешены. Отмывку повторяют 3 раза, полученную эритроцитарную массу собирают в одну пробирку и перемешивают.

Получение эритроцитов с уменьшенным или увеличенным содержанием холестерина в мембране

Для осуществления процесса встраивания или экстракции холестерина из мембраны эритроцита готовят 6 микроцентрифужных пробирок Эппендорфа – 2 для контрольных проб, 2 – для инкубации с М β CD, 2 – для инкубации эритроцитов с раствором холестерина в М β CD. В каждую пробирку вносят 200 мкл эритроцитарной массы. В контрольные пробирки необходимо добавить буфер Алена (1800 мкл), в опытные – 1500 мкл буфера Алена и 300 мкл 20 mM раствора М β CD или раствора холестерина в М β CD. Пробы бережно перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 30 мин при периодическом (1 раз в 5 мин) перемешивании. Для удаления М β CD и остатков холестерина из суспензии эритроцитов производят отмывку эритроцитов в буфере Алена. Для этого инкубируемые пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об./мин. Центрифугирование крови и эритроцитарной массы во всех случаях проводят при комнатной температуре (а не при 4°C, как это обычно принято при работе с кровью и эритроцитарной массой) для того, чтобы избежать большого перепада температур при инкубации клеток при 37°C. Супернатант после первого центрифугирования собирают в пробирки Эппендорфа для определения степени гемолиза клеток. Далее пробы разбавляют буфером Алена, перемешивают и снова проводят

центрифугирование. Цикл отмывки повторяют еще 4 раза. Полученную после отмывки эритроцитарную массу объединяют для контрольных и опытных проб соответственно.

Определение целостности мембран эритроцитов при модификации мембраны

Для определения степени гемолиза при модификации мембраны клеток определяют оптическую плотность пропорциональную содержанию гемоглобина в супернатанте после первого центрифугирования. Для этого измеряют поглощение на спектрофотометре Specol 11 при 540 нм супернатантов всех проб (в качестве нулевой пробы – буфер Алена). Оптическую плотность супернатанта сравнивают между контрольными пробами и пробами с модифицированной мембраной.

Определение вязкости мембраны эритроцитов при модификации мембраны

Вязкость мембраны эритроцитов определяют методом ЭПР (методом спиновых зондов). Стеариновую кислоту с парамагнитными фрагментами у разных углеродных атомов (5 и 16 – для 5 и 16ДС, соответственно (рис.2)) встраивают в мембрану эритроцитов. Одним из параметров, которым по спектру ЭПР можно описать поведение радикала, внедренного в исследуемую систему, например мембрану, служит время корреляции – τ_c , которое можно представить для не очень вязких систем как время поворота радикала на угол 90° относительно оси молекулы. Если под действием температуры или других агентов вязкость мембраны изменяется, то это приводит к изменениям скорости вращения радикала, т.е. к изменению времени корреляции, что сразу отразится на виде спектра.

Разработанные теоретические модели позволяют вычислять время корреляции по форме спектра ЭПР.

Для времен корреляции, лежащих в диапазоне 10^{-11} до 10^{-9} сек время корреляции можно вычислить по формуле:

$$\tau_c = 6.65 \cdot \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{h_{+1}}{h_{-1}}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ с}$$

$$\tau_c = \frac{4}{3} \pi R^3 \frac{\eta}{kT}$$

где η - вязкость, R - радиус частицы, h_{+1} и h_{-1} - интенсивности низкочастотной и высокочастотной компонент спектра, выраженные в относительных единицах, а ΔH_{+1} - ширина

между минимумом и максимумом для низкопольной компоненты, выраженная в единицах магнитного поля - в гауссах.

Таким образом, воздействуя на мембрану тем или иным способом и измеряя τ_c , можно сказать какие структурные перестройки претерпевает мембрана в интересующих нас условиях.

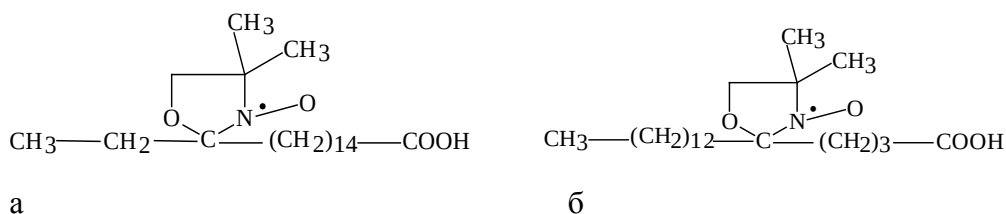


Рис.2. Структурные формулы 16- (а) и 5- (б) доксилстеариновых кислот.

Схема определения параметра τ_c по спектру ЭПР 16ДС представлена на рис.3. В ходе выполнения работы студенты измеряют амплитуды низкопольной и высокопольной компонент спектра h_{+1} и h_{-1} и ΔH_{+1} - ширину между минимумом и максимумом для низкопольной компоненты (рис. 3а). Для того чтобы ширину низкопольной компоненты перевести в Гс используется калибровка магнитного поля по Mn^{2+} . Для этого при регистрации спектров ЭПР записывают спектр марганцевого эталона отдельно или вместе со спектром образца (рис. 3б) и измеряют в условных единицах расстояние между 3 и 4 линиями Mn^{2+} , которое равно 86.7 Гс.

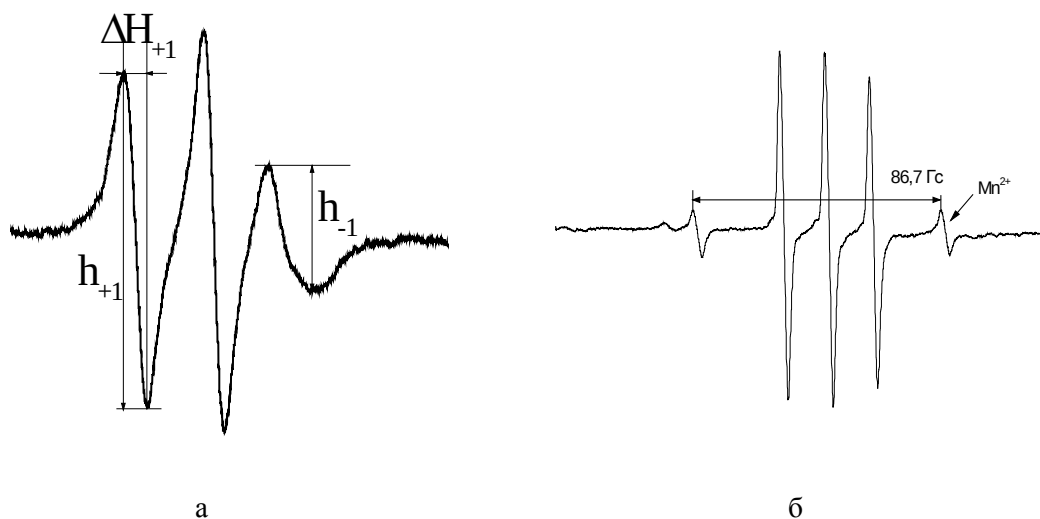


Рис. 3. Схема определения параметра τ_c по спектру ЭПР 16ДС. Положение измеряемых параметров спектра (а) и положение полос спектра марганцевого эталона (б).

С помощью зонда 16ДС можно получить информацию об изменениях, происходящих в глубоких областях внутримембранного пространства (2.2 нм). Для того, чтобы получить информацию об изменениях, происходящих ближе к поверхности мембраны, на глубине 0.6 нм, используют зонд 5ДС (рис. 2б). Типичный спектр зонда 5ДС в мембране эритроцитов представлен на рис. 4.

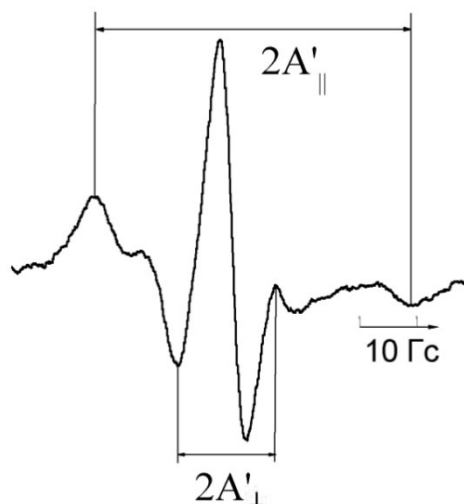


Рис. 4. Схема определения параметров $2A'_{||}$ и S по спектру ЭПР 5ДС.

Параметр $2A'_{||}$, определяемый по спектру ЭПР спинового зонда 5ДС является чувствительным к степени упорядоченности жирнокислотных остатков фосфолипидов в составе мембраны. Его увеличение отражает увеличение упорядоченности мембраны. Параметр $2A'_{||}$ определяется в Гс, для этого, также как и в случае с зондом 16ДС, используют калибровку магнитного поля по марганцевому эталону.

Также по спектру ЭПР спинового зонда 5ДС можно определить параметр упорядоченности, который напрямую отражает степень упорядоченности жирнокислотных остатков фосфолипидов в составе мембраны.

Подробнее о методе спиновых зондов и методе спектроскопии ЭПР можно узнать из методических указаний к малому практикуму по биофизике, а также из источников (Современные методы биофизических исследований, 1988, Кузнецов, 1976).

Для регистрации спектров ЭПР спиновых зондов, встроенных в мембраны эритроцитов с увеличенным и уменьшенным содержанием холестерина в мембране пробы готовят следующим образом. В пробирку Эппендорфа объемом 0.5 мл вносят 125 мкл суспензии эритроцитов и добавляют 0.5 мкл спиртового раствора зондов 5 или 16ДС в концентрации $2,5 \times 10^{-2} \text{ М}$, при этом конечная концентрация зонда в пробе составляет $1 \times 10^{-4} \text{ М}$. Сразу после внесения зонда пробу

следует быстро и тщательно перемешать. Измерение спектров можно осуществлять через 5 мин после добавления зонда в эритроцитарную массу, за это время произойдет встраивание зонда в мембрану эритроцитов. После перемешивания и инкубации в течение 5 мин пробу набирают в пластиковый капилляр, который герметизируют (например, пластилином), тщательно протирают снаружи и помещают в резонатор прибора. Для записи спектра подбирают подходящие значения усиления, значение постоянной времени составляет 0.1 с, ослабление мощности СВЧ 12.5 Дб.

Определение формы эритроцитов при модификации мембраны

Для определения влияния холестерина на форму клеток необходимо развести полученную эритроцитарную массу буфером Алена из расчета 5 мкл эритроцитарной массы на 1 мл буфера в пробирках Эппендорфа объемом 1.5 мл. В разбавленную суспензию добавить 20 мкл 25% глутарового альдегида (под тягой!), инкубировать в течение 50 мин, осадить центрифугированием (на центрифуге MiniSpin Plus под тягой, 5000 об., 3 мин), слить супернатант в струю воды. Отмыть клетки дистиллированной водой 4 раза, тщательно перемешивая осадок с помощью вортекса, нанести клетки в виде монослоя на предметные стекла. Высушенные мазки наблюдать под световым микроскопом, для составления отчета сфотографировать.

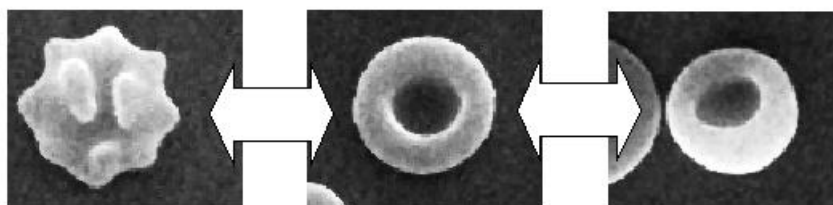


Рис. 5 Микрофотографии морфологических форм эритроцитов крысы (СЭМ, $\times 1000$). Слева направо: эхиноцит, дискоцит, стоматоцит.

При встраивании или экстракции из мембраны эритроцитов как липидов мембраны, так и экзогенных соединений форма эритроцитов может изменяться вследствие изменения соотношения площадей наружного и внутреннего монослоев плазматической мембраны (Sheetz, Singer, 1976). Такие изменения возможны и в случае экстракции и включения холестерина в мембрану эритроцитов (Casseraa et al., 2002). Эритроциты могут изменять свою нормальную дискоидную форму и превращаться в эхиноциты, если увеличивается площадь наружного монослоя, и в стоматоциты, если увеличивается площадь внутреннего монослоя (рис. 5).

По полученным фотографиям суспензии эритроцитов оценивают изменение морфологии клеток при изменении состава мембраны. По наличию и количеству (оценивается визуально)

модифицированных форм можно судить о встраивании и экстракции соединений из мембраны и о сохранности формы клеток в процессе модификации состава мембраны.

Регистрация спектров ГКР мембранносвязанного гемоглобина в эритроцитах при модификации мембраны.

Подробно особенности методов спектроскопии комбинационного рассеяния и гигантского комбинационного рассеяния описаны в задаче «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра». Для регистрации спектров ГКР суспензии эритроцитов необходимо подготовить суспензию эритроцитов, полученную разведением крови в 10^4 раз. Оптимальное усиление сигнала наблюдается при объемном соотношении суспензии эритроцитов к коллоидному раствору 3:2. Для того, чтобы избежать изменения осмолярности среды при добавлении гипоосмотического раствора коллоидов серебра, следует сделать разведение крови в два этапа – в 100 раз изотоническим буфером Аллена, а затем полученную суспензию развести гипертоническим буфером в 100 раз. Далее быстро в течение не более 10с смешать полученную суспензию эритроцитов с коллоидным раствором в объемном соотношении 3:2. При каждом разведении необходимо быстро и тщательно перемешивать пробы. Полученную пробу набрать в стеклянный капилляр, установить в ячейку прибора, сфокусировать лазер и записать спектр ГКР при мощности лазера на выходе 30 мВт и времени накопления спектра 100 с. Указанный способ приготовления проб эритроцитов с коллоидным раствором серебра является неинвазивным для клеток и не приводит к гемолизу эритроцитов, сам по себе не изменяет микровязкость мембраны и не влияет на морфологию клеток (Brazhe et al., 2009). Для каждой пробы следует сделать не менее трех независимых измерения. Регистрацию спектров цитоплазматического гемоглобина цельной крови производят при тех же параметрах, однако в капилляр набирают неразбавленную суспензию эритроцитов, полученную в результате модификации мембраны.

Получение липосом

Липосомы получали по методу (Racker, 1973) с модификациями.

Для получения липосом используют L- α -лецитин, выделенный из соевых бобов, содержащий 17% фосфатидилхолина. 40 мг лецитина разводят в 1 мл буфера Алена. Полученную смесь гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе до исчезновения комков и получения однородной суспензии. Смесь помещают в пробирку Эппендорфа и озвучивают "банным" способом в течение 40 минут на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при токе 8 μ А и частоте 22 кГц до полного просветления суспензии.

Для оценки диаметра полученных липосом используют спектрофотометрический метод, предложенный в работе (Chong, Colbow, 1976) для определения диаметра липидных частиц по мутности суспензии. Определяют поглощение суспензии липосом разведенной до концентрации лецитина 1 мг/мл на спектрофотометре Specol 11 (Carl Zeiss, Германия) в кварцевых кюветах толщиной 1 см при 436 нм. Если поглощение суспензии составляет менее 0.1, можно считать, что, в соответствии с (Chong, Colbow, 1976), липосомы имеют достаточно узкое распределение по размеру, со средним радиусом 400 Å и пригодны для использования в эксперименте.

Липосомы хранят в холодильнике при +4°C и используют в течение 24 часов.

Для получения липосом заданного размера используют мини-экструдер. Подробно процесс получения липосом заданного размера методом экструзии описан в задаче «Методы приготовления и анализа моноламеллярных липосом». Принцип получения липосом при помощи экструзии заключается в том, что при продавливании суспензии многослойных липосом или липосом произвольного размера через фильтры с порами определенного диаметра они разбиваются на частицы размера, соответствующего размерам пор. Экструдер собирают согласно прилагаемой к нему инструкции, набирают полученную обработкой ультразвуком суспензию липосом в один из шприцов и продавливают суспензию липосом через мембрану 11 раз. Полученные липосомы должны иметь размер, соответствующий размерам пор фильтра (например, 100 нм).

Модификация состава мембраны эритроцитов с помощью липосом

При инкубации эритроцитов совместно с суспензией липосом часть липидов из мембраны липосом может встроиться в мембрану эритроцита. Как правило, встраивание липидов происходит во внешний монослой мембраны, что приводит к образованию эхиноцитов. Для модификации состава мембраны эритроцитов с помощью липосом к 300 мкл эритроцитарной массы добавляют 100 мкл полученной суспензии липосом и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. После этого проводят исследование изменения структуры мембраны методом ЭПР, морфологию эритроцитов, как описано выше.

Оформление результатов и их обсуждение.

- 7) Отчет по задаче оформляется в виде небольшой научной работы и включает разделы «Введение», «Цели и задачи», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения» и «Выводы». Цели и задачи должны быть сформулированы четко и кратко.
- 8) В разделе «Материалы и методы» необходимо отразить последовательность действий при модификации структуры мембраны, основные этапы приготовления липосом и исследования модифицированных и контрольных мембран эритроцитов.
- 9) В разделе «Результаты и обсуждения» должны быть представлены спектры ЭПР спиновых зондов в мембранах модифицированных и контрольных клеток, параметры, рассчитанные по данным спектрам, сравнительный анализ свойств мембраны модифицированных и контрольных клеток. Спектры КР и ГКР и параметры, рассчитанные с использованием данных спектров, отражающие изменения конформации цитоплазматического и примембранного гемоглобина при модификации мембраны. Также должны быть представлены результаты контроля целостности клеточных мембран в процессе модификации мембраны и результаты контроля морфологии эритроцитов при модификации мембраны (фотографии), а также произведен анализ полученных результатов.
- 10) По полученным в работе результатам необходимо написать развернутые выводы.

Вопросы к задаче

- Какую роль играет холестерин в клеточных мембранах?
- Каковы механизмы действия M β CD при модификации мембран живых клеток?
- Каков механизм изменения липидного состава мембраны при добавлении к клеткам суспензии липосом?
- Что такое липосомы? Какие способы приготовления липосом вам известны? Какие достоинства и недостатки имеются у каждого из них?
- Объясните принципы метода спектроскопии ЭПР и спиновых зондов. Какую информацию о мембране клеток можно получить с помощью этих методов?
- Объясните результаты, полученные при помощи метода спиновых зондов.
- Объясните результаты, полученные методами КР и ГКР, каковы возможные механизмы наблюдаемых изменений (или причины отсутствия таковых)?
- С какой целью проводят определение гемолиза при модификации мембраны и оценку морфологии клеток? О чем свидетельствуют полученные результаты?

Список литературы

- Bernhardt I., Ellory J.C. Red Cell Membrane Transport In Health And Disease. Springer, 2003. 748p.
- Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New Insight into Erythrocyte through In Vivo Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Biophysical Journal, 2009, V. 97, № 12, p.3206-3214.
- Casseraa M.B., Silbera A.M., Gennaro A.M. Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study. Biophysical Chemistry, 2002, № 99, p.117–127.
- Chong C.S., Colbow K. Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. Biochim Biophys Acta. 1976, v. 436, N2, p.260-282.
- Hui S.W., Stewart C.M., Carpenter M.P., Stewart T.P. Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocyte membrane. J Cell Biol, 1980, v. 85, №2, p.283–291.
- Racke E. A new procedure for the reconstitution of biologically active phospholipid vesicles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. vol.55 p.224-230.
- Rodal S.K., Skretting G., Garred Q., Vilhardt F., Deurs F., Sandvig K. Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. Molecular Biology of the Cell, 1999, Vol. 10, 961–974.
- Sheetz M.P., Singer S.J. Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shape of human erythrocytes. The J. of Cell Biol., 1976, 70, p.247-251.
- Кузнецов А.Н. Метод спинного зонда (основы и применение). М.: Наука, 1976.
- Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике. Под ред. А.Б.Рубина. М.: Высш. шк., 1988. стр. 226-258.

«Определение эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET), фёрстеровского радиуса и константы скорости переноса энергии от квантовых точек к биологическим акцепторам», Максимов Е.Г.

Аннотация задачи

Задача предлагает комплексное исследование фотофизических свойств квантовых точек и освоение ряда методов нанобиотехнологий и клеточной биофизики. Выполнение данной задачи возможно не только в рамках цикла, но и как самостоятельной задачи практикумов по нанобиотехнологиям, клеточной биофизики и спектроскопическим методам.

Современные нанотехнологии позволяют синтезировать полупроводниковые CdSe/ZnS нанокристаллы, или так называемые квантовые точки (КТ), которые поглощают свет в широком оптическом диапазоне от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области. Спектр флуоресценции КТ достаточно узок (полуширина спектра составляет 20—25 нм), идеально симметричен, а положение максимума испускания флуоресценции определяется диаметром нанокристалла. Несколько уступая лучшим флуоресцентным меткам в величине квантового выхода флуоресценции (~70 % при комнатной температуре), квантовые точки превосходят их на несколько порядков по величине сечения поглощения света. Яркость свечения нанокристаллов настолько высока, что их можно визуализировать как единичные объекты с помощью обычного флуоресцентного микроскопа. Это стало причиной широкого применения квантовых точек в качестве флуоресцентных зондов. Покрытие нанокристаллов органической оболочкой из би- или трифункциональных полимеров обеспечивает их растворимость в воде за счет поверхностных полярных групп. Функциональные группы органической оболочки, доступные для конъюгации, делают возможным создание искусственных светособирающих комплексов на основе квантовых точек, которые могут служить высокоэффективными донорами энергии для фотосинтетических пигмен-белковых комплексов. Вышеперечисленные свойства делают квантовые точки удобным объектом для исследования процессов переноса энергии.

Цель задачи: освоить методики регистрации спектров поглощения и флуоресценции, а также основные методы определения квантового выхода флуоресценции зондов; освоить программу Photochemcad 2.1 и расчеты константы скорости миграции энергии, эффективности FRET, интеграла спектрального перекрытия и фёрстеровский радиус в донорно-акцепторной паре.

Объекты исследования: биологическая макромолекула/пигмент-белковый комплекс на выбор, полупроводниковые квантовые точки (CdSe/ZnS или CdTe в зависимости от фотофизических свойств биологического объекта).

Методы: абсорбционная спектроскопия, спектрофлуориметрия, метод счета фотонов для регистрации кинетик затухания флуоресценции.

План выполнения работы:

1. Выбор донорно-акцепторной пары для проведения исследования.
2. Регистрация спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора.
3. Анализ спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора, определение квантового выхода донора.
4. Регистрация кинетики затухания флуоресценции донора методом счета фотонов, определение времени жизни возбужденного состояния.
5. Анализ эффективности миграции энергии в донорно-акцепторной паре с помощью программы Photochemcad 2.1.

Предполагаемые результаты и навыки:

- Освоение методов абсорбционной спектроскопии, спектрофлуориметрии, счета фотонов для регистрации кинетик затухания флуоресценции;
- Приобретение навыков анализа спектров поглощения и флуоресценции, а также расчета квантовых выходов флуоресцентных зондов;
- Освоение программы Photochemcad 2.1. и проведение квантово-механических расчетов: эффективность перекрывания спектров, эффективность миграции энергии и соответствующих констант.
- Полученные результаты продемонстрируют зависимость эффективности миграции энергии от донора к акцептору от их спектральных свойств. Задача ознакомит нанотехнологов, физиков и химиков с особенностями применения наночастиц в спектроскопии и оптических методах для исследования свойств живых клеток, а биологов — с возможностью получать дополнительную информацию о структуре и свойствах биомолекул при использовании квантовых точек.

Оценка итогов проведенного практикума: основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

1. краткое теоретическое введение с описанием исследуемого объекта и указанием

преимуществ квантовых точек по сравнению с органическими флуоресцентными зондами;

2. четко сформулированные цели и задачи исследования;
3. основные методы исследования;
4. корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и обсуждение полученных результатов;
5. четкие выводы по полученным результатам;
6. список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами зачет, в ходе которого студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным за практикум.

Организация задачи практикума

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством преподавателя и выполняет отдельное исследование, которое может производиться как независимо, так и в рамках цикла задач. Местом проведения являются лаборатории кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

В ходе выполнения работы используется следующее оборудование:

- 11) спектрофлуориметр Horiba Jobin Yvon FluoroMax®-4 (Франция)
- 12) спектрофотометр Perkin Elmer Lambda 900 (США)
- 13) комплекс Simple Tau-140 для регистрации кинетики затухания флуоресценции Becker & Hickl (Германия)
- 14) вортекс «Bio Vortex V1» производства фирмы «Biosan»;
- 15) магнитная мешалка MSH 300 производства фирмы «Biosan»;
- 16) персональный компьютер с установленной программой Photochemcad 2.1.

Описание задачи

Введение

Флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) - это перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору. Он происходит без промежуточного испускания фотонов и является результатом диполь-дипольных взаимодействий между донором и акцептором. Скорость переноса энергии зависит от степени перекрытия спектра испускания донора со спектром поглощения акцептора, относительной ориентации дипольных моментов переходов и расстояния между молекулами. Именно это привело к широкому использованию FRET для измерения расстояний между донорами и акцепторами. Для таких измерений необходимо, чтобы пара донор-акцептор была разделена расстоянием, которое не изменялось бы за время жизни возбужденного состояния донора.

Рассмотрим донор и акцептор, которые находятся на фиксированном расстоянии r . Константа скорости переноса энергии от донора к акцептору определяется выражением:

$$k_T = \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot \kappa^2 \cdot \varphi_d}{2^7 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N_A \cdot r^6 \cdot \tau_d} \int_0^\infty \frac{F_d(\nu) \cdot \varepsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu, \quad (1)$$

где

κ^2 – фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве

дипольных моментов переходов донора и акцептора (пример на рис.1.)

вычисляется по формуле $\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3 \cdot \cos\theta_d \cdot \cos\theta_a)^2$,

φ_d – квантовый выход донора в отсутствие акцептора,

n – показатель преломления среды,

N_A – число Авогадро,

r – расстояние между донором и акцептором,

τ_d – время жизни возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора,

ν – волновое число,

$F_d(\nu)$ – нормированная интенсивность флуоресценции донора

в шкале волновых чисел в диапазоне от ν до $\nu + \Delta\nu$

(суммарная интенсивность принимается равной единице),

$\varepsilon_a(\nu)$ – коэффициент экстинкции акцептора, соответствующий волновому числу ν .

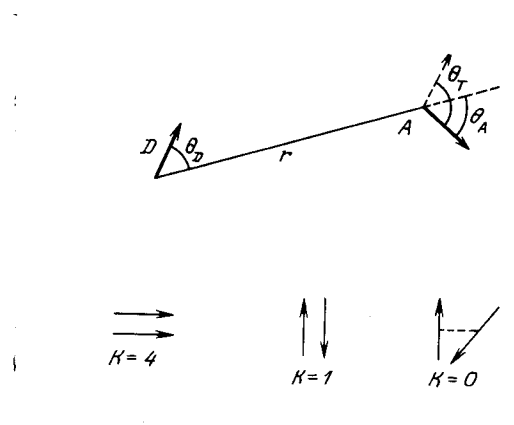


Рис.1. Диполи донора (D) и акцептора (A), находящиеся на фиксированном расстоянии r

(θ_T - угол между диполем испускания донора и диполем поглощения акцептора,

θ_d и θ_a — углы между этими диполями и вектором, соединяющим донор и акцептор).

Если обозначить φ_d/τ_d за λ_d (константа скорости испускания донора), а интеграл по волновому числу за J (интеграл перекрывания) и подставить все константы, выражение для константы скорости примет следующий вид:

$$k_T = 8,71 \cdot \frac{J \cdot \kappa^2 \cdot \lambda_d}{r^6 \cdot n^4} \cdot 10^{23} \quad (2)$$

Интеграл перекрывания, отражающий степень спектрального перекрывания между испусканием донора и поглощением акцептора, может быть также записан в другой форме в шкале длин волн (λ):

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \cdot \varepsilon_a(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

Также для упрощения уравнения (1) можно объединить постоянные члены. При этом вводится понятие фёрстеровского радиуса (R_0) как расстояния, на котором константа скорости переноса энергии (k_T) равна константе скорости затухания флуоресценции донора в отсутствие акцептора ($\Gamma_d = \tau_d^{-1}$). На этом расстоянии половина молекул донора дезактивируется за счет переноса энергии, а половина – по обычным излучательным или безызлучательным механизмам. Из уравнения (1) и условия $k_T = \tau_d^{-1}$ получаем:

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln 10 \cdot \kappa^2 \cdot \varphi_d}{2^7 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4} \int_0^{\infty} \frac{F_d(\nu) \cdot \varepsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (4)$$

Подставив это выражение в уравнение (1) получаем простое выражение для константы скорости переноса энергии:

$$k_T = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (5)$$

Фёрстеровский радиус находится в пределах 20-50 Å. Этот диапазон расстояний сравним с диаметром большинства белков и толщиной биологических мембран, что приводит к многочисленным применениям переноса энергии в биологических исследованиях. Любые явления, которые оказывают влияние на расстояние между донором и акцептором, будут влиять на скорость переноса энергии, что позволяет их количественно охарактеризовать. Например, используя степень переноса энергии между фиксированными донорами и акцепторами можно установить расстояние между ними.

Новое и в равной степени интересное приложение метода переноса энергии – определение статических и динамических конформационных свойств макромолекул в растворе. При детальном анализе кинетики затухания флуоресценции донора можно в принципе определить распределение расстояний между парами донор-акцептор и скорость, с которой донор и акцептор диффундируют относительно друг друга. С помощью таких измерений можно выявить детали структурной гетерогенности макромолекул и структурные флуктуации этих молекул на сравнительно больших расстояниях ($\sim 40 \text{ \AA}$). В настоящее время подобный детальный анализ требует тщательной оценки, как при получении, так и при интерпретации спектральных данных. Тем не менее, выявленные возможности метода переноса энергии, скорее всего, приведут к непрерывному развитию необходимых методов.

Часто измеряют эффективность переноса энергии E , которая определяется как отношение числа поглощенных донором фотонов к числу фотонов, перенесенных на акцептор:

$$E = \frac{k_T}{\tau_d^{-1} + k_T} = \frac{k_T}{\Gamma_d + k_T} \quad (6)$$

Эффективность переноса энергии также можно вычислять, исходя из относительного квантового выхода флуоресценции в присутствии (F_{da}) и в отсутствие (F_d) акцептора или времен затухания в этих же условиях (τ_{da} , и τ_d соответственно):

$$E = 1 - \frac{F_{da}}{F_d} = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad (7)$$

Это уравнение получается из предыдущего, если учесть что $F_{da}/F_d = \Gamma_d/(\Gamma_d + k_T)$, $\tau_{da} = (\Gamma_d + k_T)^{-1}$ и $k_T = \tau_{da}^{-1} - \tau_d^{-1}$.

Если подставить уравнение (5) в (6), то эффективность переноса энергии можно непосредственно связать с расстоянием:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (8)$$

Важно осознать, что предположения, использованные при выводе этих уравнений, применимы только к донорно-акцепторным парам, разделенным фиксированным

расстоянием. Эта ситуация часто встречается для маркированных белков, но фиксированных донорно-акцепторных расстояний, как правило, не бывает ни для смеси донора и акцептора в растворе, ни для доноров и акцепторов, равномерно распределенных в мембране. В этих случаях необходимы более сложные преобразования. Их, как правило, выводят путем усреднения константы скорости переноса в соответствии с предполагаемым пространственным распределением донорно-акцепторных пар. Далее, фиксированные расстояния донор-акцептор приводят к единственной скорости переноса, и, как следствие, кинетика затухания интенсивности флуоресценции должна быть одноэкспоненциальной кривой.

Если считать модель с фиксированным расстоянием донор-акцептор адекватной, то легко заметить, что скорость переноса энергии зависит от фёрстеровского радиуса, который в свою очередь определяется величинами κ , n , φ_d и J . Значения этих величин должны быть известны для вычисления расстояния. Показатель преломления обычно известен из состава растворителя, φ_d определяют путем сравнения со стандартными соединениями, а интеграл перекрывания для пары донор-акцептор должен быть вычислен. Важно отметить, что в уравнениях, приведенных выше, предполагается, что при связывании с акцептором время затухания флуоресценции донора не изменяется по каким-либо иным причинам кроме безызлучательного переноса энергии. Для маркированных макромолекул это наблюдается не всегда. Аллостерические взаимодействия между центрами связывания донора и акцептора могут изменить время затухания для донора за счет или усиления других процессов затухания, или, наоборот, предотвращения этих процессов. В таких случаях необходим более сложный анализ кажущейся эффективности переноса.

Материалы и методы

Материалы и растворы

- Водные растворы CdSe/ZnS и CdTe квантовых точек.
- Препараты ФС1, ФС2, ССК2.
- Фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин.
- Спиртовые экстракты хлорофилла *a* и *b*.
- Раствор родамина 6Ж в этиловом спирте.
- Буфер TRIS HCl pH 7,5.

Метод абсорбционной спектроскопии

Оптическая спектроскопия зародилась в 1802 году, когда были открыты Фраунгоферовы линии — темные линии в спектре Солнца. Это явление было заново открыто и описано Фраунгофером в 1814 году. В 60-е годы XIX века Кирхгоф попытался объяснить природу этих линий, считая что они связаны с наличием в атмосфере Солнца различных газов, и для каждого газа существует определенная линия. Целенаправленная научная спектроскопия началась в 1853 году, когда Андрес Йонас Ангстрем сопоставил линии излучения газов с различными химическими элементами — так зародился новый метод получения информации о составе веществ — спектральный анализ.

Интенсивность светового потока при его прохождении через исследуемую среду уменьшается вследствие превращения энергии излучения в различные формы внутренней энергии вещества и (или) в энергию вторичного излучения. Способность вещества поглощать свет зависит главным образом от электронного строения атомов и молекул, а также от длины волны и поляризации падающего света, толщины слоя, концентрации вещества, температуры, наличия электрических и магнитных полей. Для измерения поглощательной способности используют спектрофотометры - оптические приборы, состоящие из источника света, камеры для образцов, монохроматора (призма или дифракционная решетка) и детектора. Сигнал от детектора регистрируется в виде непрерывной кривой (спектра поглощения) или в виде таблиц, если спектрофотометр имеет встроенную ЭВМ. Применение абсорбционной спектроскопии основано на следующих законах.

1. Закон Бугера-Ламберта: если среда однородна и слой вещества перпендикулярен падающему параллельному световому потоку, то:

$$I = I_0 e^{-kd},$$

где I_0 и I -интенсивности соотв. падающего и прошедшего через вещество света, d -толщина слоя, k -коэффициент поглощения, который не зависит от толщины поглощающего слоя и интенсивности падающего излучения. Для характеристики поглощения широко используют коэффициент экстинкции, или светопоглощения; $k' = k/2,303$ (в см^{-1}) и оптическую плотность $A = \lg I_0/I$, а также величину пропускания $T = I/I_0$. Отклонения от закона известны только для световых потоков чрезвычайно большой интенсивности (для лазерного излучения). Коэффициент k зависит от длины волны падающего света, т.к. его величина определяется электронной конфигурацией молекул и

атомов и вероятностями переходов между их электронными уровнями. Совокупность переходов создает спектр поглощения (абсорбции), характерный для данного вещества.

2. Закон Бера: каждая молекула или атом независимо от относительного расположения других молекул или атомов поглощает одну и ту же долю энергии излучения, т.е. $k = c\epsilon$, где c - концентрация в-ва. Если c выражена в моль/л, ϵ называют молярным коэффициентом поглощения. Отклонения от этого закона свидетельствуют об образовании димеров, полимеров, ассоциатов, о химическом взаимодействии поглощающих частиц.

3. Объединенный закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 e^{-\epsilon cd}$$

Вид спектра поглощения определяется как природой образующих его атомов и молекул, так и агрегатным состоянием вещества. Спектр разреженных атомарных газов - ряд узких дискретных линий, положение которых зависит от энергии основного и возбужденных электронных состояний атомов. Спектры молекулярных газов - полосы, образованные тесно расположенными линиями, соответствующими переходам между колебательным и вращательным энергетическими уровнями молекул. Спектр вещества в конденсированной фазе определяется не только природой составляющих его молекул, но и межмолекулярными взаимодействиями, влияющими на структуру электронных уровней. Обычно такой спектр состоит из ряда широких полос различной интенсивности. Иногда в нем проявляется структура колебательных уровней (особенно у кристаллов при охлаждении). Прозрачные среды, например вода, кварц, не имеют в спектре полос поглощения, а обладают лишь границей поглощения.

По спектрам поглощения производят качественный и количественный анализ веществ. Абсорбционная спектроскопия широко применяют для изучения строения вещества. Она особенно эффективна при исследовании процессов в жидких средах; по изменениям положения, интенсивности и формы полос поглощения судят об изменениях состава и строения поглощающих свет частиц без их выделения из растворов.

Метод спектрофлуориметрии

При поглощении фотона электрон в молекуле переходит на одну из свободных орбиталей и молекула оказывается в возбужденном состоянии. Таких уровней может быть

несколько, а молекула может оказаться на любом из них, в зависимости от того, какой была длина волны действующего излучения. Обратный переход на основной энергетический уровень приводит к уменьшению энергии системы, которая может растрачиваться по следующим каналам:

- испускаться в виде кванта флуоресценции с вероятностью k_f
- растрачиваться на колебательные движения ядер и поступательное движение молекул самого флуоресцирующего вещества k_d
- растрачиваться при взаимодействии возбужденной молекулы с посторонней молекулой тушителя флуоресценции k_q
- расходоваться при переходе молекулы в триплетное состояние k_{st}
- растрачиваться при осуществлении фотохимических реакций k_r

Квантовый выход процесса дезактивации возбужденного состояния можно определить как соотношение:

$$\varphi_i = \frac{k_i}{\sum_n k_n}$$

Так, например, квантовый выход флуоресценции, отражающий вероятность дезактивации возбужденного состояния по излучательному пути, рассчитывается по формуле:

$$\varphi_f = \frac{k_i}{\sum_n k_n} = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_q + k_{st} + k_r}$$

Исследование спектров флуоресценции – зависимости интенсивности излучения от длины волны $I_f = f(\lambda)$ - позволяет проводить качественный и количественный анализ различных компонентов в биологических и модельных системах, изучать их агрегацию и взаимодействие друг с другом.

Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав смеси. Для люминесцентного анализа используются растворы с низкой оптической плотностью, в противном случае возникает необходимость учитывать эффекты экранирования и реабсорбции. Важной особенностью спектра флуоресценции многокомпонентных систем является зависимость его формы от длины волны возбуждения (т.к. при разных длинах волн могут возбуждаться разные соединения).

Количественный люминесцентный анализ проводится в соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера, согласно которому количество поглощаемой световой энергии равно: $I = I_0 e^{-\varepsilon c l}$. Интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности возбуждающего света I_0 , квантовому выходу флуоресценции φ_f , и коэффициенту поглощения $1 - T$:

$$I_f = I_0 \varphi_f k (1 - T) = I_0 \varphi_f k (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

Константа k зависит от следующих условий эксперимента:

- от телесного угла, в пределах которого собран свет флуоресценции
- ширины спектрального интервала, вырезаемого монохроматором
- пропускания монохроматора
- чувствительности приемника

Из выражения для I_f следует, что интенсивность флуоресценции не пропорциональна концентрации, но при малой оптической плотности ($D < 0,1$) можно использовать выражение, которое получается при разложении выражения для I_f в степенной ряд и учете только первого члена этого ряда:

$$I_f = 2,3 I_0 \varphi_f k \varepsilon c l$$

Очевидно, что при низких концентрациях флуоресцирующего вещества интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации вещества. На этом основан количественный флуоресцентный анализ.

Определение квантового выхода флуоресцентного красителя

В данной задаче студентам предлагается освоить наиболее простой и широко распространенный метод определения квантового выхода вещества – метод сравнения со стандартом. Суть метода заключается в том, что для некоторого стандартного вещества с известным значением квантового выхода флуоресценции регистрируется зависимость интенсивности флуоресценции от поглощения. Затем такая же зависимость регистрируется для испытуемого образца. Сравнение этих зависимостей позволяет определить значение квантового выхода.

Предлагается следующий порядок действий:

1. Приготовить 5 растворов стандартного вещества с различными концентрациями. Для корректного измерения спектров поглощения значение оптической плотности не должно превышать 0,7 единицы оптической плотности, однако для измерения спектров флуоресценции обычно используют более разбавленные растворы - не более 0,1 - 0,2 единицы оптической плотности, поскольку реабсорбция может приводить к искажению спектров флуоресценции. Поэтому рекомендуется приготовить растворы с низкой оптической плотностью, но для регистрации спектров поглощения использовать кюветы с большим оптическим путем.
2. Провести измерения спектров поглощения растворов стандартного вещества, провести анализ спектра поглощения и выбрать длину волны возбуждения для регистрации спектров флуоресценции.
3. Провести регистрацию спектров флуоресценции растворов стандартного образца. Рассчитать площади (взять интеграл) под кривыми интенсивности флуоресценции.
4. Построить график зависимости: площадь под спектром флуоресценции от оптической плотности на длине волны возбуждения флуоресценции. Определить градиент полученной зависимости (обычно, если измерения проведены аккуратно, экспериментальная зависимость хорошо аппроксимируется линейной функцией вида $y = ax$)
5. Повторить пункты 1-4 для испытуемого образца.
6. Рассчитать значение квантового выхода для испытуемого образца по формуле:

$$\varphi_2 = \varphi_1 \frac{grad_2}{grad_1}$$

В качестве стандартных образцов обычно используют растворы флуоресцентных красителей, таких как родамин 6Ж.

Ход выполнения работы

I. Выбор донорно-акцепторной пары для проведения исследования.

Студентам предоставляют возможность выбрать любой раствор квантовых точек для выполнения работы. Далее преподаватель предлагает на выбор несколько

вариантов акцептора энергии, обсуждаются перспективы образования гибридных структур.

II. Регистрация спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора.

Для измерения готовят водные растворы квантовых точек и акцептора энергии различной концентрации. Измерения спектров поглощения проводятся с помощью спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 900 в 50 мм кварцевых кюветах, в качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду для раствора квантовых точек и соответствующий буфер для акцепторов. Измерения спектров флуоресценции проводятся на Horiba Jobin Yvon FluoroMax®-4 в 10 мм кварцевых кюветах. Важно отметить, что во время всех измерений настройки приборов (ширина щели, время накопления, усреднении и т.д.) должны быть одинаковыми.

III. Анализ спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора, определение квантового выхода донора.

Проводится согласно методике описанной в разделе «определение квантового выхода». Для анализа спектров, расчета интегралов и построения графиков используется программное обеспечение OriginPro 8.0.

IV. Регистрация кинетики затухания флуоресценции донора методом счета фотонов, определение времени жизни возбужденного состояния.

Измерения проводятся на установке SimpleTau-140 в 10 мм кварцевых кюветах. Поскольку метод счета фотонов обладает высокой чувствительностью, измерения можно проводить на сильно разбавленных растворах квантовых точек. Анализ кинетик затухания флуоресценции проводится с помощью пакета программ SPCImage.

V. Анализ эффективности миграции энергии в донорно-акцепторной паре с помощью программы Photochemcad 2.1.

Спектры поглощения и флуоресценции экспортируются из программы OriginPro 8.0 в виде электронных таблиц и затем импортируются в программу Photochemcad 2.1. Студенты создают собственную базу данных в которую должны входить спектры поглощения и флуоресценции донора, а также информация об их коэффициентах экстинкции, квантовых выходах, временах жизни и т.д. Далее необходимо:

1. загрузить спектр флуоресценции донора (КТ) и спектр поглощения акцептора
2. открыть меню «Modules» и выбрать из списка опцию «Förster Energy Transfer»

3. в меню ввести следующие параметры:

- коэффициент преломления среды $n = 1,33$ (для водного раствора)
- ориентационный фактор κ^2 ($2/3$ соответствует беспорядочной ориентации дипольных моментов донора и акцептора)
- время жизни возбуждённого состояния донора в отсутствие акцептора
- расстояние между молекулами донора и акцептора (принять равным $50 \text{ \AA}$)
- квантовый выход донора
- коэффициент экстинкции акцептора
- длину волны для коэффициента экстинкции
- границы перекрывания спектров

Далее выполнить «Calculate».

Оформление результатов и их обсуждение

1. При подготовке отчета по каждому из разделов задачи необходимо представить спектры поглощения и флуоресценции квантовых точек и акцептора энергии. Каждый рисунок должен иметь четкую подпись и сопровождаться описанием в основном тексте.
2. Представить графики зависимостей, по которым были рассчитаны квантовые выходы квантовых точек.
3. Представить кинетики затухания флуоресценции квантовых точек, результаты их аппроксимации суммой экспонент и соответствующие времена жизни возбужденного состояния.
4. К отчету должны прилагаться скриншоты из программы Photochemcad 2.1. демонстрирующие спектры поглощения и флуоресценции, соответствующий им интеграл перекрывания, Фёрстеровский радиус, константа скорости миграции энергии и эффективность миграции энергии.
5. Сделать выводы по всей задаче.

Дополнительные вопросы

1. Что такое квантовый выход флуоресценции и чем он определяется?
2. Какими свойствами должны обладать молекулы двух веществ для того чтобы между ними мог происходить перенос энергии?
3. Чем FRET отличается от перепоглощения квантов флуоресценции?
4. Какие свойства делают квантовые точки универсальными флуоресцентными

зондами?

5. По каким параметрам можно судить об эффективности миграции энергии?

ЛИТЕРАТУРА

- Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. // Российские Нанотехнологии (2007) т. 2. №1-2 С. 160-173.
- I.L. Medintz, H. Mattoussi Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology // Phys. Chem. Chem. Phys., (2009). 11. P. 17–45
- Y.E. Borissevitch ; TABAK, M. . Correction of Stern-Volmer fluorescence quenching constants at very low optical absorption of the quencher. In: ELAFOT - Encontro Latinoamericano de Fotoquímica e Fotobiologia. 1997. Los Cocos. Córdoba.
- Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. 1999. 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- S.V. Gaponenko, Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals. 1997. Cambridge University Press.
- Корватовский Б.Н., Пашенко В.З., Рубин А.Б., Рубин Л.Б., Тусов В.Б. (1982) Автоматизированный импульсный флуорометр высокого временного разрешения и чувствительности. Биол. науки. Т.11. С. 105..
- Dale, R. E. and J. Eisinger (1974) Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. Biopolymers 13. 1573-1605

**«Молекулярно-механическое моделирование свойств углеродных нанотрубок», Зленко Д.В.,
Мамонов П.А.**

Аннотация

В рамках данной задачи студенты получают практические навыки создания и настройки молекулярно-механических моделей, осваивают методы молекулярного моделирования. В качестве объекта моделирования используются углеродные нанотрубки различного строения. В ходе работы студенты исследуют их механические колебательные свойства, упругие свойства, а также проницаемость нанотрубок для молекул воды. При решении этих задач студенты осваивают методы гармонического анализа, управляемой и обычной молекулярной динамики, знакомятся с техникой интерпретации результатов молекулярного моделирования. Перечисленный комплекс работ позволяет дать студентам минимальный базовый уровень владения методами молекулярного моделирования, а также познакомить с интересными и необычными свойствами углеродных нанотрубок.

Введение

На сегодняшний день методы молекулярного моделирования стали незаменимым инструментом исследования биологических молекул и наноструктур. Совершенствование теоретических подходов и развитие вычислительной техники позволило им приблизиться по информативности к экспериментальным методам исследования. Вместе с тем подходы основанные на моделировании обладают рядом преимуществ перед экспериментальными методами. Исследование свойств молекулярных систем «*in silico*» не требует специализированного экспериментального оборудования и позволяет в короткие сроки решать задачи, требующие значительного времени и средств при исследовании в реальном эксперименте. Несмотря на то, что в общем случае точность результатов, получаемых при моделировании, уступает экспериментальным, подобный подход находит применение в ситуации, когда стоит задача массового тестирования свойств большого количества соединений. Например, таким образом тестируется сродство потенциальных лигандов к белку-мишени, при создании новых лекарств. Другим преимуществом подхода основанного на моделировании является возможность более глубокого анализа процессов происходящих в молекулярной системе. Более того, в таких сложных системах, как биополимеры и их комплексы, а также наноструктуры, интерпретация результатов реальных экспериментов часто оказывается затруднительной без привлечения результатов численного моделирования. Одной из таких задач является, например, исследование структурно-функциональных взаимосвязей в белках, и в частности механизмов конформационной регуляции их активности. Наконец, подходы основанные на моделировании позволяют исследовать свойства еще не созданных, гипотетических био- и наноструктур, что может привести к созданию новых материалов и наноустройств.

Одним из широко применяемых подходов к моделированию молекулярных систем, знакомству с которым посвящен данный практикум, является молекулярно-механический подход. В основе этого подхода лежит представление об атомах, как о классических точечных взаимодействующих частицах. Взаимодействие между этими частицами описывается набором эмпирических потенциалов, именуемых «силовым полем». Наиболее часто применяемый для моделирования молекулярных систем метод состоит в расчете динамики молекулярно-механической системы в рамках классической механики, с последующим анализом полученных траекторий движения атомов. Такой подход обладает высокой информативностью, позволяя описывать большинство процессов, происходящих в молекулярной системе и не сопровождающихся разрывом/образованием ковалентных связей и изменением электронного состояния системы. Важным преимуществом молекулярно-механического моделирования является относительно низкая ресурсоемкость соответствующих вычислительных процедур, что позволяет рассчитывать динамику систем включающих сотни тысяч атомов на временах до десятков наносекунд.

В качестве объекта исследования в практикуме используются нанотрубки различного строения. Нанотрубки являются классическим нанообъектом и представляют интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения. Данный практикум посвящен исследованию механических свойств нанотрубок и их проницаемости для молекул воды.

Первой задачей, решаемой в рамках практикума, является исследование спектра нормальных колебаний изолированной нанотрубки. Данная задача призвана продемонстрировать то промежуточное положение между макрообъектами и молекулярными системами, которое занимают нанообъекты. Так, будучи одиночной молекулой, нанотрубка демонстрирует свойства присущие механическим макросистемам: в колебательном спектре отдельной нанотрубки присутствуют колебания, аналогичные колебаниям струны, деформации сжатия-растяжения и изгибной деформации упругой балки.

Следующая задача практикума состоит в определении модуля упругости сжатия отдельной нанотрубки. С этой целью выполняется расчет управляемой молекулярной динамики нанотрубки при действии на нее растягивающей силы до достижения системой состояния равновесия. По изменению длины нанотрубки и значению приложенной силы рассчитывается модуль Юнга. Также рассчитывается модуль упругости материала на основе нанотрубок с учетом плотности их упаковки. Результаты полученные на данном этапе демонстрируют более высокие прочностные характеристики нанотрубок по сравнению с известными конструкционными материалами.

Заключительная часть практикума посвящена моделированию латеральной проводимости нанотрубок для воды. С этой целью выполняется расчет молекулярной динамики нанотрубок в воде и вычисляются коэффициенты диффузии молекул воды в полости нанотрубки и в объеме воды. Результаты моделирования свидетельствуют о высокой проводимости нанотрубок для воды.

Способность нанотрубок к латеральной проводимости веществ считается практически важным свойством, которое может быть использовано для организации трансмембранной проницаемости липидных мембран, при решении ряда медико-биологических проблем.

Цель и задачи

Основной целью данного практикума является обучение студентов принципам создания молекулярно-механических моделей, подбору параметров проведения молекулярных расчетов, а также основным приемам моделирования молекулярных систем и обработки полученных массивов данных.

В ходе выполнения практикума студенты решают следующие задачи:

- Создание молекулярно-механических моделей углеродных нанотрубок различного строения.
- Оптимизация геометрии молекулярных моделей нанотрубок.
- Расчет и анализ спектра нормальных колебаний нанотрубок.
- Расчет модуля упругости нанотрубки при растяжении, с использованием метода управляемой молекулярной динамики.
- Расчет коэффициента диффузии воды внутри нанотрубки и в растворе с использованием метода молекулярной динамики.

Объекты и методы

В качестве объекта исследований в задаче используются углеродные нанотрубки различного строения. Моделирование осуществляется в рамках молекулярно-механического подхода. Для моделирования используется свободно распространяемый пакет программ GROMACS [<http://www.gromacs.org/>]. Для создания, редактирования и визуализации молекулярных систем используется программа PyMOL. Непосредственно для создания нанотрубок и визуализации нормальных колебаний используются программные модули PyMOL `ntgen.py` и `nmgen.py`, доступные на сайте <http://erg.biophys.msu.ru/>. В качестве среды для технических расчетов используется интерактивная командная среда IPython [<http://ipython.scipy.org/>], являющаяся интерфейсом интерпретатора языка Python [<http://www.python.org/>]. В сочетании с библиотеками численных алгоритмов SciPy [<http://www.scipy.org/>] и графики matplotlib [<http://matplotlib.sourceforge.net/>] данное ПО является мощным и удобным пакетом для численного анализа.

Ход задачи практикума.

Часть 1. Создание нанотрубок

В качестве объекта исследования в задаче предлагается использовать нанотрубки различного строения. Нанотрубку можно представить как прямоугольный фрагмент монослоя графита, свернутый в цилиндр (рис. 1). Строение нанотрубки определяется ориентацией сторон этого прямоугольника относительно векторов трансляционной симметрии монослоя графита (a_1 , a_2). Практически, строение нанотрубки задается парой индексов (n,m), определяющих одну из сторон этого прямоугольника (C_h) как линейную комбинацию векторов a_1 и a_2 : $C_h = n a_1 + m a_2$, при этом вектор перпендикулярный C_h оказывается параллелен оси получающегося при сворачивании цилиндра. В данной задаче предлагается использовать две нанотрубки: строения (10,0), условно называемая «зигзаг», и (6,6) - «кресло» (рис. 2). Данный выбор позволяет продемонстрировать существенное влияния строения нанотрубок на их механические и электрические свойства.

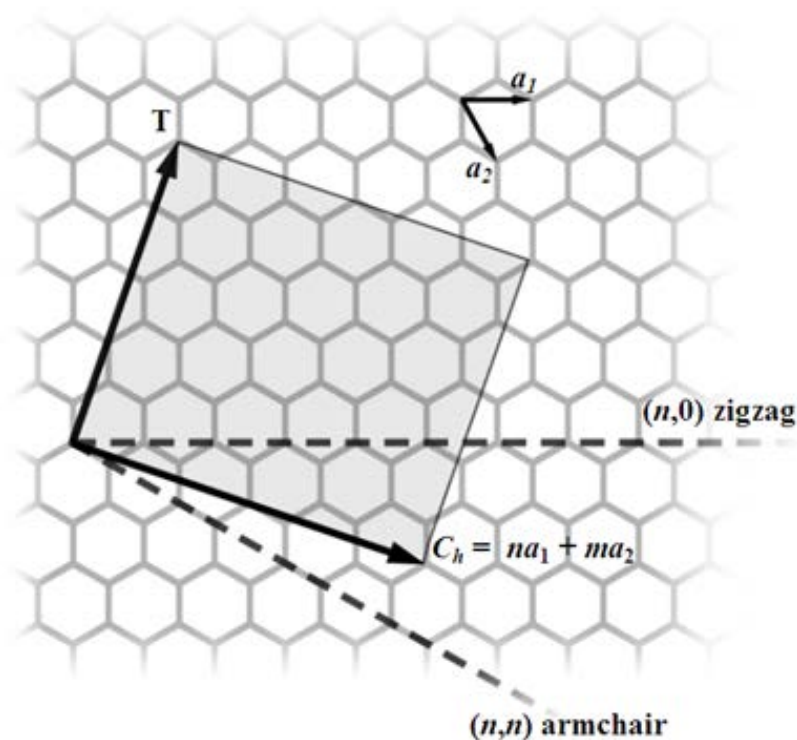


Рис. 1: Развертка нанотрубки на монослое графита. a_1 , a_2 — вектора трансляционной симметрии монослоя графита. C_h — сторона фрагмента монослоя графита, изгибающаяся при сворачивании цилиндра. Задана как линейная комбинация векторов трансляционной симметрии a_1 , a_2 с коэффициентами n и m . T — вектор направленный вдоль оси симметрии нанотрубки, и задающий ее длину.

Практически, генерация координат нанотрубок осуществляется при помощи специального программного модуля PyMOL. Для генерации координат следует запустить программу PyMOL и выполнить из ее командной строки следующие команды:

```
PyMOL > ntgen nt-10-0, 10, 0, 24, save=nt-10-0
```

PyMOL > ntgen nt-6-6, 6, 6, 20, save=nt-6-6

В результате будут сгенерированы объекты nt-10-0 и nt-6-6 с нанотрубками типа «зигзаг» и «кресло» соответственно (рис. 2). Также в текущей директории будут созданы соответствующие файлы со структурой нанотрубок (*.gro) и с их топологией (*.top) пригодные для дальнейшего

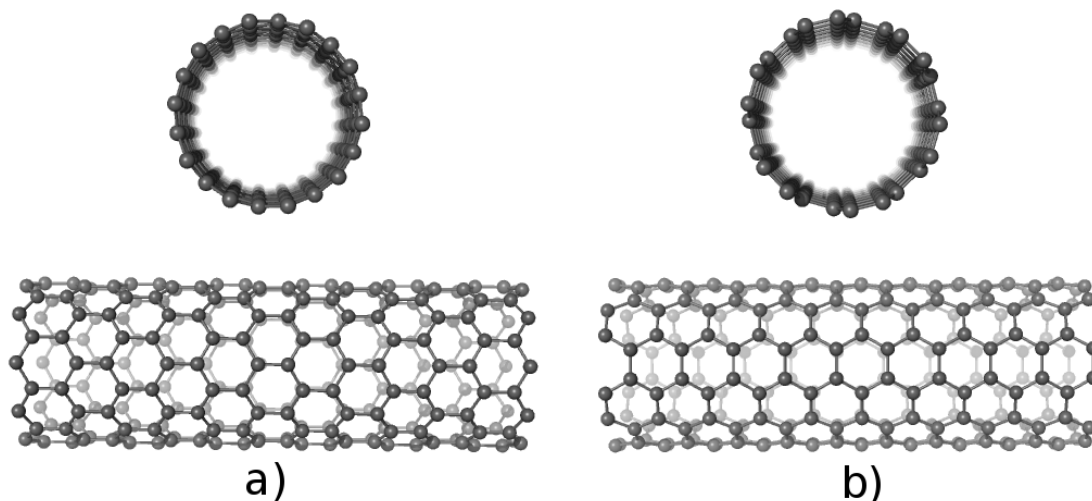


Рис. 2: Нанотрубки различного строения. Водороды на конца нанотрубок не показаны. а) Нанотрубка строения (10,0), «зигзаг». б) Нанотрубка строения (6,6), «кресло».

использования с пакетом GROMACS.

Дальнейшие манипуляции выполняются для каждой из полученных структур, а при их описании будет использовано единое обозначение *nt-N-M*, подразумевающее обе структуры.

Часть 2. Оптимизация геометрии системы

Чтобы перейти к расчетам молекулярной динамики, нам необходимо создать основной файл топологии (*.top). Он должен ссылаться на файлы молекулярных топологий (*.itp) и подключать таблицы силового поля (ff*.itp). Также файл должен содержать информацию о том, в каком количестве представлены в структуре молекулы и в каком порядке они идут. Файл составляется в текстовом редакторе и выглядит следующим образом:

```
#include "ffoplsaa.itp"
#include "nanotube.itp"

[ system ]
Your nanotube name
[ molecules ]
CNT 1
```

В последней строчке указывается, что в нашей системе имеется один остаток CNT.

Следующий этап - создание файлов молекулярно-динамических параметров (*.mdp), в которых содержатся все условия проведения МД-расчетов: один - для оптимизации геометрии (em.mdp), а второй - для расчета матрицы Гесса исследуемой нанотрубки (nm.mdp). Эти файлы студенты создают вручную, под руководством сотрудника, проводящего практикум. Ниже дан пример файла em.mdp с краткими комментариями, предназначенного для проведения оптимизации геометрии.

; em.mdp

```
cpp      =    /usr/bin/cpp    ;Препроцессор.
integrator    =    steep    ;Метод оптимизации геометрии.
nsteps      =    100000 ; Кол-во шагов интегрирования.
emtol       =    100      ; Порог энергии.
emstep      =    0.001    ; Величина шага по энергии.
nstcomm     =    1        ; Частота удаления движения ЦМ.
comm_mode   =    linear   ; Способ удаления движений ЦМ.
ns_type     =    grid     ; Способ поиска соседей.
nstlist     =    1        ; Частота обновления списка соседей
rlist       =    1.25     ;Радиус обрезания списка соседей.
coulombtype  =    pme      ;Способ расчета электростатики.
fourierspacing = 0.12     ; Амплитуда функций в Фурье преобр.
pme_order   =    4        ; Порядок интерполяции.
ewald_rtol   =    1e-5    ;Точность расчета электростатики.
ewald_geometry = 3d       ; Размерность пространства.
optimize_fft =    yes     ;Оптимизация fft.
rcoulomb     =    1.25     ;Радиус обрезания электростатики.
vdwtype      =    switch   ;Способ описания VdW взаимодействий.
rvdw        =    1.15     ;Радиус обрезания VdW
rvdw_switch  =    1.0      ; Радиус переключения режимов VdW
pbc         =    xyz      ; Периодические граничные условия.
nstxout     =    10       ;Частота вывода координат.
nstlog      =    10       ; Частота вывода записей в лог-файл.
nstenergy   =    10       ;Частота вывода энергий.
```

Затем проводится оптимизация геометрии построенных на первом этапе структур в вакууме. Все расчеты GROMACS запускаются в 2 этапа: сбор всей информации по расчету в один

бинарный файл при помощи утилиты grompp и собственно численное моделирование программой mdrun. На первом этапе создается полностью самостоятельный бинарный файл, который необходим и достаточен для запуска расчета filename.tpr. Программа mdrun работает, получая на вход только этот файл. Запуск команды производится следующим образом:

```
$ grompp -f em.mdp -c *.gro -p *.top -o em.tpr
```

Программа mdrun дает на выходе от 4 различных файлов: лог расчета (mdrun.log), бинарный файл макроскопических характеристик системы (ener.edr), бинарный файл координат, скоростей и сил всех атомов системы (traj.trr), файл с состоянием структуры на последний момент расчета (confout.gro). Для того, чтобы не задавать имена каждому файлу используется директива -deffnm.

```
$ mdrun -s em.tpr -deffnm common_filename
```

Следует обратить внимание на тот факт, что конечная структура confout.gro имеет исключительно декоративный смысл, потому как не может быть использована в дальнейших расчетах из-за низкой точности. Конечное состояние системы с наивысшей точностью записано только внутри файла traj.trr и именно он должен использоваться для дальнейших запусков. Это имеет большое значение для корректного расчета Гессiana системы, необходимого для анализа нормальных колебаний системы.

Часть 3. Расчет нормальных колебаний

Для расчета матрицы Гесса также используется утилита mdrun, на вход ей необходимо подать траекторию, полученную в ходе оптимизации:

```
$ grompp -f nm.mdp -c *.gro -t enmin.trr -p *.top -o nm.tpr
```

Файл nm.mdp должен отличаться от предыдущего файла параметров только значением integrator = nm.

```
$ mdrun -s nm.tpr -deffnm hessename
```

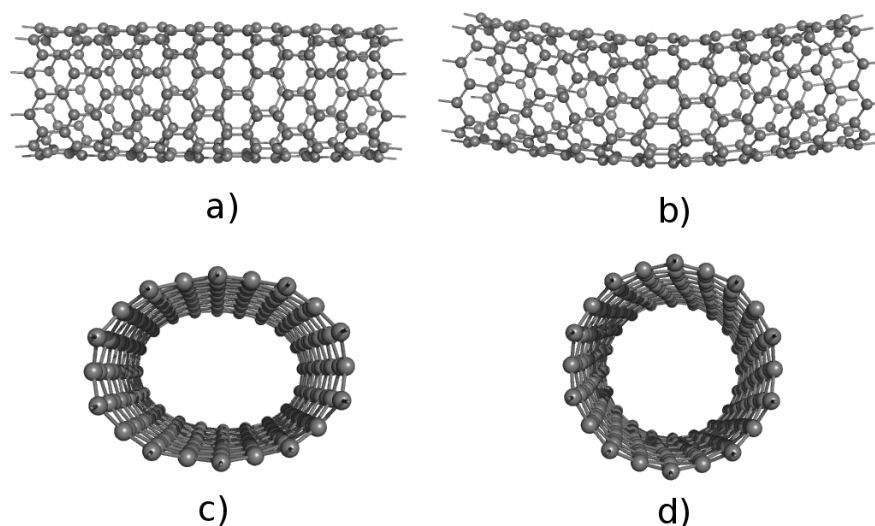


Рис. 3: Примеры нормальных колебаний нанотрубки. Для наглядности амплитуды сильно преувеличены.

Полученный на выходе Гессиан (файл `hessename.mtx`) представляет из себя матрицу гессе в бинарном виде, ее необходимо передать модулю `nmgen` программы `pyMol`. Программа рассчитывает частоты и вектора нормальных колебаний, а также позволяет визуализировать интересующие нормальные моды и непосредственно наблюдать за смещениями вовлеченных в эти колебания атомов. Пример такой визуализации представлен на рис.2.

Для запуска `nmgen` необходимо выполнить из командной строки `PyMOL` следующую команду:

```
PyMOL> nmgen name, id, mtx=hessename.mtx, amp=n
```

где `name` - имя нанотрубки, для которой рассчитывается визуализация колебания, `id` - номер этого колебания, `n` - амплитуда смещения атомов, `hessename.mtx` – соответствующий выходной файл. Необходимо отыскать среди низкочастотных нормальных колебаний, колебания соответствующие деформации нанотрубки как целого, выписать их частоты и описать эти колебания. Следует обратить внимание на то, как меняются частоты нормальных колебаний при изменении числа вовлеченных в них атомов, а также при изменении кратности (числа минимумов и максимумов) однотипных колебаний, например, деформации сжатия-растяжения нанотрубки.

Часть 4. Расчет модуля упругости углеродной нанотрубки

Вычисление модуля упругости (модуля Юнга) производится методом управляемой молекулярной динамики, при котором на краевые атомы нанотрубки действует некоторая внешняя сила, при помощи которой моделируется ее растяжение (Рис.4).



Рис. 4: Растяжение нанотрубки под действием внешней силы. Расчеты проводились методом управляемой молекулярной динамики.

Расчет модуля Юнга (Е) выполняется из выражения, связывающего давление (Р) на нанотрубку и ее относительное удлинение:

$$\begin{aligned} P &= E \frac{\Delta L}{L} \\ P &= \frac{F}{S} \end{aligned} \quad (1)$$

в свою очередь давление на нанотрубку может быть вычислено из прикладываемой к ней силы и площади поперечного сечения.

Расчет модуля Юнга с помощью МД под действием внешней силы происходит по следующей схеме:

7. Термостатирование системы в отсутствии внешней силы (200 пс).
8. Термостатирование системы с приложенной внешней силой (200 пс).
9. Визуальная проверка расчетов на корректность.
10. Получение средних значений удлинения и энергии.

Необходимо создать два файла молекулярно-динамических параметров, один из которых предназначен для расчетов управляемой молекулярной динамики (force.mdp), а второй - для проведения термостатирования (md.mdp). Файл параметров для расчетов динамики существенно отличается от предыдущих, поэтому рассмотрим его здесь подробнее.

```

cpp          = /usr/bin/cpp
integrator    = sd — интегратор молекулярной динамики
dt            = 0.0007 — шаг интегрирования ур-й движения (пс)
nsteps        = 100000000 — кол-во шагов
nstcomm       = 10
comm_mode     = Linear
  
```

```
ld_seed      = 12173 — инициализатор случайных чисел
nstxout      = 2000 — частота записи координат
nstlog       = 500 — частота записи в log-файл
nstenergy    = 5000 — частота записи в бинарный файл энергий
energygrps   = system
nstlist      = 10
ns_type      = grid
```

; это параметры вычисления энергии — скопируйте их из предыдущего mdp-файла

```
pbc          = *
rlist        = *
coulombtype   = *
fourierspacing = *
pme_order    = *
ewald_rtol    = *
ewald_geometry = *
optimize_fft  = *
rcoulomb      = *
vdwtype       = *
rvdw          = *
rvdw_switch   = *
```

; настройки термостата и баростата

```
tcoupl       = berendsen ; тип баростата
tc_grps      = system
tau_t        = 0.1 ; частота срабатывания баростата
ref_t        = 280 ; температура
pcoupl       = berendsen
pcoupltype   = no ;
gen_vel      = yes
gen_temp     = 280 ; начальная температура
gen_seed     = 15000
; ускорение (только для force.mdp)
acc_grps     = ltail htail
accelerate    = 0 0 -5 0 0 +5
```

Запуск расчетов происходит по той же схеме:

```
$ grompp -f force.mdp -c *.gro -p *.top -o force.tpr -n *.ndx
```

```
$ mdrun -s force.tpr -deffnm force
```

```
$ grompp -f md.mdp -c *.gro -p *.top -o md.tpr
```

```
$ mdrun -s md.tpr -deffnm md
```

Обратите внимание на то, что для подготовки одного из tpr-файлов необходим файл NDX. Как его составить, смотрите ниже. На выходе получаются траектория (*.trr) - файл, в котором содержатся координаты всех атомов системы во все моменты времени и энергетический файл (*.edr).

По окончании молекулярно-динамических расчетов можно приступить к обработке полученных данных и расчету модуля Юнга. Для этого на первом этапе необходимо рассчитать

изменение длины и потенциальной энергии нанотрубки в релаксированном и растянутом состоянии.

Для этого используются соответствующие утилиты пакета GROMACS: `g_traj` и `g_energy`. Синтаксис `g_traj` следующий:

```
$ g_traj -f *.trr -s *.tpr -n *.ndx -ox coord.xvg -com -ng 2 -nox -noy
```

[`-com`] означает, что будут выведены координаты центра масс группы, [`-ng 2`] означает, что будут обрабатываться 2 группы атомов, а ключи [`-nox/-noy`] означают, что координаты X и Y выводиться не будут. Для того, чтобы указать утилите `g_traj` координаты каких именно атомов необходимо извлечь из траектории используется индекс-файл (*.ndx), который создается программой `make_ndx` и далее редактируется вручную с использованием пакета PyMOL. Для генерации начального индекса, запустите следующую команду:

```
$ make_ndx -f file.gro -o indexname.ndx
```

В полученный NDX-файл необходимо добавить две группы атомов: верхнее углеродное кольцо и нижнее. Синтаксис следующий:

```
[htail]
1 2 3 4 5 6 7 8
[ltail]
467 456 778 346 758
```

Здесь `htail` и `ltail` — название групп, а номера — это абсолютные номера атомов, входящих в группу. `htail` — группа концевых углеродов лежащая «вверху» по оси Z, `ltail` — то же, но с другой стороны нанотрубки.

Синтаксис команды `g_energy` следующий:

```
$ g_energy -f *.edr -s *.edr -o ener.edr
```

При просьбе выбрать поля из таблице, необходимо выбрать полную потенциальную и кинетическую энергии.

Следующий этап работы: вычисление модуля Юнга на основе имеющихся таблиц энергий и координат. Вычисления производятся в среде для технических расчетов IPython. Для загрузки XVG-файла в массив используется функция `load`:

```
> a = loadtxt('file.xvg')
```

Для вычисления среднего значения массива — функция `mean`:

```
> eav = mean(a[:,3])
```

Для визуализации массива — функция plot:

```
> plot(a[:,0], a[:,1])
```

Вычисления модуля Юнга производятся согласно формуле (1) двумя способами. В одном случае в качестве силы F подставляется масса одного углеродного кольца, умноженного на ускорение, заданное в mdr-файле. Во втором случае в качестве F подставляется разница средних значений потенциальной энергии системы, деленная на среднее удлинение по оси Z .

Обратите внимание, что в обоих случаях необходимо брать среднее значение энергии и удлинения для равновесной области. Итерация, начиная с которой систему можно считать равновесной определяется качественно по графику энергии (см. Рис. 5).

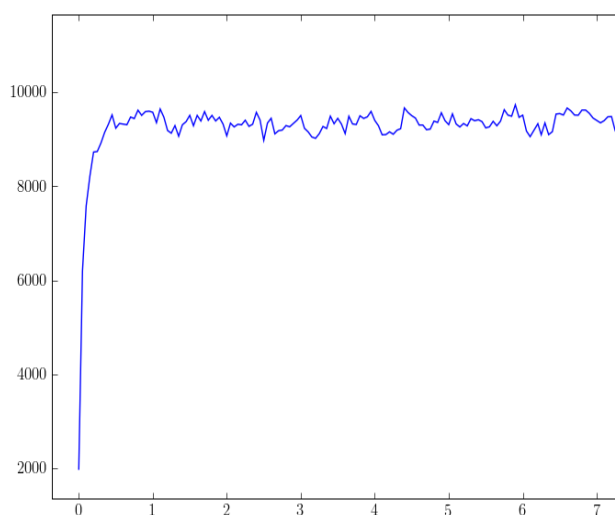


Рис. 5: Динамика изменения потенциальной энергии нанотрубки при приложении к ней растягивающей силы.

Для вычислений необходимо учитывать размерности физических единиц, принятые в GROMACS:

- 17) Энергия — кДж/моль
- 18) Ускорение — нм/пс²
- 19) Расстояние — нм
- 20) Время — пс

Часть 3. Скорость диффузии воды в углеродной нанотрубке

Для выполнения этой части работы необходимо сначала добавить в систему воду. Эту операция выполняется при помощи утилиты `gen_box`:

```
$ gen_box -sp *.gro -cs tip4p.gro -o *.gro
```

Для модели воды используется модель `tip4p`, в которую добавлена четвертая виртуальная частица, описывающая неподеленную электронную пару атома кислорода, что необходимо для корректного образования водородных связей в системе.

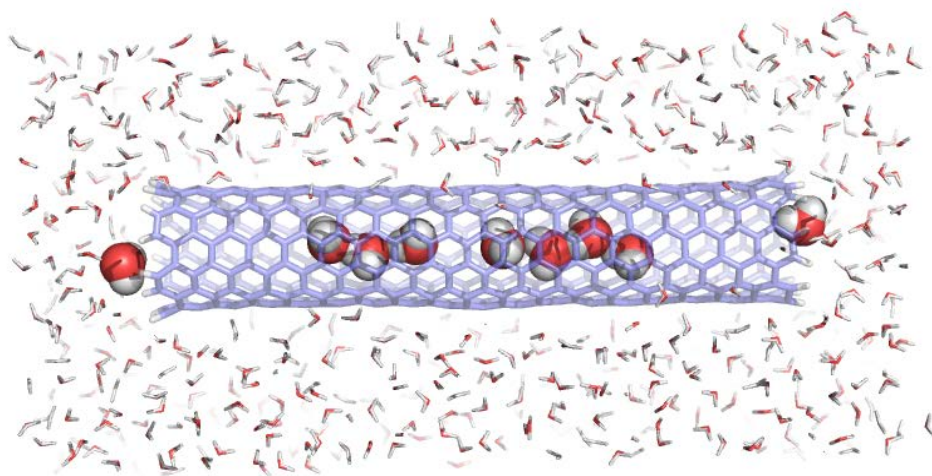


Рис. 6: Цепочки связанных друг с другом водородными связями молекул воды внутри нанотрубки.

Файл молекулярно-динамических параметров подготавливается по уже известной схеме.

Файлы TOP необходимо модифицировать в связи с добавлением в систему воды, а именно добавить строчку 'SOL 256' в TOP-файл. После окончания молекулярно-динамических расчетов необходимо извлечь из полученной траектории координаты молекул воды, которые необходимы для расчета коэффициента диффузии. Для этого используется утилита `g_traj`. Соответственно, ей необходимо передать номера атомов интересующих молекул воды, что делается при помощи соответствующего индекс-файла (*.ndx). Создание индекс-файла уже обсуждалось ранее. В данном случае необходимо внести группу молекул воды, находящихся внутри нанотрубки.

Затем из траектории извлекаются координаты атомов интересующих молекул воды:

```
$ g_traj -f *.trr -s *.tpr -n *.ndx -ox coord.svg -mol
```

, где ключ `[-mol]` указывает на то, что будут выписаны не координаты атомов, а координаты центров масс молекул.

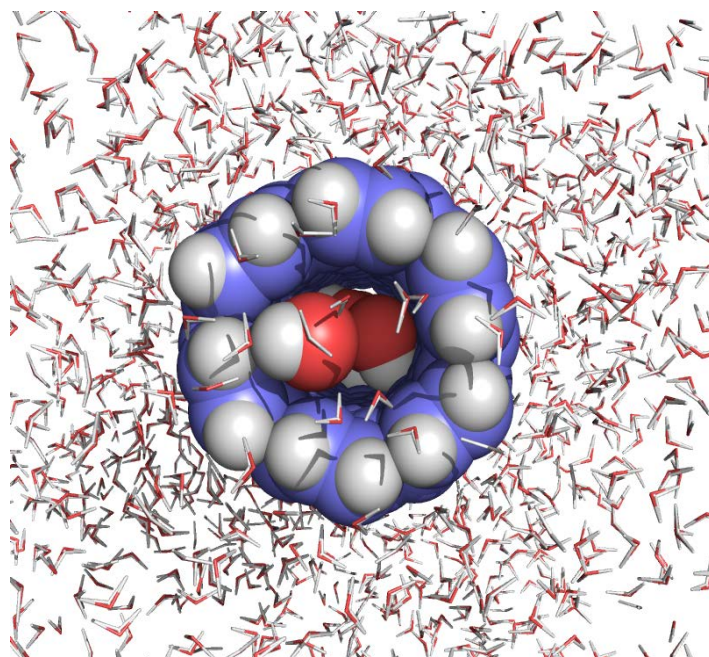


Рис. 7: Молекулы воды внутри нанотрубки. Хорошо видно, что молекулы воды располагаются внутри нанотрубки в весьма ограниченном объеме.

Обработка полученных данных производится также в среде IPython. Написать программу необходимо самостоятельно, руководствуясь формулой:

$$D = \frac{\langle |X(t) - X(0)|^2 \rangle}{2nt},$$

где D – коэффициент диффузии, $X(t)$ — радиус-вектор положения молекулы в момент t , n – размерность пространства. Параметр n будет отличаться для молекул воды в объемной фазе и внутри нанотрубки.

Требования к отчету

В конце практикума студенты готовят письменный отчет по задаче. Отчет должен включать следующие разделы:

19. Введение, включающее краткую характеристику метода молекулярной динамики, а также характеристика объекта исследования - нанотрубок, их структуры, свойств и возможных путей их практического использования.
20. Цель и основные задачи данного практикума.
21. Описание хода выполнения задачи, состоящее из трех частей, посвященных трем

разделам задачи. Каждая часть должна начинаться с постановки задачи и краткого описания используемых для ее решения подходов. Затем должно следовать собственно описание хода работы, снабженное промежуточными числовыми результатами и иллюстрациями. В заключении приводятся финальные результаты моделирования, со всеми необходимыми выкладками, сравниваются и интерпретируются результаты моделирования для нанотрубок различного строения.

22. Заключение, в котором кратко формулируются полученные результаты и дается сравнительная характеристика нанотрубок различного строения.

Контрольные вопросы

- Сколько атомов содержит минимальная кристаллографическая ячейка монослоя графита? Пояснить на схеме.
- Каковы типичные размеры (радиус, длина) нанотрубки?
- Рассчитать погрешности в определении равновесной длины связи в двухатомной молекуле и ее потенциальной энергии, при оптимизации с пороговым значением градиента энергии $10 \text{ кДж моль}^{-1} \text{ нм}^{-1}$. Потенциальная энергия системы задана, как $U = k (R_{AB} - R_0)^2 / 2$.
- Справедливы ли результаты гармонического анализа для системы **не** находящейся в потенциальном минимуме поверхности потенциальной энергии? Пояснить на примере одномерного потенциала.
- Найти частоты и вектора нормальных колебаний одномерной системы состоящей из двух частиц массой m_1 и m_2 , если потенциальная энергия данной системы задана как $U = k_1 (x_1 - x_2)^2 / 2$.
- Что такое шаг интегрирования и радиус обрезания в методе молекулярной динамики? Чем важны эти параметры?
- Что такое периодические граничные условия в методе молекулярной динамики, для чего они используются?
- В чем состоит метод управляемой молекулярной динамики?
- Что такое модуль упругости? Какие существуют методы расчета коэффициента упругости на основании данных молекулярной динамики?
- Что такое коэффициент диффузии? Какие микроскопические характеристики молекулярной системы его определяют?
- Почему коэффициент диффузии воды внутри нанотрубки выше, чем коэффициент диффузии воды в объемной фазе?

Рекомендуемая литература

- Сивухин Д.В. *Общая физика*. Москва. Наука. 1974.
- Тихонов А.Н., Самарский А.А. *Уравнения математической физики*. Москва. Наука. 1972.
- David van der Spoel, Lindahl E., Hess B., et al. *GROMACS User Manual*. Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands. 1991-2000.
- **Suzuki K. On Elastic Properties of Single-walled Carbon Nanotubes as Composite Reinforcing Fillers. J. Comp. Mat. 41(9):1123-1135. 2007.**
- ChenXin F.U., YunFei C., JiWei J. *Molecular dynamics simulation of the test of single-walled carbon nanotubes under tensile loading*. Sci China Ser E-Tech Sci. 50(1):1-17. 2007.
- Garde A.S., Hummer G. *Osmotic water transport through carbon nanotube membranes*. PNAS, 100(18):10175-10180. 2003.
- **Walthery J.H., Jaz R., Halicioglu T., Koumoutsakos P. Molecular dynamics simulations of carbon nanotubes in water. Center for Turbulence Research Proceedings of the Summer Program 2000**

« Изучение токсичности наноматериалов с использованием флуоресценции микроводорослей», Осипов В.А

Введение

Большинство веществ, входящих в состав промышленных и бытовых стоков, способны оказывать токсическое действие на микроводоросли. В связи с этим водорослевые биотесты входят в число основных при нормировании качества вод: «Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов», Минприроды РФ, 2002; «Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) » / Ю.С. Григорьев // ПНД Ф Т 14,1:2:4,10-04, М.2004; «Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. » ФР.1.39.2007.03223. / Н.С.Жмур, Т.Л. Орлова // М., «Акварос»2007.

В современной практике широко используются стандартизированные методы биотестирования на пресноводных зеленых микроводорослях рода *Chlorella* и *Scenedesmus*, культивируемых по общепринятой методике. Основными показателями токсического действия служат рост и выживаемость культуры. Между тем оценка токсичности вод и в особенности питьевой воды по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции является чрезвычайно актуальна. Флуориметры позволяют регистрировать параметры флуоресценции хлорофилла культур водорослей для быстрого обнаружения в водной среде токсических веществ. Преимущества использования флуоресценции связаны с быстротой (2 мин), низкой трудоемкостью процесса измерения, а так же с ее высокой чувствительностью к действию токсикантов, поскольку она отражает состояние фотосинтетического аппарата водорослей, являющегося мишенью для многих веществ. Регистрация на свету первичных изменений фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительного к повреждающим воздействиям, позволяет сократить время инкубации до 1-3 часов, по сравнению с 1-10 сутками при оценке токсичности по снижению скорости роста. Испытания метода на ряде модельных токсикантов (ионы Cu, Hg, Cd, Cr, Zn, гербициды и др.) показали, что чувствительность его находится на уровне ПДК для этих веществ. С использованием этого метода возможно проведение исследования детоксицирующих свойств гуминовых веществ различного генезиса по отношению к тяжелым металлам, гербицидам и ПАУ. Методика выполнения измерений обеспечивает выполнение измерений с низкой погрешностью. Учитывая кратковременность экспериментов и предусмотренную методикой возможность жесткого контроля за условиями проведения опытов, разброс измеряемых параметров в повторях относительно низкий.

Материалы нанотехнологии уже сегодня получили широкое применение в производстве товаров широкого потребления, технике и медицине. На сегодняшний день насчитывается более 2300 видов продукции с применением наноматериалов и мировое производство интенсивно растет. Наноматериалы используются в производстве пластиков, катализаторов, аккумуляторов и электродов топливных элементов, систем очистки воды, ортопедических имплантов, проводящих покрытий и компонентов электроники. Увеличение производства приведет к увеличению их выброса в окружающую среду. При этом наночастицы и наноматериалы обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий.

Поэтому, чрезвычайно важным является оценка экологических последствий их влияния на экосистемы. Это отражено в специальных постановлениях, утвержденных Гл.санврачем РФ -«Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека.» МР 1.2.2522-09, М., 2009 г. ; «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов. Методические указания» МУ 1.2.2520-09 М., 2009 г.

Применение флуоресценции водорослей в качестве биосенсоров, по-видимому, может быть с успехом использовано для тестирования наноматериалов. В последнее время появилось несколько работ по влиянию наночастиц на водоросли. Многие наночастицы делаются с содержанием различных металлов, в том числе и тяжелых металлов. Соли тяжелых металлов занимают особое положение среди загрязнений внешней среды, что связано с их высокой токсичностью, способностью накапливаться в организмах и передаваться по трофической цепи. Тяжелые металлы, попадая в водоемы, оказывают токсическое действие на фитопланктон, который является первичным звеном в системе пищевых связей водных организмов и определяет состояние водной экосистемы в целом. Среди метаболических процессов внутри растительной клетки наиболее чувствительным к действию тяжелых металлов является фотосинтез. Исследования показывают, что по флуоресценции водорослей возможно обнаруживать разные токсичные загрязнители и, особенно, соли тяжелых металлов, при достаточно низких концентрациях. Соответственно, этот подход, может быть легко использован для наноматериалов, содержащих металлы.

Цель данной задачи – освоение методов флуоресцентного анализа на примере исследования токсического действия наноматериалов (наночастиц серебра) на

микроводоросли с использованием метода регистрации световых и индукционных параметров флуоресценции хлорофилла.

Объекты исследования: В экспериментах используются культуры пресноводных одноклеточных зеленых водорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Chlamydomonas reinhardtii*.

Методы: флуоресцентные методы анализа состояния фотосинтетических организмов (световые кривые и индукционные кривые флуоресценции (**JIP-тест**)).

План работы:

- 1) Установка рабочей концентрации водорослей в суспензии по сигналу Ft для работы в оптимальном диапазоне чувствительности приборов. Определение отношения Fv/Fm для контрольного образца для подтверждения его высокой фотосинтетической активности.
- 2) Разлить суспензию водорослей в колбы объемом 50 мл. Одну колбу оставить в качестве контрольного образца. В другие колбы добавить исследуемые наночастицы в нужных концентрациях.
- 3) Провести инкубацию водорослей с наноматериалами в камере для культивирования и измерить параметры флуоресценции через 1, 4, 8 часов и сутки.
- 4) Записать данные и напечатать черновые рисунки по световым и индукционным кривым с программ для приборов.
- 5) Построить графики по световым зависимостям параметров флуоресценции (Ft, Fm', Yield, qN, NPQ, rETR) и рассчитать параметры световой кривой относительной скорости нециклического электронного транспорта (коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световых кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи (rETR_{max}) и насыщающую интенсивность света (E_n).
- 6) Построить и рассчитать параметры индукционных кривых флуоресценции (расчет по JIP-тесту).
- 7) Применение различных программных пакетов для обработки полученных результатов.
- 8) Выводы по проделанной работе;

Предполагаемые результаты

- Освоение методики приготовления различных концентраций наночастиц серебра, также медицинского препарата «Аргоника», содержащего коллоидное серебро;
- Освоение методов регистрации параметров флуоресценции микроводорослей на предложенных приборах;
- Анализ быстрых световых и индукционных кривых флуоресценции водорослей и выявление наиболее информативных показателей;
- Приобретение навыков проведения экспериментов по биотестированию для характеристики токсичности современных наноматериалов;
- Результаты, полученные по параметрам флуоресценции продемонстрируют изменения метаболических процессов внутри растительной клетки при действии наночастиц. Задача может ознакомить нанотехнологов, биофизиков, биологов, химиков, гидробиологов и экологов с подходами по оценке токсического действия наноматериалов (на примере наночастиц серебра) на микроводоросли.

Оценка итогов проведенного практикума

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

9. Краткое теоретическое введение с описанием исследуемого объекта и указанием преимуществ быстрых флуоресцентных параметров для исследования объекта;
10. Четко сформулированные цели и задачи исследования;
11. Описание основных методов исследования;
12. Корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и обсуждение полученных результатов;
13. Четкие выводы по полученным результатам;
14. Список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами устную беседу, в ходе которой студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

Организация задачи практикума

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством одного преподавателя и выполняет отдельное исследование, которое может производиться как независимо, так и в рамках цикла задач. Местом проведения являются лаборатории кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

В ходе выполнения работы используется следующее оборудование:

- 21) Импульсно модулированный флуориметр Water-PAM фирмы Walz, Effeltrich, Germany.
- 22) Aqua-Pen флуориметр – фирмы Photon Systems Instruments, Czech Republic.
- 23) Шейкер S-3.08-M платформа 347 x 235 мм, до 300 об/мин, движение орбитальное, электронный.
- 24) Центрифуга CM 6M производства фирмы Elmi.
- 25) Колбы конические 10 штук – 50 мл;
- 26) Дозаторы пипеточные - на 1 мл, 200 мкл, 10 мкл;
- 27) Климатическая камера для выращивания и инкубирования водорослей с исследуемым препаратом (автоматическое поддержание температуры и светового режима).

Описание задачи

Природа флуоресценции хлорофилла «a» в фотосинтетических мембранах растений и водорослей

Основой флуоресцентных методов является то, что хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей. Энергия кванта света, поглощенного светособирающим комплексом, может быть превращена в энергию разделенных зарядов, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или за счет рассеяния в тепло.

Существует два наиболее вероятных для молекулы хлорофилла синглетных возбужденных уровней: более высокий (S_2^*) при поглощении синего и более низкий (S_1^*) при поглощении красного света (Рис.1). Это определяет наличие в спектре поглощения хлорофилла двух главных пиков, синего и красного максимума. При этом при поглощении кванта синего света электрон попав на более высокий энергетический уровень, тотчас же падает обратно на «красную» орбиту.

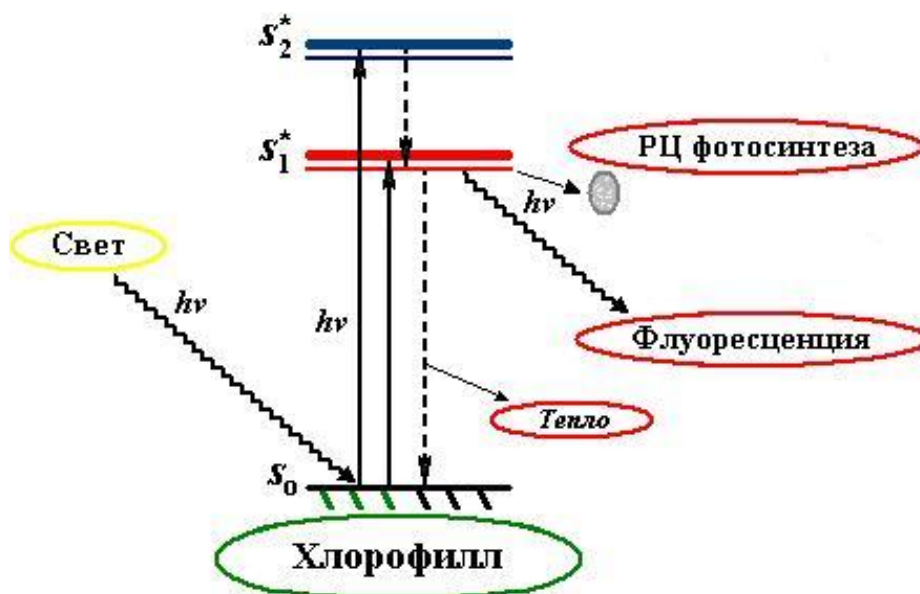


Рис. 1. Электронные переходы молекулы хлорофилла при поглощении квантов света. Прерывистые стрелки - безызлучательные переходы. Красная и синяя горизонтальные линии соответствуют поглощению квантов света в красной и синей области спектра.

Одним из путей дезактивации возбуждения (перехода молекулы из состояния S^*_1 в основное состояние) наряду с тепловой диссипацией и использованием при фотосинтезе является испускание квантов красного света, называемое флуоресценцией. Флуоресценция испускается при переходе молекулы из возбужденного синглетного состояния в основное. Время жизни флуоресценции для большинства органических молекул, в том числе и для хлорофилла, лежит в пределах от 10^{-9} до 10^{-6} с.

Реакционный центр ФС2 состоит из специальной молекулы хлорофилла P680, которая в возбужденном состоянии является первичным донором электрона для хинонного акцептора Qa. Восстановление $P680^+$ происходит очень быстро, менее чем за 1 мкс, а скорость окисления Qa^- значительно меньше и лимитируется темновыми реакциями. Состояние реакционного центра ФС2 в котором P680 восстановлен и Qa окислен, называется открытым. Через время порядка 1 мкс после разделения зарядов и появления первичной пары $P680^+ Qa^-$ происходит восстановление $P680^+$ от вторичных доноров. В результате РЦ оказывается в состоянии $P680Qa^-$, которое называется закрытым (Рис.2). Энергия кванта света, поглощенного в ФС2, может быть превращена в энергию разделенных зарядов $P680^+ Qa^-$, которая используется в дальнейших реакциях фотосинтеза, либо потеряна путем излучения кванта флуоресценции или рассеяния в тепло. Эти три процесса характеризуются константами скорости K_p , K_f и K_d , соответственно (Рис.2).

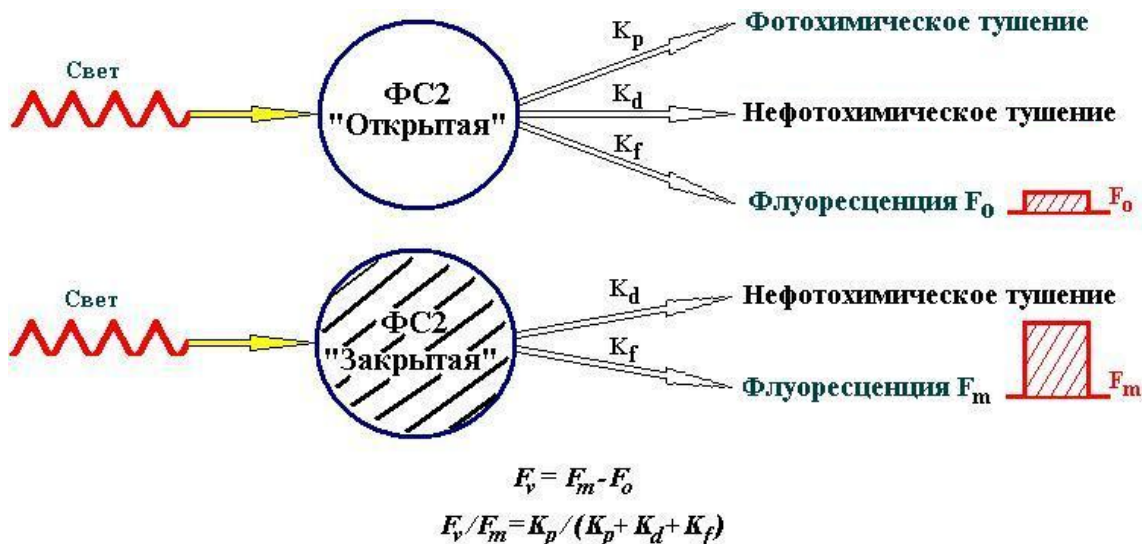


Рис. 2. Схема изменения эффективности использования световой энергии при открытых и закрытых реакционных центрах фотосистемы 2. При открытых РЦ ФС2 энергия поглощенных квантов света используется в фотосинтезе (K_p), рассеивается в тепло (K_d) и испускается в виде флуоресценции (K_f), выход флуоресценции низкий (F_0). При закрытых РЦ ФС2 энергия не используется в фотосинтезе ($K_p=0$), а расходуется в нефотохимическое тушение (K_d) и во флуоресценцию (K_f), выход флуоресценции максимальный (F_m).

При открытом состоянии реакционных центров эффективность использования энергии возбуждения в фотосинтезе высока, вероятность потери энергии минимальна и квантовый выход флуоресценции, ($F_o = K_f / (K_p + K_f + K_d)$), минимален и составляет около 2%. Снижение выхода флуоресценции хлорофилла в результате использования энергии света в первичных реакциях фотосинтеза называют фотохимическим тушением флуоресценции хлорофилла. При закрытых реакционных центрах фотохимическое разделение зарядов становится невозможным, и квантовый выход флуоресценции возрастает до $F_m = K_f / (K_f + K_d)$ и составляет около 5%. Разность между максимальным и минимальным выходом флуоресценции $F_v = F_m - F_o$ называется переменной флуоресценцией. Эта величина пропорциональна той части энергии света, которая не используется в фотохимических реакциях фотосинтеза и теряется в виде флуоресценции и тепла при закрытых реакционных центрах. Из приведенных выше соотношений связи значений выхода флуоресценции при открытых и закрытых реакционных центрах следует одно из важнейших соотношений $F_v / F_m = K_p / (K_p + K_f + K_d)$, т.е. отношение интенсивностей переменной и максимальной флуоресценции (относительный выход переменной флуоресценции) равно квантовому выходу использования энергии света открытыми реакционными центрами ФС2. По изменению этой величины можно судить об эффективности основного фотосинтетического запаса энергии электронного возбуждения Р680 в различных условиях. У водорослей в оптимальных условиях F_v / F_m близко к 0.7, а при действии токсикантов - уменьшается. У мертвых водорослей $F_v / F_m = 0$. В настоящее время этот параметр флуоресценции как показатель состояния и эффективности функционирования фотосинтетического аппарата широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях

Уровень постоянной флуоресценции F_o с высоким коэффициентом корреляции соответствует суммарному содержанию пигментов фотосинтетического аппарата фитопланктона, осуществляющих сбор энергии и, соответственно, также коррелирует с биомассой клеток водорослей. Поэтому он может быть использован для оценки ростовых процессов культур клеток.

Важным преимуществом флуоресцентных методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние клеток микроводорослей под действием токсикантов непосредственно в среде их обитания *in situ* в режиме реального времени. Оперативность измерений показателей флуоресценции имеет особое значение для раннего обнаружения появления поллютантов в среде.

На кафедре биофизики биологического факультета МГУ разрабатываются методы и аппаратура для регистрации параметров быстрой флуоресценции флуоресценции хлорофилла на культурах микроводорослей и природном фитопланктоне непосредственно в среде его обитания *in situ*. В частности создан погружной зонд-флуориметр, позволяющий оценивать состояние фитопланктона в водоеме по глубине и по акватории и тем самым выявлять места антропогенных воздействий.

В данной задаче предлагается провести сравнительное исследование световых зависимостей и индукционных кривых параметров флуоресценции при действии различных концентраций наносеребра в разных формах у зеленых пресноводных водорослей.

Материалы и методы

В эксперименте используются культуры пресноводных одноклеточных зеленых водорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Chlamydomonas reinhardtii*. Культивирование проводится в накопительном режиме при температуре 25⁰С и периодическом освещении интенсивностью 30 мкЕ/(м²с) люминесцентными лампами дневного света. Продолжительность светового периода составляет 14 ч, темнового 10 ч. Культуру водоросли *Chlorella pyrenoidosa* выращивают на среде Успенского. Культуру зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* выращивают фототрофно на трис-ацетат-фосфатной среде. Водоросли экспонируют от нескольких часов до нескольких суток при разных концентрациях исследуемых наноматериалов в тех условиях, что и при выращивании культуры с орбитальным перемешиванием с использованием шейкера.

Препарат

В опытах будет использоваться препарат наночастиц серебра [Ag]. Размер частиц в водных растворах варьируют в нем в пределах от 10 до 200 нм, со средней величиной частиц 40 нм. В настоящем исследовании предполагается выяснение воздействия частиц серебра, в рекомендованном для медицины препарате «Аргоника». Согласно инструкции по применению препарата в его состав входят вода, серебро, хитозан. «Аргоника» представляет собой коллоидный раствор высокодисперсного кластерного серебра, размеры частиц 2,0-4,0 нм. Модифицированный хитозан по инструкции синергически усиливает действие серебра. Для сравнения предлагается использовать химический препарат нитрата серебра (AgNO₃).

Серебро, а в последние годы – особенно наносеребро, применяется в медицине для лечения ран, язв, для стерилизации и увеличения сроков хранения лекарственных препаратов, в стоматологии, а также в биологии. При работе с антибиотиками установлено, что спектр их действий узок, а патогенные микроорганизмы слишком быстро к ним адаптируются. Поэтому в последнее время уделяется пристальное внимание хорошо проверенным средствам терапии с участием серебра. Серебро проявляет высокую бактерицидную активность как по отношению к аэробным и анаэробным микроорганизмам (в том числе и антибиотикорезистентным штаммам), так и к некоторым вирусам и грибам. Препараты, содержащие серебро, активны против многих возбудителей

раневых инфекций (*Staphylococcus spp.*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*). При этом нужно принимать во внимание тот факт, что резистентность микроорганизмов к серебру редка, и ее можно преодолеть увеличением концентрации препарата. В то же время большие концентрации ионов серебра могут быть ядом для организмов. В течение длительного времени считалось однозначно доказанным, что лечебными свойствами обладают ионы Ag^+ , а не металлическое серебро. Тем не менее, вопрос о механизме действия наночастиц серебра на различные биомакромолекулы, вирусы, бактерии и клетки до настоящего времени остается окончательно не выясненным и требует дополнительных исследований. Ионное и коллоидное серебро используются как антибактериальные, противовирусные и фунгицидные агенты. Комбинированные каталитические и антимикробные свойства ионов серебра в настоящее время находятся на стадии исследований препаратов биосовместимых полимеров с ионами серебра для использования в качестве матрикса в лечебных целях.

Флуориметр Water-PAM

В работе используется импульсный флуориметр WaterPAM (Walz, Германия). Water-PAM служит для измерения различных параметров флуоресценции и их световых зависимостей. Процедура измерения фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции на флуорометре приведена на рисунке 3. Сначала измеряется уровень F_0 у выдержанного в темноте образца при открытых реакционных центрах. Затем подается один импульс насыщающего света 0,8 с, который закрывает реакционные центры и убирает фотохимическое тушение. При этом режиме регистрируют максимальную флуоресценцию F_m . Эти два уровня задают максимальную величину переменной флуоресценции $F_v = F_m - F_0$. Через некоторый интервал времени включается постоянный действующий свет, который индуцирует изменения выхода флуоресценции, характерные для обычной индукционной кривой флуоресценции хлорофилла $F(t)$. При этом на всем протяжении индукционной кривой переменная величина $F(t)$ остается меньше, чем F_m . Разница между F_m и $F(t)$ характеризует общее тушение флуоресценции, которое развивается под действием постоянного света. Общее тушение складывается из фотохимического и нефотохимического тушения. Во время действия насыщающей вспышки фотохимическое тушение снимается, и флуоресценция возрастает до значения F_m' . Однако, значение F_m' остается меньше, чем F_m . Так как в обоих случаях фотохимическое тушение отсутствует, разница между $(F_m - F_m')$ характеризует величину нефотохимического тушения, индуцированного постоянным освещением. Соответственно, разница $(F_m' - F(t))$ характеризует величину фотохимического тушения и пропорциональна количеству фотосинтетически активных центров ФС2 на этом свете.

На свету проводятся измерения быстрых световых зависимостей различных параметров флуоресценции при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 900 мкЕ/(м²с). Протокол измерения световых кривых показан на рисунке 4.

Water PAM: Light Curve Protocol

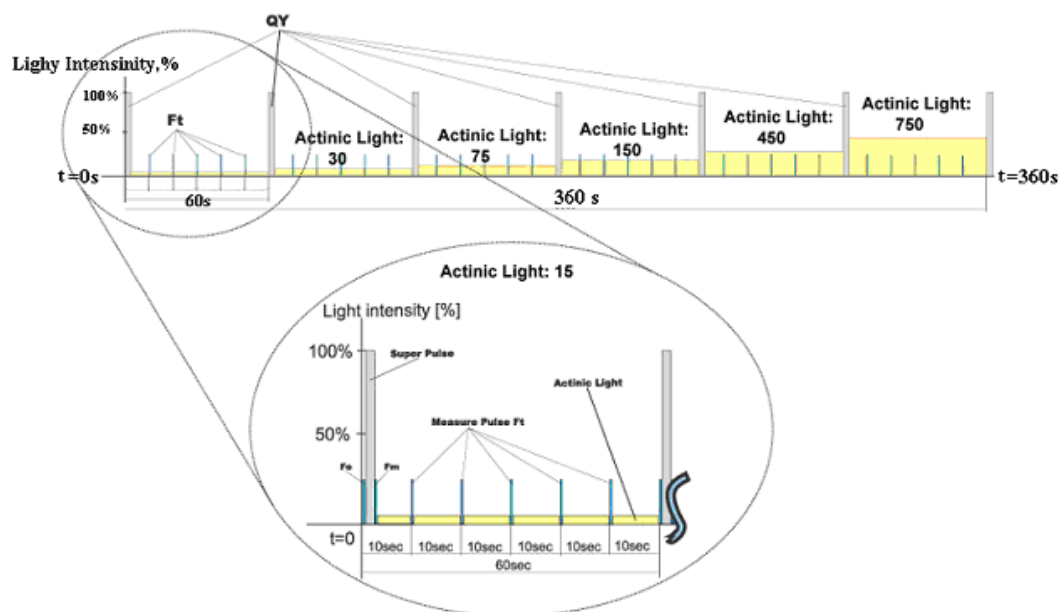


Рис. 4. Принцип регистрации световой кривой флуоресценции на флуориметре

Время освещения при каждой интенсивности составляет 30 секунд. При таких временах освещения быстрые переходные процессы, связанные с изменением интенсивности, заканчиваются и световые зависимости близки к таковым, регистрируемым при длительном стационарном освещении. В конце каждого сеанса освещения измеряется выход флуоресценции хлорофилла $F(t)$, а также параметры F_m' с использованием насыщающей вспышки (0.8 с, 2000 мкЕ/(м²с)). На основании всех параметров определяется квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС 2 как отношение $Y = (F_m' - F_t) / F_m'$, нефотохимическое тушение флуоресценции $NPQ = (F_m - F_m') / F_m$ и относительная скорость нециклического электронного транспорта при данной интенсивности света ($rETR$). Скорость транспорта электронов рассчитывается по формуле $rETR = Y \cdot E_i$, где E_i – освещенность, мкЕ/(м²с). На основании полученных световых кривых оценивают следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световых кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи ($rETR_{max}$) и насыщающую интенсивность света (E_n). α рассчитывают как коэффициент линейной регрессии, построенной по точкам, лежащим на светолимитированном участке световых кривой, $rETR_{max}$ – как среднее по значениям $rETR$, находящимся на светонасыщающем участке. E_n рассчитывают по формуле $E_n = rETR_{max} / \alpha$. Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой.

Метод регистрации индукционной кривой флуоресценции.

При включении возбуждающего света можно наблюдать характерную индукционную кривую флуоресценции, в которой различают несколько фаз (Рис.5). Параметры кинетики

изменения амплитуды флуоресценции хлорофилла *a* обладают большой информативностью для характеристики состояния первичных процессов фотосинтеза. Это связано с тем, что изменения состояния фотосинтетического аппарата сопровождаются изменением вероятности тушения энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла, что и проявляется в изменении квантового выхода флуоресценции при освещении (эффект Каутского). Сложная индукция нарастания переменной флуоресценции хлорофилла отражает последовательное заполнение различных пулов пластохинона на акцепторной стороне ФС2, а кинетика затухания – гетерогенность окисления восстановленного пула. Начальный уровень *O* (original) соответствует так называемой постоянной флуоресценции *F_o*, излучаемой при окисленном акцепторе *Q_a*. Такое состояние достигается путем длительной темновой адаптации объекта или освещении его дальним красным светом, возбуждающим ФС1.

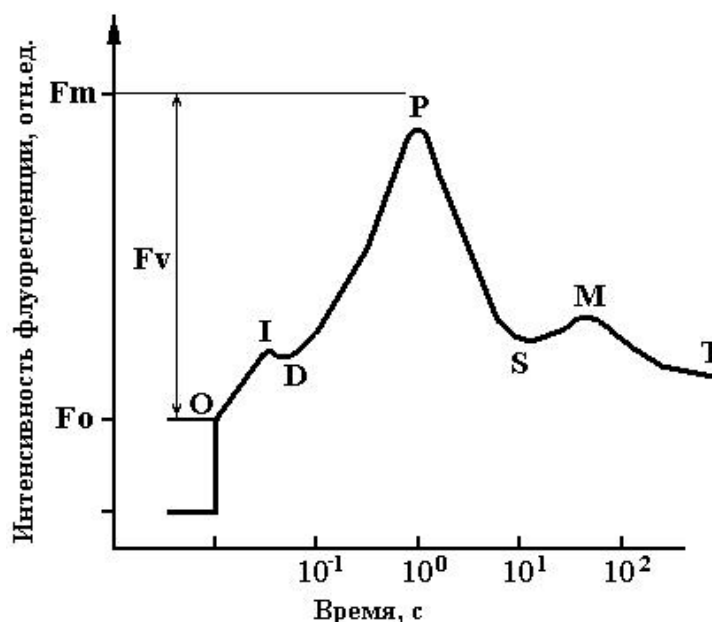


Рис. 5. Типичная индукционная кривая флуоресценции зеленых водорослей при включении возбуждающего света, в которой различается несколько фазовых переходов.

Изменения O-I-D-P называют быстрой индукцией флуоресценции. Она протекает за 1–3 с в зависимости от интенсивности света и других факторов. Более медленные изменения индукции флуоресценции *P-S-M-T* протекают за время от нескольких десятков секунд до нескольких минут.

Возрастание выхода флуоресценции от уровня *O* до уровня *P* (peak) представляет собой переменную флуоресценцию *F_v* и происходит вследствие восстановления *Q_a* при освещении. При длительной предварительной темновой адаптации образца, которая приводит к инактивации темновых реакций фиксации двуокиси углерода, или при достаточно высокой интенсивности

действующего света, выход флуоресценции на уровне Р может быть равен F_m . Возрастание замедляется в точке I (infection), после чего иногда следует некоторое снижение выхода до уровня D (dip).

Переход OIД отражает изменение степени восстановленности Qa в цепи транспорта электронов в условиях полного окисления пула NADP после ФС1, когда стадией, лимитирующей скорость потока электронов, является окисление пластохинона. Спад D обусловлен окислением Qa в реакциях ФС1, после быстрого восстановления его в ФС2 (Рис.3).

По мере восстановления пула НАДФ скорость потока электронов начинает ограничиваться реакциями окисления НАДФ–Н. Это связано с тем, что состояние темновой адаптации характеризуется низкой активностью использования восстановленного НАДФ вследствие недостаточного количества промежуточных продуктов в цикле восстановления CO_2 , а также инактивации в темноте некоторых ферментов этого цикла. Увеличение выхода флуоресценции в фазе DP отражает смещение квазистационарного состояния в сторону большей восстановленности Qa в результате восстановления пулов НАДФ и пластохинона. Одной из причин медленного последующего спада от Р до S (stationary), за которым следует одна или несколько волн М (maximum)–Т (terminal), является ускорение транспорта электронов в результате световой активации реакций восстановления CO_2 . Это медленное тушение флуоресценции вызывается не только окислением Qa, но и так называемыми процессами нефотохимического тушения, приводящими к безызлучательному тушению возбуждения в реакционных центрах ФС2 и к перераспределению энергии возбуждения между фотосистемами в пользу фотосистемы 1, имеющей при комнатной температуре низкий квантовый выход флуоресценции. Развитие процессов нефотохимического тушения вызывается целым рядом процессов, таких как электрохимический потенциал протонов на мембране, тушение каротиноидами, циклический перенос электронов в ФС2, и фоторазрушение реакционных центров ФС2.

Использование импульсных флуориметров позволило существенно расшифровать механизмы процессов, происходящих при включении и выключении постоянного освещения. В адаптированных к темноте листьях все центры фотохимически активны и флуоресценция соответствует уровню F_0 . При освещении их насыщающей вспышкой флуоресценция становится максимальной (F_m) и быстро релаксирует в темноте до исходного уровня. На постоянном свете происходит частичное восстановление Qa. Освещение образца на этом фоне постоянного освещения насыщающей фотосинтез вспышкой увеличивает уровень флуоресценции не только до величины F_m' , меньшей чем F_m , т.к. имеет место нефотохимическое тушение флуоресценции, связанное с диссипацией части энергии возбуждения в РЦ и фотосинтетической антенне. Оно обусловлено по крайней мере тремя процессами: энергизационным ΔpH -зависимым тушением, уменьшением сечения поглощения ФС2 вследствие перехода части фосфорилированных ССК к ФС1 и фотоингибированием ФС2. Таким образом, разница между максимальной флуоресценцией F_m и F_m' обусловлена той частью флуоресценции, которая тушится за счет нефотохимических

процессов. Все эти процессы отражаются на кинетической кривой, которая имеет немонотонный характер. При длительной экспозиции листьев на сильном свете флуоресценция сначала возрастает до F_m , затем снижается до F_m' за счет нефотохимического тушения.

О-Ј-І-Р кинетика световой индукции флуоресценции хлорофилла.

Усовершенствование регистрирующей части кинетических флуориметров позволило увеличить временное разрешение измерений до 10 мкс. В результате стало возможным фиксировать очень быстрые изменения флуоресценции хлорофилла *a*, происходящие при освещении листа или водорослей светом высокой интенсивности ($3000 \text{ мкЕ/м}^2\text{с}$). Типичная индукционная кривая, получаемая при данном способе измерений, характеризуется кинетикой О-Ј-І-Р (латинскими буквами обозначены фазы индукционной кривой, разрешаемые в логарифмической шкале времени) (Рис.6). Уровень, обозначенный как О на кинетической кривой соответствует минимальной флуоресценции F_0 , а Р - максимальной флуоресценции F_m .

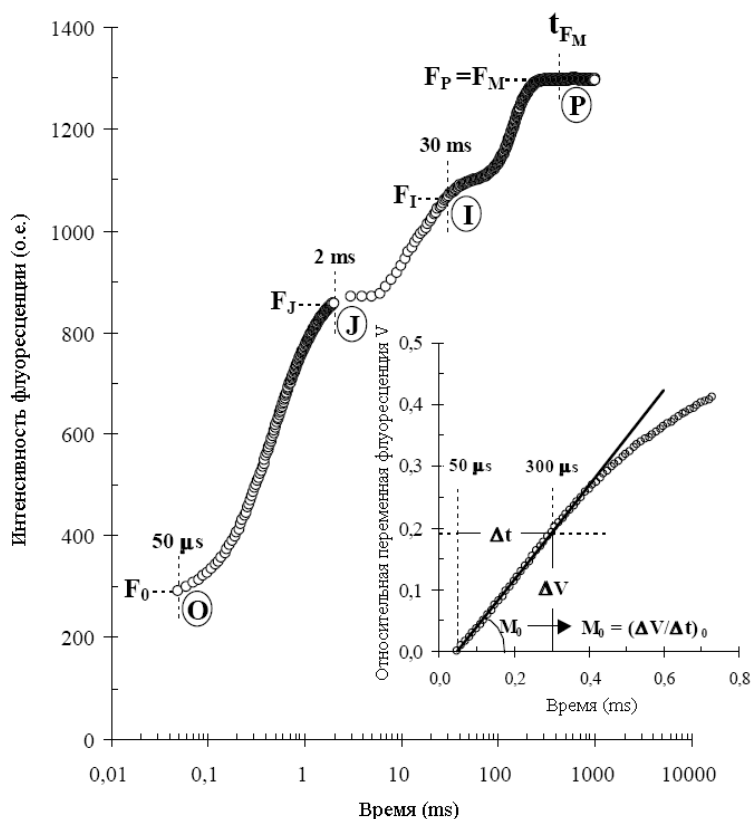


Рис. 6. Типичная индукционная кривая роста флуоресценции хлорофилла (ОЈІР) для клеток растений и водорослей. Переходы приведены в логарифмическом масштабе времени от 50 мкс до 1 сек. Обозначения в (О) относятся к выбранным данным флуоресценции и используются в ЈІР-тесте для расчета структурных и функциональных параметров. Сигналы: F_0 интенсивность флуоресценции (при 50 мкс); интенсивность флуоресценции F_J (при 2 мс), F_I (при 30 мс); максимальная интенсивность флуоресценции, $F_P = F_m$ (в момент обозначается как t_{F_m}). Вставка отражает изменения относительной переменной флуоресценции от времени, от 50 мкс до 1 мс до 1 мс в линейном масштабе ($V = (F - F_0) / (F_m - F_0)$). Начальный наклон рассчитывается как: $M_0 = (dV/dt)_0 \equiv (\Delta V/\Delta t)_0 = (V_{300\mu s})/(0,25 \text{ мс})$.

Фаза J-I-P отражает, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Qa^+ , обусловленное восстановлением Qb и пула хинонов, т.е. последовательным накоплением Qa^+Qb , Qa^+Qb^{2-} , и RQH_2 состояний. Для проведения количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров кинетической кривой O-J-I-P был предложен так называемый «JIP-тест». JIP-тест оперирует следующими параметрами кинетической кривой индукции флуоресценции: (а) интенсивностью флуоресценции при 50 мкс, 100 мкс и 300 мкс, 2 мс, 30 мс и 6 с; (б) временем достижения максимальной флуоресценции (tF_m) и (в) площадью над кинетической кривой до уровня F_m (см. таблицу). Эти параметры используются для расчета характеристик первичных процессов фотосинтеза, приведенных в методах. Многие параметры JIP-теста являются взаимозависимыми (т.е. изменение одних приводит к изменению других). Независимые параметры (V_j , W и M_o), полученные из анализа фазы O-J, обеспечивают информацией о восстановлении Qa . Из параметров (V_i , S_m), можно получить информацию о дальнейшем накоплении восстановленного Qa^+ , которое происходит в результате восстановления Qb и пула хинонов. С помощью JIP-теста удастся исследовать чувствительность фотосинтеза к действию различных стрессов и загрязнений.

Табл. Измеряемые и рассчитанные параметры флуоресценции в JIP-тесте.

Измеряемые параметры флуоресценции	
F_o	Интенсивность флуоресценции при 50 мкс
F_j	Интенсивность флуоресценции при 2 мс
F_i	Интенсивность флуоресценции при 20 мс
$F_p(=F_m)$	Максимальный выход флуоресценции
$F_{100\text{мкс}}$	Интенсивность флуоресценции при 100 мкс
$F_{300\text{мкс}}$	Интенсивность флуоресценции при 300 мкс
$F_{6с}$	Интенсивность флуоресценции при 6 с
$t(F_m)$	Время (мс) достижения максимальной флуоресценции F_m

Area	Площадь между кинетической кривой флуоресценции (O-J-I-P) и уровнем F_M
Параметры JIP-теста	
$F_V = F_M - F_O$	Максимальная переменная флуоресценция
$V_J = (F_J - F_O) / F_V$	Относительная амплитуда O-J фазы
$V_I = (F_I - F_J) / F_V$	Относительная амплитуда J-I фазы
$M_o = 4 \cdot (F_{300\text{мкс}} - F_O) / F_V$	Начальный наклон фазы O-J роста флуоресценции
$S_M = (\text{Area}) / F_V$	Площадь между кинетической кривой флуоресценции (O-J-I-P) и уровнем F_M , нормированная на величину F_V
$ET_o / \text{ABS} = (F_V / F_M) (1 - V_J)$	Квантовый выход электронного транспорта
$q_E = (F_M - F_{6s}) / F_V$	Способность к рН-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции
$q_{PQ} = (F_M - F_I) / F_V$	Способность пула хинонов тушить флуоресценцию

Флуориметр Aqua-Pen

В задаче используется портативный флуориметр AquaPen для измерения параметров быстрой индукции флуоресценции водорослей. Прибор обладает высокой чувствительностью и может быть использоваться для работы с природными водорослями.

AquaPen измеряет образцы с помощью оптического датчика. Прибор оснащен синим измеряющим светом и регистрирует флуоресценцию в красной области спектра.

AquaPen измеряет следующие параметры флуоресценции хлорофилла:

Fo и **Fm** – постоянная и максимальная флуоресценция у адаптированного к темноте образца при одиночном освещении односекундным импульсом мощного белого света; **Fo'** и **Fm'** – постоянная и максимальная флуоресценция после продолжительного

освещения; **Ft** – квазистационарный уровень флуоресценции у адаптированного к свету листа;

Ft эквивалентно **Fo**, если образец адаптирован к темноте .

QY - квантовый выход фотосистемы 2 ($QY = (Fm' - Ft) / Fm'$). В темно-адаптированных образцах **QY** соответствует **Fv / Fm**.

OD - Оптическая плотность при 680 нм представляет рассеяния света и поглощение хлорофилла. Оптическая плотность при 720 нм представляет собой рассеяние света.

NPQ - фотохимическое тушения флуоресценции.

OJIP - кинетика индукции флуоресценции хлорофилла во время воздействия на образец светом высокой освещенности.

Обозначения источников света :

ML (measuring pulse) - измеряющий свет. Слабый импульсный свет, не вызывающий фотохимических реакций (интегральная плотность потока фотонов - 0,2 - 1 мкмоль фотонов $m^{-2}s^{-1}$, длительность импульсов 1-3 мкс, частота - от 1,6 до 600 кГц в зависимости от режима записи и типа прибора).

AL (actinic light) - действующий (актиничный) свет, поддерживающий фотосинтез.

SP (super pulse) - короткие вспышки насыщающего света, интенсивность которого достаточна для быстрого восстановления пула **Qa** ($>2000 \text{ мкЕ } m^{-2}s$, длительность вспышки 0,8-2 с).

Описание порядка выполнения измерений

Порядок измерения световых кривых с помощью прибора WaterPAM.

Для проведения измерений необходимо последовательно выполнить следующие действия:

- 1) Запустить программу wincont.exe. На экране компьютера появляется интерфейс программы.
- 2) При усилении Gain-2 в вкладке Light Curve измерить световую зависимость. Для этого в правом верхнем окне Online Parameter дождаться пока сигнал фоновой флуоресценции **Ft** перестанет сильно меняться и остановится на одном уровне сигнала.
- 3) Начать измерение световых зависимостей **Ft**, **Fm'**, **Yield**, **qN**, **NPQ**, **rETR** нажатием на «Start» в интерфейсе программы. Повторность измерений должна быть трехкратной, для дальнейшего усреднения полученных результатов (если во время измерений обнаружится выпадение точек, то следует переизмерить новый образец).

- 4) После завершения измерений сохраните файл в расширении csv, затем экспортировать его в Excel.
- 5) Распечатать полученные графики и закрыть программу.

Порядок измерения индукционных кривых с помощью прибора AquaPen.

Для проведения измерений необходимо последовательно выполнить следующие действия:

1. Запустить программу FluorPen.exe. На экране компьютера появляется интерфейс программы.
2. Подключить к USB порту Bluetooth и установить соединение с прибором в меню Setup/ Device ID. В нижнем левом углу вместо Device: Not connected появится Device: AquaPen.
3. В меню Device открыть Online Control. В интерфейсе программы откроется окно Online Control
4. Измерить индукционные кривые нажатием на ОЛР в окне Online Control.
5. Рассчитать параметры индукционных кривых по ЛР-тесту (см. таблицу).
6. Сохранить результаты в меню нажатием Save в файловом расширении .dat. Далее файл .dat сохранить в .csv формате с последующим экспортом его в Excel.

Оформление результатов и их обсуждение

□ Построить графики зависимостей **F_o**, **F_m** и Fv / Fm от времени инкубации при разных концентрациях наночастиц. (в процентах от контроля).

□ Для опытных образцов с изменениями в значении Fv/Fm в 20-30 % построить графики световых зависимостей параметров флуоресценции Ft, Fm', Yield, qN, NPQ, rETR и сравнить с параметрами контрольного образца. (см. для примера рис.7. с нанотрубками)

□ На основании полученных световых кривых rETR рассчитать следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световых кривой, α), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи (rETR_{max}) и насыщающую интенсивность света (E_n). Данные представить в таблице и сравнить с контрольным образцом. (см. для примера таблицу с нанотрубками)

□ Если для каждой пробы делалось несколько измерений, то определить перечисленные соотношения для каждого из зарегистрированных кривых, а в итоговую таблицу внести средние значения и стандартное отклонение или ошибку среднего.

□ Для опытных образцов с изменениями в значении Fv/Fm в 20-30 % построить и рассчитать параметры индукционных кривых флуоресценции (расчет по ЛР-тесту). Данные представить в таблице и сравнить с контрольным образцом.

□ Представить в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и провести обсуждение их и сделать четкие выводы по полученным результатам; Отметить

параметры флуоресценции, которые наиболее сильно изменяются при повреждении культуры в присутствии наночастиц.

Ниже для примера приведены результаты, полученные в опытах по исследованию действию нанотрубок на параметры флуоресценции водорослей (статья Маторин и др., Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. С. 321-328.

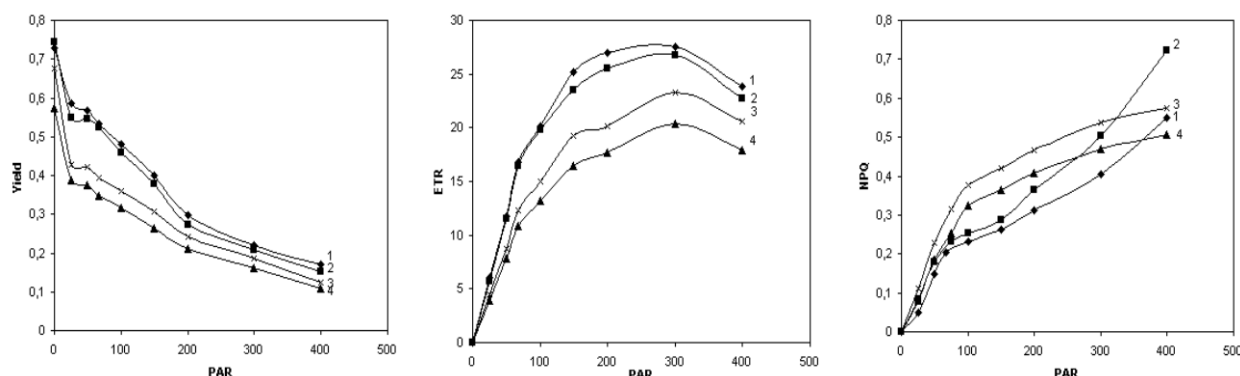


Рис. 7. Изменения параметров флуоресценции в зависимости от интенсивности действующего света в суспензии клеток *C. reinhardtii* под воздействием одностенных (SW) и многостенных углеродных нанотрубок (MW). Время инкубации- 1 сутки. А -квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии в фотосистеме 2 как отношение $Y = (F_m' - F_t) / F_m'$, В- относительная скорость нециклического электронного транспорта, С -нефотохимическое тушение $NPQ = (F_m / F_m') - 1$. (1) - контроль , (2)- после добавления одностенных (SW) и (3,4) - многостенных углеродных нанотрубок (MW) в концентрациях 0,5 мг/мл и 1 мг/мл , соответственно .

Таблица. Изменения параметров световых зависимостей флуоресценции клеток *C. reinhardtii* в контроле и после добавления нанотрубок (суточная инкубации)

Параметры флуоресценции	Контроль	SW трубки (2 мкг/мл)	MW трубки (1 мкг/мл)	MW трубки (2 мкг/мл)
Fv/Fm	0.73±0.001	0.70±0.01	0.68±0.01	0.57±0.03
Y(при 400 кЕ/(м ² с))	0.17±0.02	0.15±0.07	0.12±0.04	0.11±0.03
E _{Y1/2} мкЕ/(м ² с)	166±8.5	161±9.1	121±7.6	128±6.2

$rETR_{(max.)}$ (отн.ед)	23.8 ± 1.7	22.7 ± 1.3	20.6 ± 1.5	17.9 ± 0.9
α	0.23 ± 0.02	$0,22 \pm 0.01$	0.168 ± 0.01	0.149 ± 0.03
E_n (мкЕ/(м ² с))	120.2 ± 14.2	124.1 ± 13.5	137.9 ± 10.5	136.3 ± 14.5

где, F_v/F_m - параметры проб в темноте; $Y = (F_m' - F_t)/F_m'$ - фотохимическая активность ФС 2; $E_{Y1/2}$ -интенсивность света полуспада величины Y . Параметры, описывающие зависимость электронного транспорта ($rETR$) от освещенности (световые кривые): коэффициент максимальной утилизации световой энергии, угол наклона световой кривой(α), максимальная относительная скорость нециклического транспорта электронов ($rETR_{max}$) и насыщающая интенсивность света (E_n).

Дополнительные вопросы

- ☐ Природа быстрой флуоресценции хлорофилла у водорослей?
- ☐ Методика регистрации фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции и расчет относительной скорости нециклического транспорта электронов при фотосинтезе?
- ☐ Связь параметров индукционной кривой флуоресценции с конкретными реакциями фотосинтеза?
- ☐ Какую информацию можно получить о действии наночастиц на водоросли при использовании методов регистрации световых и индукционных кривых флуоресценции?

Какие еще методы можно использовать для контроля качества водной среды при действии наноматериалов?

ЛИТЕРАТУРА

1. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D. // Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // Oceanologia. 2004. V. 46. № 4. P. 519-531.
2. Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. Two year review of progress on government actions: Joint Academies' Response to the Council for Science and Technology's Call for Evidence. RS Policy Document 35/06. The Royal Society. 2005. London. UK.

3. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Kdgi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* // Environmental Science & Technology. 2008. V. 42. P. 8959–8964.
4. Schreiber U. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis / U. Schreiber [et al.] // In: Shulze ED, Caldwell MM (eds) Ecophysiology of photosynthesis. Springer, Berlin. 1994 .P. 49-70.
5. Антал Т.К., Граевская Е.Э., Маторин Д.Н., Воронова Е. Н., Погосян С.И., Кренделева Т.Е., Рубин А.Б. // Изучение токсического действия хлорида ртути и метилртути на фотосинтетическую активность диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* флуоресцентными методами // Биофизика. 2003. Т. 49. №1. С. 72-78.
6. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла // Учебно-методическое пособие. М.: – МГУ. Макс пресс. 2010. 117 с.
7. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона // Итоги науки и техники. Биофизика. М.: ВИНТИ. 1990. Т. 40. С. 49-100.
8. Маторин Д.Н., Каратеева А.В., Осипов В.А., Лукашев Е.П., Сейфуллина Н.Х., Рубин А.Б. Влияние углеродных нанотрубок на параметры флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. С. 321-328.
9. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Смуров А.В. Оценка качества среды инструментальными методами с использованием фототрофных организмов // В учебном пособии. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование. Ред. Мелехова О.П., Егорова Е.И. М.: Изд. Академия. 2007. С. 243-246
10. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. МР 1.2.2522-09. Москва. 02 июля 2009.
11. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга // Технология живых систем. 2005. Т. 2. С. 47-68.
12. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов // Министерство природных ресурсов РФ РЭФИА. НИА. М.: Природа. 2002. 117с.
13. Филенко О.Ф. Водная токсикология // М.: Изд. Черноголовка. 1988. 156 с.

«Методы приготовления и анализа моноламеллярных липосом», Паршина Е.Ю.

Аннотация задачи.

Наноразмерные липосомы являются широко используемым в настоящее время объектом нанотехнологий. Несмотря на то, что липосомы впервые были описаны в 1963 г. А. Бэнгхэм, а основное развитие это направление получило в 80-е годы, когда были запатентованы основные методы получения липосом, в настоящее время интерес к данным искусственным мембранным структурам с позиции нанобиотехнологии возрастает. Исследование новых типов липосом осуществляется в различных направлениях. Липосомы традиционно используются как модельный объект, имитирующий клеточную мембрану, при этом объектом исследования может быть как собственно липидный компонент мембраны, так и белок-липидные взаимодействия, если в мембрану встроены молекулы белка. Липосомы могут быть использованы для доставки различных компонентов в живую клетку. Это могут быть и встроенные в мембрану липосом амфифильные или гидрофобные молекулы лекарственных препаратов или биологически активных соединений, и заключенные в водную фазу липосом растворимые соединения, а также липосомы могут быть использованы для доставки генетического материала в клетки. Технологии, связанные с приготовлением липосом, применяются во многих областях, начиная от косметической и пищевой промышленности и заканчивая наукоемкими технологиями и передовыми разработками в области фармакологии, биологии и медицины. Методы, применяемые для приготовления липосом, чрезвычайно разнообразны и варьируют в зависимости от целей исследования. Данная практическая работа позволит студентам освоить некоторые методические подходы приготовления моноламеллярных липосом, а также изучить методы оценки качества полученных суспензий липосом. Это методы определения распределения липосом по размерам и свойств липосомальной мембраны. В рамках практикума по бионанотехнологиям для студентов 4 курса кафедры биофизики биологического факультета МГУ методы приготовления липосом также рассматриваются в задаче «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран», однако данная задача позволяет более подробно рассмотреть различные методы приготовления липосом и способы их анализа.

Цель работы: освоение методов получения моноламеллярных липосом, липосом с включенными в мембрану молекулами β -каротина и белков, определение размеров липосом и структурного состояния их мембраны.

Объекты исследования: моноламеллярные липосомы.

Используемые методы: методы ультразвуковой обработки и экструзии (приготовление липосом), динамическое светорассеяние, спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), ЭПР-спектроскопия спиновых зондов 5- и 16-доксилстеариновых кислот (5-ДС и 16-ДС), встроенных в мембраны липосом.

План работы:

1. Изучение общих принципов и подходов в приготовлении липосом и приготовление липосом из гомогенизированной в буфере смеси фосфолипидов и гидратированной липидной пленки путем ультразвуковой обработки и экструзии, с включением в состав липидного бислоя молекул β -каротина.
2. Изучение основ метода динамического светорассеяния и определение размера приготовленных липосом (измерение размера липосом проводится в лаборатории факультета наук о материалах МГУ совместно с Е.А. Гудиным).
3. Регистрация спектров ЭПР 5- и 16-ДС, встроенных в мембрану липосом. Обработка полученных спектров ЭПР, оценка вязкости липидного матрикса различных образцов. Данная часть цикла знакомит студентов с методом контроля вязкости мембран липосом, метод может быть использован при модификации состава или структуры искусственных мембран.
4. Анализ структуры мембраны приготовленных липосом при помощи спектроскопии КР. Упорядоченность мембраны оценивается по спектрам жирнокислотных цепей фосфолипидов, входящих в состав липосом.
5. Анализ структуры мембраны липосом по спектрам резонансного КР инкорпорированных в липидный бислой молекул каротина, изучение подходов к обработке спектров КР.

Предполагаемые результаты: в процессе выполнения задачи студенты освоят методы приготовления моноламеллярных липосом, методы анализа их размеров и структуры мембран (динамическое светорассеяние, спектроскопия ЭПР и КР). Будут получены малые моноламеллярные липосомы, определены их размеры и структурное состояние их мембран, что позволит выбрать условия приготовления липосом с заданными свойствами. Будет освоена

методика приготовления липосом с модифицированным составом мембраны – с включенными в состав мембраны молекулами β -каротина.

В ходе выполнения работы используется следующее оборудование:

- 1) магнитная мешалка MSH 300 производства фирмы «Biosan»
- 2) pH-метр pH410 производства фирмы «Аквилон»
- 3) Ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т, Россия
- 4) Мини-экструдер производства фирмы «Avanti Polar Lipids»
- 5) спектрофотометр Specol 11 производства фирмы «Carl Zeiss»
- 6) ЭПР-спектрометр РЭ 1307, Россия
- 7) КР-спектрометр R-3000, «Raman Systems», США

8) КР-спектрометр с лазерами 473 и 532 нм (Ciel, Eurolase), системой регистрации МОРС 1/3648 (Троицк, Россия), сделанной на базе линейной ПЗС TCD1304DG (Toshiba, Япония) с фильтром LPO2-473RS-50 (Shemrock, USA);

- 9) Zetasizer Nano (Malvern, UK)

Описание задачи.

Введение.

Липосомами называют искусственные частицы, образованные одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями, ограничивающими внутреннюю водную фазу от внешней среды (рис.1а). При диспергировании в воде многие фосфолипиды могут самопроизвольно образовывать гетерогенную смесь везикул, состоящих из нескольких концентрических бислойных оболочек. Эти структуры называют мультиламеллярными липосомами (рис.1б). Моноламеллярные липосомы состоят из одного бислоя. Различают малые моноламеллярные (диаметр 20-50 нм) и большие моноламеллярные (диаметр 50-200 нм и выше). Можно также приготовить гигантские фосфолипидные везикулы размером с клетку, имеющие диаметр до 300 мкм.

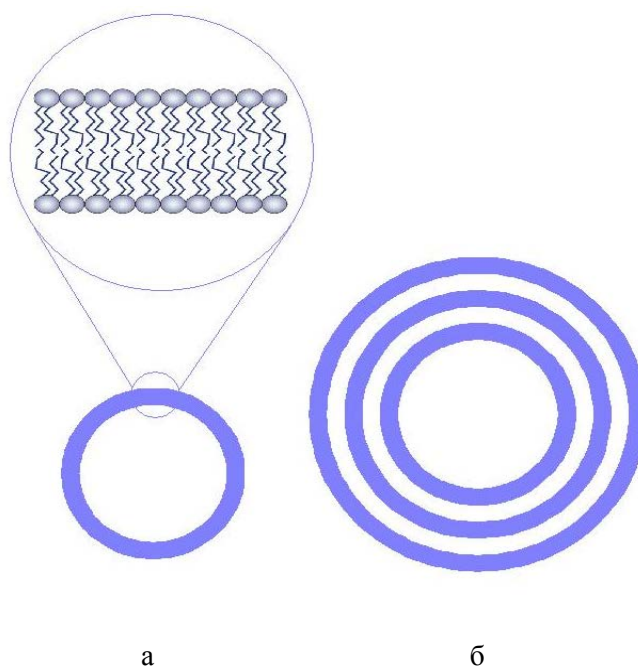


Рис. 1. Строение моноламеллярных (а) и мультиламеллярных (б) липосом.

В бионанотехнологии наноразмерные липосомы используются в качестве средств доставки биологически активных веществ в клетки, при этом активное вещество может быть как заключено во внутреннем объеме липосомы (в водной среде), так и включено в состав липидного бислоя. Варьируя состав липосомальной мембраны можно реализовать адресную доставку содержимого липосом. Кроме того, липосомы и липосомы с инкорпорированными молекулами белка широко используются как модельные объекты для экспериментальных исследований биологических мембран. Важными характеристиками липосом являются их липидный состав, средний диаметр и степень гетерогенности по размерам. О распределении липосом по размеру можно судить по данным гель-проникающей хроматографии, светорассеяния, ультрацентрифугирования, а также путем визуализации липосом методом электронной микроскопии. В настоящее время для оценки распределение частиц по размерам широко используют метод динамического светорассеяния.

Важными параметром, характеризующими способность липосом включать во внутреннюю водную фазу различные вещества является внутренний водный объем, который увеличивается с ростом диаметра липосомы. Суммарный внутренний водный объем липосом зависит также от их количества, т.е. концентрации фосфолипида.

Существуют различные способы приготовления липосом, варьирующие в зависимости от требований к характеристикам получаемых липосом (Геннис, 1997). Для получения однослойных или многослойных липосом, в зависимости от размера и требований к гомогенности распределения по размеру получаемых липосом, а также включения в липосомы различных веществ, используются различные подходы. Мультиламеллярные везикулы (многослойные

липосомы) получают путем диспергирования в водном буферном растворе пленки фосфолипидов, предварительно растворенных в неполярном растворителе (как правило, смеси хлороформа и метанола), высушенной на поверхности стеклянной колбы. По ряду своих характеристик эти структуры значительно уступают моноламеллярным везикулам и, как правило, редко используются. Эти везикулы осмотически активны, но сложность их внутренней организации затрудняет анализ результатов измерения осмотической активности.

Малые моноламеллярные липосомы обычно готовят путем ультразвуковой обработки водных дисперсий фосфолипидов. Затем везикулы фракционируют по размеру методом гелепроникающей хроматографии или центрифугированием в градиенте глицерина. Другой способ приготовления таких везикул состоит в быстром введении в водную фазу раствора липида в этаноле. Кроме того, для приготовления малых моноламеллярных липосом можно использовать экструзию. Метод основан на продавливании суспензии многослойных липосом через мембрану с порами заданного размера. При этом многослойные липосомы постепенно разбиваются на отдельные монослойные везикулы, размер которых соответствует диаметру пор мембраны.

Преимуществом малых монослойных липосом (ММЛ) является однородность их распределения по размеру, однако малый размер может быть и недостатком, так как при малом радиусе кривизны бислоя липосом затрудняется упаковка в нем липидных молекул. Площадь наружного монослоя липосомы почти в 2 раза превышает площадь внутреннего монослоя, это приводит к тому, что в около 70% фосфолипидов находится в наружном монослое. При этом в наружном монослое располагаются молекулы фосфолипидов, имеющие большую площадь полярной головки и малую площадь фосфолипидных хвостов (имеющие форму «обратного конуса»), например фосфатидилхолин или сфингомиелин (рис.2), таким образом в малых моноламеллярных липосомах наблюдается асимметрия распределения липидов между наружным и внутренним монослоями.

Внутренний водный объем ММЛ довольно мал и лежит в пределах от 0,5 до 1 л/моль фосфолипида.

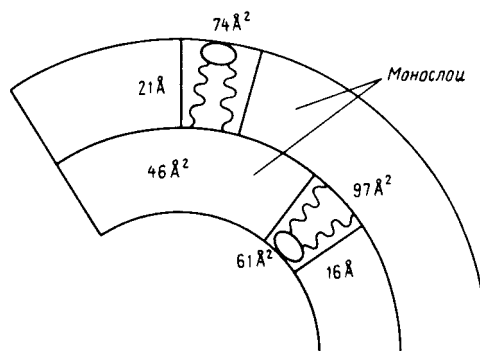


Рис.2. Поперечное сечение бислоя в малых моноламеллярных липосомах (Huang, Mason, 1978).

Для формирования больших моноламеллярных липосом (БМЛ) используются различные методы в зависимости от липидного состава везикул и их предполагаемого назначения. Например, методы, при которых происходит разбавление суспензии липосом, оказываются непригодными для формирования липосом, транспортирующих лекарственные препараты, а методы, основанные на использовании органических растворителей, не подходят для реконструкции белков. Внутренний объем БМЛ намного больше, чем у ММЛ, и лежит обычно в интервале от 5 до 20 л/моль фосфолипида. Чаще всего для получения БМЛ используют диализ или разбавление детергентных растворов, поскольку он пригоден для включения белков в образующиеся БМВ. Липид (или липид с белком) диспергируют избытком детергента, а затем детергент удаляют различными методами (например, диализом). При снижении концентрации детергента липиды начинают собираться в монослойные везикулы. Размер липосом зависит не только от типа детергента или липида, но и от скорости удаления детергента.

Инфузия и метод упаривания обратной фазы (Szoka et al., 1980) – это методы, связанные с использованием неполярных растворителей. Однако для приготовления модельных мембран, содержащих белки, эти методы непригодны. Методы слияния представляют собой несколько подходов, основанных на слиянии ММЛ до образования липосом большего размера. Например, повторные операции замораживания-оттаивания, пригодные для реконструкции некоторых мембранных белков, или использование ионов кальция для слияния ММЛ, содержащих фосфатидилсерин. Добавление фосфатидилхолинов с короткими цепями в количестве до 20 % от общего содержания липидов позволяет превращать мультиламеллярные бислои в стабильные БМЛ. Добавление жирных кислот или детергентов при определенных условиях вызывает слияние ММЛ с образованием БМЛ. Добавление жирных кислот способствует также включению белков в бислой БМВ.

Для формирования БМЛ подходит также, как и для приготовления ММЛ, метод экструзии. Быстрая экструзия мультиламеллярной дисперсии через поликарбонатные фильтры дает БМЛ диаметром 60 – 100 нм.

Моноламеллярные везикулы клеточных размеров образуются при обычной гидратации липидов и липидно-белковых смесей в растворах с низкой ионной силой. Размер везикул составляет от 0,1 до 300 мкм, а их внутренний водный объем достигает 300 л/моль фосфолипида. Эти везикулы остаются стабильными при центрифугировании, проводимом для разделения их по размерам. Кроме того, в них можно вводить микроэлектроды для проведения электрических измерений.

Свойства липосом, полученных различными способами, а также при включении в состав мембраны различных дополнительных компонентов, могут варьировать. Для контроля свойств и структурного состояния мембраны могут быть использованы различные биохимические и биофизические методы. В частности, для определения вязкости и упорядоченности липидного компонента мембраны может быть использован метод спиновых зондов, позволяющий получать прямую информацию о микровязкости различных по глубине областей мембраны. Метод комбинационного рассеяния является неинвазивным методом определения конформационного состояния молекул, входящих в состав мембраны липосом, полученная таким образом информация также позволяет судить о структурном состоянии липидного компонента мембраны.

Материалы и методы

Материалы используемые в задаче

1. L- α -лецитин (выделенный из соевых бобов), β -каротин (Sigma, USA).
2. KH_2PO_4 , MgSO_4 , KOH, хлороформ отечественного производства, градации не ниже ч.д.а.
3. Препарат «Веторон» как источник β -каротина (ЗАО «Аквион», Россия)
4. Спиновые зонды 5 и 16 ДС (Sigma, USA)

Получение липосом.

Липосомы получают по методу (Racker, 1973) с модификациями.

Для приготовления липосом используют буферный раствор А, содержащий 50 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ MgSO_4 , pH=7.5. Для этого в 1 л дистиллированной воды растворяют 6.85 г KH_2PO_4 и 0.24 г MgSO_4 . pH доводят до значения 7.5 сухим гидроксидом калия KOH в таблетках (приблизительно 8 таблеток или 1.7 г). Буфер хранится при температуре +4°C и может быть использован в течение 1-2 месяцев.

Липосомы готовят из L- α -лецитина, выделенного из соевых бобов, содержащего 17% фосфатидилхолина. 40 мг лецитина разводят в 1 мл буферного раствора А. Полученную смесь гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе до исчезновения комков и получения однородной суспензии. Полученную смесь (1 мл) помещают в пробирку Эппендорфа и озвучивают "банным" способом в течение 40 минут на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при токе 8 μA и частоте 22 кГц до полного просветления суспензии.

Для приготовления липосом с включенными в состав мембраны молекулами β -каротина в пробирку Эппендорфа к 1 мл готовой суспензии липосом добавляют раствор β -

каротина. Для этого препарат «Веторон» (помимо β -каротина содержит витамины Е и С и поверхностно активные вещества, концентрация β -каротина 20 мг/мл), разводят до концентрации 14 % в буфере А (14 мкл «Веторона» на 86 мкл буфера). 1 мкл этого раствора добавляют в 1 мл суспензии липосом и озвучивают на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т дополнительно в течение 10 мин. Конечная концентрация β -каротина составляет 2.8×10^{-3} мг/мл суспензии липосом. Соотношения числа молекул β -каротина к числу молекул фосфатидилхолина в липосомах (если принять, что липосомы состоят на 100% из фосфатидилхолина) составляло $1:10^4$.

Для приблизительной оценки диаметра полученных липосом без β -каротина использовали спектрофотометрический метод, предложенный в работе (Chong, Colbow, 1976) для определения диаметра липидных частиц по мутности суспензии. Определяли поглощение суспензии липосом, разведенной до концентрации лецитина 1 мг/мл, на спектрофотометре Specol 11 (Carl Zeiss, Германия) в кварцевых кюветах толщиной 1 см при 436 нм. Если поглощение суспензии составляло менее 0.1, считали, в соответствии с (Chong, Colbow, 1976), что липосомы имеют достаточно узкое распределение по размеру, со средним радиусом 40 нм и пригодны для использования в эксперименте. Для липосом с включенным в состав мембраны β -каротином такой метод не применим, т.к. в области 450 нм находится максимум поглощения β -каротина.

Липосомы с β -каротином хранят в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ и используют для эксперимента в течение 3 суток.

Получение липосом заданного диаметра методом экструзии.

Для получения липосом заданного размера используют мини-экструдер («Avanti Polar Lipids»). Принцип получения липосом при помощи экструзии заключается в том, что при продавливании суспензии многослойных липосом или липосом произвольного размера через поликарбонатные фильтры с порами определенного диаметра они разбиваются на частицы размера, соответствующего размерам пор. Экструдер собирают согласно прилагаемой к нему инструкции (рис.3).

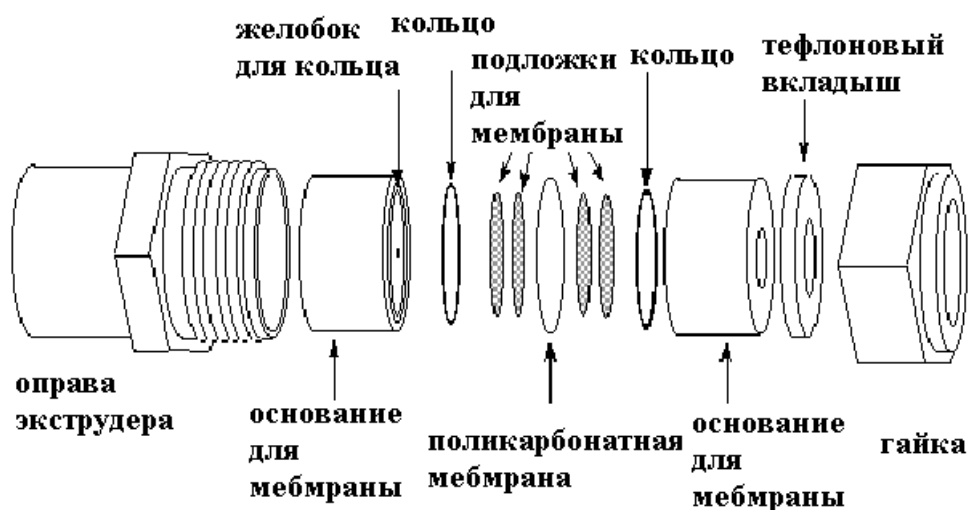


Рис. 3. Схема сборки мини-экструдера (<http://avantilipids.com>).

Для этого на тефлоновое основание для мембраны помещают резиновое кольцо, в центр помещают каплю буферного раствора, на нее помещают 2 подложки для мембраны (белые кружочки) (рис.4.1). Поликарбонатную мембрану с порами необходимого размера (прозрачная пленка) осторожно берут пинцетом с мягкими кончиками и помещают сверху. После этого тефлоновое основание осторожно помещают в оправу экструдера (рис.4.1). Вторую половину экструдера собирают аналогичным образом, но без поликарбонатной мембраны. Аккуратно опускают ее в оправу экструдера на первое основание для мембраны (рис.4.2). Необходимо следить, чтобы мембрана располагалась ровно, без складок. Сверху помещают тефлоновый вкладыш и осторожно закручивают экструдер гайкой (рис.4.3). Для закручивания гайки достаточно усилия, развиваемого рукой, применять гаечный ключ не нужно.



1.



2.



3.

Рис. 4. Последовательность сборки мини-экструдера (<http://avantilipids.com>).



Рис. 5. Внешний вид собранного мини-экструдера (<http://avantilipids.com>).

После того, как экструдер собран, набирают полученную обработкой ультразвуком суспензию липосом в один из микрошприцов, прилагаемых к экструдеру. 2 микрошприца осторожно вставляют в отверстия с 2 сторон экструдера (рис.5). Нажимая на поршень заполненного суспензией липосом шприца продавливают суспензию липосом через мембрану. Затем продавливают суспензию липосом в другую сторону, надавливая на поршень второго шприца. Необходимо следить за тем, чтобы не происходило утечки суспензии липосом. Всего производят пропускание суспензии липосом через фильтр минимум 11 раз. Полученные липосомы должны иметь размер, соответствующий размерам пор фильтра (например, 100 нм).

В рамках данной работы предлагается получить суспензии липосом с встроенными молекулами β -каротина и без β -каротина диаметром 30 и 100 нм (всего 4 типа липосом). После окончания пользования мини-экструдером необходимо тщательно промыть дистиллированной водой микрошприцы и все части экструдера, осторожно вытереть их насухо фильтровальной бумагой и положить для окончательной просушки. Поликарбонатные мембраны могут быть использованы повторно, поэтому их также необходимо промыть дистиллированной водой и высушить.

Определение размеров липосом методом динамического светорассеяния.

Размер липосом определяют методом динамического светорассеивания на приборе Zetasizer Nano (Malvern, UK). Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее, из коэффициента диффузии рассчитывается радиус наночастиц.

Хаотическое броуновское движение монодисперсных наночастиц вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации. В свою очередь, эти флуктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц. Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в зависящей от времени корреляционной функции флуктуаций интенсивности. Если форма частиц известна или задана, их размер может быть рассчитан с использованием соответствующей формулы. Например, для сферических частиц можно использовать формулу Стокса-Эйнштейна:

$$D=k_B T/6\pi\eta R,$$

где k_B - константа Больцмана, T - абсолютная температура и η - сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса R .

Более подробные сведения о методе динамического светорассеяния можно найти в следующих источниках: В.Е.Эскин "Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул" – Ленинград: Наука, 1986; А.Д.Лебедев, Ю.Н.Левчук, А.В.Ломакин, В.А.Носкин "Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии" – Киев: Наукова думка, 1987; "Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов" Г.Камминс и Э.Пайк (ред.) – М.: Мир, 1978, а также в инструкции к прибору Zetasizer Nano.

Для исследования полученных суспензий липосом методом динамического светорассеяния их необходимо разбавить в 50 раз буферным раствором А, который предварительно должен быть очищен от возможных загрязнений. Для этого буферный раствор пропускают через гидрофильный мембранный фильтр. Для этого необходимое количество буфера набирают в одноразовый шприц, на который надевают фильтрующую насадку, например Миллипор Миллекс с ПТФЭ мембраной типа LCR, диаметр пор 0.45 мкм. Буфер фильтруют через насадку, после чего насадку промывают деионизованной водой. В 1.470 мл профильтрованного буферного раствора А разводят 30 мкл исходной суспензии липосом. Для измерений на приборе Zetasizer Nano используют одноразовые полистироловые кюветы. В программе регистрации выставляют значение показателя преломления исследуемых части соответствующее показателю преломления липидов. Проводят измерения распределения по размеру липосом с β -каротином и без β -каротина размером 30 и 100 нм (после экструзии) и исходной суспензии липосом, не подвергнутой экструзии (всего 5 образцов).

Исследование структуры мембраны липосом.

Для оценки состояния мембраны липосом используются методы нерезонансного и резонансного комбинационного рассеяния, метод спиновых зондов (спектроскопия ЭПР).

Метод спектроскопии нерезонансного комбинационного рассеяния

Основы метода спектроскопии комбинационного рассеяния подробно описаны в задаче «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра».

Метод комбинационного рассеяния используют для оценки упорядоченности жирнокислотных остатков фосфолипидов в мембране липосом с встроенными в мембрану молекулами β -каротина и без β -каротина размером 30 и 100 нм. При регистрации спектров КР липидов используют спектрометр Raman Systems R-3000, мощность излучения 290 мВт, длина волны лазера 785 нм. Для экспериментов каплю суспензии липосом, объемом 50 мкл, наносят на зеркальную подложку. Суммарное время регистрации сигнала составляет 180 сек. Запись и обработку спектров производили с помощью программы RSIScan. При обработке спектров КР производят вычитание базовой линии и определяют амплитуду пиков при помощи пакета программ Matlab 7.5.

Спектр комбинационного рассеяния липидов мембраны липосом приведен на рис.6.

Для анализа структуры мембран липосом были выбраны полосы 1060 и 1130, которые соответствуют транс-конформации С-С связей жирнокислотных цепей, и полоса 1088, которая соответствует гош-конформации (Кэрри, 1985) (табл.).

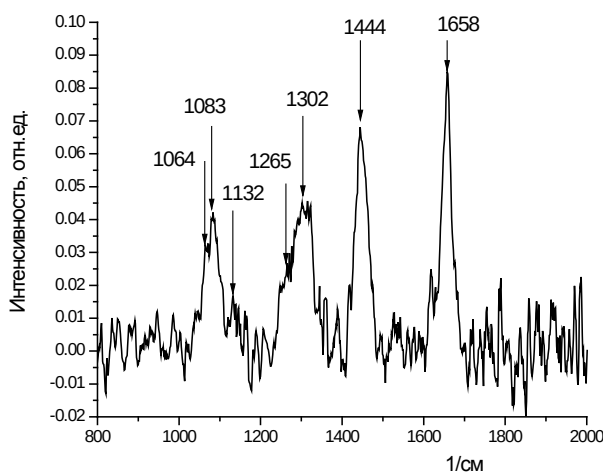


Рис. 6. Спектр комбинационного рассеяния липидов мембраны липосом.

Таблица. Положения максимумов в спектре комбинационного рассеяния липидов и соответствующие им колебания связей в молекулах фосфолипидов.

Положение максимума, 1/см	Связи	Комментарий
1060-1064	–HC–CH– , транс-конформация	соответствует упорядоченной структуре
1083-1088	–HC–CH– , гош-конформация	соответствует неупорядоченной структуре
1130-1132	–HC–CH– , транс-конформация	соответствует упорядоченной структуре
1265-1270	=C–H, колебания в плоскости	отражает количество двойных связей
1300-1302	–CH ₂ – , крутильные колебания	
1444-1445	C–H связи метиленовых групп, деформационные колебания	
1658-1664	–HC=CH–	отражает количество двойных связей

Известно, что параметр, рассчитываемый как $(I_{1130} + I_{1060})/I_{1088}$ отражает долю жирнокислотных цепей в транс-конформации по отношению к цепям в гош-конформации, что соответствует упорядоченности структуры мембраны и, следовательно, ее микровязкости (Pézolet, Georgescauld, 1985). Данная область спектра является чувствительной к изменению структуры мембраны.

Метод спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния

Резонансное комбинационное рассеяние наблюдается, когда длина волны возбуждающего света соответствует области поглощения исследуемого вещества. При этом амплитуда регистрируемого сигнала комбинационного рассеяния значительно увеличивается по сравнению с нерезонансным случаем (до 10^4 раз). Спектроскопия резонансного комбинационного рассеяния (РКР) используется для оценки состояния молекул β -каротина в мембранах липосом. Источником возбуждающего света служит аргоновый лазер, генерирующий излучение с длиной волны 473 нм, что близко к максимуму спектра поглощения β -каротина. Луч лазера фокусируют на капилляре с исследуемой суспензией. Мощность излучения устанавливают на уровне 18-20 мВт. Рассеянное излучение собирается системой линз на фоточувствительную матрицу. Регистрация и обработка спектров осуществляется с помощью компьютера, для записи спектров используют программу "МОПС". Время регистрации одного спектра составляет 60 с. При обработке спектров РКР производят вычитание базовой линии при помощи оригинальной программы, разработанной в лаборатории биофизики клетки каф. биофизики биологического ф-та МГУ, а также определяют амплитуду пиков при помощи пакета программ Matlab 7.5.

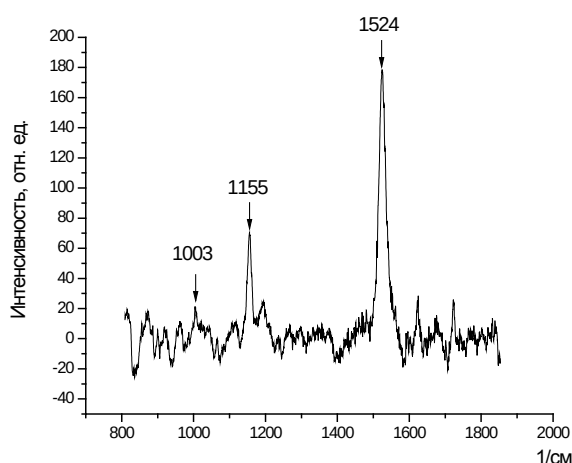


Рис. 7. Спектр резонансного комбинационного рассеяния β -каротина в составе мембран липосом.

Как видно из рис.7, спектр резонансного КР (РКР) β -каротина представляет собой три пика с положениями максимумов 1008, 1160 и 1526 см. Первый пик связан с колебанием связи C–CH, второй — с колебанием связи =CH–CH= и третий — с колебанием связи –C=C–. Полоса 1526 см является важной характеристической линией: частота колебания –C=C– и положение соответствующего пика в спектре РКР является точной мерой жесткости связи –C=C– и поэтому используется для оценки степени сопряженности π - электронной системы. Кроме того, положение этого пика зависит от длины β -каротина (числа атомов C) и смещается в сторону больших частот при

уменьшении числа атомов углерода в цепи. Агрегация β -каротина, влияющая на положение максимума поглощения, не затрагивает положения полос спектра КР. При цис-конформации двойных связей β -каротина пик 1160 см имеет два ярко выраженных плеча с положениями 1190-1193 см и 1210 см. При переходе в транс-конформацию хотя бы по одной двойной связи плечо 1210 см сдвигается в низкочастотную область и практически сливается с плечом 1193 см, в некоторых случаях оно полностью исчезает. Кроме этого, при цис-транс переходе увеличивается ширина полосы 1526 см.

Молекулы β -каротина меняют конформацию при изменении упорядоченности окружающих их фосфолипидных «хвостов», что влияет на спектры РКР каротиноидов. Ранее было показано, что отношение интенсивностей полос I_{1526}/I_{1160} зависит от вязкости мембраны, мембранного потенциала, количества мембраносвязанных ионов, транспорта ионов через мембрану и отражает упорядоченность фосфолипидов в окружении молекул β -каротина мембраны липосом (Максимов и др., 1996). Таким образом, в данной работе β -каротин можно рассматривать в качестве метки, характеризующей вязкость мембранных липидов, увеличение параметра I_{1526}/I_{1160} соответствует увеличению вязкости мембраны липосом. В рамках данной задачи предлагается зарегистрировать спектры РКР каротина встроенного в мембраны липосом различного диаметра и сравнить параметры, характеризующие вязкость их мембран.

Определение вязкости мембраны липосом

Прямым способом, позволяющим оценить вязкость мембраны липосом является метод спиновых зондов. Спиновые зонды – молекулы стеариновой кислоты с парамагнитными фрагментами у разных углеродных атомов (5 и 16 – для 5 и 16ДС, соответственно) встраивают в мембрану липосом и регистрируют спектры ЭПР зондов. Более подробно методе спиновых зондов и методе спектроскопии ЭПР описан в задаче «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран». Дополнительную информацию можно получить из методических указаний к малому практикуму по биофизике, а также из источников (Современные методы биофизических исследований, 1988, Кузнецов, 1976).

Для регистрации спектров ЭПР спиновых зондов, встроенных в мембраны липосом пробы готовят следующим образом. В пробирку Эппендорфа объемом 0.5 мл вносят 125 мкл суспензии липосом и добавляют 0.5 мкл спиртового раствора зондов 5 или 16ДС в концентрации $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$, при этом конечная концентрация зонда в пробе составляет $1 \times 10^{-4} \text{M}$. Сразу после внесения зонда пробу следует быстро и тщательно перемешать. Измерение спектров можно осуществлять через 5 мин после добавления зонда в суспензию липосом, за это время произойдет встраивание зонда в

мембрану липосом. После перемешивания и инкубации в течение 5 мин пробу набирают в пластиковый капилляр, который герметизируют (пластилином), тщательно протирают снаружи и помещают в резонатор прибора. Для записи спектра подбирают подходящие значения усиления, значение постоянной времени составляет 0.1 с, ослабление мощности СВЧ 12.5 Дб. Регистрируют спектры ЭПР спиновых зондов 5 и 16 ДС встроенных в мембрану липосом с β -каротином и без β -каротина диаметром 30 и 100 нм. По полученным спектрам определяют время вращательной корреляции τ_c в случае зонда 16 ДС и $2A'_{\parallel}$ и S в случае зонда 5 ДС.

Оформление результатов и их обсуждение.

1. Отчет по задаче оформляется в виде небольшой научной работы и включает разделы «Введение», «Цели и задачи», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения» и «Выводы». Цели и задачи должны быть сформулированы четко и кратко.

2. В разделе «Материалы и методы» необходимо отразить основные методы приготовления липосом, использованные в данной работе.

3. В разделе «Результаты и обсуждения» должны быть представлены результаты измерения размеров липосом методом динамического светорассеяния и произведено сравнение липосом, полученных разными способами. Также должны быть представлены спектры КР, РКР и ЭПР для различных образцов липосом, а также параметры, рассчитанные по данным спектрам. Необходимо произвести сравнительный анализ свойств мембраны различных образцов липосом и обсудить возможные причины наблюдаемых различий (или отсутствия таковых).

4. По полученным в работе результатам необходимо написать развернутые выводы.

Вопросы для самостоятельной работы.

1. Что такое липосомы? Каково их строение?
2. Как могут быть использованы липосомы в бионанотехнологиях, биологии и медицине?
3. Каковы основные принципы приготовления липосом?
4. Какие методы могут быть использованы для характеристики структуры и свойств липосом?
5. Какие факторы могут влиять на структуру липидного бислоя липосом различного размера и состава?

6. Каковы недостатки и преимущества использования липосом в качестве модельных систем?

Список литературы.

- Chong C.S., Colbow K. Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1976, v. 436, N2, p.260-82.
- Huang C., Mason J.T. Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978, №75, V. 1, p. 308–310.
- Pérolet M., Georgescauld D. Raman spectroscopy of nerve fibers. A study of membrane lipids under steady state conditions. *Biophysical Journal*. V. 47, Issue 3, March 1985, pp. 367-372.
- Racker E. A new procedure for the reconstitution of biologically active phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973. vol.55 p.224-230.
- Szoka F., Jacobson K., Derzko Z., Papahadjopoulos D. Fluorescence studies on the mechanism of liposome-cell interactions in vitro. *BBA*, 1980, july, v. 600, n. 1, p. 1-18.
- Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. – М.: Мир, 1997.
- Камминс Г., Пайк Э. (ред.) "Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов", М.: Мир, 1978.
- Кэри П. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. М.: Мир, 1985. С. 221-246.
- Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. "Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии", Киев: Наукова думка, 1987
- Максимов Г.В., Н. Раденович, Ю.Е. Борисова, М.К. Еремич. Исследование вязкости возбудимых мембран с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. *Биофизика*. 1996. 41. С. 400-406.
- Сайт компании «Avanti Polar Lipids» <http://avantilipids.com>
- Эскин В.Е. "Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул", Ленинград: Наука, 1986.

«Методы комплексного исследования действия нанообъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов», Юсипович А.И.

Аннотация

В рамках настоящей задачи студенты получали навыки исследования действия коллоидных частиц на биологические объекты (эритроциты крысы). Оценка воздействия коллоидов проводилась при помощи методов лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), позволяющей оценить форму, диаметр и содержание гемоглобина в эритроците, методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), способного измерить геометрические размеры (длину, ширину и толщину), а также используя метод спектроскопии комбинационного рассеяния, позволяющего оценить состояние белка гемоглобина – основного компонента эритроцита. Аналогичным образом оценивалось уменьшение и увеличение содержания холестерина в мембранах исследуемых эритроцитов.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с развитием нанотехнологий и расширением использования нанокompозитных материалов актуальной задачей стала оценка воздействия этих наноматериалов на биологические объекты. Это важно не только для оценки безопасности применения наночастиц, но и при их использовании для изучения свойств биологических объектов. Например в случае применения коллоидов серебра для усиления сигнала комбинационного рассеяния, где важно разделить эффекты, обусловленные действием коллоидов и, непосредственно, эффекты обусловленные экспериментальным воздействием.

При этом в силу малых размеров и, в силу этого, высокой реакционной способности, наночастицы могут оказывать воздействие не только на входящие в состав клеток вещества, например белки (воздействие на наноуровне), но и влиять на всю клетку в целом (воздействие на микроуровне клеточной организации). Таким образом, при оценке действия наночастиц наиболее целесообразным является не только и не столько обнаружение наночастиц в различных частях биологического объекта, но и, в первую очередь, определение общего состояния объекта, подвергнувшегося воздействию наночастиц или наноструктурированных веществ.

Для оценки состояния клеток на микроуровне наиболее логичным представляется использовать какую-либо разновидность микроскопии. Для определения геометрических размеров эритроцитов (длины, ширины и высоты) использовался метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для оценки других характеристик эритроцитов предлагается использовать разновидность лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) — неинвазивной методики, способной получать высоконтрастные изображения живых объектов без их модификации красителями. Помимо способности получать высоконтрастные изображения, ЛИМ позволяет количественно, с высокой точностью, оценивать фазовую высоту (параметр пропорциональный произведению толщины образца на его показатель преломления) объектов.

Для оценки изменения состояния входящих в состав клетки белков при воздействии коллоидов и модификации мембран используется метод спектроскопии комбинационного рассеяния. Данный метод позволяет неинвазивно и достаточно быстро оценить состояние различных молекул, входящих в состав клеток, оценивая спектр комбинационного рассеяния от образца. Таким образом, сочетание этих двух методов позволит оценивать состояние клетки на различных уровнях ее организации.

Прекрасным тестовым объектом для иллюстрации действия наночастиц на биологические объекты являются эритроциты — наиболее многочисленные форменные элементы крови, основное содержимое которых составляет гемоглобин. Мембрана клеток имеет двойной слой липидных и белковых компонентов и содержит большой набор ферментов. Эритроциты обладают антигенными свойствами, участвуют в гемостазе, но основная роль их — снабжение тканей кислородом и участие в транспорте углекислого газа. Эта функция эритроцитов выполняется за счет способности гемоглобина связываться с газами. Нарушение нормальной работы организма приводит к изменению характеристик эритроцитов (формы, размера, объема, свойств мембраны и т.д.), а также на количестве и свойствах гемоглобина, входящего в состав этих клеток. Кроме того, изменение характеристик самих эритроцитов, например, в результате действия наночастиц, также может привести к изменению характеристик как эритроцитов, так и входящего в их состав, гемоглобина.

Эритроциты — также и наиболее яркий пример клеток, свойства которых зависят от состояния плазматической мембраны. Холестерин является важным компонентом клеточных мембран, в том числе мембран эритроцитов. В мембране эритроцита содержание холестерина составляет порядка 25-30 %. Изменение липидного состава мембраны эритроцитов, в частности, увеличении и уменьшение содержания холестерина, приводит к изменению структуры мембраны. Увеличение содержания холестерина, как правило, приводит к увеличению вязкости и упорядоченности мембраны, снижение содержания холестерина — к снижению упорядоченности и вязкости. Предполагается, что изменение липидного состава и вязкости мембраны меняют размеры и форму эритроцитов, а также, опосредованно оказывают влияние на конформацию и O_2 -связывающие свойства мембранносвязанного и всего гемоглобина, содержащегося в эритроците, что непосредственно может оказать влияние на выполнение эритроцитами кислородотранспортной функции. Для уменьшения содержания в мембране холестерина в задаче использовался метил- β -циклодекстрин, экстрагирующий холестерин из мембраны. Для насыщения мембраны холестерином использовался раствор холестерина в метил- β -циклодекстрине.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью настоящей задачи практикума было развитие у студентов навыков самостоятельной работы оценки состояния живых клеток, при действии различных веществ, включая наночастицы.

В результате прохождения задачи студент должен освоить:

методику работы с атомно-силовым микроскопом;

методику работы с лазерным интерференционным микроскопом;

методику работы с рамановским (КР) спектрометром;

получить навыки приготовления препаратов для исследований при помощи микроскопии и КР-спектрометрии;

навыки статистической обработки полученных результатов;

навыки подготовки отчета и презентации полученных результатов.

Использованное оборудование

Для проведения задачи использовались следующие приборы:

Атомно-силовой микроскоп Солвер ПРО-М (НТ-МДТ, Россия). Сканер микроскопа позволяет сканировать область (длина-ширина-высота) $100 \times 100 \times 7$ мкм, минимальный шаг сканирования составляет 0,012 нм. Для получения изображений использовалась программа NOVA (НТ-МДТ, Россия).

Лазерный интерференционный микроскоп, разработанный в институте ВНИИОФИ, (Москва, Россия) на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4 (ЛОМО, Россия). Прибор позволяет получить как изображения эритроцитов в отраженном свете, так и интерференционное изображение клетки. В ходе исследования использовали объектив 30x с апертурой 0,65. Размеры регистрируемого кадра составлял 195×145 мкм. Для получения кадров используют программу Winphast, а также специальное программное обеспечение. Реконструкцию фазового изображения из интерференционной картины осуществляли с помощью метода фазового шага. Для захвата изображений использовалась черно-белая 12-битная ПЗС видеокамера VS-415U (NPK Videoscan, Russia), размер матрицы 6.5×4.83 мм, разрешение составляло 782×582 . В каждом опыте получали девять интерферограмм, время сохранения интерферограммы определялось временем экспозиции камеры (обычно 20 мсек). Время сохранения изображения составляет менее 2 секунд, общее время получения фазового изображения составляла около 10 секунд (на стандартном PC Pentium IV, 3.2 GHz, 1 Гб RAM, OS Windows XP). В качестве источника излучения использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 650 нм и мощностью 5 мВ (мощность излучения на объекте была менее 2 мВт).

Спектрометр комбинационного рассеяния. В качестве источника света использовался лазер с длиной волны 473 нм, мощность излучения, приходящаяся на объект, составляла

10 мВт. Для записи спектров на ПК со спектрометром совмещалась система регистрации изображения на основе линейной матрицы Hamamatsu (производитель ООО «МОПС», Россия).

Персональный компьютер, предназначенный для обработки результатов с предустановленными программами FIJI (США) и демоверсией программы Microcal Origin (Microcal Inc., США).

Расходные и вспомогательные материалы

Используемые материалы

1. Холестерин, М β CD (Sigma, USA).
2. NaOH, гидроксилламин гидрохлорид, нитрат серебра, NaCl, KCl, Na₂HPO₄ × 12H₂O, NaH₂PO₄ × 2H₂O, 25% раствор глутарового альдегида (Sigma, USA).
3. CaCl₂, MgSO₄, хлороформ, глюкоза, гепарин, отечественного производства, градации не ниже ч.д.а.

Вспомогательное оборудование

1. центрифуга MiniSpin Plus производства фирмы Eppendorf, США.
2. вортекс «Bio Vortex V1» производства фирмы «Biosan», Латвия
3. магнитная мешалка MSH 300 производства фирмы «Biosan», Латвия
4. твердотельный термостат «Термит», Россия
5. рН-метр pH410 производства фирмы «Аквилон», Россия

Приготовление необходимых растворов

Методика забора крови

Осуществляется преподавателем

Объект исследования – эритроциты, – выделяют из крови белых лабораторных крыс. Для этого животное наркотизируют хлороформом, проводят декаптацию и собирают кровь в лабораторный стакан, содержащий в качестве антикоагулянта гепарин (40 мкл на 8-10 мл крови). Хранение крови осуществляется при комнатной температуре.

Приготовление растворов на основе буфера Аллена

Приготовление данных растворов выполняется в рамках проведения задачи «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран».

Приготовление изотонического буфера Аллена (мМ):

145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgSO₄, 4 Na₂HPO₄ × 12H₂O, 1 NaH₂PO₄ × 2H₂O, 10 глюкоза, то есть на 100 мл раствора взвешиваем: 841 мг NaCl, 37 мг KCl, 110 мкл 10 % раствора CaCl₂, 12 мг MgSO₄, 143 мг Na₂HPO₄ × 12H₂O, 15 мг NaH₂PO₄ × 2H₂O, 180 мг глюкозы, последовательно разбавляем в воде. pH доводим 1М раствором NaOH до 7,4.

Для экстракции холестерина из мембраны эритроцитов готовили 20 mM раствор МβCD в буфере Алена, хранили при 4°C в темноте.

Для насыщения мембраны эритроцита холестерином готовили раствор холестерина в МβCD. Для этого 4 мг холестерина перемешивали в стеклянном гомогенизаторе с 3 мл раствора МβCD и обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т при токе 8 мА и частоте 22 кГц в течение 1 часа, затем инкубировали ночь при 37°C и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин для удаления нерастворенного холестерина. В работе использовали собранный супернатант. Хранили в темноте при 4°C.

Приготовление растворов коллоидов серебра

Приготовление растворов осуществляется аналогично растворам коллоидов, использованных в задаче «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра».

Коллоидный раствор серебра получали восстановлением AgNO₃ гидроксиламин гидрохлоридом. Для этого раствор, содержащий 90 мл 3,33·10⁻³ М раствора гидроксида натрия и 0,5 мл гидроксиламин гидрохлорида, перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение 2 мин. Далее, не прекращая перемешивания, в реакционную смесь в два этапа добавляли 10 мл 10⁻² М раствора нитрата серебра. Созревание коллоидов – 10-15 мин.

Получение эритроцитов с уменьшенным или увеличенным содержанием холестерина в мембране

Изготовление эритроцитов осуществлялось в рамках проведения задачи «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран»

Для осуществления процесса встраивания или экстракции холестерина из мембраны эритроцита готовили 6 микроцентрифужных пробирок Эппендорфа – 2 для контрольных проб, 2 – для инкубации с МβCD, 2 – для инкубации эритроцитов с раствором холестерина в МβCD. В

каждую пробирку вносили 200 мкл эритроцитарной массы. В контрольные пробирки добавлять буфер Алена (1800 мкл), в опытные – 1500 мкл буфера Алена и 300 мкл 20 mM раствора MβCD или раствора холестерина в MβCD. Пробы бережно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30 мин при периодическом (1 раз в 5 мин) перемешивании. Для удаления MβCD и остатков холестерина из суспензии эритроцитов производили отмывку эритроцитов в буфере Алена. Для этого инкубируемые пробы центрифугировали 5 мин при 2000 об./мин. Центрифугирование крови и эритроцитарной массы во всех случаях проводили при комнатной температуре (а не при 4°C, как это обычно принято при работе с кровью и эритроцитарной массой) для того, чтобы избежать большого перепада температур при инкубации клеток при 37°C. Супернатант после первого центрифугирования собирают в пробирки Эппендорфа для определения степени гемолиза клеток. Далее пробы разбавляли буфером Алена, перемешивали и снова проводили центрифугирование. Цикл отмывки повторяли еще 4 раза. Полученную после отмывки эритроцитарную массу объединяли для контрольных и опытных проб соответственно.

Приготовление образцов для АСМ и ЛИМ

Осуществляется преподавателем

Для приготовления образцов для ЛИМ использовали смешанную кровь крыс, полученную путем декапитации, в качестве антикоагулянта использовали гепарин (25 ед./мл), кровь использовали в течение 2 часов. Для увеличения времени хранения проводилась фиксация препаратов. Кровь разводили в буфере Аллена (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM глюкозы, pH 7.4) в 200 раз, затем производили фиксацию клеток глутаровым альдегидом (Sigma) (конечная концентрация глутарового альдегида составляла 0.5%) в течение 1 часа. Отмывку клеток от глутарового альдегида проводили дистиллированной водой путем четырехкратного центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин. Все операции проводили при комнатной температуре.

При приготовлении препарата для АСМ клетки наносили на предметное стекло в виде капли и высушивали на воздухе.

Образцы для ЛИМ получали нанесением клеток на зеркальное предметное стекло в виде капли с последующим высушиванием на воздухе. За час до проведения измерений на предметное стекло, содержащее эритроциты, наносили каплю раствора глицерин-дистиллированная вода в соотношении 1:1 и покрывали покровным стеклом

Программное обеспечение:

1. MORS – программа для регистрации спектров КР;
2. PyLab – программа для обработки спектров КР (вычитание базовой линии, определение основных интенсивных пиков);
3. Winphast – программа для получения фазовых изображений;

4. FIJI – разновидность программы ImageJ, предназначена для первичной обработки фазовых изображений, полученных методом ЛИМ;
5. Microcal Origin (демоверсия) – программа для стат. обработки данных полученных при помощи методов КР-спектроскопии и ЛИМ.

Объекты исследования

Объектами исследования являлись эритроциты крыс в условиях *in vitro*, а также фиксированные эритроциты крыс.

Используемые методы

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия)

Метод лазерной интерференционной спектроскопии

Методика приготовления фиксированных эритроцитов

Метод атомно-силовой микроскопии

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

Атомно-силовая микроскопия

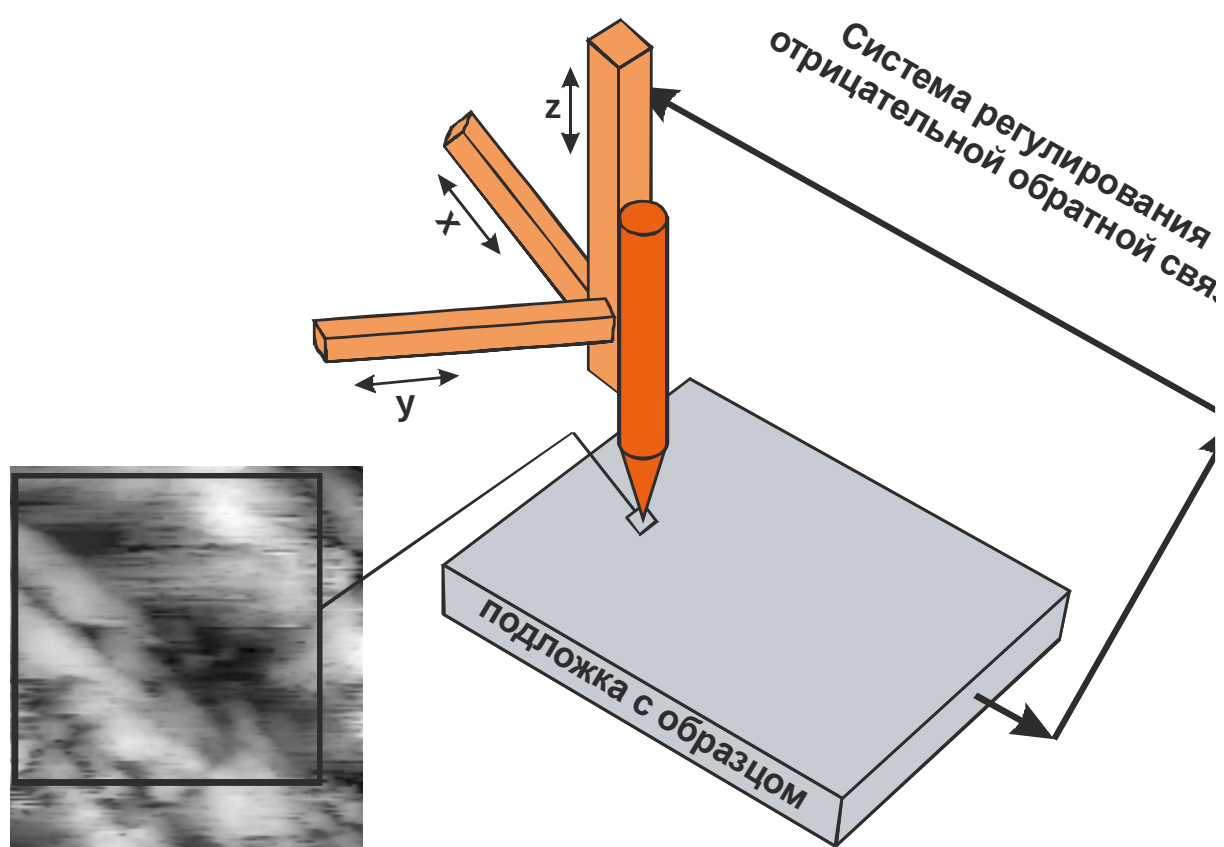


Рис. 1. Принципиальная схема сканирующего зондового микроскопа. В качестве примера представлено СТМ изображение белка –пероксидазы хрена, нанесенной на подложку из высокоориентированного пирографита. Размер стороны квадрата 30 нм.

Атомно-силовая микроскопия является разновидностью сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). СЗМ представляет собой совокупность методов исследования поверхности, использующих различные принципы. Главной особенностью сканирующей зондовой микроскопии является наличие микроскопического *зонда*, который, перемещаясь по выбранному участку исследуемой поверхности образца (сканирование), взаимодействует с каждой точкой внутри выбранного участка. Характер взаимодействия зонда с поверхностью определяется разновидностью СЗМ: оценивается либо прямое взаимодействие зонда и образца, либо при помощи системы обратной связи. Результатом сканирования образца является построение топографического изображения исследуемого участка, где координата z представляет из себя величину, зависящую от взаимодействия зонда с поверхностью в каждой точке образца. Кроме того, возможно оценить изменение

величины взаимодействия зонда в каждой точке поверхности в течение времени, т.е. оценить динамику изменения регистрируемого параметра в точке. Принципиальная схема сканирующего зондового микроскопа приведена на рисунке 1.

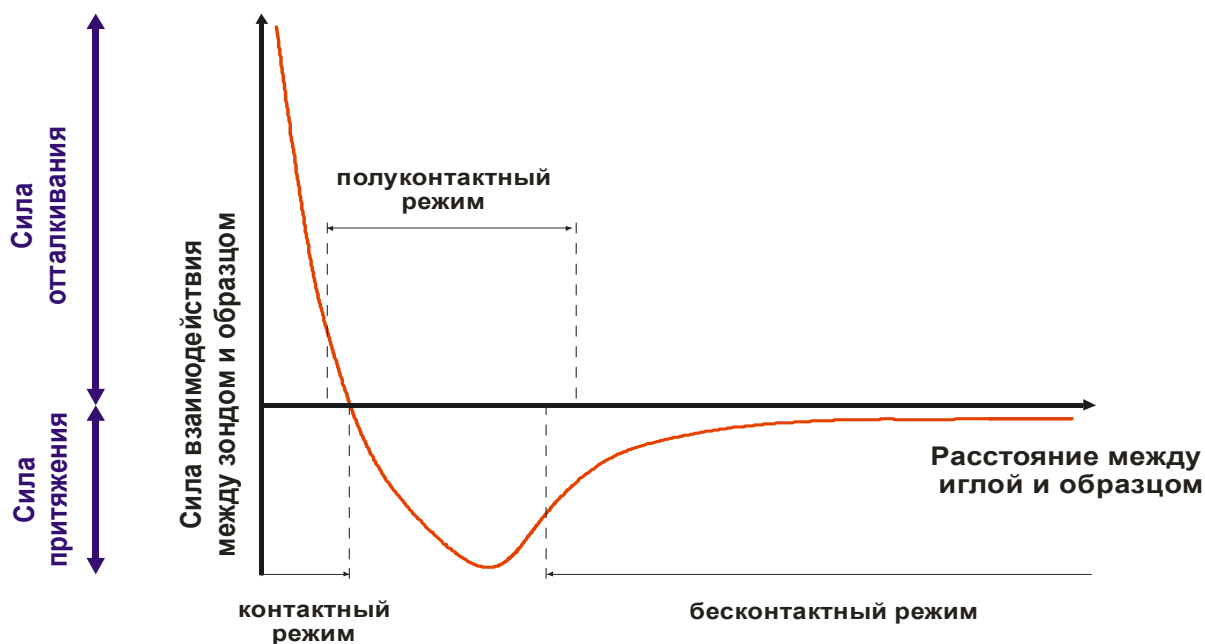


Рис. 2. Типичная зависимость силы взаимодействия от расстояния между острием зонда и поверхностью образца. Также на рисунке указаны участки кривой, относящиеся к различным режимам работы атомно-силового микроскопа.

К разновидностям СЗМ относят: сканирующую туннельную микроскопию, оценивающую величину туннельного тока между зондом и образцом; наиболее распространенную в биологии атомно-силовую микроскопию, измеряющую силы притяжения и отталкивания макромолекул; электрохимическую микроскопию, оценивающую величину тока, протекающего между зондом и точкой на поверхности, а также магнитно-силовая микроскопия, оценивающая величину магнитного взаимодействия между зондом и поверхностью и микроскопию ближнего поля, являющуюся комбинацией оптической и зондовой микроскопии, в которой использование оптического зонда, позволяет достичь разрешения порядка нескольких десятков нанометров.

АСМ позволяет получать изображения объектов размерами от десятых нанометров до десятков микрон. АСМ достаточно успешно используется для получения изображений и оценки свойств различных биологических объектов: кристаллов аминокислот, белков, клеточных мембран, молекул ДНК и других макромолекул, пленок из биополимеров,

вирусов, различных клеток, тканей и т.д. В качестве зонда используется гибкая макроскопическая консоль (кантилевер) с острой иглой, которая в результате нано- и микроскопических взаимодействий иглы с образцом, может быть изогнута на достаточно большую величину, которая и измеряется. Отклонение кантилевера пропорционально величине взаимодействия атомов (Ван-дер-Ваальсовы силы) зонда и образца, а также воздействию электричества, магнитного поля, трения и т.д. На малых расстояниях (порядка 1 ангстрема) между острием зонда (в идеальном случае он представляет из себя 1 атом) и атомами образца возникают силы отталкивания, на больших – силы притяжения. Существует несколько групп методик проведения измерений с помощью АСМ: контактные, полуконтактные (с прерывистым контактом) и бесконтактные (Рис. П1.2). При контактном режиме работы микроскопа контролируется сила отталкивания между образцом и острием зонда, а отклонения кантилевера отражают рельеф поверхности, а также сопротивление (если объект является проводящим) или распределение сил трения по поверхности образца. При полуконтактном режиме взаимодействие зонда с поверхностью образца не является постоянным и только в течение короткого периода зонд «ощущает» отталкивающие его силы. При бесконтактном режиме основной вклад в силу взаимодействия зонда и образца вносят силы притяжения. В настоящее время для работы с биологическими объектами используют различные разновидности полуконтактных методов или контактные методы в которых используют специальные гибкие кантилеверы. При использовании таких методов по сравнению с обычными контактными давление кантилевера на поверхность образца существенно меньше или отсутствует, что позволяет успешно работать с биологическим объектом.

Параметры, измеряемые КР-спектроскопией

Данный вид спектроскопии основан на регистрации спектров комбинационного рассеяния веществ. Комбинационное (рамановское) рассеяние света — неупругое рассеяние оптического излучения на молекулах вещества (твёрдого, жидкого или газообразного), сопровождающееся заметным изменением его частоты. В отличие от рэлеевского рассеяния, в случае комбинационного рассеяния света в спектре рассеянного излучения появляются спектральные линии, которых нет в спектре первичного (возбуждающего) света. Число и расположение появившихся линий определяется молекулярным строением вещества. Данные линии используются для оценки состояния молекулы вещества.

В работе для оценки состояния гемоглобина в эритроците использовали следующие соотношения полос КР спектров: $I_{1375}/(I_{1355} + I_{1375})$ как отношение оксигемоглобина к общему количеству гемоглобина в окси- и дезокси- форме (*это практически весь гемоглобин в клетке*); $I_{1355}/(I_{1355} + I_{1375})$ – как отношение дезоксигемоглобина к общему количеству гемоглобина в окси- и

дезоксигемоглобине; соотношение $(I_{1355}/I_{1564})/(I_{1375}/I_{1588})$ использовалась как характеристика сродства Гб к O_2 ; отношение I_{1580}/I_{1564} как оценка погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца, а отношение $I_{123}/(I_{1355} + I_{1375})$ использовалось для определения доли комплексов гемоглобин-NO по отношению к общему количеству гемоглобина.

Таблица 1. Параметры, используемые для оценки состояния гемоглобина в эритроцитах методом КР-спектроскопии.

Название	Отношение пиков	Значение
1	$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	отношение оксигемоглобина к общему количеству гемоглобина в окси- и дезокси- форме
2	$I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$	отношение дезоксигемоглобина к общему количеству гемоглобина в окси- и дезокси- форме
3	$(I_{1355}/I_{1564})/(I_{1375}/I_{1588})$	сродство Гб к O_2
4	I_{1580}/I_{1564}	оценка погруженности атома железа в плоскость порфиринового кольца
5	$I_{1623}/(I_{1355}+I_{1375})$	отношение гемоглобина, связанного с NO к общему количеству гемоглобина в окси- и дезокси- форме

Использование отношений КР-пиков, а не их абсолютных значений обусловлено тем, что абсолютное значение интенсивности спектра зависит от количества гемоглобина, и следовательно, эритроцитов в пробе и в области фокусировки лазера. Внутренняя нормировка пиков (на интенсивности других полос) обеспечивает то, что анализируемые параметры в разных пробах не зависят от количества гемоглобина, а определяются только конформацией гемоглобина и относительным содержанием его различных форм.

Лазерная интерференционная микроскопия

Распространение световой волны в пространстве по одной координате, x , с течением времени, t , можно описать следующим выражением:

$$A(x, t) = A_0 \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} x - \omega t\right) \quad (1)$$

Где A_0 - максимальная амплитуда световой волны, λ - длина волны. Выражение $\frac{2\pi}{\lambda} x - \omega t$

называется фазой световой волны. Глаз чувствителен к яркости света, которая связана с интенсивностью световой волны, которая пропорциональна квадрату A_0 . Кроме того глаз ощущает цвет, определяемый длиной волны λ . Однако человек не в состоянии визуально оценить изменение

фазы. Существуют методы позволяющие пересчитать изменение фазы в изменение интенсивности. К таким методам относится и ЛИМ.

Принцип действия ЛИМ основан на измерении локальных фаз света отраженного объектом. В приборе луч лазера разделяется на два, один из которых, проходя через клетку, отражается от зеркальной подложки, на которой находится клетка (отраженный луч). Другой луч является контрольным и не проходит через объект. При наложении отраженного и контрольного луча формируется интерференционная картина (фазовое изображение объекта). При построении фазового изображения сигнал нормируется по длине волны и определяется величина оптической разности хода (ОРХ) двух лучей иначе называемая фазовой высотой (Ф):

$$\Phi = \frac{\theta}{2\pi} \frac{\lambda}{2}, \quad (2)$$

где θ – разность фаз, рад; λ –длина волны источника, нм.

В общем случае фазовая высота, Φ , в каждой точке объекта связана с его геометрическими размерами (толщиной), z [Vishnyakov, 1998].

$$\Phi(x, y) = \int_0^{z \max} (n(x, y, z) - n_1) dz \quad (3)$$

где n_1 –показатель преломления буферного раствора, величина которого постоянна, $n(x, y, z)$ – величина показателя преломления в точке клетки с координатами x, y высотой z .

Фазовое изображение клетки представляет собой распределение величин, в различных областях объекта, а значение фазовой высоты в каждой точке (i), представляет собой сумму высот различных оптических сред (z), где n - коэффициенты преломления соответствующей среды:

$$\Phi_i = (n_1^i z_1^i + n_2^i z_2^i + \dots + n_n^i z_n^i) - n_1 z \quad (4)$$

В случае если различия показателя преломления для органелл не очень велики, и/или сами размеры объектов малы, то они не вносят существенный вклад в суммарное изменение фазовой высоты. Поэтому для безъядерных клеток, таких как эритроциты, и в отсутствии больших вкраплений, имеющих другую природу, основные различия в показателях преломления наблюдается между цитоплазмой и областью мембраны. Однако, поскольку вклад мембраны очень мал (менее 1%), можно пренебречь вкладом мембраны и оперировать неким усредненным показателем преломления клетки, зависящим от свойств веществ находящихся в цитоплазме. Для эритроцитов таким веществом является белок гемоглобин. Типичный пример фазового изображения эритроцитов представлен на рисунке 3. Таким образом для однородных клеток возможно значительно упростить формулу 4, рассчитав среднее значение фазовой высоты, Φ_{mean} , в клетке:

$$\Phi_{mean} = (n_{cell} - n_m) \cdot z_{mean} \quad (5)$$

где n_m — показатель преломления буферного раствора; n_{cell} — показатель преломления клетки; z_{mean} — средняя геометрическая высота (толщина) объекта.

Аналогичную формулу можно использовать и для ядерных клеток, однако в этом случае следует помнить, что величина фазовой высоты (и, соответственно, показателя преломления) в точке изображения будет зависеть как от общего количества вещества в точке, так и от соотношения различных веществ (например, если это ядро, то фазовая высота (показатель преломления) будет определяться, главным образом, белком и ДНК), вносящих свой вклад в фазовую высоту в данной точке.

Таким образом, зная среднее значение фазовой высоты клетки и ее площадь, мы можем оценить объем клетки, V_{cell} , определяемый, как произведение её площади, S , на среднее значение геометрической высоты:

$$V_{cell} = z_{mean} S \quad (6)$$

$$\text{или } V_{cell} = \frac{\Phi_{mean} S}{n_{cell} - n_m} \quad (7)$$

Также можно из экспериментально измеряемых параметров, Φ_{mean} и S , можно оценить содержание гемоглобина в клетке:

$$m_{Hb} = \frac{\rho_{Hb}}{(n_{hem} - n_m)} \Phi_{mean} S \quad (8)$$

где ρ_{Hb} — удельная плотность гемоглобина, которая принимается равной $1,36 \text{ г/см}^3$, — показатель преломления гемоглобина = 1.615.

Особенности применения метода ЛИМ

Основными достоинствами метода ЛИМ является получение высококонтрастных изображений живых и функционирующих клеток без их дополнительной модификации (например, использование красителей). При этом возможна количественная оценка изменения ОРХ, что позволяет при соблюдении некоторых условий оценить форму, размеры (толщину) объектов, величину показателя. Кроме того, клеточные вакуоли наполнены жидкостью (коэффициент преломления приблизительно равен коэффициенту преломления воды) или другими, более плотными веществами. Все эти особенности сказываются на суммарной оптической плотности в каждой точке объекта. В данном случае на фазовом изображении объекта цитоплазматические структуры с низким коэффициентом преломления будут выглядеть как впадины (например, вакуоли заполненные жидкостью), а клеточные органеллы, имеющие высокий коэффициент преломления — как выступы (ядро, митохондрии и т. д.). В связи с более низкой плотностью

цитоплазмы величина фазовой высоты в точке будет меньше, по сравнению с участком клетки, имеющую такую же реальную высоту, но с низким коэффициентом преломления.

Таким образом, исходя только из одного фазового изображения, достаточно тяжело определить истинные размеры (толщину) клеток. Оптическая разность хода лучей в точке зависит как от геометрических размеров образца (толщины), так и от величины показателя преломления в точке (формулы 5 и 6). Поэтому, для оценки показателя преломления клетки, величины пропорциональной концентрации вещества, необходимо независимым методом оценивать толщину (или объем) клеток.

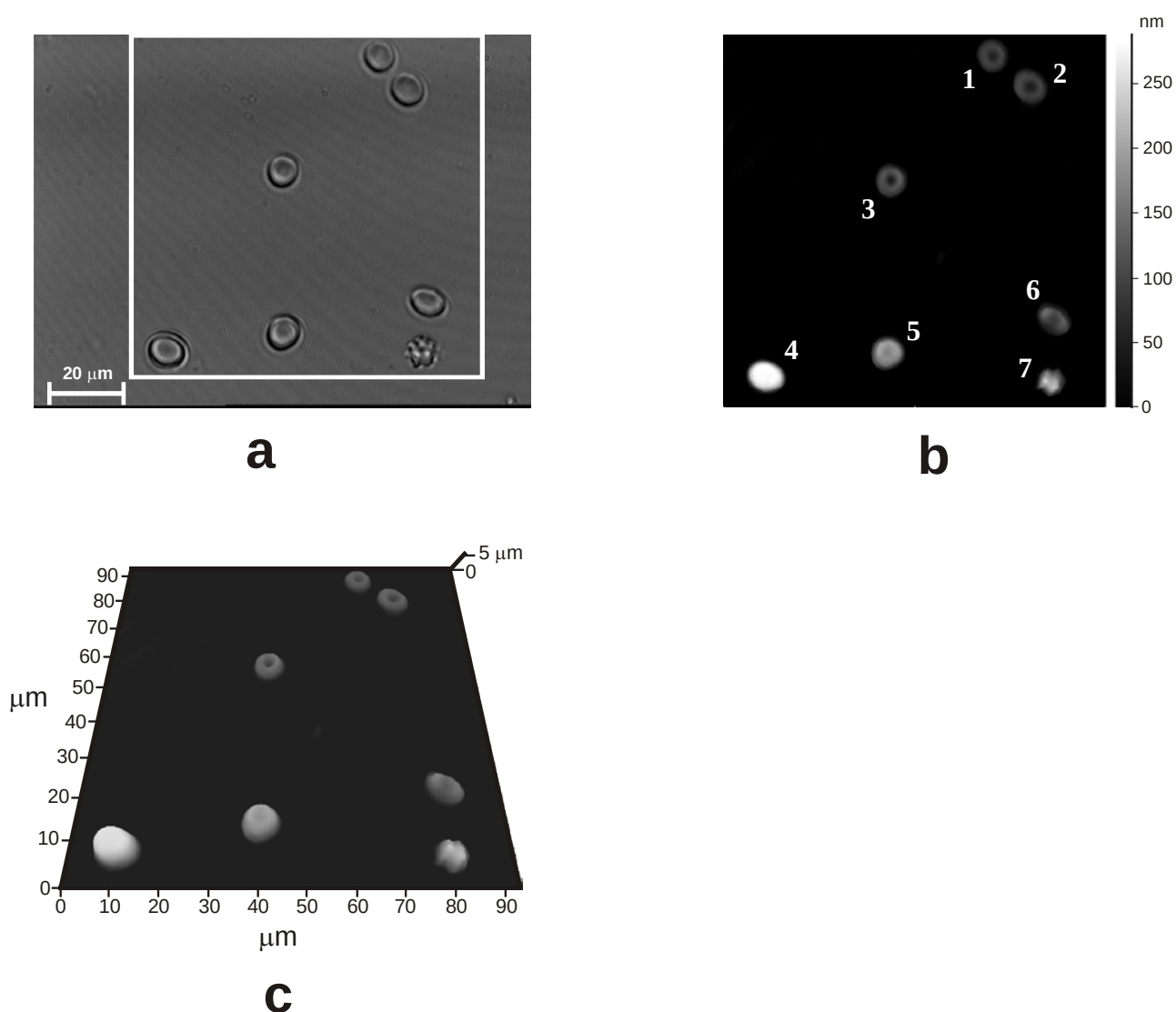


Рис. 3. Эритроциты человека в плазме крови, измеренные при помощи метода ЛИМ.

На рисунке представлено изображение различных форм эритроцитов полученное традиционным способом (а), а также фазовое изображение эритроцитов (b и c). На рисунке находятся следующие формы эритроцитов: 1, 2, 3 – дискоциты, 4 – агрегат из трех клеток, 5 – агрегат из двух клеток, 6 – стоматоцит, 7 – эхиноцит. На рис. b приведена фазовая высота клеток (в нм), на рис. c представлено трехмерное изображение объекта, фазовая высота которого пересчитана в настоящую толщину объектов (см. формулу П2.5), показатель преломления эритроцита принимался равным 1,405, показатель преломления плазмы 1,35.

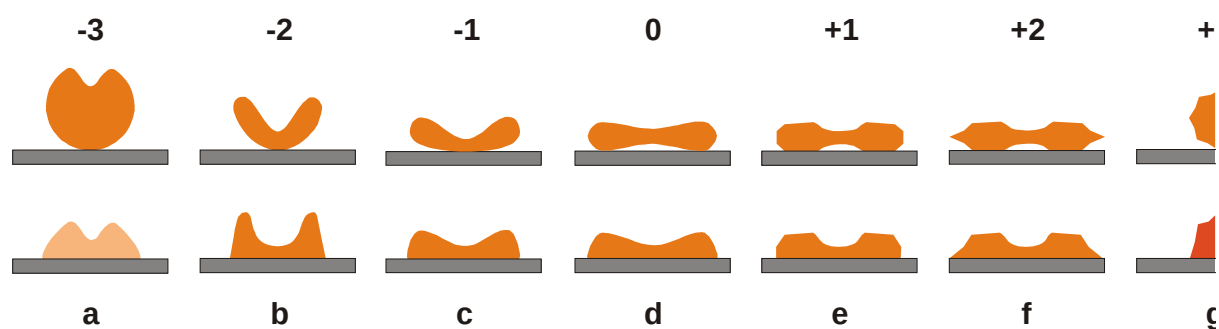


Рис. 4. Поперечные сечения различных форм эритроцитов и их фазовых изображений.

Поперечные сечения стоматоцита 3-го типа (а), 2-го типа (b), первого типа (с), дискоцита (d), и эхиноцита 1-го (е), второго (f) и третьего (g) типов – верхний ряд, а также сечения их фазовых портретов – нижний ряд.

Суммарная величина, фазовой высоты в точке не зависит от того, в какой последовательности луч проходит через различные компоненты среды (см. формулу П2.5). Это приводит к некоторым особенностям отображения клеток методом ЛИМ. Фазовая высота эритроцитов, показатель преломления которых одинаков по всему объёму клетки, пропорциональна геометрической высоте (толщине) клетки. Учитывая теоретические представления об отображении толщины клеток при помощи ЛИМ, мы предположили, как будут выглядеть объёмные фазовые изображения различных морфологических форм эритроцитов, полученных с помощью ЛИМ (Рис 4). У эритроцита, имеющего форму двояковогнутого диска – дискоцита, на фазовых изображениях толщина в центре клетки значительно меньше, чем по краям (Рис. 4d). Стоматоциты, чашеобразные клетки, имеют углубление только с одной стороны клетки, второе углубление сглаживается. Сильно модифицированные клетки – стоматоциты 3 типа в световой микроскоп напоминают «открытый рот»). На фазовом изображении эти клетки характеризуются большей толщиной и меньшей площадью по сравнению с дискоцитами (Рис. 4b, c). Эхиноциты должны характеризоваться локальными выростами, что также приводит к изменению толщины клетки (Рис. 4e, f). Очевидно, что в случае серьезных морфологических изменений формы клетки плоские дисковидные эритроциты становятся более округлыми (Рис. 4a, g).

Для оценки морфологической картины суспензии эритроцитов используется морфологический индекс. Каждой клетке на изображении присваивался определенный балл в соответствии с ее формой. Стоматоцитам третьего типа присваивалось значение -3, второго -2, первого -1, дискоцитам 0, эхиноцитам первого типа +1, второго +2, третьего +3 (Рис. 2). Морфологический индекс определялся как отношение суммы баллов, характеризующих клетки, деленной на общее количество клеток.

ХОД ЗАДАЧИ ПРАКТИКУМА

План работы

Выполнение задачи производилось по следующему плану:

1. Выделение крови, получение суспензии эритроцитов (выполняется в рамках задачи «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран» или предоставляется преподавателем).
2. Получение растворов, содержащих коллоиды в различных концентрациях (выполняется в рамках задачи «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра» или предоставляется преподавателем).
3. Получение эритроцитов с уменьшенным и увеличенным содержанием холестерина путем инкубации эритроцитов с метил- β -циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из плазматической мембраны, и с раствором холестерина в метил- β -циклодекстрине, увеличивающем содержание холестерина в мембране, соответственно (выполняется в рамках задачи «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран» или предоставляется преподавателем).
4. Получение КР-спектров от эритроцитов с различным содержанием холестерина и эритроцитов, инкубируемых в растворе коллоидов различной концентрации (не менее трех измерений от каждой пробы).
5. Фиксация эритроцитов с различным содержанием холестерина и эритроцитов в растворах, содержащих коллоидные частицы серебра. Изготовление препаратов для АСМ и ЛИМ.
6. Определение геометрических размеров эритроцитов методом АСМ.
7. Оценка морфологии, измерение площади и средней фазовой высоты эритроцитов при помощи ЛИМ (для получения достоверного результата показатели рассчитывают, используя не менее 100 клеток от каждого образца).
8. Обработка КР-спектров, определение отношений пиков КР-спектра для эритроцитов с различным содержанием холестерина и эритроцитов в растворах, содержащих коллоидные частицы серебра.
9. Определение морфологического индекса, расчет средних значений площади, средней фазовой высоты и содержания гемоглобина в эритроцитах с различным содержанием холестерина и эритроцитов в растворах, содержащих коллоидные частицы серебра методом ЛИМ, а также определение средних размеров эритроцитов методом АСМ.
10. Написание отчета.

11. Сдача отчета.

ОФОРМЛЕНИЕ ЗАДАЧИ ПРАКТИКУМА

После окончания работы над задачей студенты сдают письменный отчет, который является основной формой отчетности по настоящей задаче, и содержащий следующие материалы:

1. **Титульный лист** со всеми подписями. Образец титульного листа приведен в приложении 1;
2. **Оглавление**;
3. Краткое теоретическое **Введение** в котором приводится обоснование для применения методов, используемых в задаче, к исследуемым объектам (эритроцитам);
4. **Цели и задачи** исследования;
5. **Методы исследования**, в этом разделе приведены основы используемых в задаче методов (см. **Приложение 2**), а также особенности измерений применительно к используемым объектам (эритроциты);
6. **Результаты**, в этом разделе приведены корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов включая изображения типичных объектов измеренных различными методами, а также средние значения с разбросами и гистограммы распределения измеренных величин в настоящем разделе должны быть приведены типичные изображения объектов, примеры типичных КР-спектров, для ЛИМ и АСМ приведены гистограммы распределения измеряемых параметров, а также сводные таблицы и/или рисунки для данных КР-спектроскопии и ЛИМ с указанием среднего значения и разбросов (стандартного отклонения).

Таблица 1 – Форма таблицы с результатами, полученными методом КР-спектроскопии

(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Проба	$I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$	$I_{1355}/(I_{1355}+I_{1375})$	$(I_{1355}/I_{1564})/(I_{1375}/I_{1588})$	I_{1580}/I_{1564}	$I_{1623}/(I_{1355}+I_{1375})$
1					
2					
...					

Таблица 2 – Форма таблицы с результатами, полученными методом ЛИМ

(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Проба	Диаметр ($L \pm \Delta L$) мкм	Площадь ($S \pm \Delta S$) мкм ²	Максимальная фазовая высота ($\Phi_{\max} \pm \Delta \Phi_{\max}$) нм	Средняя фазовая высота ($\Phi_{\text{mean}} \pm \Delta \Phi_{\text{mean}}$) нм	Содержание гемоглобина ($\text{Hb} \pm \Delta \text{Hb}$) пг
1					
2					
...					

Таблица 3 – Форма таблицы с результатами, полученными методом АСМ

(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)

Проба	Диаметр ($L \pm \Delta L$) мкм	Площадь ($S \pm \Delta S$) мкм ²	Высота ($\Phi_{\max} \pm \Delta \Phi_{\max}$) мкм
1			
2			
...			

7. **Выводы**, в настоящем разделе студенты самостоятельно интерпретируют полученные результаты;
8. **Литература**, в разделе приводится список используемой литературы.

Отчет о выполнении задачи выполняется в электронном виде, на одной стороне листа формата А4 (297х210мм).

Все страницы текста и таблицы должны быть пронумерованы. Объем отчета не должен превышать 40-45 страниц.

ОЦЕНКА ИТОГОВ ПРАКТИКУМА

По представленному отчету преподавателем проводится устная беседа со студентами, в ходе которой студенты отвечают на контрольные вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, а также по ходу выполнения работы. Контрольные вопросы прилагаются ниже. В качестве варианта предлагалось выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

Список контрольных вопросов

1. Что такое комбинационное рассеяние?
2. Какие параметры используются для оценки состояния гемоглобина методом КР?
3. Что такое зондовая микроскопия?
4. Какие параметры измеряет метод АСМ?
5. Какие параметры измеряет метод ЛИМ?
6. Какие особенности измерения биологических объектов существуют при использовании ЛИМ?
7. Какую информацию можно получить при использовании метода ЛИМ при исследовании биологических объектов?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках выполнения настоящей задачи студенты должны освоить следующие навыки: методику работы с лазерным интерференционным микроскопом;

методику работы с АСМ микроскопом;

методику работы с рамановским (КР) спектрометром;

получить навыки приготовления препаратов для исследований при помощи микроскопии и КР-спектрометрии;

навыки статистической обработки полученных результатов;

навыки подготовки отчета и презентации полученных результатов.

Данная задача позволяет получить и применить самостоятельно навыки работы оценки состояния клеток и входящих в их состав нанообъектов при воздействии коллоидных частиц серебра, а также при различном соотношении холестерина в мембране.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. 1989. Лабораторные методы исследования в клинике. "Медицина", Москва.
2. Козинец, Г. И. и Симоварт, Ю. А. 1984. Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови. Таллин: Валгус.
3. Кэрри, П. (1985). Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. Москва: Мир.
4. Соловьев, К. Н., Гладков, Л. Л., Старухин, А. С. и Шкирман С.Ф. 1985. Минск: Наука и техника.
5. Шиффман, Ф.Д. 2001. Патолофизиология крови. Санкт-Петербург.
6. Юсипович А.И., Брызгалова Н.Ю., Паршина Е.Ю., Ломакин А.Г., Родненков О.В., Левин Г.Г., Максимов Г.В., и Рубин А.Б. Применение лазерной интерференционной микроскопии для

оценки формы и состояния эритроцитов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2008. 3, 357-360.

7. Bernhardt I., Ellory J.C. Red Cell Membrane Transport In Health And Disease. Springer, 2003. 748p.
8. Yusipovich, A., I, Parshina, E. Y., Brysgalova, N. Y., Brazhe, A. R., Brazhe, N. A., Lomakin, A. G., Levin, G. G., и Maksimov, G., V. Laser interference microscopy in erythrocyte study. J.Appl.Phys. 2009. 105(10), 102037.