

УДК 549.211

## **ВЛИЯНИЕ ГЕТЕРОАУКСИНА НА СОСТОЯНИЕ ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКИ НАНОЧАСТИЦ АЛМАЗА КАК МОДЕЛЕЙ БИОМЕМБРАН И МАКРОМОЛЕКУЛ**

**З.А. Симонова, П.Е. Кузнецов**

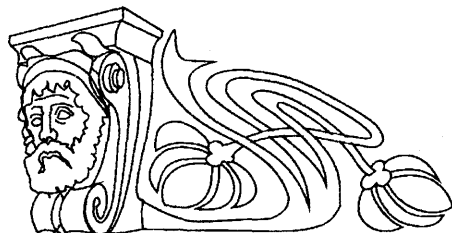
Саратовский государственный университет,  
кафедра биохимии и биофизики  
E-mail: biofac@sgu.ru

В настоящей работе показано, что в качестве моделей биосистем молекулярного и супрамолекулярного уровня целесообразно использовать гидрозоль наночастиц ультрадисперсного алмаза, в частности при изучении воздействия различных факторов на водное окружение биологических структур. Изучено влияние индолил-3-уксусной кислоты на состояние приповерхностной воды методом флуоресцентного зондирования. Экспериментально установлено, что определенные концентрации индолил-3-уксусной кислоты вызывают значимое снижение подвижности воды вблизи поверхности наночастиц. В работе выдвинуто и обосновано предположение, что ИУК может вызывать фазовый  $\lambda$ -переход в структуре сетки водородных связей приповерхностной воды.

**Influence of heteroauxin on the hydrated shell condition of nanoparticles of diamond as models of biomembranes and macromolecules**

**Z.A. Simonova, P.E. Kuznetsov**

The paper shows that nanoparticle hydrosols of ultradispersed diamond can be used as models of biosystems on the molecular and supramolecular level,



in particular, in analysis of the influence of different factors on the water environment of biological structures. The influence of indolyl-3-acetic acid on the near-surface water state by fluorescent probing was studied. Some concentrations of indolyl-3-acetic acid have been established to significantly decrease the water motility near the surface of nanoparticles. A supposition is put forward and justified that indolyl-3-acetic acid may induce phase  $\lambda$ -transition in the hydrogen bond network of the near-surface water.

Гетероауксин, или индолил-3-уксусная кислота (ИУК) — известный стимулятор роста растений. Однако механизм его биологического действия до конца не известен. Считают, что первичная, быстрая реакция на ИУК, осуществляемая за 10–15 мин, происходит из-за снижения pH в водной фазе клеточной стенки при индукции гетероауксином мембранного насоса, перекачивающего ионы  $H^+$ . Вторичная, медленная реакция на ауксин обусловлена, видимо, синтезом, или актива-



цией ферментов, катализирующих образование полисахаридов [1].

В самые последние годы обнаружен, выделен и охарактеризован белок АВР1 — предполагаемый рецептор ауксина. Представлены некоторые доказательства того, что этот белок действительно является рецептором. Так, обнаружено связывание ауксина с АВР1: константы связывания ауксина и его структурных аналогов хорошо коррелируют с их стимулирующим эффектом, определенным по скорости роста растений. Вместе с тем эти доказательства носят скорее косвенный характер и полной уверенности в том, что АВР1 — действительно рецептор ауксина, до сих пор нет [2].

Полученные ранее результаты [3] позволяют предположить, что немонотонность биологического отклика может быть связана с изменением структуры сетки водородных связей приповерхностной воды вблизи клеточных мембран и, возможно, вблизи интегрального рецептора и ферментов.

Гидратные структуры привлекают пристальное внимание ученых, работающих в области супрамолекулярной химии, молекулярной биологии, биохимии.

Известна способность некоторых природных и синтетических биорегуляторов снижать подвижность и увеличивать слой приповерхностной воды. Предполагается, что это связано со способностью данных соединений вызывать фазовый  $\lambda$ -переход в структуре сетки водородных связей приповерхностной воды, а снижение коэффициента самодиффузии приповерхностной воды является следствием этого перехода типа порядок—беспорядок [4].

Вероятно, такой эффект приводит к изменению параметров их трансмембранного транспорта и связывания с рецепторами. Для его изучения целесообразно применять модели макромолекул или клеточных мембран, созданных на основе наночастиц. Это позволяет выделить из множества процессов, происходящих вблизи мембраны или макромолекулы, только те, которые связаны с влиянием исследуемых соединений на состояние сетки водородных связей воды вблизи поверхности.

Использование методов флуоресцентного зондирования позволяет напрямую оценить изменение диффузионной подвижности приповерхностной воды [5].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния индолил-3-уксусной кислоты на состояние примембранной воды вблизи твердых поверхностей методом флуоресцентного зондирования.

Предлагаемый нами путь основан на том,

что в водном растворе с низкой концентрацией определяемого вещества специально создается твердая поверхность большой площади. С этой целью создают гидрозоль наночастиц ультрадисперсных алмазов (УДА). Проведенные ранее исследования [6] позволяют утверждать, что гидрозоль УДА целесообразно использовать в качестве моделей биосистем молекулярного и супрамолекулярного уровня, в частности при изучении воздействия различных факторов на водное окружение биологических структур. Эти гидрозольные ранее были предложены в качестве модельных систем [7], поскольку их частицы инертны и имеют диаметр, сопоставимый с размером биологических макромолекул (4 нм).

Индикатором, реагирующим на подвижность приповерхностной воды изменением оптических свойств, может служить хорошо известный флуоресцентный зонд на подвижность воды — 4-диметиламинохалкон.

Нами были проведены экспериментальные работы по изучению влияния ИУК на состояние примембранной воды. В своих экспериментах мы использовали дистиллированную воду, обеспыленную и стерилизованную фильтрованием с помощью вакуумного насоса через воронку Бюхнера с микробиологическим фильтром, диаметра пор 0,4 мкм. Далее эта вода подвергалась деаэрированию под вакуумом в течение 1 часа.

Мы применяли ИУК, полученный от фирмы Aldrich, чистоты 98%. Исходный раствор ИУК с концентрацией  $5.2 \times 10^{-5}$  М готовили смешиванием спиртового раствора этого вещества с водой в соотношении 1:1000. Водные растворы ауксина готовили методом последовательного разведения. Растворы ИУК перед измерением выдерживали в герметичных бюксах при температуре 25°C в течение 24 часов.

В качестве флуоресцентного зонда использовали спиртовой раствор 4-диметиламинохалкона с концентрацией  $10^{-2}$  М. Синтез 4-диметиламинохалкона (ДМХ) проведен А.К. Рамазановым на кафедре органической химии СГУ по методу, предложенному Ю.А. Владимировым и Г.Е. Добрецовым [5].

В своих экспериментах мы использовали наночастицы УДА, полученные от Красноярского НЦ СО РАН, с концентрацией 0.05 мг/мл. Гидрозоль был получен трехкратным ультразвуковым дезинтегрированием по 30 секунд (Epan, максимальная мощность).

Исследуемые образцы содержали наночастицы УДА, спиртовой раствор ДМХ с концентрацией  $10^{-5}$  М и ИУК с концентрациями от  $10^{-3}$  до  $10^{-11}$  мг/мл (от  $10^{-5.2}$  до  $10^{-13.2}$  М). Пробы выдерживали в герметичных бюксах



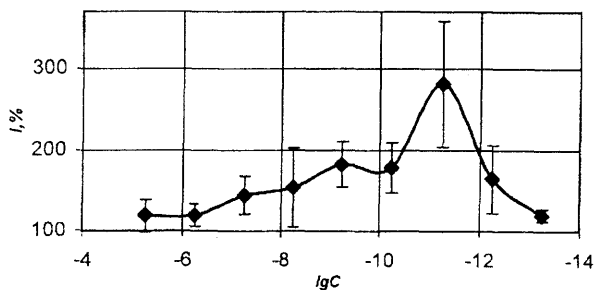
в суховоздушном термостате ТС-80 (Россия) при температуре 30°C в течение 1 часа, после чего проводили измерения.

Эксперименты по исследованию флуоресценции осуществлялись на кафедре биохимии и биофизики СГУ с использованием спектрофлуориметра «Флюорат-02-Панорама». Измерения проводили в флуориметрическом режиме работы прибора при длине волны возбуждения 422 нм с полной коррекцией. Спектральный диапазон сканирования эмиссии 518–522 нм. Интенсивность света, рассеянного гидрозолями, приготовленными аналогично, но в отсутствии ИУК и ДМХ, вычиталась из интенсивностей, полученных в экспериментах. За 100% принималась интенсивность флуоресценции ДМХ в описанных гидрозолях в отсутствии ИУК.

В данной работе изучалось влияние индолил-3-уксусной кислоты на состояние приповерхностной воды вблизи твердых гидрофобных поверхностей методом флуоресцентного зондирования. Ранее [8] ЯМР-методом инверсии-восстановления была исследована спинрешеточная релаксация протонов воды в гидрозолях УДА в широком интервале содержания дисперсной фазы  $\phi$ . Было показано, что при низком содержании УДА ( $\phi < 1,5$  мг/мл) гидрозоль содержит частицы со средним радиусом  $\sim 20$  нм, являющиеся плотными агрегатами частиц размером 4 нм. В таких гидрозолях из-за плотной упаковки наночастиц приповерхностная вода, попадая в мелкие поры, будет иметь малую подвижность, имитируя воду внутри глобулярного белка. Одновременно частицы дисперсной фазы имеют большую толщину гидратной оболочки, сопоставимую с их радиусом [6]. Это позволяет создавать большой объем приповерхностной воды, имитирующей воду, связанную на поверхности мембран или белков. Проведенные исследования [8] позволяют утверждать, что такие гидрозоли УДА целесообразно использовать в качестве моделей биосистем молекулярного и супрамолекулярного уровня, в частности при изучении воздействия различных факторов на водное окружение биологических структур. Поэтому в настоящей работе использовался гидрозоль УДА с  $\phi = 0,05$  мг/мл. Кроме того, низкие концентрации УДА позволяют исследовать гидрозоли этих наночастиц оптическими методами.

Авторами статьи использовался известный эффект увеличения интенсивности флуоресценции ДМХ при снижении диффузионной подвижности воды [5].

Результаты получены усреднением по пяти сериям независимых измерений и приведены на рисунке.



Изменение относительной интенсивности ( $I$ ) флуоресценции 4-диметиламинохалкона в зависимости от молярной концентрации ( $C$ ) индолил-3-уксусной кислоты в гидрозоле наночастиц алмаза

Из графика видно, что определенные концентрации ИУК вызывают значимое снижение диффузионной подвижности воды вблизи поверхности наночастиц. Следует отметить немонотонность зависимости подвижности приповерхностной воды от концентрации ИУК.

Кроме того, обращает на себя внимание тот факт, что малые концентрации ИУК (до  $\sim 10^{-10}$  М) способны вызывать значимое изменение подвижности воды.

Причина немонотонности зависимости подвижности приповерхностной воды от концентрации определенных веществ исследовалась ранее в работе [4], где в рамках теории Н.Н. Боголюбова показано, что таковой, вероятно, является фазовый  $\lambda$ -переход в структуре сетки водородных связей приповерхностной воды.

Стоит сказать несколько слов о фазовых переходах, представляющих собой изменение состояния непрерывной среды, в данном случае – сетки водородных связей воды. При фазовом переходе первого рода, например при переходе лед–вода, приходится тратить энергию на разрыв водородных связей. При фазовом переходе второго рода число водородных связей сохраняется, но скачком, резко происходит перестройка сетки водородных связей. Фазовый  $\lambda$ -переход близок к переходу второго рода, в этом случае также идет перестройка сетки водородных связей без сокращения их количества. Однако фазовый  $\lambda$ -переход представляет собой чаще наблюдаемую более реалистичную ситуацию, при которой переход происходит не в точке, а плавно [9]. При этом длительно могут сосуществовать обе фазы – с измененной и неизменной структурой сетки водородных связей.

В области фазового  $\lambda$ -перехода коэффициент самодиффузии воды снижается. Дело в том, что в области перехода не существует разности химического потенциала между фазами. Значит, нет и движущей силы диффузии, поскольку движущая сила диффузии – градиент химического потенциала. Поэтому с точки зрения формальной термодинамики в точке фа-



зового перехода происходит обращение коэффициента диффузии в ноль. Следовательно, в случае обнаружения значительного снижения подвижности воды можно более обоснованно говорить о существовании  $\lambda$ -перехода, вызываемого растворенным веществом в структуре сетки водородных связей воды. Впервые этот эффект описан М.Ф. Вуксом с соотр. [10].

Таким образом, полученные результаты не противоречат гипотезе о том, что ИУК может вызывать фазовый  $\lambda$ -переход в структуре сетки водородных связей приповерхностной воды.

Они позволяют предположить, что немонотонность зависимости подвижности воды от концентрации ИУК в водной фазе, по крайней мере частично, обуславливает немонотонность биоэффекта ИУК. Это может быть связано с изменением структуры сетки водородных связей приповерхностной воды вблизи клеточных мембран, что в свою очередь влияет на структуру липидного бислоя мембраны и затем на состояние интегрального АВР1-рецептора. Возможно и прямое влияние изменения сетки Н-связей на состояние рецептора.

### Библиографический список

1. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М., 1986. Т.2.
2. Романов Г.А., Обручева Н.В., Новикова Г.В., Мошков И.А. Молекулярный механизм действия фитогормонов // Физиология растений. 2002. Т. 49, №2. С. 330—336.
3. Кунцевич А.Д., Кузнецов П.Е., Назаров Г.В. и др. Роль приповерхностной воды в проявлении биологического действия опиатов // Докл. РАН. 1998. Т. 363, №4. С. 552—553.
4. Kuznetsov P.E., Gracheva A.A., Zlobin V.A. et al. Optical properties of aqueous morphine solutions // SPIE Proceedings. 2003. V. 5068. P. 396—404.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
6. Чиганова Г.А. Агрегирование частиц в гидрозольх ультрадисперсных алмазов // Коллоид. журн. 2000. Т. 62, №2. С. 272—278.
7. Kuznetsov P.E., Nazarov G.V., Aparkin A.M. et al. // Abstr. of the VII Intern. Conf. on the Problems of Solvation and Complex Formation in Solutions. Ivanovo, 1998.
8. Апаркин А.М., Назаров Г.В., Злобин В.А. и др. Ядерная ( $^1\text{H}$ ) магнитная релаксационная спектроскопия гидрозоль ультрадисперсных алмазов // Коллоид. журн. 2003. Т. 65, №6. С. 1—4.
9. Эткинс П. Физическая химия: В 2 т. М., 1980. Т.1.
10. Вукс М.Ф., Шурупова Л.В. Рассеяние света и фазовые переходы в растворах простых спиртов // Оптика и спектроскопия. 1976. Т. 40, №1. С. 154—159.