

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

на правах рукопису

ШАМОНИНА ГАННА МИХАЙЛІВНА

МЕМБРАНОТРОПНА АКТИВНІСТЬ АНГІОТЕНЗИНІВ І БРАДІКІНІНУ

ЯК ФАКТОР ЇХ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ.

03.00.11 - ембріологія, гістологія і цитологія.

03.00.04 - біохімія.

А в т о р е ф е р а т

Дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ - 1995

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00760226 (N)

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

на правах рукопису

ШАМСОНІНА ГАННА МИХАЙЛІВНА

МЕМБРАНОТРОПНА АКТИВНІСТЬ АНГІОТЕНЗИНІВ І БРАДІКІНІНУ

ЯК ФАКТОР ЇХ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ.

03.00.11 - ембріологія, гістологія і цитологія.

03.00.04 - біохімія.

А в т о р е ф е р а т

Дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ - 1995

AB 34.414

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії мембранології НДІ фізіології і на кафедрі цитології, гістології та біології розвитку біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка

Наукові керівники:

- доктор біологічних наук, професор В.К.Рибальченко
- доктор медичних наук, професор В.М.Гордієнко

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор О.І.Кононський
- доктор біологічних наук, професор В.М.Войцицький

Провідна установа - Науково-дослідний інститут ендокринології та обміну речовин АМН України

Захист відбудеться *23 квітня* 1995 р.

о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.01.13 при Київському університеті імені Тараса Шевченка за адресою: пр.Глушкова ,2, НДІ фізіології, кім.504 (актовий зал).

Відгуки на автореферат надсилати за адресою: 252033, Київ-33, вул.Володимирська,64.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Київського університету імені Тараса Шевченка за адресою:

м.Київ, вул.Володимирська,60.

Автореферат розіслано *22 березня* 1995 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук, доцент *ДВ* О.В.Данилова



## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ.** Дослідження залежності регуляторних функцій нейропептидів від їх структури - одна з комплексних проблем, що виникла на межі цілого ряду наукових дисциплін. Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених вивченню різних характеристик пептидних регуляторів, питання про їх загальні функціональні властивості до цього часу лишаються невивченими. Насамперед це стосується фізико-хімічних принципів взаємодії пептидів з плазматичними мембранами клітин і основаних на них механізмів системної організації фізіологічних функцій, бо координація гомеостатичних реакцій організму відбувається за участю нервової, ендокринної та імунної систем [Ашмарин А.П., Каменская М.А., 1988; Замятнин А.А., 1991; Чипенс Г.И. і співавт., 1990].

В останнє десятиріччя було показано [Рибальченко В.К. і співавт., 1989-1993; Schwüger R., 1985-1989; Alsina M.A., 1987], що в процесі взаємодії нейропептидів з плазматичними мембранами клітин активну роль відіграє ліпідний матрикс, активуючи мембранні рецептори та регуляторні білки. В зв'язку з цим дослідження взаємодії регуляторних нейропептидів з плазматичними мембранами клітин є одним з актуальних завдань біології та медицини. Серед нейропептидів особливе місце посідають ангіотензини і брадикінін, оскільки їх дія пов'язана з такою розповсюдженою патологією як гіпертонічна хвороба [Cleland J.G.F., 1991; Постнов Ю.И., Орлов С.Н., 1987]. Розвиток серцево-судинних патологій супроводжується змінами кількісного співвідношення ангіотензин-1: ангіотензин-2: брадикінін і впливає на процеси взаємодії цих нейропептидів з плазматичними мембранами клітин. Щоб дослідити механізми взаємодії нейропептидів з плазматичними мембранами клітин за різних умов, були вибрані плазматичні мембрани еритроцитів та саркоплазматичного ретикулу, так як на цей час невідомі специфічні рецептори до досліджуваних пептидних регуляторів.

**МЕТА І ГОЛОВНІ ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.** Метою і основним напрямком роботи є дослідження взаємодії пептидів ангіотензинів і брадикініну та амінокислот, що входять до їх складу з штучними і біологічними мембранами та визначення ролі ліпідного матриксу мембран в механізмах їх взаємодії. Для досягнення поставленої мети вирішували наступні завдання:

1. Дослідити взаємодію ангіотензинів, брадикініну та їх складових амінокислот з ліпідними моношарами та плазматичними мембранами

еритроцитів .

2. Дослідити взаємодію ангіотензину-1 та ангіотензину-2 з біомолекулярними штучними ліпідними мембранами.

3. Встановити вплив брадикініну на транспорт кальцію в везикулах саркоплазматичного ретикулуму.

4. Методами математичного моделювання прогнозувати можливу конформацію ангіотензинів і брадикініну на межі розподілу фаз водний розчин електроліту-фосфоліпід. Визначити основні механізми взаємодії досліджуваних нейропептидів з ліпідним матриксом біологічних мембран.

**НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ.** Виявлені механізми взаємодії ангіотензинів і брадикініну з ліпідним матриксом штучних та плазматичних мембран еритроцитів та везикул саркоплазматичного ретикулуму. Показано, що під впливом досліджених пептидів змінюється стан мембранної поверхні і організації ліпідного матриксу. Про це свідчать такі параметри як граничний стрибок потенціалу, поверхневий тиск, ємність і провідність ліпідного бішару. Встановлена роль амінокислот в реалізації мембранотропних ефектів ангіотензинів і брадикініну. Виявлений взаємозв'язок між частотою виявлення амінокислот в мембраноактивних пептидах та інтенсивністю їх взаємодії з модельними ліпідними мембранами. На базі отриманих даних побудована модель, що відображає механізми виникнення мембранних ефектів ангіотензинів і брадикініну. Показано, що альбумін підсилює дію брадикініну і амінокислот на моношарі ліпідів.

**ТЕОРЕТИЧНА І ПРАКТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ РОБОТИ.** Мембранна активність нейропептидів пояснює деякі фізіологічні та патологічні реакції і може бути застосована в науковій та клінічній практиці. Встановлені механізми взаємодії ангіотензинів і брадикініну, так як і амінокислот, що входять до складу їх молекул, з штучними і плазматичними мембранами розширюють уявлення про первинні процеси зв'язування з клітиною регуляторних нейропептидів, що дає можливість розробити підходи спрямованої регуляції функціональної активності клітин. З'ясування ролі амінокислот в реалізації мембранотропних ефектів ангіотензинів і брадикініну відкриває перспективи наукового обґрунтування спрямованого пошуку і синтезу нових регуляторних пептидів.

Результати досліджень впроваджені в учбовий процес при читанні курсів лекцій для студентів біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка та медичного інституту Ук

раїнської асоціації народної медицини.

**АПРОБАЦІЯ РОБОТИ.** Результати роботи були представлені на 3-му Всеукраїнському з'їзді гастроентерологів (Дніпропетровськ, 1989), Всесоюзній конференції "Нейрогуморальна регуляція" (Томск, 1989), Всесоюзному симпозиумі "Организм и среда" (Бухара, 1992), конференції, присвяченій 150-літтю кафедри фізіології людини і тварини Київського університету ім. Тараса Шевченка (Київ, 1992), Міжнародній конференції "Нейрофармакологія на рубеже двух тысячелетий" (Санкт-Петербург, 1992), I з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 1994), 14 з'їзді Українського фізіологічного товариства (Київ, 1994), 6-й симпозиум по біохімії ліпідів (Санкт-Петербург, 1995).

**ПУБЛІКАЦІЇ.** Результати роботи викладені в 14 наукових публікаціях.

**СТРУКТУРА РОБОТИ.** Робота складається з вступу, огляду літератури, глави, присвяченій матеріалам і методам досліджень, глави результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, заключення, висновків. Роботу викладено на 140 сторінках машинописного тексту та ілюстровано 15 малюнками і 7 таблицями. Список цитованої літератури включає 240 першоджерел вітчизняних і зарубіжних авторів.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Взаємодію пептидів з біологічними мембранами досліджували на плазматичних мембранах (ПМ) еритроцитів та мембрани саркоплазматичного ретикулу (СР) скелетних м'язів безпорідних кролів в модельних системах - фосфатидилхолінові ліпосоми, шари мембран, сформовані з фосfolіпідів та плазматичних мембран еритроцитів, бімолекулярні ліпідні мембрани, сформовані з фосфатидилхоліну та холестерину. В досліджах використовували розчини: 0,1 М КСІ (1-0,1 г-екв\л), 0,01 М КСІ (1-0,01 г-екв\л),  $4 \cdot 10^{-2}$  СаCl<sub>2</sub> (1-0,01 г-екв\л) та бідистильоровану воду. Пептиди були надані Рижським інститутом біоорганічної хімії.

Поверхневу активність пептидів та їх взаємодію з моношарами досліджували за допомогою установки, що складається з 2-х функціональних блоків реєстрації: поверхневого тиску та граничного отримка потенціалу. Поверхневий тиск вимірювали за Вільгельмі (George L. Gaines G. 1966) за допомогою напівзануреної платинової пластинки (чутливість методу 0,1 мН/м). Граничний стрибок потенціалу, що виникає при появі моношару на поверхні субфази, вимірювали за методом динамічного конденсатора (чутливість - 1 мВ),

В експерименті запис зазначених параметрів проводиться одночасно. За нульове значення приймали параметри поверхні розподілу фаз до нанесення поверхнево активних речовин. Розчин пептидів вносили в об'єм субфази (0,01M KCL та інш., рН 6,2) за допомогою насоса Бернуллі, що запобігав безпосередньому їх попаданню на поверхню. Ліпідні моношари формували шляхом нанесення розчину ліпідів у хлороформі на поверхню розчину електроліту до досягання необхідної величини двомірного тиску. Аналогічно наносили суспензії ПМ еритроцитів.

Вімолекулярні ліпідні мембрани (БЛМ) отримували по методу [Muller, Rudin 1964] на отворі діаметром 0.8 мм у тефлоновій комірці. Як мембраноутворюючий розчин використовували азолектин (суміш фосфоліпідів бобів сої), загальну фракцію ліпідів мозку бика в суміші з холестерином в н-декані. Концентрація ліпідів у всіх розчинах була 20 мг/мл.

Електричні характеристики БЛМ визначали за допомогою стандартних хлорсрібних електродів з агаровими містками. Поляризаційний потенціал між електродами не перевищував 1-1,5 мВ.

Електричну провідність мембран та їх ємність вимірювали за стандартними методиками [Tien, 1975; Смельченко та інш. 1990]. Різницю потенціалів подавали на мембрану за допомогою джерела, яке давало змогу одержувати постійну напругу або напругу, яка лінійно змінюється, і контролювали за допомогою цифрового вольтметра Ц-4313. Потенціал на електроді, сполученому з зовнішнім розчином електроліту (цис-сторона мембрани), задавали відносно внутрішнього об'єму тефлонової комірки (транс-сторона), який приймали за віртуальну землю. Струм крізь мембрану вимірювали в умовах фіксації потенціалу за допомогою швидкодіючого операційного підсилювача, який дає змогу реєструвати струм до 0,1 пА. Струм реєстрували двокоординатним самозаписувачем Н-307/1.

Вміст кальцію визначали за інтенсивністю флуоресценції хлоретрацикліну (ХТЦ) 10 мкМ при довжині хвилі збудження 390 нм і випромінювання 540 нм [Nagasaki, Kasai, 1980] на спектрофлуориметрі Hitachi SP850. Середовище інкубації містило 100 мМ KCL; 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1,5 мМ АТФ; 5 мМ креатинфосфат, 2-3 од. активності креатинкінази; 10 мМ HEPES; рН 6,8 при 20°C. Концентрація іонів Ca<sup>2+</sup> у середовищі для реєстрації флуоресценції ХТЦ не перевищувала 7 мкМ. Об'єм середовища інкубації 2 мл. Аналіз проводили у термостатованій камері з інтенсивним перемішуванням.

Везикули саркоплазматичного ретикулуму з скелетних м'язів кроля, що містять фрагменти лонгітудальних цистерн виділяли диференційним центрифугуванням за [Ритов та інш., 1982].

Ліпосоми готували з розчину яєчного фосфатидилхоліну у колеата натрію (100 мМ KCL, 10% гліцерин, 0,1 М-ЕДТА, 10 мг/мл колеата натрію, 10 мМ трис-HCL, рН 7,5 при 20°C, кінцева концентрація ліпиду 10 мг/мл) за допомогою діалізу проти трьох порцій середовища для розчинення фосфатидилхоліну без колеату натрію. Співвідношення об'ємів складало 1:30, час діалізу для кожної порції - 4-16 годин при постійному перемішуванні та t-40°C.

Плазматичні мембрани еритроцитів отримували за [Лапшина Е.А. Заводник І.В., 1993]. Ліпіди виділяли за [Folch J. et al, 1951]. Білок визначали за [Lowry O.H. et al, 1961].

Розрахунки можливої структури пептидних молекул розраховували за моделлю [Narita M., Kojima J., 1989, Gorbitz C.K., 1989, Фінкельштейн Ф.Б., 1975]. Результати досліджень оброблялись загальноприйнятими методами варіаційної статистики. На рисунках та таблицях представлені узагальнені дані.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

#### МЕМБРАНОТРОПНА АКТИВНІСТЬ АНГІОТЕНЗИНІВ.

Встановлено, що ангіотензин-2 та його подовжений аналог-ангіотензин-1 мають поверхнево активні властивості і при введенні в розчин електроліту формують на його поверхні адсорбційні моношари про що свідчить зростання значень граничного стрибка потенціалу (ГСП) і поверхневого тиску (ПТ) на поверхні розподілу фаз водний розчин електроліту-повітря. Концентраційна залежність зміни значень ПТ і ГСП для цих пептидів представлена на рис. 1. Інтенсивність адсорбції охарактеризовано за величинами граничної адсорбції Гібса і питомої площі, що припадає на одну молекулу пептиду у моношарі.

Для ангіотензину-2 мінімальна концентрація адсорбції, яка необхідна для початку утворення моношару, становить пересічно  $5 \cdot 10^{-7}$  М, при який стаціонарне значення ГСП встановлюється за 48 хвилин і дорівнює 74 мВ. Ангіотензин-1 починає створювати моношари на межі розподілу фаз, починаючи з концентрації  $10^{-6}$  М, значення ГСП встановлюється за 30 хвилин і дорівнює 90 мВ. Таким чином, ангіотензин-1 має більш виражені поверхнево активні властивості ніж ангіотензин-2. Рівень адсорбції Гібса для ангіотензину-2 становить пересічно  $3,7 \cdot 10^{-6}$  М/м<sup>2</sup> при площі на молекулу 0,45 нм<sup>2</sup>. Сійки

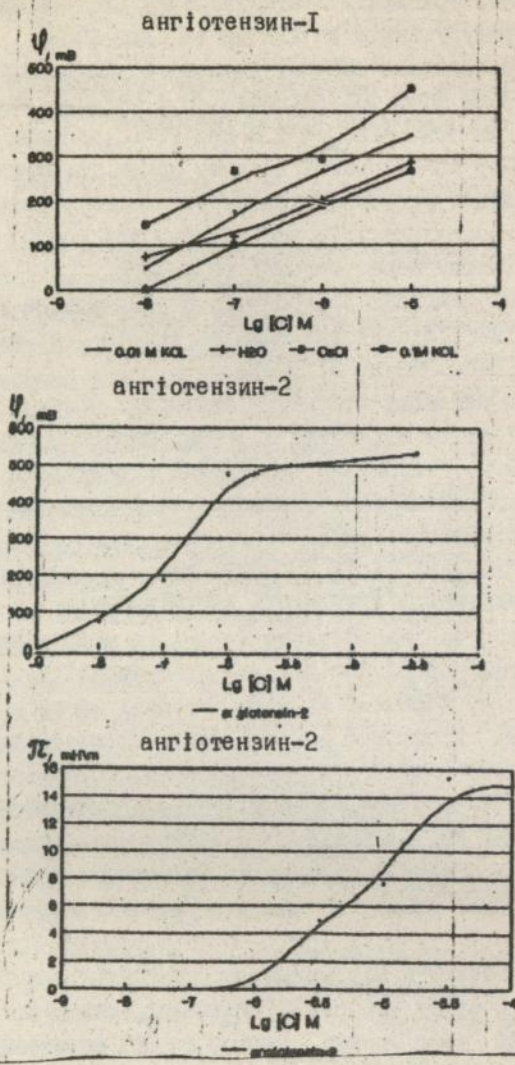


Рис.1.Зміни граничного стрибка потенціалу  $\psi$  та поверхневого тиску  $\pi$  в процесі адсорбції ангіотензину-1 і ангіотензину-2 на межі розподілу фаз водний розчин електроліту - повітря.

Табл.1.Зміни граничного стрибка потенціалу,поверхневого тиску і площі моношарів в процесі розширення-стиснення.

Моношари	Параметр моношарів					
	$\Delta S$	$\Delta\Pi$	$\Delta\psi$	S/S <sub>0</sub>	$\Pi/\Pi_0$	$\psi/\psi_0$
Азолектин	0,183	35	101	0,42	3,55	1,51
Азолектин+Брадикінін(10 <sup>-6</sup> )М	0,214	26	20	0,32	1,9	1,07
Азолектин+Ангіотензін(10 <sup>-6</sup> )М	0,187	21	49	0,41	4,2	0,55
Азолектин+Альбумін(10 <sup>-4</sup> )М	0,18	17	111	0,43	2,1	1,33
Азолектин+Фенілаланін(10 <sup>-3</sup> )М	0,186	35	361	0,41	5,3	5,01
Азолектин+Аргінін(10 <sup>-3</sup> )М	0,156	42	199	0,51	13,3	2,27
Азолектин+Гістидин(10 <sup>-3</sup> )М	0,168	22	38	0,47	2,8	1,12
Альбумін 1М	0,114	7,5	229	0,64	1,4	0,28
Альбумін+Гістидин(10 <sup>-3</sup> )М	0,08	1,6	319	0,76	1,1	0,28
Фенілаланін10 <sup>-4</sup> М	0,12	9,7	111	0,62	3,55	2,22
Азолектин+Ангіотензін(10 <sup>-7</sup> )М						
H <sub>2</sub> O	0,181	22	138	0,43	2,48	1,51
0,01 М КСІ	0,173	25	16	0,45	3,4	0,95
4*10 <sup>-4</sup> М СаСІ <sub>2</sub>	0,158	32	30	0,5	3,9	1,1
Ангіотензін-2						
9,43*10 <sup>-6</sup> М, Si-13,9 нм <sup>2</sup>	0,005	28	143	0,98	6,6	0,53
1,9*10 <sup>-6</sup> М, Si-7,2 нм <sup>2</sup>	0,02	33	30	0,96	5,1	0,86
2,8*10 <sup>-6</sup> М, Si-6,2 нм <sup>2</sup>	0,058	19	217	0,82	2,1	0,55

Табл.2.Значення відношення питомої площі молекул ангіотензину-1 та ангіотензину-2 до питомої площі молекул фосфоліпідів(S<sub>1,ат-1</sub>/S<sub>1,л</sub>) в ліпідних моношарах,сформованих в процесі адсорбції пептидів.

Склад водної фази	ангіотензін-1			
	азолектин:фосфатидилсерин:фосфатидилінозит:фосфатидилхолін			
H <sub>2</sub> O	2,5	0	1,3	3
0,01М КСІ	1,2	3,4	1,5	2,4
4*10 <sup>-4</sup> М СаСІ <sub>2</sub>	2,1	2,4	1,3	4,1
	ангіотензін-2			
H <sub>2</sub> O	5,4	4,3	3,6	13
0,01М КСІ	4,3	4,0	3,3	42,9
4*10 <sup>-4</sup> М СаСІ <sub>2</sub>	16,3	9,3	6,5	26

моношари досліджувані пептиди формують при концентраціях значно більших за  $10^{-5}$ М.

При вивченні впливу іонів калію та кальцію на адсорбцію ангіотензину-1 (рис.1) встановлено, що наявність іонів підсилює чи знижує активність адсорбції пептиду в ряду:  $0,01 \text{ M KCL} > \text{H}_2\text{O} > 4 \cdot 10^{-4} \text{ M CaCl}_2 > 0,1 \text{ M KCL}$  (рис.1.).

Моношари можуть знаходитися в декількох станах [Рубина.П., 1987]. Перехід з одного стану до іншого можна вираїти у вигляді функції:  $f[S_{n+1}(N)t] = S_n(N)t / S_0(N)t$  (1), де  $S_0(N)t$  - стан рідкої плівки;  $S_n(N)t$  - стан твердоконденсованої плівки;  $S_{n+1}(N)t$  - стан колапса. Тоді параметри розширення-стиснення моношарів:  $S$ ,  $S_0$  - площа моношару в стані рідкої плівки та моношару в твердоконденсованому стані;  $\Pi$ ,  $\Pi_0$  - поверхневий тиск і  $\Psi$ ,  $\Psi_0$  - граничний стрибок потенціалу в тих же станах. Перехід системи з стану рідкої плівки до твердоконденсованого і входження в колапс буде супроводжуватися змінами параметрів системи, що може бути вираховане. Результати розрахунків цих параметрів представлені в табл.1. Приріст значень ГСП, ПТ і площі моношарів ангіотензину-2 може свідчити про внесок електростатичних взаємодій між молекулами пептида в процесі формування адсорбційних моношарів.

В іншій серії дослідів встановлено, що пептиди мають спорідненість до моношарів фосфоліпідів, які є моделлю поверхні ліпідного матриксу, плазматичних мембран. Наявність ліпідного моношару сприяє адсорбції пептидів із розчину електроліту у нижчих початкових концентраціях в порівнянні з системою розчин електроліту - повітря. В перші 3 хвилини відбуваються зміни ГСП у моношарах фосфоліпідів, потім змінюються ПТ, що може свідчити про збудовування пептидів між ліпідними молекулами. Визначення впливу іонів водної фази на інтенсивність взаємодії пептидів з фосфоліпідними моношарами представлена в рядах:

**ангіотензин-2:** без додаткового введення солі:

азолектин > фосфатидилінозит > фосфатидилсерин > фосфатидилхолін;

при введенні  $0,01 \text{ M KCL}$ :

фосфатидилінозит > фосфатидилсерин > азолектин > фосфатидилхолін;

при введенні  $4 \cdot 10^{-2} \text{ M CaCl}_2$ :

фосфатидилінозит > фосфатидилсерин > азолектин > фосфатидилхолін;

**ангіотензин-1:**

без додаткового ведення солі:

фосфатидилінозит > азолектин > фосфатидилхолін > фосфатидилсерин;

при введенні  $0,01 \text{ M KCL}$ :

азолектин > фосфатидилінозит > фосфатидилхолін > фосфатидилсеріє;  
при веденні  $4 \cdot 10^{-2}$  М  $\text{CaCl}_2$ :  
фосфатидилінозит > азолектин > фосфатидилсерин > фосфатидилхолін.

Співвідношення величин питомої площі молекул пептидів до питомої площі молекул фосфоліпідів представлені в табл.2. Їх аналіз свідчить про взаємодію ангіотензину з ліпідними моношарами і вплив на ці процеси іонів калію і кальцію. Встановлено, що ангіотензин-2 більш активно вбудовується в моношари фосфоліпідів ніж його подовжений аналог ангіотензин-1. Характеристики модифікованих пептидами ліпідних моношарів (табл.1), як приріст площі моношару  $\Delta S$ ,  $\Delta P$  та  $S \setminus S_0$ ,  $P \setminus P_0$  - свідчать про наявність спорідненості ангіотензину-2 до іонів кальцію.

При вивченні взаємодії ангіотензину-2 та ангіотензину-1 з ліпідними бішарами (рис.2) встановлено, що при їх введенні з цис-сторони мембрани змінюється в 1,4 і 1,2 рази ємність та в 30 і 1,8 рази відповідно провідність БЛМ. Зміни електричної ємності та провідності бішарів виникають за рахунок дискретних флуктуацій, що може вказувати на формування в даних мембранах іонних каналів. Амплітудно-частотний аналіз іонних каналів, сформованих пептидами показує, що ангіотензин-2 утворює канали з провідністю від 320 до 560 пСм, з піком 400-440 пСм; ангіотензин-1 - іонні канали з провідністю від 50 до 700 пСм з піками 50-80 пСм та 480-610 пСм. Введення іонів кальцію з цис-сторони мембрани (рис.2) блокує іонні канали, сформовані ангіотензином-2, і активує іонні канали, утворені ангіотензином-1, про що свідчать збільшення провідності, частоти відкриття і часу життя каналів в цьому випадку.

Шари, сформовані з фрагментів ПМ еритроцитів є системою, що моделює поверхню клітини. Характеристики шарів плазматичних мембран еритроцитів представлені в табл.3. Аналіз результатів, представлених на рис.3, свідчить про те, що досліджувані пептиди взаємодіють з ПМ еритроцитів на межі розподілу фаз розчин електроліту-ПМ. Стационарного стану система ПМ - ангіотензин-2 переосічно досягає за 30 хвилин, а ПМ-ангіотензин-1 - за 43 хвилини. Наявність іонів калію у водній фазі підсилює взаємодію пептидів з ПМ еритроцитів можливо за рахунок інкорпорації молекул пептидів в ліпідний матрикс цих мембран. Про наявність даного процесу свідчить аналіз результатів, представлених в табл.4, таких як  $\Delta S$ ,  $\Delta P$ ,  $\Delta \psi$ ,  $S \setminus S_0$ ,  $P \setminus P_0$ ,  $\psi \setminus \psi_0$ . Така взаємодія починається вже при щільності ПМ 5-8 мн/м.

Табл.3.Зміни граничного стриска потенціала (ГСП) і поверхневого тиску (ПТ) в процесі адсорбції плазматичних мембран еритроцитів (ПМЕ) на межу розподілу фаз водний розчин електроліту-повітря.

концентрація мембран мг\білка	вода		час адсорбції хв	водний розчин 0,01 М КСІ		час адсорбції хв
	ГСП, мВ	ПТ, мН/м		ГСП, мВ	ПТ, мН/м	
0,125	258	0	97	0	0	90
0,150	298	1	84	308	1	61
0,175	369	4	49	383	3	45
0,200	519	8	48	464	6	40

Табл.4.Параметри ізотери розширення-стиснення моношарів плазматичних мембран еритроцитів, модифікованих ангіотензином-1 і ангіотензином-2.

Параметри моношарів	плазматичні мембрани еритроцитів		ангіотензин-2		ангіотензин-1	
	H <sub>2</sub> O	0,01MKCI	H <sub>2</sub> O	0,01MKCI	H <sub>2</sub> O	0,01MKCI
S <sub>0</sub> , м <sup>2</sup>	0,42	0,42	0,42	0,42	0,4	0,42
S, м <sup>2</sup>	0,41	0,40	0,32	0,37	0,3	0,79
ΔS, м <sup>2</sup>	0,01	0,02	0,1	0,05	0,1	0,37
S/S <sub>0</sub>	0,98	0,95	0,8	0,9	0,8	1,8
Π <sub>0</sub> , мН/м <sup>2</sup>	17	6	25	3	8,8	16,4
Π, мН/м <sup>2</sup>	67	36	46	28	21	16,5
ΔΠ, мН/м <sup>2</sup>	50	30	21	25	12	0,1
Π/Π <sub>0</sub>	5000	1800	210	500	120	3,7
Φ <sub>0</sub> , мВ	414	559	280	208	533	733
Φ, мВ	447	699	341	210	475	125
ΔΦ, мВ	33	140	61	2	58	608
Φ/Φ <sub>0</sub>	1,1	1,25	1,22	1	0,9	0,17
Π/Π <sub>0</sub> /S/S <sub>0</sub>	4	6,3	2,42	10,5	3,2	0,6

Табл.5.Зміни флуоресценції хлортетрацикліну в ході транспорту кальцію везикулами саркоплазматичного ретикулуму (СР)

умови досліджу	кількість	відносні одиниці	кількість аламетацину
	мкл	флуоресценції в %	мкл, яка повністю зникає флуоресценції до 0
СР	10	100	10
СР+декан	10	123	30
СР+ліпосоми	5	80	25
СР+ліпосоми	10	91	20-15
СР+брадикінін	1,5	146	10
СР+брадикінін	2	128	10
СР+брадикінін	4	191	10
СР+брадикінін+декан	4+10	123	30
СР+декан	10	114	-
СР+декан+брадикінін	10+2	275	-
СР+декан+брадикінін	10+22	343	20
СР+брадикінін	0,4	123,3-125	-
СР+брадикінін	0,8	147-145	-
СР+брадикінін	1,2	183,3-180	-
СР+брадикінін	1,6	170-185	20-25

ангіотензин-I  
 $\mu=50\text{мВ}$

I

- II - 8

ангіотензин-2  $\mu=50\text{мВ}$

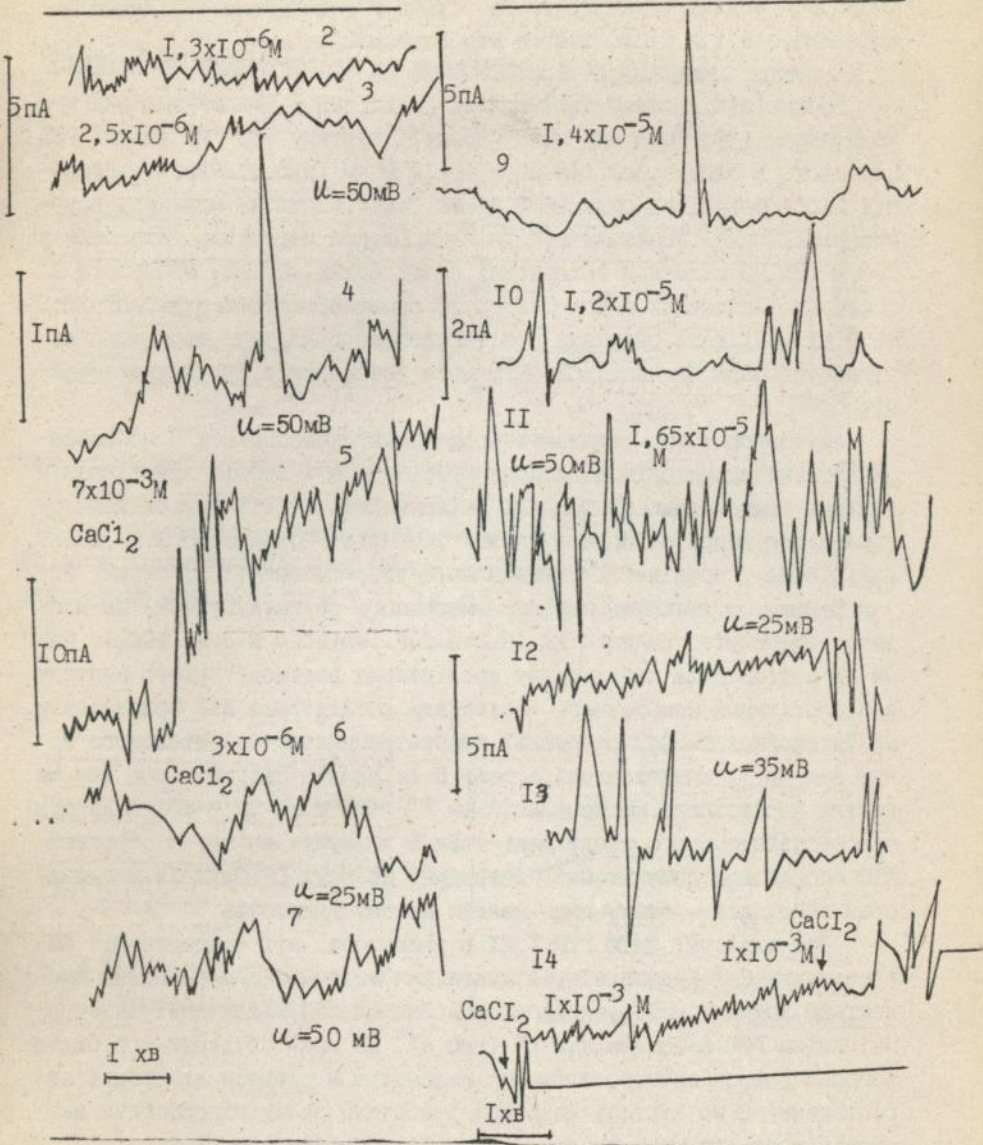


Рис.2. Флуктуації струму крізь бішарові ліпідні мембрани з фосфатидилхоліну та холестерину (5:1) і бішарові ліпідні мембрани, модифіковані ангіотензинами (2-7,9-14).

Таким чином, ангіотензину за рахунок поверхнево активних властивостей здатні взаємодіяти не тільки з модельними ліпідними мембранами, але і з біологічними мембранами.

#### ВЗАЄМОДІЯ БРАДИКІНІНУ З МОДЕЛЬНИМИ ТА БІОЛОГІЧНИМИ МЕМБРАНАМИ.

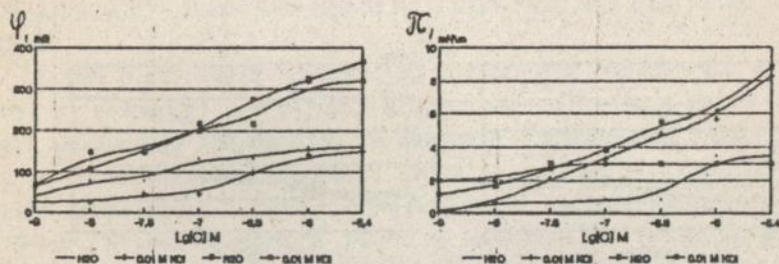
Брадикінін починає взаємодіяти з ліпідними моношарами вже при концентрації  $10^{-8}$ М, а при концентрації пептиду  $10^{-6}$ М зміни ГСП становить в середньому 148 мВ, ПТ-14,2 мН/м (рис.4). Рівень адсорбції Гібса пересічно складає  $3,89 \times 10^{-7}$ М/см<sup>2</sup>, площа на молекулу в моношарі-4,3 нм<sup>2</sup>. Значення ГСП та ПТ колапса пересічно становлять 273 мВ та 53 мН/м<sup>2</sup> при збільшенні площі модифікованих моношарів на 13,4%. При зменшенні S/S<sub>0</sub>- 0,25-0,75 спостерігається плато ПТ-32,2 +2,9 мН/м. Ці дані свідчать про інкорпорацію молекул пептиду в ліпідні моношари, в наслідок чого може змінюватися структура останніх.

Амінокислоти, що складають брадикінін, взаємодіють з моношарами азолектину у такій послідовності: аргінін > пролін > фенілаланін > гліцин > серин (рис.5). Саме ці амінокислоти зустрічаються найчастіше в структурі мембраноактивних пептидів (Рибальченко В.К., 1990) аргінін-9% , пролін-13%, фенілаланін-11%, гліцин-11% , серин- 3%.

Відомо, що везикули саркоплазматичного ретикулу (СР) не містять рецепторів брадикініну (Brown J.F., Whittle B.J.R., 1992). Саме ця модель була вибрана для дослідження взаємодії цього пептиду з біологічними мембранами. Результати дослідження дії брадикініну на інтенсивність флуоресценції хлортетрацикліну (спеціального зонду для Ca<sup>2+</sup>) представлені в табл.5. Їх аналіз свідчить про те, що пептид в діапазоні концентрацій  $10^{-4}$  -  $10^{-3}$ М на 23 - 46% підвищує флуоресценцію цього зонду. Дані табл.5 вказують на те, що брадикінін сприяє накопиченню Ca<sup>2+</sup> всередині везикул СР. Одна із можливостей такої дії - блокування шляхів витоку цих іонів.

При вивченні змін ГСП і ПТ в залежності від концентрації ангіотензину-2 і брадикініну в модельних системах з моношарами азолектина встановлено, що ангіотензін-2 викликає характерні інтенсивні зміни ГСП, а брадикінін-ПТ (рис.4). Це може свідчити про більш вагомий внесок електростатичних взаємодій в процесі адсорбції ангіотензину-2 на ліпідні моношари і значний вклад гідрофобних взаємодій в аналогічних процесах адсорбції брадикініну.

Методами математичного моделювання були розраховані можливі геометричні структури ангіотензину та брадикініну в неполярному розчині (воді) і на межі розподілу фаз вода-фосфоліпід. Пептиди в



ангіотензин-2 ангіотензин-1 ангіотензин-2 ангіотензин-1  
 Рис.3.Зміни граничного стрибка потенціалу  $\Psi$  та поверхневого тиску  $\Pi$  в процесі взаємодії ангіотензину-2 (1,2) і ангіотензину-1 (3,4) з плазматичними мембранами еритроцитів на межі розподілу фаз водний розчин 0,01 М KCL (2,4) та без додаткового введення солі.

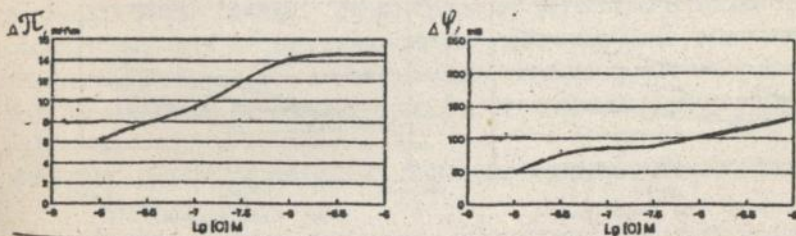


Рис.4.Зміни граничного стрибка потенціалу  $\Psi$  та поверхневого тиску  $\Pi$  в процесі взаємодії брадикініну з азолектиновими моношарами.

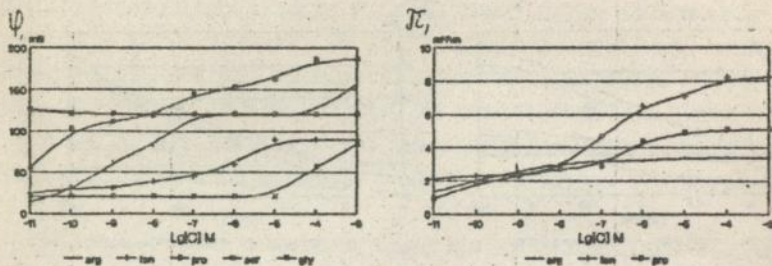


Рис. 5. Зміни граничного стрибка потенціалу  $\Psi$  та поверхневого тиску  $\Pi$  в процесі взаємодії амінокислот, що входять до складу брадикініну з азолектиновими моношарами.

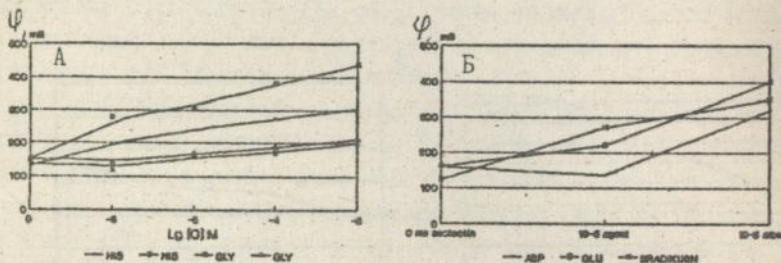


Рис. 6. Зміни граничного стрибка потенціалу  $\Psi$  в процесі взаємодії амінокислот з моношарами азолектину (2,4) і альбуміну (1,3) -А; Б - при комбінованій взаємодії брадикініну і амінокислот з альбуміном в процесі їх адсорбції на азолектинові моношари.

неполярному середовищі не мають стабільної структури, але при переході межі розподілу фаз вода-фосфоліпід ангіотензину мають витягнуту структуру, а молекула брадикініну створює декілька поворотів пептидного ланцюга. Лінійні розміри молекул ангіотензину складають 2-2,5 нм в залежності від довжини пептидного ланцюга, брадикініну - 2-2,2 нм.

#### РОЛЬ АЛЬБУМІНУ В ПРОЦЕСІ ВЗАЄМОДІЇ АМІНОКИСЛОТ З ЛІПІДНИМИ МОНОШАРАМИ.

Одним з напрямків роботи було дослідження поверхневої активності та взаємодії з ліпідними моношарами альбуміну з метою вивчення можливості амінокислот та пептидів модифікувати білкові моношари (рис.6). Рівень адсорбції Гібса для моношарів альбуміну дорівнює всередньому  $1,3 \cdot 10^{-3}$  М/м<sup>2</sup> при площі на молекулу в моношарі 0,79 нм<sup>2</sup>. Рівень адсорбції Гібса на моношари азолектину дорівнює  $2,1 \cdot 10^{-4}$  М/м<sup>2</sup> при площі на молекулу в модифікованих ліпопротеїнових моношарах 0,35 нм<sup>2</sup>. Співвідношення молекул альбуміну до ліпідів становить 1:2,25. Встановлено, що амінокислоти гліцин та гістидин здатні взаємодіяти з моношарами альбуміну, але процес протікає значно слабше в порівнянні з аналогічним явищем при використанні азолектинових моношарів. Крім того, амінокислоти практично не модифікують альбумінові моношари, а лише адсорбуються на поверхні останніх (табл.1), що свідчить про перевагу ліпід - пептидної взаємодії перед пептид - рецепторним зв'язуванням в процесі адсорбції пептидів на поверхню клітин. Однак альбумін підсилює взаємодію брадикініну, як і амінокислот (аспарагінової та глутамінової) з ліпідними моношарами (рис.6), що очевидно має фізіологічне значення.

#### ПЕРВИННІ МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ПЕПТИДІВ З ПЛАЗМАТИЧНИМИ МЕМБРАНАМИ КЛІТИН.

Процес взаємодії пептидів з плазматичними мембранами клітин можна розділити на етапи. Спершу пептид адсорбується на поверхні ПМ за рахунок поверхнево активних властивостей. Межа переходу з гідрофільного середовища у гідрофобне є єдиним фактором, що ініціює перехід молекули пептиду з неактивного стану в активний для зв'язування з рецептором. Цей процес можна описати наступним рівнянням [Рубин А.Б., 1987]:

$$W = W_e + W_{dd} + W_{di} + W_{ds} + W_g + W_{vd} + W_{da} \quad (2),$$

де  $W$  - внутрішня енергія молекул,  $W_e$  - енергія електростатичної взаємодії,  $W_{dd}$  - енергія диполь-дипольної взаємодії,  $W_{di}$  - енергія ді-

поль-індукованої взаємодії,  $W_{ds}$  - енергія дисперсійної взаємодії,  $W_g$  - гідрофобна енергія,  $W_{vd}$  - енергія водневих зв'язків (донор),  $W_{va}$  - енергія водневих зв'язків (акцептор).

Для порушення цієї досить лабільної системи необхідні незначні зрушення, щоб молекула перегрупувалась і її внутрішня енергія зменшилася. Таким зрушенням буде, згідно законам термодинаміки, перехід системи в менш енергетично емний стан, щоб реалізувались поверхнево активні властивості молекули. Адсорбуючись на поверхні розподілу фаз водний розчин електроліту - ПМ, молекула пептиду виконує роботу адсорбції, котра описується виразом [George L., Gaines G., 1966]:

$$W = RT * \ln [ (1/RT * d\mu/d\ln C) ] / k \quad (3),$$

де  $W$  - робота адсорбції,  $C$  - концентрація пептиду,  $k$  - коефіцієнт переходу молекули на межі розподілу фаз водний розчин електроліту - повітря ( $9 \cdot 10^{-8}$ ).

Внутрішня енергія молекул пептиду в процесі адсорбції на поверхню плазматичних мембран переходить в роботу адсорбції і являє собою функцію:  $\int_0^n f W dW = \sum_{n \rightarrow 0} W_n$  (4)

де  $W$  - робота адсорбції, яка пропорційна сталій внутрішній енергії молекули пептиду. На другому етапі молекула пептиду заглиблюється в гідрофобне оточення мембрани, хоча внутрішня енергія пептиду знаходиться на досить стабільному енергетичному рівні. На третьому етапі взаємодії з ПМ молекула пептиду інкорпорує в гідрофобне оточення. Внутрішня енергія молекули пептиду знаходиться на досить сталому енергетичному рівні. Можливо, вже на цьому етапі взаємодія пептиду з ПМ призводить до того, що його молекула має стабільну конформацію. Причиною взаємодії пептиду з ПМ можуть бути:

- 1). пептид утворює стійкі моношари на поверхні плазматичної мембрани; 2). на поверхні плазматичної мембрани вже існують стійкі моношари ліпідів мембранного матриксу, котрі за рахунок гідрофобності при досить високому рівні вільної енергії будуть також здатні до зниження рівня внутрішньої енергії.

Слід зауважити, що ефектами такої взаємодії на першому етапі буде збільшення ентропії системи за рахунок змін в структурі ліпідного матриксу ПМ, а на другому етапі ентропія системи буде зменшуватись за рахунок мембранних перебудов і ймовірного утворення іонних каналів.

Можливо, що вже на першому етапі молекули пептиду будуть електростатично взаємодіяти з ліпідними моношарами - негативно заряд-

жені групи ліпідів будуть притягуватись позитивно зарядженими фрагментами пептиду. Коли відстань між молекулами ліпідів і пептиду зменшиться до Ван-дер-Ваальсової, взаємодії між молекулами призведуть до змін в структурі самого ліпідного матриксу під впливом гідрофобних взаємодій.

Декілька факторів можуть гальмувати взаємодію пептиду з рецептором, відводячи білок-білкові реакції на другий план: 1). Пептидний рецептор або функціональний білок знаходиться в мембрані, але не формує моношари, а пронизує її наскрізь. 2). Пептидні рецептори або мембранні ферменти постійно знаходяться в неактивному стані і активуються тільки в процесі зв'язування з пептидом.

Таким чином, в роботі встановлені мембранні механізми взаємодії ангіотензину і брадикініну з плазматичними мембранами клітин. Отримані в ході досліджень докази мембранної активності пептидів дозволяють по-новому розглянути проблему молекулярних механізмів зв'язування регуляторних пептидів з мембранами.

Представлена в роботі залежність мембранотропної активності пептидів від їх концентрацій є доказом біологічної активності малих кількостей нейротрансмітерів. Потрапивши в кров'яне русло, молекули пептидів не можуть з достовірністю потрапляти на плазматичні мембрани клітин без додаткових енергетичних затрат, тому що будуть атаковані значною кількістю ферментів. Необхідною умовою потрапляння пептидів на плазматичні мембрани клітин є поверхнева активність останніх, що пояснюється швидким виходом поверхнево активної речовини на межу розподілу фаз.

Здатність амінокислот і ліпідів формувати смектичні шари за типом "казяїн-гість" створює предумови до їх взаємодії, які можливо мали місце ще до виникнення клітини в коацерватній краплі і мабуть є більш давні, ніж ліганд-рецепторні взаємодії. Зміна структури мембранних ліпідів при взаємодії пептидів з плазматичними мембранами клітин є причиною формування ліганд-рецепторного комплексу в мембрані. Взаємодія окремих амінокислот з модельними і біологічними мембранами співвідносна з частотою виявлення цих амінокислот в мембранотропних пептидах.

### ВИСНОВКИ

1. Ангіотензином притаманна поверхнева активність, вони взаємодіють з фосфоліпідними моношарами, структурами шарів, сформованими з фракції плазматичних мембран еритроцитів та ліпідними бімолекулярними мембранами. Така взаємодія змінює упаковку ліпідних молекул та супроводжується утворенням іонних каналів в ВЛМ.
2. Брадикінін взаємодіє з ліпідними моношарами та з мембранами саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів, що супроводжується модифікацією фізико-хімічних властивостей мембран - підвищенням поверхневого тиску і граничного стрибка потенціалу моношарів та збільшенням "кальцієвої" ємності везикул ретикулуму.
3. Альбумін, якому також притаманна поверхнева активність, не тільки сам взаємодіє з ліпідними моношарами, а й підсилює ефект взаємодії брадикініну з цими структурами.
4. Запропоновано модель взаємодії досліджених нейропептидів з моношаровими ліпідними моделями мембран та з мембранами еритроцитів і саркоплазматичного ретикулуму. На першому етапі взаємодії ангіотензину та брадикінін адсорбуються на поверхні мембран за рахунок електростатичних зв'язків з полярними головками ліпідів, на другому етапі молекули пептидів інкорпують в ліпідний матрицю за рахунок гідрофобних взаємодій.
5. Отримані експериментальні дані про взаємодію ангіотензину та брадикініну з штучними та біологічними мембранами, які не мають рецепторів до названих пептидів, з урахуванням даних сучасної літератури, відіграє важливу роль ліпідного матрицю мембран у сприйнятті, класифікації та трансформації енергії зовнішніх стимулів в енергію біологічного збудження.

### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Рыбальченко В.К., Гевод В.С., Шамонова А.М., Могилевич Б. Р. Взаимодействие брадикинина и составляющих его аминокислот с липидными монослоями // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1991. - Т. 112, №7. - С. 64-66.
2. Рыбальченко В.К., Гевод В.С., Решетняк И.Л., Шамонова А.М. Взаимодействие ангиотензина с липидными монослоями // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1993. - Т. 115, №7. - С. 92-94.
3. Рыбальченко В.К., Гевод В.С., Шамонова А.М., Решетняк И.Л. Поверхностная активность ангиотензина // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1993. - Т. 115, №7. - С. 52-54.

4. Могилевич Б.Р., Шамоніна А.М., Рибальченко В.К. Взаємодія амінокислот, що входять до складу нейропептидів з ліпідними моношарами // Молек. генетика і біофізика. - 1992. - Вип. 17. - С. 51-54.
5. Шамоніні А.М., Могилевич Б.Р., Рибальченко В.К., Гордієнко В.М. Поверхнева активність амінокислот, що входять до складу брадикиніну і субстанції Р // Вісник Київ. ун-т, біол. - 1993. - Вип. 25. - С. 55-58.
6. Рибальченко В.К., Шамоніна А.М., Смелченко О.М., Бовикін В.Л., Ситник Т.В. Взаємодія амінокислот з біомолекулярними ліпідними мембранами // Вісник Київ. ун-т, біол. - 1993. - Вип. 25. - С. 70-72.
7. Рибальченко В.К., Островская Г.В., Сафтенку Е.Э., Шамоніна А.М., Могилевич Б.Р., Пастух А.В., Чуб И.Л. О первичных механизмах взаимодействия вазопрессина, окситоцина и брадикинина с биологическими и искусственными мембранами // Тез. докл. "Нейрональные механизмы регуляции висцеральных органов и систем. - Томск. - 1989. - С. 215-216.
8. Каплуненко Н.А., Рибальченко В.К., Шамоніна А.М. Взаимодействие брадикинина с липидными монослоями // Тез. докл. "Проблемы гастроэнтерологии" Днепропетровск. - 1988. - С. 102-103.
9. Рибальченко В.К., Гевод В.С., Смелченко А.М., Шамоніна А.М., Могилевич Б.Р. Мембранотропная активность ангиотензина // Тез. докл. "Организм и среда" Бухара. - 1992. - С. 77.
10. Рибальченко В.К., Коршак А.Л., Могилевич Б.Р., Шевчук П.Н., Пелух П.Ф., Шамоніна А.М. Мембранотропная активность ангиотензина, брадикинина, пентагастрина, субстанции Р и составляющих их аминокислот и их регулирующее воздействие на эффекторные клетки // Тез. докл. "Нейрофармакология на рубеже 21 века" - Санкт-Петербург. - 1992. - С. 188.
11. Рибальченко В.К., Островская Г.В., Могилевич Б.Р., Рибальченко Р.В., Шевченко С.І., Шамоніна А.М. "Липидный" путь взаимодействия пептидов с мембранами клеток // Тез. доп. "Актуальні проблеми фізіології" - Київ. - 1992 С. 15.
12. Шамоніна А.М. Взаємодія ангиотензину-1 з біомолекулярними ліпідними мембранами // Тез. доп. 1 з "Ізд Українського біофізичного товариства. - Київ-1994. - С. 255-256.
13. Шамоніна А.М. Взаємодія ангиотензину-1 з ліпідними моношарами // Тез. доп. 14 з "Ізд Українського фізіологічного товариства. - Київ. - С. 98.
14. Рибальченко В.К., Островская Г.В., Могилевич Б.Р., Шамоніна А.М., Лукошко С.А. Эффекты регуляторных пептидов при взаимодействии с липидными мембранами // Тез. докл. 6 симпозиум по биохимии липидов Санкт-Петербург. - 1994. - С. 36.

Шамонина А.М. Мембранотропная активность ангиотензинов и брадикинина как фактор их биологической активности.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.00.11-эмбриология, гистология, цитология; 03.00.04-биохимия. Киевский университет имени Тараса Шевченко. Киев. 1995.

Защищено 14 научных работ, содержащих теоретические и экспериментальные исследования. Впервые установлена мембранотропная активность регуляторных пептидов ангиотензина-1, ангиотензина-2, брадикинина и некоторых аминокислот, входящих в состав пептидов. Исследуемые вещества взаимодействуют как с модельными липидными мембранами, так и с плазматическими мембранами эритроцитов за счет поверхностно активных свойств. Пептиды и аминокислоты модифицируют поверхность липидного матрикса плазматических мембран. Имплантация ангиотензинов в бислоиные липидные мембраны сопровождается изменениями электрической емкости и проводимости мембран и приводит к формированию ионных каналов. Показано, что альбумин за счет собственной мембранотропной активности усиливает взаимодействие брадикинина и аминокислот с липидными монослоями. Разработана модель, которая позволяет прогнозировать взаимодействие регуляторных нейропептидов с плазматической мембраной клеток.

Shamonina A.M. The membrane tropic activity angiotensins and bradykinin

Thesis for Ph.D. degree in biological sciences on specialities: 03.00.11-embriology, histology, cytology and 03.00.04-biochemics. Taras Shevchenko University, Kiev 1995.

There are defence of 14 scientific works containing theoretical and experimental researches. The peculiarities of aminoacid sequence of membrane tropic regulatory peptides were determined for the first time. The methodical approach to prognosticate the membrane tropic activity of regulatory peptides was devised. It was shown that angiotensins and bradykinin modified lipid monolayers by incorporating between lipid molecules; as a result of angiotensins insertien into BLM it was changes af electrical conductivity of the membrane, can form potential dependent ion channels.

Ключові слова: регуляторні пептиди, мембранотропна активність, біологічні мембрани, штучні мембрани.

Підп. до друку 7.02.96р. Формат 6 х84/16. Друк офс.

Папір друк. Ум. др. арк. 1,5. Зам. І67. Тираж 100.

---

Друкарня Південно-Західної залізниці м.Київ, Лисенко, 6



445894

AB 34414

**AB 34.414**