

Раздел III. Биотехнологии, в том числе биомедицинские нанотехнологии

УДК 539.21 + 539.196 + 544.08

М.В. Батуков, П.П. Исаев

БИОНАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ БИОМЕМБРАН

Рассмотрен компьютерный метод вычисления значений характеристик, от которых зависит проницаемость каналов биомембран. Представлены расчеты ионных токов в растворах при различной концентрации, рассчитан энергетический профиль, встречающийся во всех биологических системах, K⁺ канала для иона, движущегося вдоль его оси.

Ионные каналы; биомембрана; нанотехнологии.

M.V. Batukov, P.P. Isaev

BIO-NANOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF THE BIOMEMBRANE ION CHANNELS FUNCTIONING

This article describes a computer method for calculating the values of the characteristics of which depend on the channels permeability of biomembranes. Calculations of ionic currents in solutions at different concentrations are presented, also calculated the energy profile of K⁺ channel founded in all biological systems for an ion moving along its axis.

Ion channels; biomembrane; nanotechnology.

Ионные каналы – белковые участки клеточных мембран, приспособленные для прохождения ионов натрия, калия, кальция и хлора из растворов. Открываются и закрываются при изменении конфигурации белков под влиянием концентрации химических веществ или электрического потенциала. Посредством обмена ионов через биомембрану они помогают клетке мембраны поддерживать свойственный ей ионный градиент и разность потенциалов по отношению к внешней среде. Наибольший интерес в области бионанотехнологических исследований представляют каналы, выступающие в роли биологических «ворот», поскольку именно они являются основополагающими в формировании и регулировании электрической активности клеток в нервной системе; они же регулируют процесс сердцебиения. Как следствие, нарушение транспорта ионных каналов в мембране приводит к возникновению неврологических и сердечных заболеваний, учитывая данный факт, при разработке медицинской техники и вакцин, способных искусственно регулировать проницаемость мембран, крайне важно уметь объяснять процесс функционирования ионных каналов на молекулярном уровне. На текущем этапе развития бионанотехнологий одной из основных задач при исследовании механизмов регулирования проницаемости является выявление новых алгоритмов способных устанавливать зависимость проводимости канала от его электростатического потенциала и композиционных характеристик.

В данной статье мы представляем метод, позволяющий моделировать движение ионов сквозь каналы и нанопоры, а также определять их проводимость в различных условиях с большой степенью точности.

Модель и методы: понимание структуры и функционирования ионных каналов требует комплексного физического описания в рамках теоретической модели. Существует множество подходов для описания движения ионов в растворах электролитов и сквозь поры мембран. Наиболее популярным является подход, опирающийся на Броуновскую динамику. Он представляет собой промежуточный уровень абстракции между Молекулярной динамикой и методом Пуассона-Нернста-Планка и служит оптимальным компромиссом между точностью моделирования и расчетным временем при получении необходимых данных об ионных токах, протекающих через нанопоры и каналы. При этом Броуновская динамика в явном виде моделирует траектории всех ионов только внутри области моделирования, из расчета, что поры и заряды внутри мембраны расположены на фиксированных позициях на протяжении всего процесса симуляции. Заметим, что при таком подходе, присутствие молекул воды рассматривается неявно и учитывается только среднее воздействие на ионы. Траектории ионов описываются уравнением Ланжевена:

$$m_i \frac{d\vec{v}_i}{dt} = -m_i \gamma_i \frac{d\vec{r}_i}{dt} - q_i \vec{E}_i + \vec{F}_{Ri}(t), \quad (1)$$

где m_i , q_i , \vec{r}_i , \vec{v}_i представляют собой массу, заряд, положение и скорость i -го иона соответственно. В данной формуле силовое действие на ион определяется общим электрическим полем ионов \vec{E}_i , как среднее силы противодействия с коэффициентами $m_i \gamma_i$ и силы \vec{F}_R , которая имитирует столкновения ионов и воды. Для больших систем, таких как ионы в растворе электролита, можно пренебречь инерционным аспектом [1] и определять траектории ионов, решая уравнение броуновской динамики:

$$\frac{d\vec{r}_i}{dt} = -q_i \frac{D_i}{K_B T} \vec{E}_i + \vec{\xi}_i(t), \quad (2)$$

где D_i является коэффициентом диффузии ионов, K_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура и $\vec{\xi}$ – гауссовское смещение. Интегрируя (2) с помощью метода конечных разностей, можно вычислить координаты позиций ионов в каждый момент времени:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) - q_i \frac{D_i}{K_B T} \vec{E}_i + \vec{X}(6D_i \Delta t)^{1/2}, \quad (3)$$

где \vec{X} – вектор, компоненты которого выбраны из нормального распределения с центром в нуле. Уравнение (3) описывает движение ионов в результате действия электрической силы – отдельно взятый заряд взаимодействует с остальными зарядами внутри системы.

Известно, что электрическое поле каждого иона определяется всеми зарядами, присутствующими в системе, поэтому чтобы определить силу, действующую на них, нам нужно решить уравнение Пуассона. В данном случае мы должны исходить из того, что область, которую мы моделируем, содержит две различные среды – воду и мембрану, характеризующиеся своими собственными диэлектрическими проницаемостями. Наиболее удобным и корректным способом решения уравнения Пуассона в данной области является метод Левитта [2]. Этот подход

интересен тем, что способен находить решение эквивалентной задачи, в которой все заряды рассматриваются в вакууме как заряды, индуцированные поверхностной плотностью на диэлектрической границе. При этом решение уравнения находится с учетом взаимодействия между поверхностными зарядами. Чтобы определить плотность поверхностного заряда, необходимо определить границу раздела белок–вода. Для твердых нанопор данная граница раздела определяется геометрией самой поры. В случае белкового ионного канала, граница может быть найдена из распределения заряда, определяемого обычными молекулярными силовыми полями [3] на основе данных кристаллографии. Для простоты будем считать, что для любого канала применима вращательная симметрия. После того, как граница раздела определена, производится триангуляция Делоне.

Далее мы используем принцип суперпозиции, таким образом, полное электрическое поле \vec{E}_i , действующее на ион, описывается следующим уравнением:

$$\vec{E}_i = \vec{E}_{S,i} + \vec{E}_{FC,i} + \vec{E}_{EXT,i} + \sum_{\substack{j=1 \\ i \neq j}}^N \vec{E}_{I,j}, \quad (4)$$

где $\vec{E}_{S,i}$ представляет собой электрическое поле, созданное зарядами, индуцированными границей мембрана – вода самим ионом; $\vec{E}_{FC,i}$ – учитывает электрическое поле за счет фиксированных зарядов внутри мембраны и $\vec{E}_{EXT,i}$ – вклад, который вносит трансмембранный потенциал. Последний член в уравнении (4) описывает электрическое поле, создаваемое всеми другими ионами в системе. Отметим, что последние три члена уравнения рассматривают непосредственное Кулоновское взаимодействие и влияние индуцированных зарядов.

Для осуществления симуляции алгоритма броуновской динамики необходимо рассчитать электрическую силу, действующую на ионы в каждый отдельный момент времени. Данное требование может быть выполнено путем решения уравнения Пуассона с соответствующими граничными условиями. Стандартный подход к вычислению слишком затруднителен при расчете проводимости таких систем как ионный канал, поэтому мы воспользовались методикой, описанной Хойлсом [4]. В данной методике суммарное поле, создаваемое зарядами и внешним полем рассчитывается в ряде определенных точек, а полученные результаты заносятся в специальные таблицы.

Далее в процессе моделирования общее электрическое поле в необходимых точках рассчитывается путем наложения предварительно рассчитанных элементарных частей, данные по которым берутся уже из полученных ранее таблиц. Этот подход значительно ускоряет расчеты с минимальными потерями в точности, и позволяет воспроизводить достаточно сложные модели, с помощью которых можно определить проводимость канала. Чтобы получить правильные значения электрических полей, действующих на каждый ион в трехмерном пространстве – в процессе моделирования мы рассчитывали траектории ионов с помощью поворотов. График зависимости в двумерном пространстве был построен при помощи вращательной симметрии канала.

Апробация метода: симуляция движения ионов была протестирована нами при помощи вычисления ионных токов в соответствии с уравнением (3). Полученные значения токов полностью соответствуют данным модели Нернста-Планка при различных значениях ионной концентрации и прикладываемых потенциалов (рис. 1), подтверждающие правильность нашего расчета.

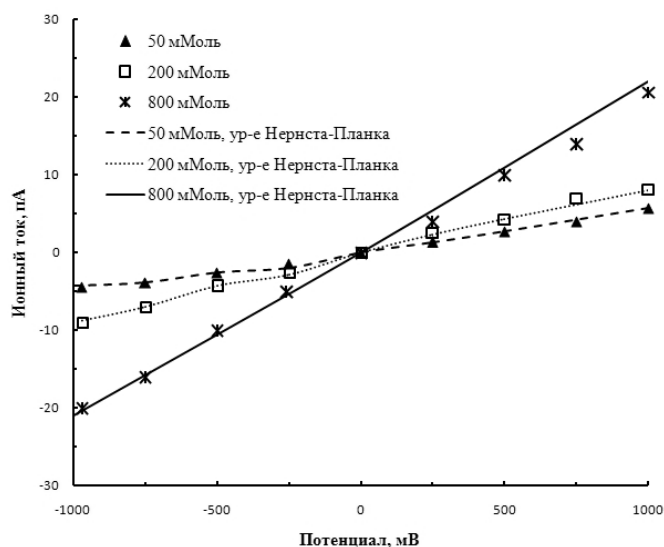


Рис. 1. Сравнение между теоретическими значениями ионных токов и результатами, полученными с помощью моделирования для потока ионов в растворе при различных концентрациях

Моделирование канала с простой геометрией было осуществлено с целью воссоздания данных об электростатике и проводимости канала, представленных в литературе. Моделирование упрощенного канала с цилиндрическим трансмембранным сегментом также дало результаты, хорошо согласующиеся с результатами, полученными Хойлсом как для электростатического расчета (рис. 2), так и для проводимости канала (рис. 3) [4].

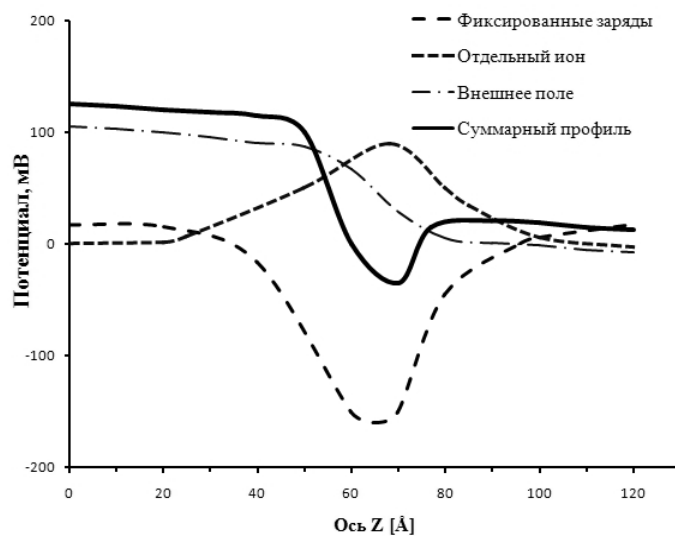


Рис. 2. Электростатические профили канала во всей области моделирования для иона, движущегося вдоль оси

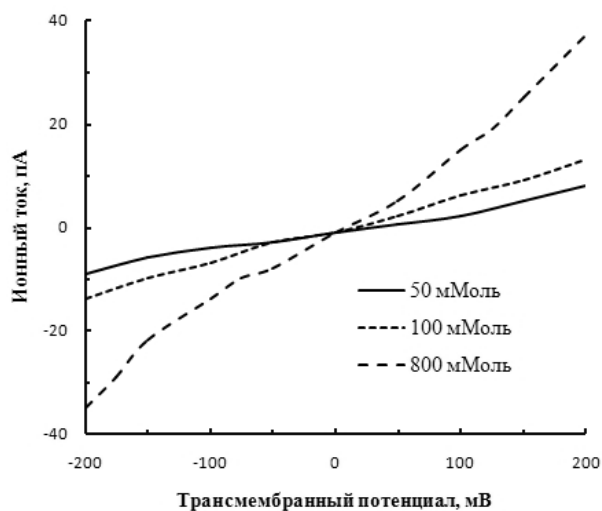


Рис. 3. Ионные токи, полученные для моделируемого канала, изображены как функция трансмембранного потенциала при различных концентрациях Na⁺-Cl⁻ раствора

Воспроизведенная модель калиевого канала KcsA была получена с помощью данных кристаллографического анализа. Чтобы получить подходящую конфигурацию в открытом состоянии – заряды из области фильтра избирательности были перенесены радиально. В симуляции взяты действительные значения коэффициентов диффузии и диэлектрической проницаемости внутри канала [3].

Электростатические профили, полученные для KcsA K⁺ каналов белка (рис. 4), подтверждают данные симуляций молекулярной динамики [3]. Вычисленные значения токов для широкого диапазона трансмембранных потенциалов и различных ионных концентраций (рис. 5) точно воспроизводят экспериментальные данные [5].

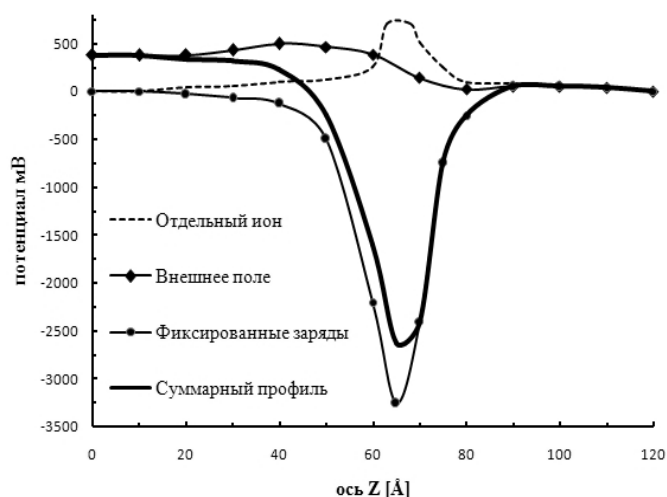


Рис. 4. Электростатические профили KcsA канала во всей области моделирования для иона, движущегося вдоль оси

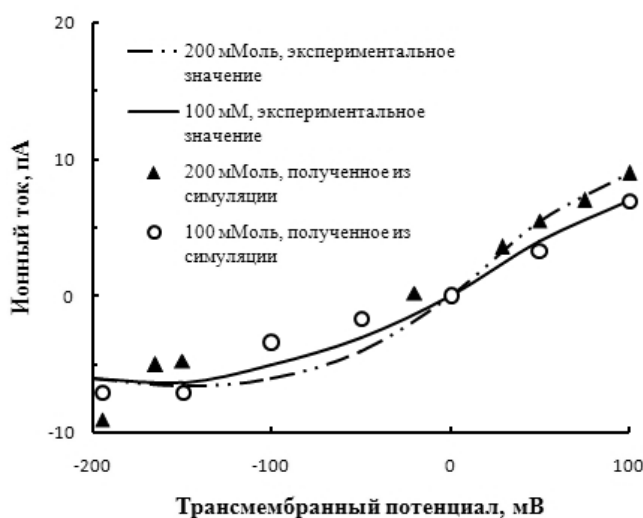


Рис. 5. Сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными для ионных токов KcsA канала как функции трансмембранного потенциала при различных концентрациях K^+ -СГ раствора

Выводы: получен числовой метод, позволяющий оценить влияние температуры, формы ионных каналов и приложенного к ним напряжения на динамику перемещения ионов. Метод полезен как эффективный инструмент исследования ионных каналов и позволяет изучать на атомном уровне сложные зависимости проводимости ионных каналов от электростатических взаимодействий. Считаем, что предложенная процедура моделирования поможет фармакологам и инженерам в процессе анализа эффективности определенных видов вакцин и создания новых видов биомедицинского оборудования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Chandrasekar S. Stochastic problems in physics and astronomy // Rev. Mod. Phys. – 1943. – Vol. 15. – P. 1-89.
2. Levitt D.G. Electrostatic calculations for an ion channel. I. Energy and potential profiles and interactions between ions // Biophys. – 1978. – № 22. – P. 209-219.
3. Chung S.H. Conducting-State properties of the KcsA potassium channel from molecular and brownian dynamics simulations. – Biophys. – 2002. – № 82. – P. 628-645.
4. Hoyle M. Computer simulation of ion conductance in membrane channels // Phys. Rev. – 1998. – № 58. – P. 3654-3661.
5. LeMasurier M. KcsA: Its a Potassium Channel // J. Gen. Phys. – 2001. – № 118. – P. 303-313.

Батуков Максим Викторович

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Таганрогский государственный педагогический институт».

E-mail: stereo@66.ru.

347905, г. Таганрог, ул. Заводская, 8/2.

Тел.: +79185332628.

Исаев Павел Павлович

E-mail: chemphys@mail.ru.

347936, г. Таганрог, ул. Инициативная, 48.

Тел.: 88634601807.

Batukov Maxim Victorovich

State educational institution of higher education "Taganrog State Pedagogical Institute".

E-mail: stereo@66.ru.

8/2, Zavodskaya street, Taganrog, 347905, Russia.

Phone: +79185332628.

Isaev Pavel Pavlovich

E-mail: chemphys@mail.ru.

48, Inicativnaya street, Taganrog, 347936, Russia.

Phone: +78634601807.

УДК 556.3

В.Ю. Вишневецкий, Н.Г. Булавкова

**ВОЗМОЖНОСТИ АППАРАТУРНОЙ РЕАЛИЗАЦИИ БИОТЕСТЕРА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ***

Рассмотрены методы биотестирования и способы их аппаратурной реализации. Проанализированы методы, используемые для построения биотестовых автоматизированных систем, как отечественного производства, так и зарубежные. Рассмотрены особенности оптического блока разработанного прибора для биотестирования.

Токсичность водной среды; биотестирование; тест-объект.

V.Yu. Vishnevetskiy, N.G. Bulavkova

**POSSIBILITIES OF HARDWARE REALIZATION OF THE BIOTESTER
FOR DEFINITION OF TOXICITY OF THE WATER ENVIRONMENT**

In article methods of biotesting and ways of their hardware realisation are considered. The methods used for construction of biotest automated systems, as domestic production, and foreign are analysed. Features of the optical block of the developed device for biotesting are considered.

Toxicity of the water environment, biotesting, test object.

Результатом интенсивной хозяйственной деятельности человека является загрязнение окружающей среды, в частности водной, многообразными токсикантами. Вследствие этого возникает кризисная экологическая ситуация, которая негативно влияет на здоровье людей. В связи с этим актуальной является задача разработки и реализации методов для получения информации о токсичности воды и источников загрязнения водных объектов.

Оценить комплексное влияние многообразных загрязняющих веществ на уровень токсичности позволяет биотестирование. Результаты биотестирования представляют интерес не только в экологическом, но и в гигиеническом плане. С одной стороны, в гигиенических исследованиях биотестирование используется как экспресс-метод оценки токсичности водной среды. С другой стороны, гидробионты принимают активное участие в процессах природного самоочищения водоемов от загрязнения, а токсичное влияние на них химических веществ может привести к снижению самоочищающей способности водоема и к ухудшению его санитарного режима, что важно с санитарно-гигиенической точки зрения [1].

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», мероприятие 1.3.1, направление «Мониторинг и прогнозирование состояния атмосферы и гидросферы», ГК № 1205 от 04.06.10).