

РАЗДЕЛ II. ХИМИЯ

УДК 535.71

**Стовбун С.В.¹, Скоблин А.А.¹, Занин А.М.¹, Михайлов А.И.¹,
Твердислов В.А.², Брагина Е.Е.³, Рыбин Ю.М.⁴, Агеев И.М.⁴, Шишкин Г.Г.⁴**

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (г. Москва),

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

⁴ Московский авиационный институт (Государственный технический университет)

СТРУКТУРНАЯ ДИНАМИКА РОСТА СТРУН В БИОМИМЕТИКАХ В СОПОСТАВЛЕНИИ С ПРОЦЕССАМИ КОММУТАЦИИ РЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК

**S. Stovbun¹, A. Skoblin¹, A. Zanin¹, A. Mikhailov¹,
V. Tverdislov², E. Bragina³, Yu. Rybin⁴, I. Ageev⁴, G. Shishkin⁴**

¹ N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

² M.V. Lomonosov Moscow State University

³ A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov
Moscow State University

⁴ Moscow Aviation Institute (State University of Aerospace Technologies)

STRUCTURAL DYNAMICS OF GROWTH OF STRINGS IN BIOMIMETICS VERSUS REAL CELL SWITCHING PROCESS

Аннотация. Изучен рост хиральных струн в модельных растворах трифторацетилированных аминок спиртов (ТФААС) в гептане и воде в сравнении с формированием анизометрических объектов, обеспечивающих коммутацию биологических клеток. В гептане струны с диаметром порядка 1 мкм: а) спирально сплетены из более тонких струн; б) имеют на растущем конце венчик тонких струн, на которых конденсируется растворенный ТФААС. В воде картина аналогична, но в ряде случаев тонкие струны, входящие в венчик, ветвятся, порождая новые венчики. Приведены аналогичные явления, обнаруженные при наблюдении коммутации реальных клеток.

Ключевые слова: хиральность, струны, биомиметики, коммутация клеток.

Abstract. We have studied the growth of chiral strings in model solutions of trifluoroacetylated aminoalcohols (TFAAS) in heptane and water in comparison with the formation of anisometric objects providing switching of biological cells. In heptane, the strings with a diameter of about 1 μm (i) are woven spirally of thinner strings, and (ii) have on the growing end the corolla of thin strings, which condenses the TFAAS dissolved. The situation in water is similar; however, in some cases, thin strings in the corolla branch out, creating new corollas. Similar phenomena found during the observation of switching of real cells are presented.

Key words: chirality, strings, biomimetics, switching of cells.

Спонтанное формирование струн – анизометрических (отношение длины L к диаметру d : $L/d \sim (10^2-10^5)$) структурных объектов, обладающих заметной механической упругостью – при охлаждении или повышении концентрации модельных гомохиральных растворов трифторацетилованных аминокислот (ТФААС) в органических растворителях, и в отдельных случаях в воде, описано в [3-5; 10]. Аналогичные явления зафиксированы в биологических жидкостях [9; 10]. Выявлено, что ТФААС являются эффективными биомиметиками. Именно, с их помощью удалось получить физико-химические модели: а) биологических сред как анизометрических жидкостей [9], б) процессов информационной и силовой коммутации микробиологических объектов [1; 6; 7]; в) биологических клеток как целостных объектов [8].

В настоящей работе исследована динамика роста струн в растворах биомиметиков. Получены физико-химические модели ряда динамических процессов, протекающих при коммутации микробиологических объектов. Методом электронной микроскопии зафиксированы структуры, формирующиеся при коммутации реальных биологических клеток, аналогичные наблюдаемым в биомиметиках.

Материалы, оборудование, методика

В качестве биомиметиков исследовались гомохиральные растворы трифторацетилованных аминокислот (ТФААС): ТФААС-1 с концентрацией 0.4 мг/мл в гептане, а также ТФААС-2 (гидрогелатора) с концентрацией 10 мг/мл в воде. ТФААС синтезированы в Лаборатории стереохимии ИХФ РАН, зав. лаб. проф. Р.Г. Костяновский; методика получения и свойства ТФААС описаны в [7; 11]; структурные формулы: ТФААС-1 – рис. 1, врезка; ТФААС-2 – рис. 5, врезка. Использовался гептан чистотой 99,9%, поставщик – фирма Химмед. Растворы ТФААС помещались в замкнутые плоские капилляры, представляющие две стеклянные пластинки, находящиеся на расстоянии 300 мкм друг от друга, соединенные герметиком, что исключало испарение

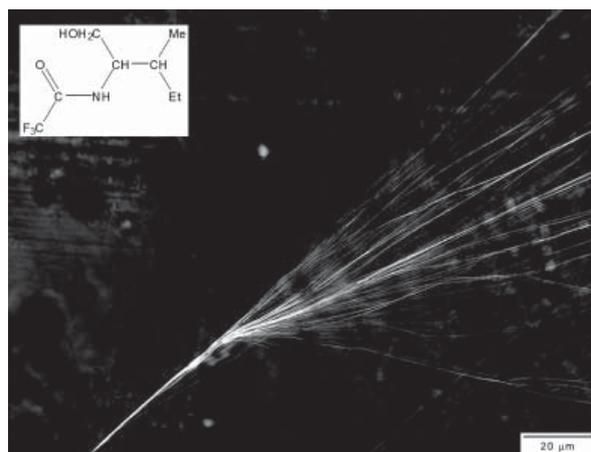


Рис. 1. КОС. Раствор ТФААС-1 в гептане, концентрация 0.4 мг/мл. Растущая струна, имеющая широкий венчик.

растворителя. В образцах создавались неравновесные условия, инициирующие кинетические процессы. Для этого образцы нагревались до 70° С с помощью элементов Пельтье (растворы ТФААС-1) или с помощью потока горячего воздуха из фена (растворы ТФААС-2) и затем остывали за счет оттока тепла в окружающую среду. Процессы, происходящие при остывании образцов, фиксировались: для растворов ТФААС-1 с помощью компьютеризированного оптического стенда (КОС) на основе микроскопа BX51 «OLYMPUS» (Research system microscope), изготовитель – OLYMPUS CORPORATION (Япония); для растворов

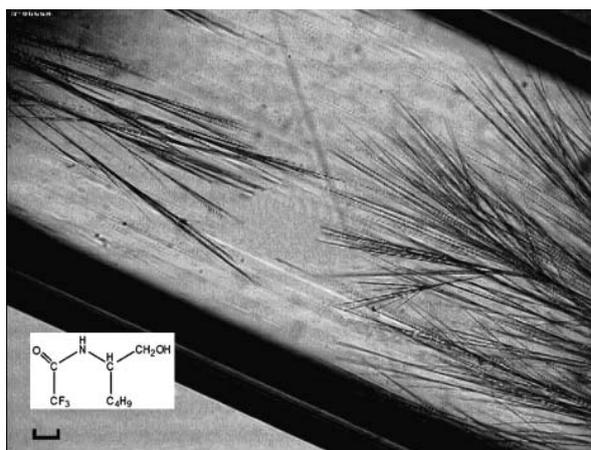


Рис. 5. ОМ. Длина масштабного штриха 100 мкм. Раствор ТФААС-2 в воде. Две группы струн, растущих навстречу друг другу.

ТФААС-2 – с помощью оптического микроскопа (ОМ) CARL ZEISS JENA (Германия).

Для исследования процессов коммутации клеток использовалась перевиваемая культура клеток VERO. Клетки выращивали на покровном стекле в среде Игла-МЕМ (Gibco, США) с 15% эмбриональной сывороткой. Клетки фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида (Ted Pella Inc, США) на 0,1M какодилатном буфере (pH 7,2-7,4) (Sigma, США). В культуральную среду добавляли 0,1 мл фиксатора, после чего среду удаляли, к клеткам добавляли свежий фиксатор и фиксировали при +4°C в течение 2 ч. Материал дофиксировали 1% раствором осмиевой кислоты (Serva, Германия), дегидратировали в градиенте этанола (50% – 30 мин, 70% – 2 ч, 96% – 2 ч) и ацетоне (2 – 24 ч).

Препарат высушивали в критической точке возгонки углекислоты (Critical Point Dryer HCP-2, Hitachi), рабочий газ CO₂, промежуточная среда – ацетон. Покровные стекла с клетками прикрепляли к столикам для сканирующей электронной микроскопии, напыление проводили в ионнораспылительной установке ИВ-3 (Eiko, Япония) сплавом золота и палладия (примерная толщина напыления 25 нм). Микрографии получали при помощи сканирующего электронного микроскопа CamScan S-2 (Cambridge Instruments, G.D) при ускоряющем напряжении 20кВ.

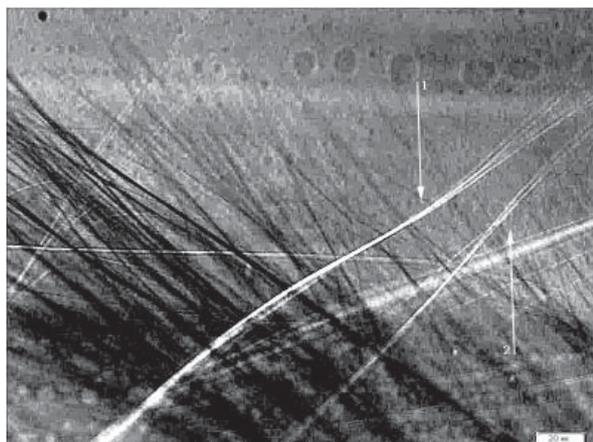


Рис. 2. КОС. Раствор ТФААС-1 в гептане, концентрация 0.4 мг/мл. Растущие струны, указанные стрелками 1 и 2, имеющие узкие венчики.

Результаты исследований

В растворе ТФААС-1 в гептане в ходе охлаждения образцов в реальном времени наблюдалось спонтанное формирование и дальнейший рост крупных струн диаметром от одного до нескольких микрон. Типичные картины приведены на рис. 1, 2. От конца струны, практически из единой точки (будем называть ее точкой схождения), расходится хорошо видимый венчик более тонких струн. Венчик может быть широким и охватывать телесный угол $\sim \pi$ (рис. 1) или существенно более узким (рис. 2). При охлаждении раствора концы тонких струн продвигаются вперед, то есть струны растут. Точка схождения также продвигается вперед, вслед за ростом тонких струн. В результате длина толстой струны увеличивается, а венчик, продвигаясь вперед, остается приблизительно одного и того же размера, иногда существенно удлиняясь, но вслед за этим быстро укорачиваясь.

Как и в предыдущих экспериментах [2-5], количественные характеристики образцов крайне неустойчивы и меняются от образца к образцу, от объекта к объекту в рамках одного образца, от одного момента времени к другому в рамках одного объекта. Прямое многократное измерение скорости роста различных струн в нескольких образцах путем обработки микрофильмов показало, что она



Рис. 3. КОС. Раствор ТФААС-1 в гептане. Короткая струна, сплетенная из более тонких струн, далее практически параллельных.

варьируется для раствора ТФААС-1 в гептане в пределах (1 – 10) мкм/с. Тонкие субмикроскопические по диаметру струны в окрестности точки схождения (сингулярности) объединяются в микроскопическую струну, образуя спиральную супрамолекулярную структуру, наблюдавшуюся в [2; 3]. Переход от почти параллельных тонких струн к их сплетению наподобие косы хорошо виден в случае короткой струны, представленной на рис. 3. Струна с более плотной спиральной структурой представлена на рис. 4. Наличие венчика расходящихся тонких струн на конце растущей толстой струны, возможно, объясняется электростатическим отталкиванием концов тонких струн на стадии их формирования, в окрестности точки схождения.

В водном растворе ТФААС-2 в ходе охлаждения образцов также наблюдается спонтанное формирование и дальнейший рост крупных струн. Типичная картина описанного процесса представлена на рис. 5. Видны две группы струн, растущие навстречу друг другу. Слева направо растут два венчика струн, раскрытые под относительно небольшим углом. Качественно картина их роста близка к описанной для предыдущего образца. Справа налево растут три венчика струн: один, наиболее крупный, по центру, второй – выше, третий – ниже. Эти венчики открыты на существенно больший угол, чем растущие навстречу. Для второй группы струн (растущих справа налево) рост струн венчика имеет большую скорость, чем скорость перемещения точки их схождения. Однако главное качественное отличие состоит в самоподобии, а именно струны венчиков ветвятся, образуя собственные венчики. Таким образом, приведенный кадр и в целом микрокиносъемка демонстрируют, для второй группы струн, вариант конденсации ТФААС, промежуточный между конденсацией собственно в струны и конденсацией в более сложные объекты (щеточки, дендриты и т.п.) [3-5; 10]. Скорость роста различных струн в нескольких образцах водного раствора ТФААС-2 варьировалась в пределах (5-15) мкм/сек.

Дальнейший механизм коммутации биологических клеток, основанный

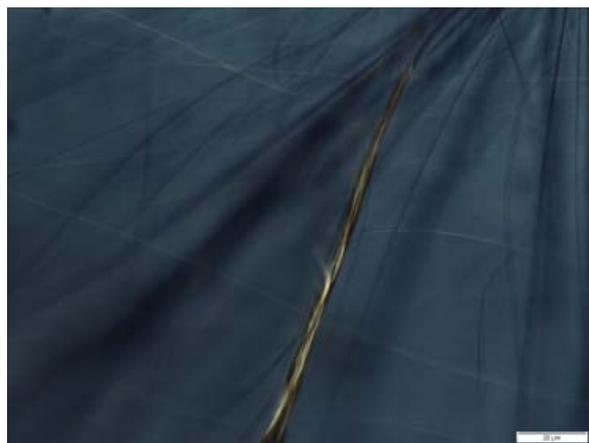


Рис. 4. КОС. Раствор ТФААС-1 в гептане. Струна, имеющая плотную спиральную структуру.

на непосредственном контакте биологических систем путем соединяющих их анизометрических элементов, описан в 2004 г. [12]. Типичные примеры коммутации биологических клеток с помощью анизометрических (удлиненных) структурных элементов приведены на рис. 6-8. Видны многочисленные структуры, очень похожие на венчики. Динамика коммутации биологических клеток с помощью соединяющих их анизометрических элементов до настоящего времени не исследована, в литературе соответствующих данных нет. Характерные скорости процессов коммутации могут быть оценены по характеристическим временам популяционных ответов, составляющих $\sim(10^1-10^3)$ с., что с учетом типичных расстояний между клетка-

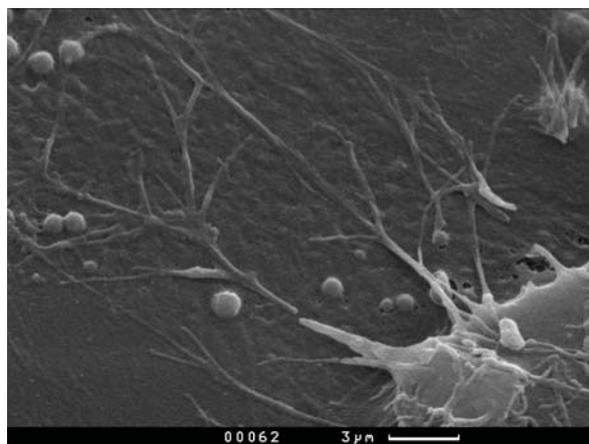


Рис. 6. СЭМ. Периферия клетки VERO. Венчиковые структуры.

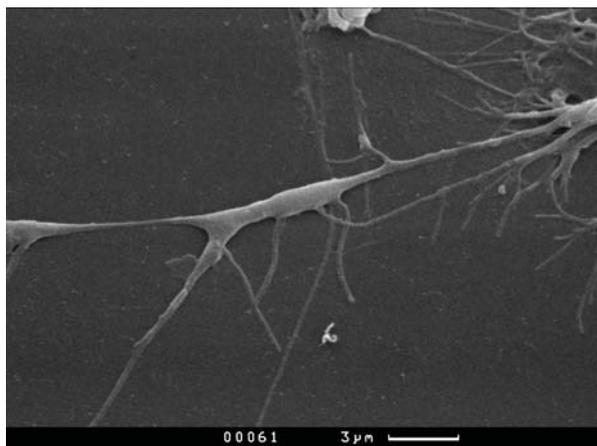


Рис. 7. СЭМ. Анизометрические структуры, обеспечивающие коммутацию клеток VERO. Венчикообразные структуры.

ми $\sim(10^1-10^2)$ мкм, согласуется со скоростями роста струн в биомиметиках, приведенными в настоящей работе. Выявленное экспериментально метрическое подобие структур, формирующихся в растворах биомиметиков и в реальных биологических системах, позволяет объяснить механизмы образования таких ранее не идентифицируемых морфологических структур.

Обсуждение и выводы

Описанный механизм роста толстой струны, несущей на растущем конце венчик тонких струн, наблюдавшийся в динамике в биомиметике, может объяснять высокую



Рис. 8. СЭМ. Периферия клетки VERO. Венчикообразные структуры.

эффективность концентрации веществ, растворенных в окружающей клетку среде, с помощью ограниченного количества струноподобных анизометрических образований, наблюдаемых в клетках, поскольку венчик тонких струн собирает растворенное вещество намного эффективней, чем торец толстой струны. Выявленный в биомиметиках характер формирования толстых струн, по-видимому, позволяет также объяснить эффективность неприцельной коммутации микробиологических объектов, например, при слабом таксисе. Действительно, рост струны с достаточно широким венчиком в направлении, приблизительно соответствующим направлению на источник сигнала, положение которого поддается лишь ориентировочной идентификации, с высокой вероятностью приведет к тому, что хотя бы одна из тонких струн, входящих в венчик, вступит в контакт с целью, что может запустить механизм подтягивания к цели основной струны.

Отметим также, что в случае диффузного механизма концентрирования вещества к торцу растущей уединенной струны, расчетная скорость ее роста v обратно пропорциональна диаметру струны [10]. При этом в условиях рассматриваемых экспериментов, для тонкой струны с диаметром ~ 1 нм [что сопоставимо с размером молекулы ТФААС $\sim (0.3 - 0.5)$ нм]: $v \sim 1$ см/с, а для типичной толстой струны с диаметром ~ 1 мкм: $v \sim 10$ мкм/с, что соответствует скоростям роста струн, указанным выше. Однако в ряде случаев наблюдается скачкообразный рост толстых струн со скоростью, существенно превосходящей расчетную скорость роста уединенной струны такого диаметра. Это явление, возможно, связано с существованием венчика. Действительно, его наличие приводит к тому, что каждая тонкая струна, входящая в венчик, может расти со скоростью, соответствующей ее диаметру. При этом в совокупности входящие в венчик струны концентрируют вещество из большого объема раствора, что способно обеспечить итоговый рост толстой струны со скоростью, характерной для составляющих ее тонких струн и существенно

большей, чем расчетная скорость роста уединенной струны соответствующего диаметра. Таким образом, в гомохиральных модельных растворах биомиметиков смоделирован ряд динамических процессов, существенных для эффективной коммутации клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Стовбун С.В. О необходимости хиральности и гомохиральности липидов для формирования 1d-супрамолекулярных структур межклеточной коммуникации // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2011. – Т. 152. – № 7. С. 56-59.
2. Стовбун С.В., Занин А.М., Скоблин А.А., Михайлов А.И., Берлин А.А. Феноменологическое описание спонтанного образования макроскопических струн в низкоконцентрированных хиральных растворах и формирования анизометрических гелей // ДАН. – 2012. – Т. 442. – Т. 5, с. 645-648.
3. Стовбун С.В., Занин А.М., Скоблин А.А., Михайлов А.И., Костяновский Р.Г., Гришин М.В., Шуб Б.Р. Макроскопическая хиральность струн // Хим. физ., 2011, Т. 30, № 12, с. 55-59.
4. Стовбун С.В., Крутиус О.Н., Занин А.М., Скоробогатко Д.С., Костяновский Р.Г., Экспериментальное наблюдение анизометрических структур в растворах с низким содержанием гелатора // Хим. физ.–2011. – Т. 30. – № 9. – С. 63-66.
5. Стовбун С.В., Михайлов А.И., Занин А.М., Костяновский Р.Г. Хиральность при самоорганизации струн в жидкой фазе и принципы экономии в природе // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2011. – № 3. – С. 92-97.
6. Стовбун С.В., Михайлов А.И., Скоблин А.А., Брагина Е.Е., Гомберг М.А. О супрамолекулярном механизме клеточной коммутации // Хим. физ. 2012. – Т. 31. – № 1. – С. 67-71.
7. Стовбун С.В., Скоблин А.А. Физико-химическое моделирование процессов межклеточной коммутации // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2011. – Т. 152. – № 11. – С. 502-505.
8. Стовбун С.В., Скоблин А.А., Занин А.М., Рыбин Ю.М., Агеев И.М., Твердислов В.А. Каплеобразные объекты, окруженные мембраной, концентрирующие вещество среды и коммутирующие посредством струн, в гомохиральных растворах // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2012. – № 1. – С. 75-81.
9. Стовбун С.В., Скоблин А.А., Твердислов В.А. Биологические жидкости как хиральные анизометрические среды // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2011. – Т. 152. – № 12. – С. 644-648.
10. Стовбун С.В. Формирование конденсированной фазы (струн) в слабых растворах хиральных веществ // Хим. физ. – 2011. – Т. 30. – № 8. – С. 3-10.
11. Kostyanovsky R.G., Lenev D.F., Krutius O.N., Stankevich A. A. Chirality-directed organogel formation // Mendeleev Commun. – 2005. – V. 15. – Is. 4. – P. 140.
12. Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H.H. Science. 2004; 303(5660):1007-1010.