

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 6, № 2
2021**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 6, № 2
2021**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 6, No. 2, 2021**

Севастополь
2021

Учредитель и издатель

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация

«Актуальные вопросы биологической физики и химии» – научный журнал, посвященный актуальным вопросам общей и молекулярной биофизики, нанобиофизики, экологической биофизики, а также современным проблемам биоорганической, биофизической и медицинской химии. Издание рассчитано на научных работников, аспирантов, студентов.

Журнал зарегистрирован в Международном центре ISSN (ISSN 2499-9962), Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (свидетельство ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018), индексируется в библиографической базе данных научных публикаций российских ученых (РИНЦ). Издается с апреля 2016 г. С 2018 г. выходит 4 раза в год.

Главный редактор

Евстигнеев М.П. (Севастополь).

Chief Editor

Evstigneev M.P. (Sevastopol).

Научный редактор

Твердислов В.А. (Москва).

Science Editor

Tverdislov V.A. (Moscow).

Редакционная коллегия

Артюхов В.Г. (Воронеж);
Бержанский В.Н. (Симферополь);
Костюков В.В. (Севастополь);
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);
Ризниченко Г.Ю. (Москва);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Тихонов А.Н. (Москва);
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

Editorial Board

Artyuhov V.G. (Voronezh);
Berzhansky V.N. (Simferopol);
Kostjukov V.V. (Sevastopol);
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);
Riznichenko G.Yu. (Moscow);
Soldatov A.A. (Sevastopol);
Tikhonov A.N. (Moscow);
Hernandez Santiago A.A. (Puebla, Mexico).

Ответственный секретарь

Воронин Д.П. (Севастополь).

Executive Secretary

Voronin D.P. (Sevastopol).

Рекомендован к печати Ученым советом ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет».

СОДЕРЖАНИЕ

Том 6, № 2, 2021

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

В.В. Рощина, Л.А. Сергиевич, Л.А. Джалалян

Определение биогенных аминов флуоресценцентным методом у живых объектов после экспозиции в озоне 207

Н.К. Кочарли, С.Т. ГумматоваВлияние γ -излучения на люцигенинзависимую хемилюминесценцию и дыхание клеток дрожжей 212**Д.Н. Чернышев, В.С. Клочкова**Разделение нативного спектра поглощения культуры *Arthrospira (Spirulina) Platensis* 217**Р.А. Ганиева, С.А. Атакишиева, Р.А. Гасанов**Эффект НА-аскорбата в защите активности ФС II в условиях одновременного действия CO₂ и фотоингибирования 222**А.А. Хохлов, О.А. Рогачевская**

Наблюдение секреции АТФ вкусовыми клетками EX VIVO 226

А.Н. Чантурия

Роль латерального натяжения в кальций-зависимом слиянии фосфолипидных мембран 230

С.Б. Дадашева, И.М. Курбанова

Растительные экстракты в защите фотосинтетических пигментов при окислительном стрессе 235

Д.Д. Орехова, Е.Д. Каримова

Ритмическая активность мозга при восприятии медиа-контента и созерцании природы 239

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

Б.Н. Клочков

Моделирование динамики волнового транспорта в биосистемах 245

Р.П. Тренкеншу, А.В. Ширяев, С.Ю. Горбунова

Моделирование пред-экспоненциальной фазы роста в культуре микроводорослей 251

Л.О. Костюкова, Д.П. Воронин, К.А. Рыбакова, Е.В. Савченко,**В.В. Костюков**

Взаимодействие возбужденной молекулы красителя лазурного А с водным окружением: теоретическое исследование 256

С.В. Аксенова, А.С. Батова, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов Моделирование нейронной сети гиппокампа с различными типами рецепторов NMDA.....	265
О.М. Масленникова, А.Л. Сибирев, В.В. Криштоп, М.Н. Шипко, М.А. Степович, О.С. Ленчер Исследование эффективности транспорта ионов K ⁺ по каналам ионных обменников в присутствии лекарственных средств – активаторов калиевых каналов	269
Л.М. Бабков, М.Д. Москвитин, Н.А. Давыдова, Я. Баран Структурно-динамическая ангармоническая модель и ИК спектр 2-Бензилфенола.....	275
А.А. Глебов, Е.А. Колесникова, А.Н. Бугай Моделирование нарушения нейрогенеза после острого облучения мышей рентгеновскими лучами.....	280
К.В. Зубова, В.А. Кузнецова, А.Ж. Аль-Альвани, Е.В. Глинская, М.В. Каневский, Е.Г. Глуховской Характеристика лентгмюровских монослоев фосфолипидов, выделенных из клеточных мембран тест-культуры <i>E. coli</i> K- 12	285

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В.Ю. Титов, А.Н. Осипов, И.И. Кочиш Предполагаемый механизм регуляции физиологических эффектов оксида азота.....	289
В.Н. Зарубин Аппарат хронофизиотерапии для лечения заболеваний путём устранения десинхроноза	296
Н.П. Милютина, Р.В. Сидоров, Н.С. Долтмурзиева, А.А. Ананян, В.В. Внуков Оценка состояния пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование	300
Д.А. Киселева, Е.В. Сидорин Изучение шаперонной активности Skp из <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> при разных значениях pH среды	306
Е.А. Гайдабура, М.Л. Золотавина, А.В. Братова Биохимические методы маркеров воспаления крови как альтернатива методов компьютерной томографии для определения степени поражения легочной ткани при новой коронавирусной инфекции	311
А.Ю. Емельянова, М.М. Игнатьева, И.А. Черенков, М.Д. Кривилев Диффузия толуидинового синего в гидрогелевых средах: данные электрохимических экспериментов и задачи для численного моделирования	315
Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, Е.В. Михлина, М.М. Симунин, И.И. Рыжков, В.С. Бондарь Каталитический эффект композита нановолокна оксида алюминия – наноалмазы при функционализации Fe ²⁺ и Cu ²⁺	321
Е.М. Кравченко, Е.С. Кучина, Е.А. Лаптева, И.Д. Одарюк Использование стабильных радикалов для изучения кинетики ферментативного окисления фенолов.....	325

С.П. Рожков

Возможная роль полиморф глобулярного белка, индуцируемых взаимодействием с ионами солей, в фазовых переходах типа жидкость-жидкость 330

Е.М. Филиппова, Ю.В. Несвижский, С.А. Титов, А.И. Глухов

Исследование физико-химических свойств клеточной стенки CANDIDA ALBICANS методом атомно-силовой микроскопии 340

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА**А.Г. Дегерменджи, Н.Н. Дегерменджи**

New directions in biophysics of aquatic ecosystems 346

Н.Н. Дегерменджи

Математическое моделирование динамики бактериопланктона на органических почвенных экстрактах берегов Красноярского водохранилища 352

Л.М. Апашева, М.И. Будник, А.В. Лобанов, Е.Н. Овчаренко, М.В. Розанцев, В.В. Турбин, А.И. Сергеев, Д.С. Стребков

Экологически чистый пероксид водорода: получение, рострегулирующие свойства 358

CONTENTS

Volume 6, No. 2, 2021

GENERAL BIOPHYSICS

V.V. Roshchina, L.A. Sergievich, L.A. Jalalyan

Determination of biogenic amines by fluorescence method in living objects after exposure in ozone..... 207

N. Kocharli, S. Hummatova

The influence of γ -RAYS on lucygenin-dependent chemiluminescence and yeast cell respiration 212

D.N. Chernyshev, V.S. Klochkova

Decomposition native absorption spectrum of the culture micro alga *Arthrospira (Spirulina) Platensis* 217

R.A. Ganiyeva, S.A. Atakishiyeva, R.A. Gasanov

Effect of na-ascorbate in the protection of PS II activity under conditions of simultaneous action of CO₂+ and photoinhibition 222

A.A. Khokhlov, O.A. Rogachevskaya

Ex vivo monitoring of atp secretion by taste cells 226

A.N. Chanturia

The role of the lateral tension in calcium-dependent phospholipid membrane fusion 230

S.B. Dadashova, I.M. Kurbanova

Plant extracts in protection of photosynthetic pigments in oxidative stress.....235

D.D. Orekhova, E.D. Karimova

Brain rhythmic activity during media-content perception and nature viewing 239

MODELLING IN BIOPHYSICS

B.N. Klochkov

Modeling of wave transport dynamics in biosystems.....245

R.P. Trenkenshu, A.V. Shiryaev, S.Yu. Gorbunova

Modeling the pre-exponential growth phase in microalgae culture pigments..... 251

L.O. Kostjukova, D.P. Voronin, K.A. Rybakova, E.V. Savchenko, V.V. Kostjukov

Interaction of an excited molecule of azure a dye with a aqueous environment: a theoretical study 256

S.V. Aksenova, A.S. Batova, A.N. Bugay, E.B. Dushanov Modeling of the hippocampus's neural network with different types of NMDA receptors	265
O.M. Maslennikova, A.L. Sibirev, V.V. Krishtop, M.N. Shipko, M.A. Stepovich, O.S. Lencher Study of the efficiency of K ⁺ ion transport through ion exchanger channels in the presence of drugs – potassium channel activators.....	269
L.M. Babkov, M.D. Moskvitin, N.A. Davydova, J. Baran Structural- dynamic anharmonic model and IR spectrum of 2-benzylphenol	275
A.A. Glebov, E.A. Kolesnikova, A.N. Bugay Modeling impairment of neurogenesis due to acute x-ray exposure of mice	280
K.V. Zubova, V.A. Kuznetsova, A.Zh. Al-Alvani, E.V. Glinskaya, M.V. Kanevsky, E.G. Glukhovskaya Characteristics of langmuir monolayers of phospholipids isolated from cell membranes E. Coli K-12 test cultures	285

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

V.Yu. Titov, A.N. Osipov, I.I. Kochish Proposed mechanism of regulation of the physiological effects of nitric oxide	289
V.N. Zarubin Chronophysiotherapy device for treatment of diseases by eliminating desynchronosis	296
N.P. Milutina, R.V. Sidorov, N.S. Doltmurzieva, A.A. Ananyan, V.V. Vnukov Assessment of the condition of patients who have undergone coronary artery bypass grafting	300
D.A. Kiseleva, E.V. Sidorin Study of the chaperonic activity of Skp protein from Yersinia pseudotuberculosis at different pH values.....	306
E.A. Gajdabura, M.L. Zolotavina, A.V. Bratova Biochemical methods of blood inflammation markers as an alternative to computer tomography methods for determining the degree of pulmonary tissue damage in new coronavirus infection.	311
A.Yu. Emelyanova, M.M. Ignat'eva, I.A. Cherenkov, M.D. Krivilyov Toluidine blue dye diffusion in hydrogel media: electrochemical experiments data and tasks for numerical simulation	315
N.O. Ronzhin, E.D. Posokhina, E.V. Mikhlina, M.M. Simunin, I.I. Ryzhkov, V.S. Bondar Catalytic effect of alumina nanofibers - nanodiamonds composite after functionalization by Fe ²⁺ and Cu ²⁺	321
E.M. Kravchenko, E.S. Kuchina, E.A. Lapteva, I.D. Odaryuk The stable radicals for study the enzyme oxidation of phenols	325

S.P. Rozhkov

Possible role of globular protein polymorphs induced by interaction with salt ions in liquid-liquid type phase transitions 330

E.M. Filippova, U.V. Nesvizhskiy, S.A. Titov, A.I. Glukhov

Applying atomic force microscopy for work with the cell surface of *Candida albicans* 340

ECOLOGICAL BIOPHYSICS**A.G. Degermendzhi, N.N. Degermendzhi**

New directions in biophysics of aquatic ecosystems 346

N.N. Degermendzhi

Mathematical simulation of bacterioplankton dynamics on organic soil extracts of Krasnoyarsk reservoir 352

L.M. Apasheva, M.I. Budnik, A.V. Lobanov, E.N. Ovcharenko, M.V. Rozancev, V.V. Turbin, A.I. Sergeev, D.S. Strebkov

Environmentally friendly hydrogen peroxide: production, growth-regulating properties 358

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ У ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ ПОСЛЕ ЭКСПОЗИЦИИ В ОЗОНЕ

Рощина В.В.¹, Сергеевич Л.А.¹, Джалалян Л.А.²

¹ Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ; e-mail: larserg@mail.ru, roshchinavic@mail.ru

² ООО «Орион-Си»

ул. Орджоникидзе, 11, стр. 1, г. Москва, РФ; e-mail: orionsi@yandex.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. С помощью флуоресцентного гистохимического метода проведено исследование образования биогенных аминов дофамина и гистамина в модельных системах крови мышей и пыльце сенполии *Saintpaulia ionantha* Wendl. (fam. Gesneriaceae) при стрессе, вызванном озоном. Предпринято испытание шести физиотерапевтических режимов озона (дозы 40–250 мкл/л), вырабатываемого медицинским озонатором Орион-Си на здоровых половозрелых мышках и растениях в пластиковой камере. Для люминесцентного анализа производился отбор проб, которые обрабатывали реагентами на дофамин или гистамин, соответственно глиоксильной кислотой или орто-фталевым альдегидом. Увеличение возбуждаемой ультрафиолетом флуоресценции при длине волны 460 нм, относящейся к биогенным аминам, наблюдается у самцов мышей уже через час после экспозиции в озоне (доза 250 мкл/л), а у самок при этом – лишь через сутки и менее интенсивное. У первой группы через 3 дня присутствие биогенных аминов не отмечено, тогда как у второй – увеличено количество гистамина. Пыльца сенполии как модельная система оказалась более чувствительной к озону. Содержание дофамина и гистамина у нее повысилось по сравнению с контролем уже после экспозиции в озоне в самой малой из использованных доз–40мкл/л, и затем по мере увеличения дозы снижалось или мало изменялось. Пыльца комнатных растений может быть индикатором озона в воздухе.

Ключевые слова: гистамин, гистохимический анализ, дофамин, флуоресценция.

Электрические озонаторы используются для физиотерапии и очистки воздуха в помещениях, применяя высокие дозы озона. Поскольку озон в высоких концентрациях может увеличивать содержание стрессовых биогенных аминов в клетках этот вопрос заслуживает внимания как медиков, так и биофизиков растений. Практика использования озона в физиотерапии и дезинфекции помещений требует иметь тесты, по которым присутствие биогенных аминов можно определять флуоресцентным гистохимическим методом в клетках и тканях.

Гистохимические методы обнаружения в тканях животных биогенных аминов с использованием флуоресценции были предложены в 60–80-е годы двадцатого века. Дофамин и другие катехоламины исследовали с помощью обработки срезов глиоксильной кислотой [1,2] и последующим анализом под люминесцентным микроскопом голубого свечения клеток, возбужденных ультрафиолетовым светом. Метод определения гистамина был основан на реакции паров орто-фталового альдегида, в результате которой образуется флуоресцирующее соединение производных имидазолилэтиламина [3]. Этот комплексный продукт при малом содержании этого амина в клетках дает голубое свечение при возбуждении ультрафиолетом, при средних концентрациях – зеленое, а для высоких концентраций – желтое. До сих пор эти методы применялись в основном для исследования клеток мозга. На основании выше приведенных методик исследовали и содержание гистамина в коже человека под влиянием гиалуроновой кислоты [4]. Наряду с известным методом высокочувствительной жидкостной хроматографии для определения в растениях биогенных аминов [5], сделана попытка использовать гистохимический флуоресцентный метод для анализа растительных клеток [6].

Таким образом, следовало на модельных объектах рассмотреть возможности применения гистохимического флуоресцентного метода для изучения влияния озона, применяемого в озонаторах для терапевтических и санитарных целей. В качестве моделей можно было использовать клетки крови мышей и клетки растений, выращиваемых в комнатных условиях. Появление под действием озона биогенных аминов в клетках крови млекопитающих и пыльце еще не рассматривалось.

В связи с этим, целью данной работы является изучение гистохимическим флуоресцентным методом образования биогенных аминов в модельных системах крови мышей и пыльце комнатного растения сенполии под влиянием озона, вырабатываемого в высоких концентрациях медицинским озонатором Орион-Си.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе предпринято испытание шести физиотерапевтических режимов озона (дозы 40, 100, 130, 215, 225, 250 мкл/л за 10 мин) или в дополнительном опыте – при шестом режиме за 20 мин в пластиковой камере типа “Нога” на образование стрессовых биогенных аминов в модельных системах – крови мышей и пыльце сенполии *Saintpaulia ionantha* Wendl. (fam. Gesneriaceae). Максимальная продолжительность экспозиции мышей или целого цветущего растения в озоне составляла 20 мин. Отбор образцов крови мышей производили из хвостовой

вены, и наблюдали за поведением животных после экспозиции в озоне. Образцы пыльцы и листья указанных выше растений собирали сразу после такой же экспозиции. Дофамин или гистамин исследовали с помощью гистохимической обработки клеток глиоксильной кислотой или орто-фталевым альдегидом, соответственно, и высушивании образцов при 50-70°C [1-3]. В результате возбуждения ультрафиолетовым светом 360-380 нм флуоресцирующие продукты реакции (в зависимости от концентрации аминов- низкой до 10^{-6} М, средней 10^{-5} - 10^{-4} М и высокой 10^{-3} М и более) вызывают голубое, зеленое или желтое свечение клеток. Образцы анализировали под люминесцентным микроскопом Carl Zeiss A-10 Axio Imager и регистрировали их флуоресценцию спектрофлуориметром Perkin-Elmer 350 MPF-44B (UK) или микроспектрофлуориметром МСФ-15 (ЛОМО МИКМЕД 2). Вычислялась средняя ошибка опыта в каждом из режимов озонирования для 3 мышей и 50 пыльцевых зерен сенполии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши опыты, заметное количество обоих биогенных аминов в мазках крови мышей и масляных железах эвкалипта при гистохимическом окрашивании на присутствие дофамина (реагент глиоксильная кислота) или гистамина (реагент о-фталевый альдегид) регистрируется только после экспозиции в шестом режиме озонатора в общей дозе 250 мкл/л. Этот режим обычно используется для лечения сосудистых заболеваний конечности как максимальный. Спектры флуоресценции образцов в таком варианте озонирования в течение 10 мин приведены на рисунке 1. После гистохимической реакции на биогенные амины интенсивность эмиссии при 460 нм в образцах крови мышей, обработанных озоном, была в 100 и более раз выше, чем в варианте без такой обработки. Заметное повышение флуоресценции при 460-470 нм происходит после экспозиции с озоном и особенно велико для варианта по определению гистамина.

Измерения эмиссии в реакции гистохимического окрашивания проводили через 1 час, сутки, двое суток и 4 дня после озонирования. Отметим, что стабильное количество биогенных аминов постоянно определялось лишь спустя 20 мин. озонирования в шестом режиме озонатора (табл.1). Такая процедура с озонатором допускается при санитарной обработке помещений с помощью данного озонатора.

Стоило оценить появление и продолжительность присутствия дофамина и гистамина в образцах крови мышей после экспозиции в озоне. На рисунке 2 показана интенсивность эмиссии при 460 нм, относящаяся к биогенным аминам. После экспозиции в озоне 10 минут количество дофамина не меняется по сравнению с контролем за 60 мин, за сутки увеличивается, почти вдвое, а через трое суток возвращается к контрольному значению. Иная картина – после 20 мин-экспозиции в O_3 . Через 60 минут после экспозиции происходит рекордное (почти в три раза) увеличение дофамина образцах, которое слабо изменяется до третьих суток.

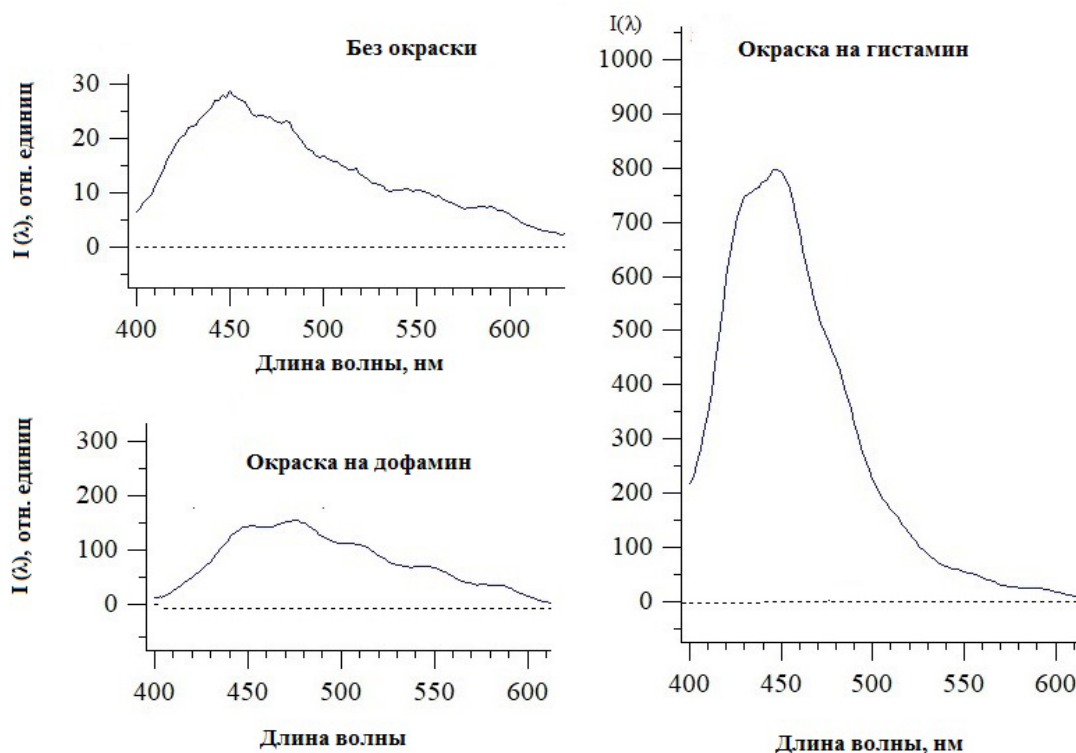


Рисунок 1. Спектры флуоресценции после гистохимической окраски на биогенные амины мазков крови озонированных в шестом режиме мышей в течении 10 мин. Микроспектрофлуориметрия при возбуждении светом 360-380 нм

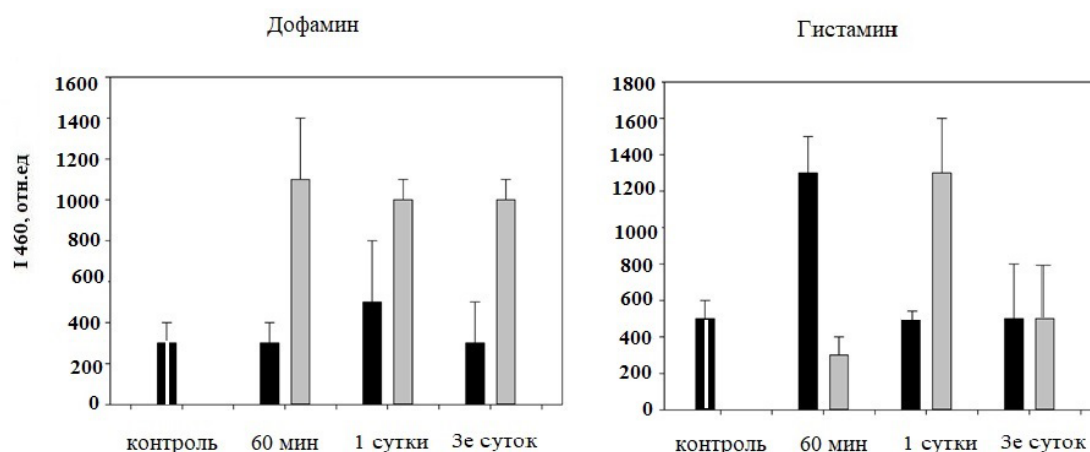


Рисунок 2. Изменение во времени интенсивности флуоресценции мазков крови мышей при 460нм (I_{460}), обработанных реагентами на дофамин и гистамин после экспозиции образцов в шестом режиме озонатора Орион-Си. Контроль – измерения до воздействия. Черные и серые столбики соответствуют экспозиции в озоне в течение 10 и 20 мин, соответственно

Возможно, не работают или повреждаются метаболизирующие дофамин ферменты. Уровень гистамина, судя по флуоресценции, резко увеличивается по отношению к контролю уже при 10 минутной экспозиции в озоне в первые 60 минут после озонирования, а в дальнейшем падает до контрольного уровня. Напротив, после 20 минутной экспозиции в первые 60 минут интенсивность флуоресценции, относящаяся к гистамину, снижена и заметно возрастает после первых суток. После трех суток разница с контролем не наблюдается и при 10- и 20-минутных экспозициях в озоне. По этим данным, видна тенденция к нивелированию стрессового эффекта со временем после озонирования.

Наблюдались также различия и по половому признаку, заметные для экспозиции 20 минут. Увеличение флуоресценции, относящееся к биогенным аминам, у самцов мышей наблюдается уже через час после озонирования, а у самок лишь через сутки и в 5 раз менее интенсивное (табл. 1). У первой группы через 3 дня присутствие биогенных аминов не отмечено, тогда как у второй – увеличено количество гистамина. Следует отметить, что количественные определения биогенных аминов требуют большей выборки и учета индивидуальных особенностей каждой мыши, поскольку у некоторых из них исходный уровень биогенных аминов может быть повышен. Мы измеряли этот уровень флуоресценции для каждой мыши, и это учитывали в обработке данных после экспозиции в озоне (табл. 1). К 72 часам после озонирования, в основном, снижается до нуля уровень дофамина и у самцов и самок. Исчезает гистамин у самцов к этому времени, а у самок его уровень может быть недостоверным в пределах большой ошибки опыта.

Под действием озона изменялось соотношение клеток крови - компонентов стресса (табл. 2). Судя по флуоресценции образцов, значительная часть биогенных аминов после озонирования концентрируется в сегментоядерных нейтрофилах (рис.3) и появляющихся на короткий промежуток времени базофилах крови мышей. Подсчет в мазке после 20 минут экспозиции в шестом режиме показал увеличение в их содержании: моноциты/ нейтрофилы/лимфоциты/базофилы: 1,3-5,5; 18,3±0,7; 79-80; 0,7-4,5 против показателей в норме соответственно 0-1; 13-50; 39-80; 0-0,5. Указанные элементы часто связаны с аллергической реакцией на стресс.

Таблица 1. Флуоресценция биогенных аминов после озонирования мышей 20 мин в шестом режиме озонатора. Среднее из каждой выборки, состоящей из 3 х мышей в каждом варианте

Образцы спустя	Флуоресценция, отн. Ед			
	Самцы		Самки	
	Дофамин	Гистамин	Дофамин	Гистамин
1 час	203±3	165±5	0	0
24 часа	195±35	0	45±15	0
72 час	0	0	0	156,6±66,7

Таблица 2. Состав компонентов крови после озонирования

Условия озонирования	Время после озонирования	Моноциты	Сегментоядерные нейтрофилы	Лимфоциты	Базофилы
№6 10мин	40 -60 мин	5,7±1,5	35±7,8	59,3±7,4	0,3±0,3
№6 20мин	60 мин	3,5±2,5	34,5±13,5	61±15	1±1
№6 20мин	1 сутки	5,5±0,5	20,5±4,5	69,5±6,5	4,5±1,5
№6 20мин	3 суток	1,3±0,3	18,3±0,7	79,7±0,3	0,7±0,3
норма		0-1	13-50	39-80	0-0,5

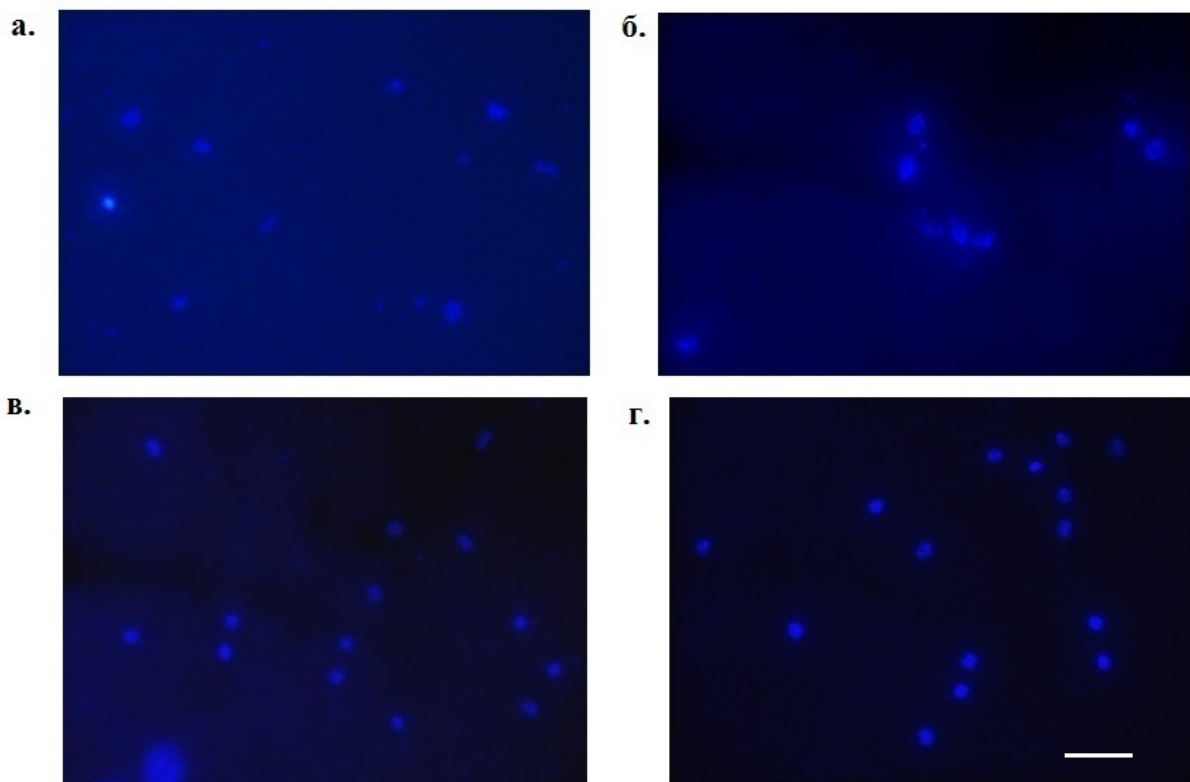


Рисунок 3. Вид флуоресценции мазков крови мышей под люминесцентным микроскопом после гистохимической окраски для определения дофамина (а, б) и гистамина (в, г) до (а, в) и после (б, г) озонирования в шестом режиме озонатора. Шкала – 30 мкм

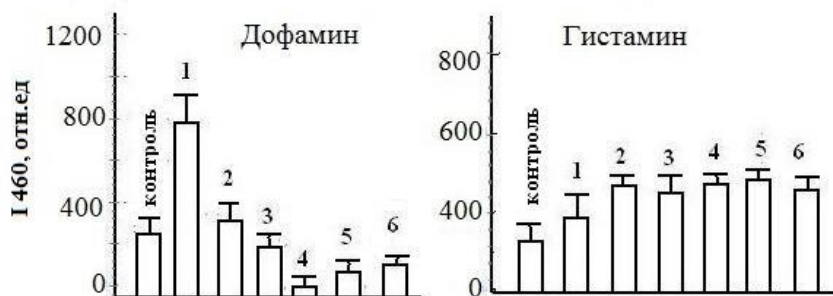


Рисунок 4. Интенсивность флуоресценции пыльцы сенполии *Saintpaulia ionantha* при 460нм (I_{460}) после экспозиции образцов в шести разных режимах озонатора Орион-Си. Спектрофлуориметрия после гистохимической окраски для определения дофамина и гистамина. Контроль – измерения до воздействия озоном

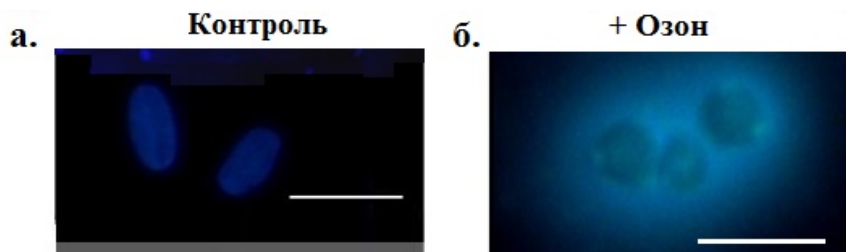


Рисунок 5. Вид флуоресценции пыльцы сенполии *Saintpaulia ionantha* под люминесцентным микроскопом после гистохимической окраски для определения гистамина до (а) и после озонирования в шестом режиме озонатора (б). Контроль – до воздействия озоном в шестом режиме, голубое свечения мало или почти незаметно. Светло голубая эмиссия видна в опыте с озоном. Шкала – 30 мкм

По сравнению с данными, полученными на мышах, пыльца как модельная система оказалась более чувствительной к озону (рис. 4). Содержание дофамина у нее повысилось в 4 раза по сравнению с контролем уже после экспозиции озона в первом режиме, затем последовательно снижалось. Уже в 4 режиме (доза 215 мкл/л) оно уменьшилось почти до нуля, а в остальных режимах 5 и 6-ом (дозы 225 и 250 мкл/л) составило почти 50% от контроля. Количество гистамина в образцах пыльцы по сравнению с контролем последовательно увеличивалось после первого режима озонирования в дозе 40 мкл/л (увеличение почти на 30%) до 125-150 процентов во всех остальных режимах.

В пыльце сенполии голубая эмиссия после окрашивания на дофамин или гистамин видна в секрете, вышедшем из клетки, апертурах (отверстиях, из которых выходит пыльцевая трубка при прорастании) и ядре в центре клетки. Это наиболее наглядно для гистамина (пример на рис. 4).

Показательно, что мыши и целые растения продолжали нормально развиваться после озонирования даже самой большой дозой озона. Следовательно, можно сделать вывод, что применение озонатора при 10 минутной экспозиции (максимальная физиотерапевтическая доза озона) не оказывает губительного влияния на живые клетки. У мышей уровень биогенных аминов в крови восстанавливался до контрольного значения через несколько дней после стрессовой реакции на озон. Таким образом, стрессовое образование этих метаболитов может быть обратимой реакцией. В отличие от клеток млекопитающих, накопление биогенных аминов у пыльцы при более низких его концентрациях в воздухе может быть индикатором озона в воздухе закрытого помещения.

Список литературы / References:

1. Bjorklund A., Lindvall O., Svensson L.A. Mechanisms of fluorophore formation in the histochemical glyoxylic acid method for monoamines. *Histochemistry*, 1972, vol. 32, no. 2, pp. 113-131.
2. Markova L.N., Buznikov G.A., Kovačević N., et al. Histochemical study of biogenic monoamines in early (Preneurons) and late embryos of sea urchins. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1985, vol. 3, no. 5, pp.493-499.
3. Cross S.A.M., Even S.W.B., Rost F.W.D. A study of the methods available for the cytochemical localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde. *Histochem J.*, 1971, vol. 3, no. 6, pp. 471-476.
4. Жирнова Н.С., Любовцева Л.А., Гурьянова Е.А., Мулендеев С.В. Люминесцентно-гистохимическое изучение гистамина в структурах кожи после введения препаратов гиалуроновой кислоты. *Вестник ОГУ*, 2007, № 6, с. 109-114. [Zhironova N.S., Lyubovtseva L.A., Guryanova E.A., Mulendeev S.V. Luminescent-histochemical study of histamines in skin structures after administration of hyaluronic acid preparations. *OSU Bulletin*, 2007, no. 6, pp. 109-114. (In Russ.)]
5. Cao B., Oleskin A.V., Vlasova T. Detecting biogenic amines in food and drug plants with HPLC: medical and nutritional implication. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 2020, vol. 10, pp. 0001-0004.
6. Рощина В.В., Яшин В.А., Кучин А.В. 2016. Флуоресценция нейротрансмиттеров и их рецепция в растительной клетке. *Биол. мемб.*, 2016, т. 33, № 2, с. 105-112. [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kuchin A.V. Fluorescence of neurotransmitters and their reception in plant cells. *Biol. Membr.*, 2016, vol. 33, no. 2, pp. 105-112. (In Russ.)]

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES BY FLUORESCENCE METHOD IN LIVING OBJECTS AFTER EXPOSURE IN OZONE

Roshchina V.V.¹, Sergievich L.A.¹, Jalalyan L.A.²

¹ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Institutskaya Street, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: roshchinavic@mail.ru

² OO Orion-Si

Orjonikidze Street, 11, built. 1, Moscow, Russia; e-mail: orionsi@yandex.ru

Abstract. Using fluorescent histochemical method, the formation of biogenic amines dopamine and histamine in model systems of the mice blood and the pollen of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (fam. Gesneriaceae) has been studied at stress caused by ozone. Six physiotherapy regimes of ozone (dose 40-250 µl/L) were tested on healthy adult mice and plants in plastic chamber produced by the Orion-Si medical ozonator. Samples for fluorescent analysis have been treated with reagents for dopamine or histamine – glyoxylic acid or ortho-phthalic aldehyde, respectively. The increase in ultraviolet fluorescence at a wavelength of 460 nm, related to biogenic amines, has observed in male mice within an hour after the ozone exposure in dose 250 µl/L, and in females - only after day and less intense. In the first group after 3 days there was no biogenic amines, while in the second group – histamine has been recorded. Pollen of *Saintpaulia* as a model system was more sensitive to ozone. Its dopamine and histamine content increased as compared to control after exposure in ozone at the lowest dose of 40 µl/L, and then decreased or did not change as the dose increased. Pollen of room-grown plants may serve as the ozone-indicator in the air.

Key words: dopamine, histamine, histochemical analysis, fluorescence.

ВЛИЯНИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЛЮЦИГЕНИНЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ И ДЫХАНИЕ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В экспериментах на дрожжевых клетках изучено действие различных доз (5–100 Гр) γ -лучей. Исследована чувствительность дыхания и скорость образования супероксидного радикала в клетках дрожжей, подвергавшихся облучению. Изучение параметров ЛюцХЛ облученных клеток дрожжей позволило обнаружить усиление реакции образования АФК, по сравнению с контрольными клетками что свидетельствует о усилении скорости образования супероксидного анион радикала $\bullet\text{O}_2^-$ и таким образом высокой активности NADPH-оксидазы. Полярографические кривые поглощения кислорода клетками *S. guilliermondii* показывают, что в результате облучения клеток малыми дозами (5-50 Гр) наблюдается незначительное ингибирование дыхания клеток. Исследование действия высоких доз (75-100 Гр) показало, что они в значительной степени ингибируют дыхание клеток дрожжей. Эти данные совпадают с данными при изучении влияния этих доз на изменение физического состояния мембран и выживаемость клеток дрожжей. Полученные данные позволяют сделать вывод о наличии отличий реакции клеток дрожжей к действию малых и высоких доз гамма излучения.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, γ -излучение, дрожжевые клетки, АФК, супероксидный радикал.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени в мире существует много информации, касающейся общих закономерностей проявления адаптивной реакции у микроорганизмов, перевиваемых клеточных культур, клеток крови, организмов животных и растений [1-5]. Ионизирующее излучение воздействует на живой орга низм таким образом, что приводит к повреждению его функциональных систем и гибели. В настоящее время считается, что ионизирующее излучение оказывает наибольшее воздействие на мембранные структуры и ядро [6]. Известно, что адаптивный ответ, развивающийся, после облучения клеток в дозе 1 сГр, существенно проявление адаптивной реакции у микроорганизмов, ослабляется в присутствии ингибиторов синтеза белка [5]. Скорее всего, белки, синтез которых индуцируется в клетке при адаптирующем облучении, относятся к семейству стрессорных и участвуют в ликвидации повреждений ДНК, возникающих при действии на клетку экстремальных факторов самой различной природы: тепла, окислительного стресса, тяжелых металлов, гормонов и т.д. Известно, что различные токсические факторы могут индуцировать в клетках синтез одних и тех же белков [7]. Не исключено, что в запуске механизма экспрессии генов адаптивного ответа определенную роль. Ионизирующее излучение вызывает повреждение и гибель клеток вследствие как прямого воздействия на структуру ДНК и белков, так и вследствие генерации АФК [1].

К активным формам кислорода (АФК) относят супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород и перекись водорода. Образуясь в небольших количествах, АФК оказывают защитное действие, так как способствуют разрушению старых, отживших, раковых клеток и патогенных микроорганизмов. Гиперпродукция АФК стимулирует свободнорадикальное ПОЛ, что сопровождается деструкцией клеточных мембран, повреждением макромолекул – белков, липидов, ДНК.

Супероксидный радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) является наиболее изученным из всех радикалов, производных кислорода. Это, вероятно, связано с тем, что он является первым промежуточным соединением в цепи последовательных одноэлектронных реакций восстановления молекулярного кислорода, $\text{O}_2: \text{O}_2 + e^- \rightarrow (\bullet\text{O}_2^-)$ (1) где: e^- – электрон.

Обнаружение J.M. McCord и I. Fridovich особого фермента – супероксиддисмутазы, который катализирует реакцию специфической нейтрализации ($\bullet\text{O}_2^-$) привело к предположению, что $\bullet\text{O}_2^-$ важнейший агент, ответственный за токсические эффекты кислорода, и что СОД является одним из компонентов антиоксидантной системы. Супероксидный радикал уникален также тем, что он ведет к образованию многих реакционно-активных веществ, таких как гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$) и гидропероксильный радикал ($\text{HO}_2^\bullet$). Например, протонирование $\bullet\text{O}_2^-$ то есть присоединение атома водорода, ведет к образованию $\text{HO}_2^\bullet$, который является более мощным оксидантом, чем сам супероксидный радикал. Взаимодействие супероксидного радикала с перекисью водорода может вести к образованию «синглетного кислорода». Удивительным свойством $\bullet\text{O}_2^-$ является его способность в зависимости от кислотности водной среды превращаться в то или иное соединение. Так, в водной среде при кислотно-щелочном равновесии супероксидный радикал превращается в гидропероксильный радикал. В кислой среде из супероксидного радикала генерируется перекись водорода [8].

На клеточном уровне дыхание – это сложная последовательность окислительно-восстановительных реакций, в результате которой клетка запасает энергию в виде молекул АТФ (их еще называют универсальной

энергетической валютой клеток). Этот процесс обеспечивается дыхательной цепью переноса электронов-системой из нескольких белковых комплексов, которые располагаются в клеточной мембране.

В последние несколько лет разными группами ученых уже были изучены структуры комплекса I из бактерии *Thermus thermophilus*, дрожжевого гриба *Yarrowia lipolytica* и быка. Исследования бычьего варианта комплекса I важно, поскольку он близок к гомологичному ферменту человека. Но в 2014 году ученым не удалось полностью расшифровать структуру – были получены данные только для 28 субъединиц из 45.

Сейчас ученые получили полную структуру комплекса I-удалось расшифровать все 45 субъединиц, входящих в его состав. Теперь понятно, что 14 субъединиц образуют консервативное ядро, сохраняющееся в структурах гомологичного фермента бактерий и грибов, а 31 субъединица специфична для млекопитающих. Комплекс имеет характерную L-образную форму-вертикально расположенная часть комплекса содержит сайты связывания NADH и убихинона и выдается в матрикс митохондрии. Горизонтальная часть закорена во внутренней мембране митохондрии и является протонной помпой - именно она переносит протоны из матрикса в межмембранное пространство. Сайт связывания NADH расположен в дистальном отделе матриксной части комплекса. Ближе к мембранной части локализуется сайт связывания убихинона. Как заключают авторы статьи, именно этот подход (изучение конформационных изменений посредством криоэлектронной микроскопии) является наиболее перспективным для дальнейшего изучения комплекса I дыхательной цепи и проверки существующих гипотез о роли промежуточных продуктов восстановления убихинона в механизме функционирования фермента [9]. В литературе мало данных о влиянии ионизирующего излучения на дыхание клеток дрожжей.

Существуют различные способы оценки образования АФК. Одним из наиболее чувствительных является хемилюминесцентный метод, особенно после открытия активаторов хемилюминесценции (ХЛ), из которых наиболее широко используются люминол и люцигенин. Известно, что существует химическая специфичность активаторов: люминол вступает в реакцию с АФК образуемыми различными ферментами, а люцигенин – только с супероксидным анион-радикалом. Метод ХЛ обладает тем преимуществом что, во-первых, методом ХЛ непосредственно определяется не концентрация, а скорость реакции, в которой они образуются [10].

Таким образом, целью данного исследования явилась оценка люцигенинзависимой хемилюминесценции (Люц ХЛ) и интенсивность дыхания клеток дрожжей *Candida guilliermondii* после воздействия различными дозами гамма лучей (5–100 Гр).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916.

Облучение клеток дрожжей осуществляли гамма квантами на установке ^{60}Co . Доза облучения составляла 5–100 Гр. Контролем служила суспензия необлученных клеток.

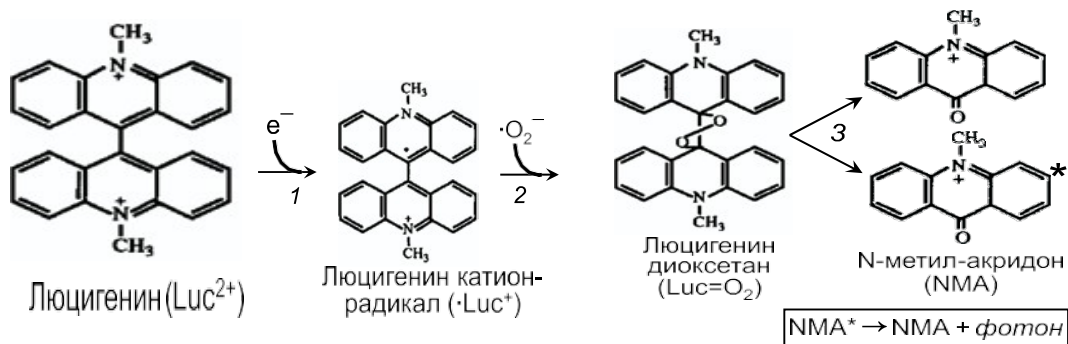
Суспензию клеток дрожжей подвергали воздействию гамма лучей затем проводили оценку образования супероксидного радикала и скорость дыхания клеток дрожжей.

Дрожжевые клетки-удобный и хорошо изученный объект для исследования влияния ионизирующего излучения. Помимо производных люминола, в качестве усилителя ХЛ широкое распространение получил люцигенин с принципиально иными структурой и механизмом действия. Этот ХЛ-зонд также используется для обнаружения супероксидного радикала [11]. Описан [12] механизм действия люцигенина.

Для определения ЛюцХЛ суспензию клеток помещали в кювету хемилюминометра, добавляли необходимое количество буфера, люцигенин и регистрировали ХЛ. Время записи кинетики варьировало от 12 до 15 минут в разных опытах. Люцигенин добавляли в конечной концентрации 0,1 мМ.

В настоящей работе методом полярографии изучено влияние различных доз гамма лучей на дыхание клеток дрожжей [13].

Точность методов анализа колебалась в пределах 0,2–0,08. Повторность опытов изменялась от 3 до 5 результаты экспериментов подвергались статической обработке. Были рассчитаны средние величины и стандартные отклонения от средних величин.



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах на дрожжевых клетках изучены параметры ЛюцХЛ.

Увеличение интенсивности ХЛ достигала максимума примерно через 3 минуты, а затем медленно снижалась. Добавление люцигенина в суспензию клеток приводило к увеличению интенсивности ХЛ. С ростом дозы облучения интенсивность ХЛ увеличивалась по сравнению с контролем (рис. 2). Изучение параметров ЛюцХЛ облученных клеток дрожжей позволило обнаружить усиление реакции образования АФК, по сравнению с контрольными клетками. Что свидетельствует о усилении скорости образования супероксидного анион радикала $\bullet\text{O}_2^-$ и таким образом высокой активности NADPH-оксидазы. Известно, что формирование супероксидных радикалов связано с мембранной NADPH-оксидазой.

NADPH-оксидаза представляет собой мембрано-ассоциированный мультимолекулярный комплекс, обладающий ферментативной активностью и являющийся структурным элементом дыхательной цепи митохондрий. В неактивном состоянии данный комплекс состоит из флавопротеина и цитохрома. Структурными компонентами NADPH-оксидазы являются 4 белковые субъединицы, формирующие функционально-активный фермент в клеточной мембране. Две субъединицы относятся к трансмембранным белкам и образуют гетеродимерный комплекс – цитохром b558, а две другие субъединицы – цитоплазматические и соединяются с цитохромом.

Таким образом, формируется активная молекула NADPH-оксидазы, необходимая для генерации супероксидного анионрадикала. Функция NADPH-оксидазы заключается в катализе восстановления молекулярного кислорода до супероксид-радикала, трансформируемого затем в перекись водорода и иные токсичные формы кислорода (гидроксидный и гидропероксидный радикалы).

Нами было обнаружено, что в клетках дрожжей НАДФН-ферментный комплекс является одной из важных мишеней при действии γ -лучей.

Инактивирующее действие γ -лучей может быть связано ингибированием дыхания клеток дрожжей. В настоящей работе методом полярографии изучено влияние различных доз гамма лучей на интенсивность дыхания клеток дрожжей [13]. Контролем служила необлученная суспензия клеток.

Установлено что интенсивность дыхания клеток дрожжей зависит от дозы γ -лучей. Полярографические кривые поглощения кислорода клетками *C. guilliermondii* показывают, что в результате облучения клеток малыми дозами (5–50 Гр) наблюдается незначительное ингибирование дыхания (рис. 3). Исследование действия высоких доз (75–100 Гр) показало, что они в значительной степени ингибируют дыхание клеток дрожжей *C. guilliermondii* и эти данные совпадают с данными при изучении влияния этих доз на выживаемость клеток дрожжей. Полученные данные позволяют сделать вывод о наличии отличий реакции клеток к действию малых и высоких доз γ -излучения.

На основании ранее нами полученных результатов можно предположить, что установленное с помощью метода флуоресцентных зондов изменение физического состояния мембран клеток дрожжей после однократного общего γ -облучения в указанных дозах в значительной степени обусловлено радиационной модификацией их липидного компонента [3]. Это, в свою очередь может, быть связано с изменением антиоксидантных систем, которое наблюдается при облучении организмов. Изменения микровязкости мембраны тесно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в клетке [14]. В настоящее время известно, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) после действия ионизирующих излучений также сопровождается активацией ключевых ферментов липидного метаболизма, что, в свою очередь, может приводить к накоплению в мембране продуктов ПОЛ.

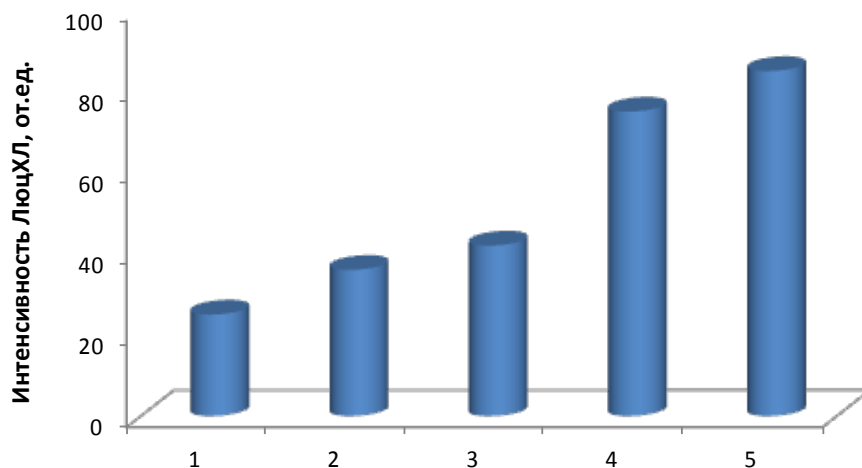


Рисунок 2. Интенсивность ХЛ люцигенина в клетках дрожжей. 1 – Контроль; 2 – 25 Гр; 3 – 50 Гр; 4 – 75 Гр; 5 – 100 Гр

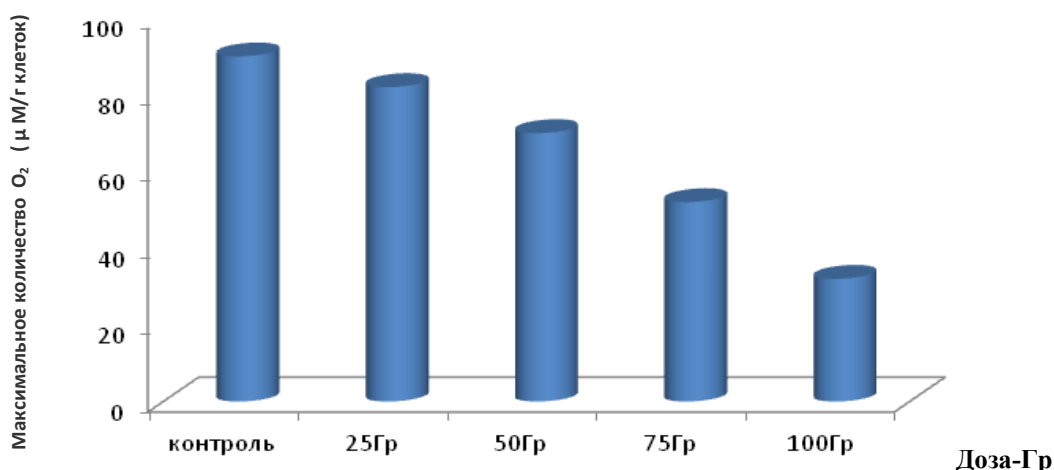


Рисунок 3. Зависимость интенсивности дыхания клеток дрожжей от дозы γ -лучей

Известно, что характер ответа клеток на стресс (активация процессов жизнедеятельности или их ингибирование и повреждение клеток) отражает степень нарушения гомеостаза живой системы под действием этого фактора. Однако если действие стрессового фактора находится в допустимых пределах по его интенсивности, то клетка или организм способны адаптироваться и выжить. Из полученных данных можно заключить, что для клеток дрожжей *S. guilliermondii* доза γ -лучей от 5 Гр до 50 Гр является малой, которую способны нейтрализовать антиокислительные системы клетки.

Список литературы / References:

1. Зюзиков Н.А., Корогодин В.И., Корогодина В.Л. Особенности действия малых доз γ -излучения на дрожжевые клетки. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 1999, т. 39, № 6, с. 619-622. [Zyuzikov N.A., Korogodin V.I., Korogodina V.L. Features of the action of small doses of γ -radiation on yeast cells. *Radiation Biology. Radioecology*, 1999, vol. 39, no. 6, pp. 619-622. (In Russ.)]
2. Комарова Л.Н. Проявление адаптивной реакции у дрожжевых клеток после действия ионизирующей радиации. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности*, 2015, № 2 (14). [Komarova L.N. Manifestation of an adaptive response in yeast cells after exposure to ionizing radiation. *Medical and biological problems of life*, 2015, no. 2 (14). (In Russ.)]
3. Кочарли, Н.К., Гумматова С.Т. Структурно-функциональное состояние плазматических мембран клеток дрожжей при действии γ -излучения. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 2, с. 223-229. [Kocharli N.K., Gummatova S.T. Structural and functional state of plasma membranes of yeast cells under the action of γ -radiation. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 223-229. (In Russ.)]
4. Dutta K., Verma N. Exposure to low dose of gamma radiation enhances the excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1998, vol. 44, pp. 243-249.
5. Wolff S. et al. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiation become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce doublestrand breaks in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988, vol. 53.
6. Ritter G.S., Nikolin V.P. et al. Characteristic of the active substance of the *Saccharomyces cerevisiae* preparation having radioprotective properties. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2020, vol. 96, no. 9, pp. 1173-1191. doi: 10.1080/09553002.2020.1793020.
7. Akaboshi E., Howard-Flanders P. Proteins induced by DNA-damaging agents in cultured *Drosophila* cells. *Mutat. Res.*, 1989, vol. 227, pp. 1-6.
8. Iriskulov B.U. Modern condition of the problem of lipid peroxide oxidation. *Central Asian Journal of Medicine*, vol. 2019, iss. 1, article 7.
9. Jiapeng Z., Kutti R. Vinothkumar, Judy Hirst. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 2016, vol. 536, pp. 80-84.
10. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и Клеточная Хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, 2009, т. 49, с. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free Radicals and Cellular Chemiluminescence. *Advances in Biological Chemistry*, 2009, vol. 49, pp. 341-388 (In Russ.)]
11. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии. М., 2013, с. 6-7. [Obraztsov I.V., Godkov M.A. *Chemiluminescent analysis of blood cells in medicine: history, theory, practice*. Federal Scientific Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Moscow, 2013, pp. 6-7. (In Russ.)]
12. Beloborodova N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J. Biomed. Sci.*, 2012, vol. 19, no. 89.

13. Новиков В.Э. Исследование кинетики дыхания дрожжевых клеток полярографическим методом. *Практикум биофизика клетки*, 2001, с. 5-7. [Novikov V.E. Investigation of the kinetics of respiration of yeast cells by the polarographic method. *Practical biophysics of cells*, 2001, pp. 5-7. (In Russ.)]
14. Владимиров Ю.А. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*, 1980, 350 с. [Vladimirov Yu.A. *Fluorescent probes in the study of biological membranes*, 1980, 350 p. (In Russ.)]

THE INFLUENCE OF γ -RAYS ON LUCYGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE AND YEAST CELL RESPIRATION

Kocharli N., Hummatova S,

Baku State University

Z. Khalilov st., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Abstract. In experiments on yeast cells, the effect of various doses (5–100 Gy) of γ -rays was studied. Respiration sensitivity and rate of superoxide radical formation were investigated in irradiated yeast cells. The study of the parameters of LucCL in irradiated yeast cells revealed an increase in the reaction of ROS formation compared to control cells, which indicates an increase in the rate of formation of the superoxide anion radical ($\bullet\text{O}_2^-$) and, thus, a high activity of NADPH-oxidase. Polarographic curves of oxygen absorption by *C. guilliermondii* cells show that as a result of irradiation of cells by low doses (5–50 Gy), was watched a slight inhibition of cell respiration. The study of the effect of high doses (75–100 Gy) showed that they significantly inhibit the respiration of yeast cells. These data coincide with the data when studying the effect of these doses on changes in the physical state of membranes and the survival of yeast cells. The obtained data allow us to conclude that there are differences in the response of yeast cells to the action of low and high doses of gamma radiation.

Key words: ionizing radiation, γ -rays, yeast cells, ROS, superoxide radical.

РАЗДЕЛЕНИЕ НАТИВНОГО СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Чернышев Д.Н., Ключкова В.С.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: chernishev.d@gmail.com

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В работе проведено математическое разделение спектра поглощения культуры микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Спектры культуры регистрировались на спектрофотометре с интегрирующей сферой. При анализе спектра вычислена производная второго порядка и определены основные максимумы поглощения. Полученные данные послужили основой при моделировании. Спектр поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* в области от 400 до 800 нм был описан шестью кривыми Гаусса. Составлена общая модель спектра поглощения культуры из отдельных пигментов. Применяя полученную модель, возможно определить концентрации хлорофилла *a*, суммарных каротиноидов и фикобилинов непосредственно по спектру поглощения нативной культуры.

Ключевые слова: спиролина, каротиноиды, хлорофилл *a*, фикобилины, спектры поглощения, гауссианы.

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации пигментов в клетках микроводорослей достаточно сложная задача, как на практике, так и в теории. [1] В большинстве современных исследований применяются методы, предполагающие разрушение клеток с последующей экстракцией пигментов. [2, 3] Очень часто определение концентрации выделенных пигментов проводится спектрофотометрически. Спектры поглощения культур микроводорослей содержат сведения о поглощении света отдельными пигментами, и характеристики светорассеяния. Поглощение света культурой микроводорослей осложняется рассеянием, возникающими из-за того, что размеры клеток в суспензиях значительно больше, чем длина волны видимого света и неоднородным распределением пигментов в клетке. Значительно устранить рассеяние удастся, используя интегрирующую сферу.

Одним из решений проблемы идентификации и разделения пигментов является декомпозиция нативного спектра математическими методами. Оптическая плотность аддитивная величина, поэтому общий спектр поглощения представляет собой сумму спектров отдельных пигментов. Спектры пигментов состоят из нескольких максимумов, форма и положение которых определяется хромофорными группами. Поглощение хромофорной группы, относительно максимума, распределено симметрично. Это свойство позволяет описать спектр пигмента одной или несколькими кривыми Гаусса. [4] В настоящей работе выполнен анализ и разделение перекрывающихся полос в нативном спектре поглощения культуры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования была выбрана *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Gomont, полученная из коллекции ФИЦ Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь.

A. platensis культивировали в накопительном режиме в унифицированной лабораторной установке [5] на питательной среде Zarrouk [6], в фотобиореакторе плоскопараллельного типа толщиной 2 см, площадью рабочей поверхности 0,05 м². Источником освещения служили холодные люминесцентные лампы Philips Daylight TL-D 54-765 6G мощностью 18 Вт. Освещённость рабочей поверхности фотобиореактора составляла 5 клк (~17 Вт/м²). Температура поддерживалась на уровне 27±1°C.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне от 400 до 800 нм на спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible, оснащённом интегрирующей сферой (диаметр 60 мм), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

При анализе спектра поглощения культуры *A. platensis* использовался метод математического дифференцирования в программе QtiPlot, а также разделение спектра на отдельные кривые Гаусса в программе MagicPlot.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе нормированного в точке максимума (678 нм) спектра поглощения культуры *A. platensis*, для достоверного выявления пиков была вычислена производная второго порядка. Контур второй производной похож на спектр поглощения, но его полосы имеют более тонкую организацию. [7] В производном спектре второго порядка была отмечена сложная структура, в которой прослеживались явные пики и плечи (рис. 1).

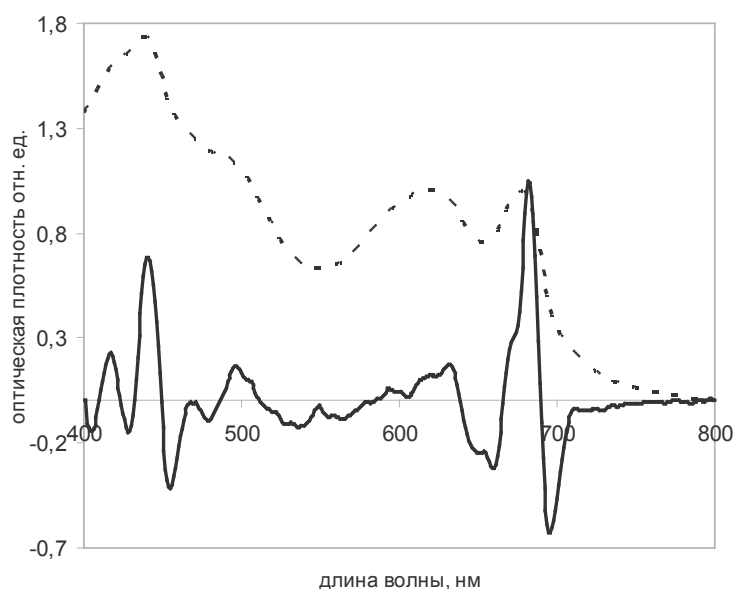


Рисунок 1. Спектр поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* нормированный по значению D_{678} (пунктирная линия). Вторая производная спектра*200 (сплошная линия)

Можно предположить, что выявленные явные максимумы связаны с определенными полосами поглощения основных пигментов сине-зеленых водорослей. А именно: хлорофилл *a*: 420, 440, 630, 680 нм, общие каротиноиды: 500 нм, и общей группой фикобилиновых пигментов: 600 нм.

Полученные данные послужили начальными точками максимумов пиков при аппроксимации спектра кривыми Гаусса. Каждый отдельный пик был описан формулой (1):

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

где $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед;

$D_{\max}$ – амплитуда пика, отн. ед;

λ_i – длина волны, нм;

$\lambda_{\max}$ – положение максимума пика, нм;

σ – полуширина пика, нм.

Результат математического разделения спектра на отдельные кривые представлен в таблице 1 и на рисунке

2.

Сравнивая полученные данные с литературными источниками [8, 9], возможно, соотнести рассчитанные пики с определенными пигментами. Спектр хлорофилла *a* соответствует пикам с максимумами 402, 434, 620, и 678 нм. Суммарные каротиноиды представлены одним пиком 482 нм. Общий спектр фикобилиновых пигментов описан пиком с максимумом 609 нм. Полученные данные хорошо согласуются с предыдущими исследованиями [10].

Вычисленные данные (положения максимумов, отношение амплитуд, и полуширины пиков) можно использовать как математические модели отдельных пигментов.

Ниже представлена модель спектра поглощения культуры. Общий спектр культуры представляет сумму спектров хлорофилла *a*, фикобилинов, и суммарных каротиноидов. В данной модели 3 неизвестных величины – концентрации хлорофилла *a*, фикобилиновых пигментов, и концентрация общих каротиноидов.

Таблица 1. Результаты вычислений пиков в спектре культуры *A. platensis*

№ пика	1	2	3	4	5	6
$\lambda_{\max}$ положение максимума пика, нм	403	434	482	609	620	678
$D_{\max}$ амплитуда пика, отн. ед.	1,051	1,240	1,068	0,785	0,231	0,567
σ полуширина пика, нм	17,0	20,9	38,6	73,7	29,5	13,0

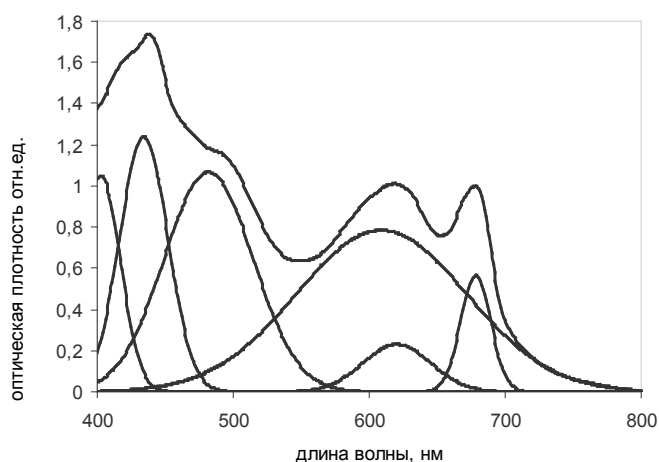


Рисунок 2. Разделение спектра поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* на отдельные кривые Гаусса

$$D(\lambda) = D_{\text{Хла}}(\lambda) + D_{\text{Фико}}(\lambda) + D_{\text{Кар}}(\lambda)$$

$$D_{\text{Хла}}(\lambda) = C_{\text{Хла}} \varepsilon_{\text{Хла}} \left(1.80 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 403}{17.0} \right)^2} + 2.13 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 434}{20.9} \right)^2} + 0.40 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 620}{29.5} \right)^2} + 0.97 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 678}{13.0} \right)^2} \right)$$

$$D_{\text{Фико}}(\lambda) = C_{\text{Фико}} \varepsilon_{\text{Фико}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 609}{73.7} \right)^2}$$

$$D_{\text{Кар}}(\lambda) = C_{\text{Кар}} \varepsilon_{\text{Кар}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 482}{38.6} \right)^2}$$

(2)

где $D(\lambda)$ – общая оптическая плотность, отн. ед;

$D_{\text{Хла}}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла a ;

$D_{\text{Фико}}(\lambda)$ – оптическая плотность фикобилинов;

$D_{\text{Кар}}(\lambda)$ – оптическая плотность суммарных каротиноидов;

$C_{\text{Хла}}$ – концентрация хлорофилла a (г/л);

$C_{\text{Фико}}$ – концентрация фикобилинов (г/л);

$C_{\text{сум.кар.}}$ – концентрация суммарных каротиноидов (г/л);

$\varepsilon_{\text{Хла}}$ – экстинкция хлорофилла a 88,15 (л г⁻¹ см⁻¹) [12];

$\varepsilon_{\text{Фико}}$ – экстинкция фикобилинов (фикоцианин) 7,3 (л г⁻¹ см⁻¹) [2];

$\varepsilon_{\text{Кар}}$ – экстинкция суммарных каротиноидов 250 (л г⁻¹ см⁻¹) [13];

Амплитуды моделей пигментов приведены к 1 в точке максимума экстинкции. Известно, что у хлорофилла, коэффициент экстинкции примерно одинаков в ацетоновом растворе и водном экстракте в красной области [11]. Для упрощения использованы стандартные значения экстинкции в максимумах поглощения пигментов [12]. Пример декомпозиции спектра представлен на рисунке .3.

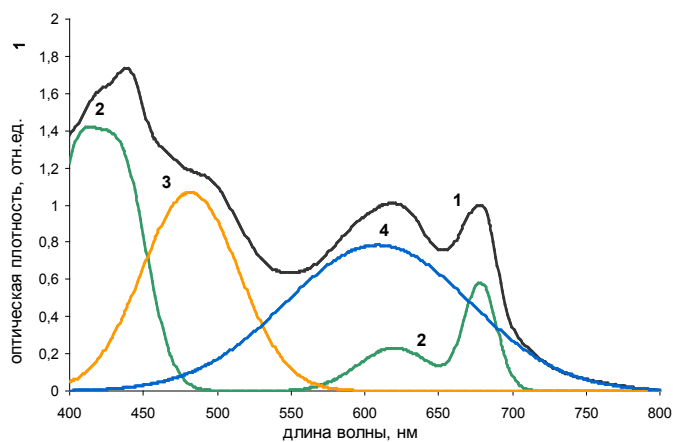


Рисунок 3. Декомпозиция спектра поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* на отдельные спектры пигментов. Общий спектр (1), хлорофилл a (2), суммарные каротиноиды (3), фикобилины (4)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый способ декомпозиции спектра может быть использован как экспресс метод определения концентрации пигментов в культуре, без выделения пигментов в чистом виде.

Список литературы / References:

1. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015, т. 25, № 1, с. 35-40. [Kopytov Yu.P. et al. The method of complex determination of the biochemical composition of microalgae. *Algologiya*, 2015, vol. 25, no. 1, с. 35-40. (In Russ.)]
2. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Холодная экстракция: учебно-методическое пособие. РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского. Севастополь, 2017, 21 с. (Препринт РАН, ИМБИ). [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of C-phycocyanin and allophycocyanin in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. *Cold extraction: an educational and methodological manual*. RAS, Institute of Marine Biological Research named after A.O. Kovalevsky. Sevastopol, 2017, 21 p. (Preprint RAS, IMBI). (In Russ.)]
3. Wellburn R.W. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 1994, vol. 144, no. 3, pp. 307-313.
4. Kupper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analytical chemistry*. 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
5. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13). [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1 (13). (In Russ.)]
6. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner). Geitler: Ph. D these, Paris, 1966, 114 p.
7. Гуляев Б.А., Литвин Ф.Ф. Первая и вторая производная спектра поглощения хлорофилла и сопровождающих пигментов в клетках высших растений и водорослей при 20°C. *Биофизика*, 1970, т. 15, № 4, с. 670-680. [Gulyaev B.A., Litvin F.F. The first and second derivatives of the absorption spectrum of chlorophyll and accompanying pigments in cells of higher plants and algae at 20°C. *Biophysics*, 1970, vol. 15, no. 4, pp. 670-680. (In Russ.)]
8. Bidigare R.R. et al. In vivo absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X. International Society for Optics and Photonics*, 1990, vol. 1302, pp. 290-302.
9. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, vol. 73, no. 1, pp. 11-23.
10. Чернышев Д.Н., Тренкеншу Р.П. Модель реконструкции спектра поглощения красной области *spirulina platensis* in vivo по характеристикам растворов хлорофилла а и фикобилинов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 4, с. 467-471. [Chernyshev D.N., Trenkenshu R.P. Model of reconstruction of the absorption spectrum of the red region of *spirulina platensis* in vivo according to the characteristics of solutions of chlorophyll a and phycobilins. *Actual issues of biological physics and chemistry*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 467-471. (In Russ.)]
11. Smith E.L. The action of sodium dodecyl sulfate on the chlorophyll-protein compound of the spinach leaf. *The Journal of General Physiology*, 1941, vol. 24, no. 5, p. 583.
12. Mantoura R.F.C., Wright S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *Oceanographic Literature Review*, 1997, vol. 10, no. 44, p. 1110.
13. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли суммарных каротиноидов в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. : учебно-методическое пособие. РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского. Севастополь, 2017, 12 с. (Препринт РАН, ИМБИ). [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of total carotenoids in dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. : *educational and methodological manual*. RAS, Institute of Marine Biological Research named after A. O. Kovalevsky. Sevastopol, 2017, 12 p. (Preprint RAS, IMBI). (In Russ.)]

DECOMPOSITION NATIVE ABSORPTION SPECTRUM OF THE CULTURE MICRO ALGA
ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS

Chernyshev D.N., Klochkova V.S.

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: chernishevd@gmail.com

Abstract. The work carried out a mathematical separation of the absorption spectrum of the culture of the microalga *Spirulina platensis*. Culture spectra were recorded on an integrating sphere spectrophotometer. When analyzing the spectrum, the second-order derivative was calculated and the main absorption maxima were determined. The obtained data served as the basis for modeling. The absorption spectrum of the culture of the microalga *Spirulina platensis* in the region from 400 to 800 nm was described by six Gaussian curves. A general model of the absorption spectrum of a culture from individual pigments was compiled. Using the resulting model, it is possible to determine the concentration of chlorophyll a, total carotenoids and phycobilins directly from the absorption spectrum of the native culture.

Key words: *Spirulina, carotenoids, chlorophyll a, phycobilins, absorption spectra, Gaussian curves.*

ЭФФЕКТ НА-АСКОРБАТА В ЗАЩИТЕ АКТИВНОСТИ ФС II В УСЛОВИЯХ ОДНОВРЕМЕННОГО ДЕЙСТВИЯ Co^{2+} И ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ

Ганиева Р.А.¹, Атакишиева С.А.¹, Гасанов Р.А.²

¹ Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана,
Бадамдарское шоссе, 40, г. Баку, 1004, Азербайджан; e-mail: SevincAtakisiyeva@gmail.com

² Бакинский государственный университет
ул. Академика Захида Халилова, 23, г. Баку, AZ 1148, Азербайджан; e-mail: ra38hasan@gmail.com

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Функциональное состояние ФС II в листьях проростков пшеницы, подвергнутых комплексному действию Co^{2+} и фотоингибированию определяли на основании различных характеристик замедленной флуоресценции хлорофилла *a* (мсек ЗФ Хл *a*). Воздействие Co^{2+} выразилось в резком падении характеристической величины мсек ЗФ Хл *a* реакционного центра ФС II и в более слабом блокировании донорной стороны характеризующей состояние $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ кластер и Y_z . Реактивные формы кислорода, генерируемые в процессе фотоингибирования, блокировали также в большей мере акцепторную сторону ЭТЦ ФС II. Увеличение времени адаптации наблюдалось значительное падение активности на донорной стороне ЭТЦ ФС II. Комплексное воздействие обоих факторов слабо влияло на изменение флуоресцентных характеристик, которые оставались почти на уровне действия Co^{2+} . Показано, что адаптивные возможности фотохимических реакций, протекающих в ЭТЦ ФС II при комплексном стрессе стимулируется низкомолекулярным антиоксидантом На-аскорбатом. Предполагается, что На-аск играет решающую роль в защите хлоропластов от окислительного стресса посредством тушения O_2 и $^*\text{OH}^1$.

Ключевые слова: ФС II, ЭТЦ, Co^{2+} , фотоингибирование, РФК, На-аскорбат.

ВВЕДЕНИЕ

Для сохранения роста и развития растительного организма происходит естественная запрограммированная смерть клетки [1]. Однако, экстремальные абиотические факторы отрицательно влияют на растительный организм, вызывая окислительный стресс и подавляя физиологические процессы [2, 3]. В данных условиях реактивные формы кислорода (РФК) генерируются как побочные продукты большинства энергопродуцирующих процессов, в частности, при фотосинтезе. Хлоропласты являются основным органом, продуцирующим РФК [4-6]. Антиоксидантная система не всегда способна сохранять баланс между образованием РФК и удалением. В данной ситуации защита становится не эффективной [7, 8]. В природе растительный организм подвергается одновременному воздействию многих отрицательных факторов. Наиболее уязвимыми являются ФС II и ее компонент кислород-выделяющий комплекс [9]. Разрушение его в условиях стресса приводит к денатурации, протеолизу белка и перекисному окислению липидов в реакционном центре (РЦ) и подавлению транспорта электрона в электрон транспортной цепи [10]. Важной задачей является определение сайта токсического действия стрессовых факторов в электрон транспортной цепи ФС II. Показано, что ТМ, включаясь в фотосинтетические пути транспорта электронов на многих участках влияют на ее фотохимическую активность [11, 12]. Фотоингибирование снижает скорость переноса электрона при высокой интенсивности света и способствует образованию фотохимически неактивных реакционных центров ФС II. Фотоингибирование определяется скоростью деградации и ресинтеза одного из ключевых белков ФС II – D_1 белок [13, 14]. Инактивация РЦ ФС II при окислительном стрессе может быть восстановлена лишь через деградацию и синтез белка D_1 *de novo* [15]. Известно, что в природе длительное воздействие стрессовых факторов приводит к неспецифическому повышению устойчивости растений называемой перекрестной адаптацией. Возможно, этот феномен связан с повышенной активностью защитных антиоксидантных соединений высокомолекулярных и низкомолекулярных, способных нейтрализовать свободные радикалы [16, 17]. Основная цель данной работы заключалась в определении механизма действия На-аск на восстановление работы ЭТЦ ФС II подавляемой двойным стрессом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные в водной среде в факторостатных условиях ($t^\circ 24^\circ\text{C}$, влажность 80%, освещение 250 мкВт/см^2). Проростки подвергали в течение 48 часов действию CoCl_2 (10^{-3}M) и действию в течение 24 часов светом высокой интенсивности ($4000 \text{ мкВт/м}^2/\text{с}$). Проростки, переживающие двойной стресс, переносили 1) в воду и 2) в раствор CoCl_2 в присутствии На-аск $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Исследования проводили *in vivo* на листьях *Triticum aestivum* L. Функциональную активность ЭТЦ ФС II оценивали методом замедленной флуоресценции (мсек ЗФ Хл *a*) [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность фотохимических процессов в электрон транспортной цепи (ЭТЦ) ФС II, после действия на проростки Co^{2+} и фотоингибированием оценивали по изменению индукционных переходов кинетических кривых msec 3Ф Хл *a*. Действие света высокой интенсивности в течении 2-х часов вызывало падение активности донорной стороны ЭТЦ. Величина отношения быстрой флуоресценции к стационарной флуоресценции (б/с), характеризующая донорную сторону, уменьшалась через 2 часа лагфазы в 1,6 раза, а через 24 часа лагфазы, эта величина уменьшалась в 3 раза (рис. 1).

Величина отношения медленной флуоресценции к стационарной флуоресценции (м/с), характеризующая активность акцепторной стороны ЭТЦ, уменьшалась через 2 часа лагфазы в, 1,3 раза, а через 24 ч – в, 2,3 раза. При действии на проростки в течении 48 часов Co^{2+} приводило к падению через 2 ч лагфазы активности б/с в 1,3 раза и в большей мере величина м/с в – 2 раза, а через 24 часа величина б/с в 0,8 раз, а величина м/с оставалась почти на таком же уровне (рис. 1). После одновременного действия на проростки Co^{2+} и фотоингибирования особых отклонений в активности ЭТЦ не наблюдалось. Величины б/с и м/с оставались почти на уровне действия Co^{2+} . Испытуемые проростки после двойного стресса были помещены на 24 часа в раствор содержащий Co^{2+} и в воду. Наблюдалось резкий спад в активности работы ЭТЦ. Величина б/с в условии с водой падала в 2,2 раза, а м/с в 2,3 раза. В условии с Co^{2+} величина б/с уменьшалась в 2,4 раза, а величина м/с в 3 раза (рис. 2). Действие Na-аск восстанавливало активность ЭТЦ подавляемой одновременным действием Co^{2+} и фотоингибированием.

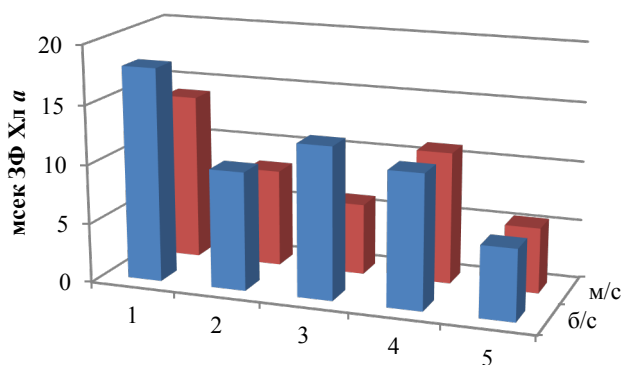


Рисунок 1. Изменение отношения быстрой и медленной флуоресценции к стационарной флуоресценции (б/с; м/с), определяющих работу донорной и акцепторной стороны ЭТЦ ФС II в условиях CoCl_2 (10^{-3}M) и фотоингибирования ($4000 \mu\text{M}$ фотон/ $\text{m}^2/\text{с}$): 1. контроль; 2. Co^{2+} (48ч); 3. Co^{2+} (48ч) через 24 ч; 4. фотоингибирование (2ч); 5. фотоингибирование (2ч) через 24 ч

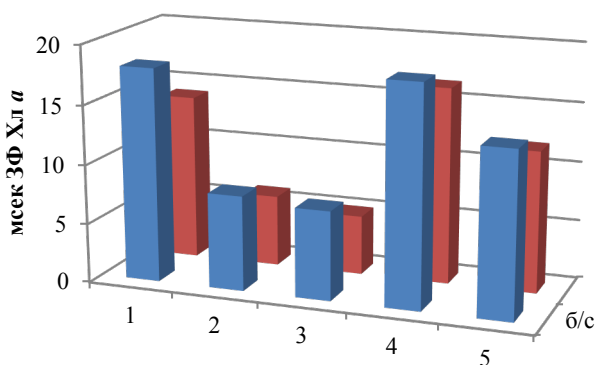


Рисунок 2. Изменение отношения быстрой и медленной флуоресценции к стационарной флуоресценции (б/с; м/с) определяющих работу донорной и акцепторной стороны ЭТЦ ФС II в условиях комплексного действия CoCl_2 +фотоингибирования и в присутствии Na-аск ($4 \cdot 10^{-4}\text{M}$): 1. контроль; 2. Co^{2+} +фотоингибирование через 24ч; 3. Co^{2+} +фотоингибирование → Co^{2+} через 24 ч; 4. Co^{2+} +фотоингибирование → 5 ч Na-аск; 5. Co^{2+} +фотоингибирование → 24 ч Na-аск

Через 5 часов воздействия Na-аскорбата величины б/с и м/с приблизились к контрольному варианту. После 24 часового воздействия Na-аскорбата эти показатели несколько уменьшились, но были в 1,3 раза и 1,8 раза выше показателей при комплексном действии стрессоров (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вызываемый действием ТМ окислительный стресс, генерирующий РФК, приводит к образованию долгоживущих $P680^{+*}$ и $TyrZ$ радикалов, которые повреждали их белковое окружение, ослабляя этим транспорт электрона между $P680$ и $TyrZ$. Кроме того, РФК, нарушая функции Q_A - Q_B акцепторов, приводит к формированию синглетного кислорода и к инактивации акцепторной стороны в цепи ФС II [19, 20]. Действие фотоингибирования приводит к инактивации донорной стороны ЭТЦ в результате образования высокоокисленной радикальной пары $P680^*$ и $TyrZ^+$. Наблюдается инактивация и акцепторной стороны. РФК, вовлекаемые в процесс фотоингибирования приводит к деструкции белка D_1 , ингибируют синтез белка D_1 *de novo* медленнее, чем инактивация ФС II. Токсическое действие Co^{2+} приводит к нарушению равновесия между фотосистемами и смещению редокс состояния Q_A повышая отток электрона на ФС I. Это приводит к возрастанию стационарной флуоресценции и падению отношения быстрой и медленной флуоресценции к стационару (рис. 1). Возможно, что падение флуоресцентных характеристик связано с нарушением функции мембран и разрушением хлорофилла в хлорофилл-белковых комплексах в ФС II [21]. Наблюдаемое наибольшее уменьшение величины м/с соответствует предположению, что сайтом токсического действия Co^{2+} определена в основном акцепторная сторона ЭТЦ ФС II. Некоторое восстановление флуоресцентных характеристик через 24 лагфазы возможно в результате активизации защитных антиоксидантных систем в растительном организме. Комплексное действие обоих стрессоров привело к незначительным изменениям флуоресцентных характеристик. Вероятно, стрессовое воздействие светом высокой интенсивности и тяжелыми металлами (ТМ) привело к повышению устойчивости растений к дополнительному стрессу или же повышению активности защитных антиоксидантных систем важных для нейтрализации радикалов. Восстановление Na-аскорбатом процессов, подавляемых одновременным действием фотоингибирования и Co^{2+} , происходит в индукционный период мсек 3Ф Хл *a* и выражается, повидимому, в результате эффективной нейтрализации образующихся РФК [22-24]. Это указывает на то, что механизм приводящий к изменению характера индукционной картины мсек 3Ф Хл *a* в результате действия обоих факторов имеет единую природу. Механизмом повышения стресс- устойчивости фотосинтетического аппарата при действии защитных систем растений является увеличение активности антиоксидантных ферментов или эффективности действия низкомолекулярных антиоксидантов. В результате фотосинтетический аппарат переключается на адаптивную программу, что и обеспечивает повышение его стресс устойчивости. Являясь сильным антиоксидантом Na-аскорбат способен нейтрализовать образующиеся при стрессе свободные радикалы и поддерживать окислительно-восстановительные реакции в ЭТЦ ФС II.

Список литературы / References:

1. Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 2008, vol. 51, pp. 167-173. doi: 10.1007/BF03030694
2. Sharma A., Kumar V., Shahzad B., Ramakrishnan M., Singh Sidhu G.P., Bali A.Sh., Handa N., Kapoor Dh., Yadav P., Khanna K., Bakshi P., Rehman A., Kohli S. K., Khan A.E., Parihar R.D., Yuan H., Thukral A.K., Bhardwaj R., Zheng B. Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: a review. *J. of plant growth regulation*, 2020, vol. 39, no. 2, pp. 509-531. doi: 10.1007/s00344-019-10018-x
3. Breusegem F.V., Dat J.F. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 2006, vol. 141, no. 2, pp. 384-390. doi: 10.1104/pp.106.078295
4. Barber J. Photosystem II: the engine of life. *Quarterly Rev. Biophys.*, 2003, vol. 36, no. 1, pp. 71-89. doi: 10.1017/S0033583502003839
5. Foyer Ch.H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 2005, vol. 17, no. 7, pp. 1866-1875. doi: 10.1105/tpc.105.033589
6. Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 2001, vol. 126, no. 1, pp. 445-462. doi: 10.1104/pp.126.1.445
7. Sabehat A., Weiss D., Lurie S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiol. Plant.*, 1998, vol. 103, pp. 437-441. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1030317.x
8. Anderson B., Barber J. Mechanisms of Photodamage and Protein Degradation during Photoinhibition of Photosystem II. *In book: Photosynthesis and the Environment*, 1996, pp. 101-121.
9. Biswal B. Photosynthetic response of green plants to environmental stress: Inhibition of photosynthesis and adaptational of photosynthesis and adaptational mechanisms. *In handbook of Photosynthesis (ed. Pessarakli M), CRC Press*, Florida, USA, 2nd edn, 2005, pp. 739-749.
10. Biswal B., Joshi P.N., Raval M.K., Biswal U.C. Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signaling and adaptation. *Current Science*, 2011, vol. 101, no. 1, pp. 47-56
11. Gaziyeve A., Aliyeva S., Kurbanova I., Ganiyeva R., Bayramova S., Gasanov R. Molecular operation of metals into the function and state of photosystem II. *Metallomics*, 2011, vol. 3, no. 12, pp. 1362-1367. doi: 10.1039/c1mt00100k

12. Kupper H., Setlik I., Spiller M., Kupper F.C., Prasil O. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of *in vivo* heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology*, 2002, vol. 38, pp. 429-441. doi: 10.1046/j.1529-8817.2002.01148.x
13. Tyystjarvi E. Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chem. Rev.*, 2008, vol. 252, no. 3, pp. 361-376. doi: 10.1016/j.ccr.2007.08.021
14. Vass I. Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1817, no. 1, pp. 209-17. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.014
15. Chan T., Shimizu Y., Pospisil P., Nijo N., Fujiwara A., Taninaka Y., Ishikawa T., Hori H., Nanba D., Imai A., Morita N., Yoshioka-Nishimura M., Izumi Y., Yamamoto Y., Kobayashi H., Mizusawa N., Wada H., Yamamoto Y. Quality control of photosystem II: lipid peroxidation accelerates photoinhibition under excessive illumination. *Plos one*, 2012, vol. 7, no. 12, e52100. doi: 10.1371/journal.pone.0052100
16. Джафарова Д., Байрамова С., Ганиева Р. Роль аскорбата в защите ФС2 от фотоокислительного стресса в листьях огурца (*Cucumis sativus* L.). X Международной научно-методической конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений», Россия, 2012, с. 215-220. [Jafarova J., Bayramova S., Ganiyeva R. The role of ascorbate in protection of FSII from photooxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. X International scientific-methodical conference "Introduction of nontraditional and rare plants", Russia, 2012, pp. 215-220. (In Russ)]
17. Nijs D., Kelley P.M. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms *in vivo*. *FEBS Lett*, 1991, vol. 284, no. 2, pp. 147-51. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80672-p
18. Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. Delayed chlorophyll fluorescence as a monitor for physiological state of photosynthetic apparatus. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2009, vol. 23, pp. 452-457. doi: 10.1080/13102818.2009.10818461
19. Gasanov R.A., Aliyeva S., Arao S., Ismailova A., Katsuta N., Kitade H., Yamada Sh., Kawamori A., Mamedov F. Comparative study of the water oxidizing reactions and the millisecond delayed chlorophyll fluorescence in photosystem II at different pH. *J. of Photochem. Photobiol.*, 2007, vol. 86, no. 2, pp. 160-164. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.08.008
20. Gasanov R.A., Aliyeva S.A., Mamedov F. Delayed fluorescence in a millisecond range – a probe for the donor side-induced photoinhibition of photosystem II. In: *Photosynthesis: Basics to applications*. [ed] S. Itoh, P. Mohanty, K.N. Guruprasad, New Delhi, India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2015, pp. 101-107
21. Курбанова И.М., Ганиева Р.А., Дадашова С.Б., Байрамова С.А., Гасанов Р.А. Состояние хлорофилл-белковых комплексов РЦ ФС II и ССК при воздействии на проростки пшеницы Cd^{2+} и Co^{2+} . *Актуальные проблемы биоэкологии*, 2010, Москва, с. 168-172. [Kurbanova I.M., Ganiyeva R.A., Dadashova S.B., Bayramova S.A., Gasanov R.A. The state of chlorophyll-protein complexes of RC FS II and LHC under action of Cd^{2+} and Co^{2+} on wheat seedlings, *Actual problems of bioecology*, 2010, Moscow, pp. 168-172. (In Russ)]
22. Naz H., Akram N.A., Ashraf M. Impact of ascorbic acid on growth and some physiological attributes of cucumber (*Cucumis sativus*) plants under water-deficit conditions. *Pak J Bot.*, 2016, vol. 48, no. 3, pp. 877-883.
23. Akram N.A., Shafiq F., Ashraf M. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Sci.*, 2017, vol. 8, pp. 613. doi: 10.3389/fpls.2017.00613
24. Xiao M., Li Z., Zhu Li, Wang J., Zhang Bo, Zheng F., Zhao B., Zhang H., Wang Y., Zhang Zh. The Multiple Roles of Ascorbate in the Abiotic Stress Response of Plants: Antioxidant, Cofactor, and Regulator. *Front Plant Sci.*, 2021, vol. 12, p. 598173. doi: 10.3389/fpls.2021.598173

EFFECT OF NA-ASCORBATE IN THE PROTECTION OF PS II ACTIVITY UNDER CONDITIONS OF SIMULTANEOUS ACTION OF Co^{2+} AND PHOTONHIBITION

Ganiyeva R.A.¹, Atakishiyeva S.A.¹, Gasanov R.A.²

¹ Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences

Baku, Azerbaijan; e-mail: SevincAtakishiyeva@gmail.com

² Baku State University

Baku, Azerbaijan; e-mail: ra38hasan@gmail.com

Abstract. The functional state of PS II in the leaves of wheat seedlings subjected to the complex action of Co^{2+} and photoinhibition was determined on the basis of various characteristics of the delayed fluorescence of chlorophyll a (msec DF Chl a). The effect of Co^{2+} was expressed in a sharp decrease in the characteristic value of msec DF Chl a of the PS II reaction center and in a weaker blocking of the donor side characterizing the state of the Mn_4O_5Ca cluster and Y_2 . Reactive oxygen species (ROS) generated during photoinhibition also blocked to a greater extent the acceptor side of the PS II ETC. An increase in the adaptation time was observed a significant drop in activity on the donor side of the ETC PS II. The combined effect of both factors had little effect on the change in fluorescence characteristics, which remained almost at the level of the effect of Co^{2+} . It has been shown that the adaptive capabilities of photochemical reactions occurring in the ETC of PS II under complex stress are stimulated by the low molecular weight antioxidant Na-ascorbate. It is assumed that Na-asc plays a decisive role in protecting chloroplasts from oxidative stress by quenching O_2^- and $*OH^1$.

Key words: PS II, ETC, Co^{2+} , photoinhibition, ROS, Na-ascorbate.

НАБЛЮДЕНИЕ СЕКРЕЦИИ АТФ ВКУСОВЫМИ КЛЕТКАМИ EX VIVO

Хохлов А.А., Рогачевская О.А.

Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Вкусковая трансдукция начинается с распознавания вкусовых молекул специализированными рецепторами апикальной мембраны вкусовых клеток и завершается кодированием сенсорной информации в форме стимул-зависимого выброса афферентного нейротрансмиттера АТФ, стимулирующего вкусовой нерв. Этот процесс подробно изучался на уровне одиночных клеток типа II, экспрессирующих специализированные вкусовые GPCR рецепторы семейств T1 и T2. Показано, что при трансдукции вкусового сигнала синаптическая передача обеспечивается функционированием во вкусовых клетках типа II неканонического химического синапса: выброс АТФ осуществляется Ca^{2+} -независимым образом через АТФ-проницаемые ионные каналы базолатеральной мембраны. Между тем, при исследовании стимул-зависимости выброса АТФ на уровне одиночных клеток или изолированных вкусовых почек практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток. Поэтому в таких экспериментах существует вероятность неспецифических эффектов вкусовых соединений. Для исследования секреции АТФ вкусовыми клетками в условиях физиологически адекватной стимуляции нами разработан экспериментальный подход, основанный на использовании модифицированной камеры Уссинга. Камера формировалась двумя перфузируемыми отсеками, между которыми плотно зажимался и изолировался фрагмент языкового эпителия, содержащий желобоватый вкусовой сосочек. Вкусовые стимулы подавались через верхний отсек, в который была обращена наружная часть эпителия. Базальная часть вкусовых почек была обращена в нижний отсек, заполняемый люциферин-люциферазной смесью для детекции выброса АТФ. Данный подход впервые позволил в режиме реального времени наблюдать выброс АТФ вкусовыми клетками в ответ на стимуляцию вкусовыми веществами, доступными только для апикальной мембраны.

Ключевые слова: камера Уссинга, люциферин-люциферазный метод, секреция АТФ, вкусовой рецепторный эпителий.

В периферической вкусовой системе вкусовые рецепторные клетки, сгруппированные во вкусовые почки, выполняют функцию хемосенсоров, детектирующих вкусовые вещества в ротовой полости. Популяция клеток вкусовой почки гетерогенна и включает три типа вкусовых клеток. Примерно половину популяции клеток вкусовой почки составляют вкусовые клетки типа I, которые выполняют преимущественно поддерживающую функцию [1]. Вкусовые клетки типа III, образующие 10-15% группу, детектируют кислые и некоторые соленые стимулы [1]. Вкусовые клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, которые специализируются на распознавании горьких и сладких стимулов и стимулов категории умами (аминокислоты, рибонуклеотиды, пептиды). Они составляют 30-40% вкусовых клеток во вкусовой почке. Распознавание вкусовых молекул обеспечивается специализированными рецепторами, функционирующими на рецептирующей апикальной мембране вкусовых клеток, обращенной во вкусовую пору. Эти клетки экспрессируют гептаспиральные вкусовые рецепторы (G-protein coupled receptor, GPCR), формирующие два подсемейств T1R и T2R. Эти рецепторы и сопряженные сигнальные системы функционируют на апикальной мембране, которая экспонирована во вкусовую пору и выполняет рецептирующую функцию. Согласно современным представлениям [1], трансдукция вкусового сигнала во вкусовых клетках типа II включает следующие основные внутриклеточные события. При связывании молекул вкусовых веществ вкусовые GPCR рецепторы сопрягаются G-белком с фосфолипазой PLC $\beta 2$, которая катализирует гидролиз фосфолипида PIP₂, производя два вторичных медиатора: растворимый IP₃ и липидный DAG. Далее IP₃ стимулирует IP₃-рецептор, что приводит к выбросу депонированного Ca^{2+} . Стимул-зависимое повышение внутриклеточного Ca^{2+} обеспечивает активацию Ca^{2+} -зависимых катионных каналов TRPM5 базолатеральной мембраны и генерацию деполяризующего рецепторного потенциала. Последний стимулирует потенциал-зависимые Na^+ каналы, инициируя генерацию серии потенциалов действия и выброс афферентного нейромедиатора АТФ [1-4].

Поскольку выделение одиночных вкусовых клеток сопряжено с достаточно жесткими ферментативными и механическими воздействиями, сохранение функциональности апикальной мембраны, представляет собой одну из проблем физиологии вкусовых клеток. Так же в экспериментах на одиночных клетках практически невозможно стимулировать только апикальную мембрану клеток, поскольку аппликация растворов происходит ко всей поверхности клетки, из которой апикальная мембрана занимает порядка 10%, что значительно повышает проявление неспецифических эффектов от экспериментальных воздействий [5]. С этой точки зрения представляется целесообразным выполнять исследования вкусовой трансдукции с использованием не только препаратов диссоциированных вкусовых почек, но и более интегральных препаратов, в которых рецептирующая мембрана и ассоциированные молекулярные структуры более сохранны и функциональны.

Один из таких препаратов был описан в работе [2], в которой использовалась камера Уссинга [6] для анализа секреции АТФ фрагментами языкового эпителия, содержащих либо желобоватый, либо листовидный вкусовой сосочек. Базолатеральная сторона эпителия располагалась в резервуаре с буферным раствором, который после стимуляции собирался, смешивался с люциферин-люциферазым реагентом и анализировался на люминометре. Эта методика позволила статистически продемонстрировать рост выброса АТФ фрагментами эпителия со вкусовыми почками в ответ на однократную стимуляцию смесью горьких веществ по сравнению с фрагментами без вкусовой ткани [2]. Тем не менее, такой подход фактически лишен внутреннего контроля по схеме контроль-воздействие-контроль. В данной работе мы модифицировали описанный выше подход и устранили указанный недостаток, обеспечив мониторинг секреции АТФ в режиме реального времени.

Камера Уссинга традиционно используется для измерения транспорта ионов и питательных веществ через эпителиальные ткани [6-8]. В нашем эксперименте барьером между отсеками камеры (рис. 1) служил фрагмент языкового эпителия с желобоватым вкусовым сосочком, как участок, наиболее богатый вкусовой тканью в процентном отношении к невкусовому эпителию. Для получения фрагмента языкового эпителия мыши, под эпителий изолированного языка инъецировалась смесь ферментов (1,1 мг/мл коллагеназы Б, 1,2 мг/мл диспазы II, 0,2 мг/мл эластазы, 0,5 мг/мл ингибитора трипсина в растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 10 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,8), затем язык помещался в бескальциевый раствор, содержащий (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 0,7 CaCl₂, 1,1 MgCl₂, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7,4), на 35 минут для ферментации соединительной ткани. После инкубации эпителий подрезался и отделялся от мышечной ткани [3-5]. Фрагмент эпителия языка с желобоватым сосочком помещался в физиологический раствор, содержащий (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 глюкозы (pH 7,4), и затем крепился в камере Уссинга так, чтобы апикальная часть эпителия была обращена в верхний отсек камеры (рисунок 1).

Наша модификация камеры позволяла перфузировать оба отсека. Раствор для перфузии апикальной (наружной) стороны эпителия содержал (мМ): 50 NaCl, 20 KCl, 4 CaCl₂, 0,5 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7,6 [9] и подавался в верхний отсек камеры. Нижний отсек камеры, куда обращена внутренняя, базолатеральная часть эпителия был заполнен люциферин-люциферазной смесью (10 мМ калиевой соли люциферина и 0,1 мкг/л рекомбинантной люциферазы, растворенных в физиологическом растворе). Поскольку секреция АТФ является финальным актом вкусовой трансдукции [2], изменение хемилюминесценции этой смеси свидетельствует о появлении АТФ, активирующего эту реакцию.

Для измерения хемилюминесценции в режиме реального времени модифицированная камера Уссинга монтировалась на микрофотометре Model 814 (PTI, США), позволяющем регистрировать даже слабые световые сигналы и работающем в режиме счёта фотонов. Фотоотчеты регистрировались и анализировались с помощью программного обеспечения Felix32 (PTI, США), полученные данные обрабатывались в программе SigmaPlot 11 (Systat Software, США) [10].

Модификация камеры обеспечила возможность независимой неоднократной смены растворов с апикальной и базальной стороны эпителия и минимальное гидростатическое давление на эпителий, что позволяло в процессе регистрации производить быструю, без гидравлического удара, смену растворов.

Герметичность камеры с закреплённым эпителием в начале регистрации проверялась краткой (1520 секунд) подачей раствора 100 нМ АТФ в верхний отсек камеры. При наличии повреждений или неплотной фиксации эпителия в камере это приводило к быстрому проникновению АТФ в нижний отсек и вызывало большой по амплитуде хемилюминесцентный сигнал – в этом случае эксперимент прекращался и в камеру устанавливался новый вкусовой эпителий. В ряде случаев уже в начале регистрации хемилюминесцентного сигнала наблюдалось снижение базового уровня АТФ (сигнала) практически до нуля за короткий промежуток времени (2-5 минут) – такой эпителий так же считался непригодным для эксперимента.

Перед началом регистрации в течении 30-40 минут производилась непрерывная перфузия обеих отсеков камеры апикальным и физиологическим растворами соответственно, для восстановления ткани после механических воздействий, связанных с закреплением её между отсеками. После периода релаксации препарата

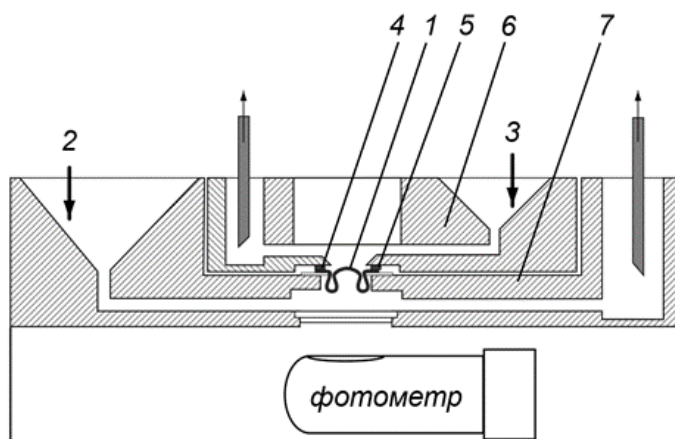


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки. 1 – фрагмент эпителия с желобоватым сосочком; 2 – подача физиологического раствора со смесью люциферин-люциферазы в нижний отсек камеры; 3 – подача «слюны» со стимулами в верхний отсек камеры; 4 – пластиковое кольцо; 5 – силиконовая прокладка; 6 – верхняя часть камеры; 7 – нижняя часть камеры

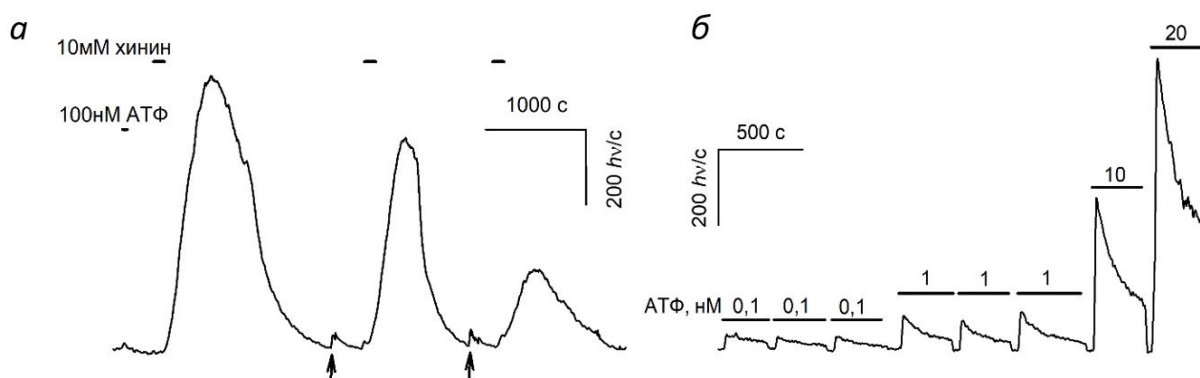


Рисунок 2. Регистрация хемилумinesцентного сигнала люциферин-люциферазной смеси в нижнем отсеке камеры в реальном времени.

а – хемилумinesцентный сигнал люциферин-люциферазной смеси, обусловленный выбросом АТФ вкусовым эпителием при кратковременной аппликации горького вещества (10 мМ гидрохлорида хинина) на апикальную поверхность эпителия. Время и продолжительность аппликаций указаны линиями над экспериментальной кривой, моменты замены смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры отмечены стрелками снизу. б – регистрация хемилумinesцентного сигнала при подаче раствора люциферин-люциферазы с известными концентрациями АТФ (калибровочные измерения для количественной оценки средней концентрации, выделенного эпителием при стимуляции). Время и продолжительность подачи раствора люциферин-люциферазы в нижний отсек камеры указаны линиями над экспериментальной кривой.

нижний отсек заполнялся люциферин-люциферазной смесью, что, как правило, позволяло наблюдать стабильную базальную хемилумinesценцию низкого уровня, видимо, вызванную спонтанным окислением люциферина.

Поскольку известно, что вкусовые клетки, расположенные в базальной части языка ответственны преимущественно за детекцию горьких вкусов [1-5], в качестве вкусовых стимулов использовали синтетические вещества гидрохлорид хинина (10 мМ) и октоацетат сахарозы (1 мМ), которые подавались путём кратковременной (на 30-50 сек) смены раствора в верхнем отсеке камеры. Аппликация вкусовых стимулов приводила к выбросу АТФ эпителием и появлению хемилумinesцентного сигнала в нижнем отсеке камеры как это показано на рисунке 2а. Интервал времени между подачей вкусового стимула и максимумом хемилумinesцентного ответа люциферин-люциферазной смеси составил 30-100 секунд. После восстановления базового уровня хемилумinesценции производилась смена смеси люциферин-люциферазы в нижнем отсеке камеры (стрелки на рис. 2а), чтобы избежать падения амплитуды ответов при последующей регистрации вследствие снижения концентрации активных реагентов люциферин-люциферазной смеси.

Для количественной оценки средней концентрации АТФ, выделенного эпителием при стимуляции, после завершения эксперимента производились калибровочные измерения, пример которых приведен на рисунке 2б. Для этого поочередно производилась отмывка нижнего отсека камеры физиологическим раствором с последующим заполнением раствором люциферин-люциферазы с известной концентрацией АТФ (рис. 2б). По пиковым значениям уровня хемилумinesценции строилась калибровочная диаграмма, как функция средней концентрации АТФ в нижнем отсеке. Согласно полученной диаграмме при данных условиях регистрации и составе люциферин-люциферазной смеси минимальная регистрируемая средняя концентрация АТФ составила приблизительно 0.1 нМ, максимальная в ряде случаев достигала 30 нМ АТФ в ответ на аппликацию 10 мМ хинина.

Разработанная нами методика мониторинга выброса АТФ вкусовым эпителием путём on-line регистрации хемилумinesценции люциферин-люциферазной смеси с помощью модифицированной циркуляционной камеры Уссинга обеспечила достаточно высокую чувствительность регистрации, соответствующую эффективной концентрации АТФ порядка 0,1 нМ (при соотношении сигнал/шум равном 1) и позволила регистрировать серию выбросов АТФ одним препаратом, стимулируемым последовательной аппликацией кратковременных горьких стимулов. Методика позволяла сохранять жизнеспособность вкусовой ткани и её способность отвечать на горькие вещества в течении длительного (до 2 часов) эксперимента, хотя при этом наблюдалось постепенное снижение (рандаун) амплитуды ответов (рис. 2а), возможно, из-за истощения запаса АТФ в клетках и/или снижения эффективности каскада трансдукции и механизма секреции. В дальнейшем данная методика может быть использована для анализа физиологических эффектов различных соединений, включая вкусовые вещества и модуляторы активности вкусовых GPCR рецепторов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035 (рук. О.А. Рогачевская).

Список литературы / References:

1. Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foskett J.K. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Archiv*, 2021, vol. 473. doi: 10.1007/s00424-020-02464-4
2. Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, 2005, vol. 310, no. 5753. doi: 10.1126/science.1118435
3. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO Journal*, 2007, vol. 26, no. 3. doi: 10.1038/sj.emboj.7601526
4. Romanov R.A., Lasher R.S., High B. et al. Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex. *Science Signaling*, 2018, vol. 11, no. 529. doi: 10.1126/scisignal.aao1815
5. Rogachevskaya O.A., Churbanov G.D., Bystrova M.F., Romanov R.A., Kolesnikov S.S. Stimulation of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor by denatonium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, vol. 416, no. 3-4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.095
6. Ussing H.H., Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1951, vol. 23. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x
7. Geraedts M.C., Troost F.J., De Ridder R.J., Bodelier A.G., Masclee A.A., Saris W.H. Validation of Ussing chamber technology to study satiety hormone release from human duodenal specimens. *Obesity*, 2012, vol. 20, no. 3. doi: 10.1038/oby.2011.104
8. He L., Yin Y., Li T., Huang R., Xie M., Wu Z., Wu G. Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 2013, vol. 18. doi: 10.2741/4178
9. Shannon I.L., Suddick, R.P., Dowd Jr. F.J. Saliva: composition and secretion. *Monographs in oral science*, Basel, Karger, 1974, vol. 2, no. 1. PMID: 4601379
10. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y2 receptors in mouse taste cells. *The Journal of Neurophysiology*, 2003, vol. 90. doi: 10.1152/jn.00312.2003

EX VIVO MONITORING OF ATP SECRETION BY TASTE CELLS**Khokhlov A.A., Rogachevskaya O.A.**

Institute of Cell Biophysics RAS

Institutskaya st., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Abstract. Taste transduction starts off the recognition of tastants by specialized receptors in the apical membrane of taste cells and ends with the encoding of sensory information in the form of a stimulus-dependent release of the afferent neurotransmitter ATP, which stimulates the taste nerve. This process has been studied in detail at the level of type II single cells expressing specialized taste GPCR receptors of the T1 and T2 families. It has been shown that, upon transduction of a taste signal, synaptic transmission is ensured by the functioning of a non-canonical chemical synapse in type II taste cells: ATP is released in a Ca²⁺-independent manner through ATP-permeable ion channels of the basolateral membrane. Meanwhile, in single cell experiments it is practically impossible to stimulate only the apical membrane of cells; however, this is feasible when registering the activity of the taste epithelium due to the physical isolation of the apical and basolateral parts. To study the secretion of ATP by taste cells under conditions of physiologically adequate stimulation, we used a modernized Ussing chamber provided an opportunity to stimulate separately the apical part of taste cells exposed to the upper cell of the chamber and to detect ATP secreted from the basal part of the epithelium into the lower cell of the chamber filled with a mixture of luciferin-luciferase. The developed experimental scheme made it possible to on-line register a series of ATP releases by the taste epithelium in response to stimulation of the apical part of the epithelium with bitter taste substances.

Key words: Ussing chamber, luciferin-luciferase, ATP secretion, taste epithelium.

РОЛЬ ЛАТЕРАЛЬНОГО НАТЯЖЕНИЯ В КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОМ СЛИЯНИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Чантурия А.Н.

Eastern Scientific

Роквилл, США; e-mail: alexandr32@hotmail.com

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Слияние гранул кортекса яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* исследовалось в экспериментальной системе, позволяющей медленное увеличение концентрации кальция в микро молярном диапазоне. Установлено, что кроме пороговой концентрации, запускающей слияние гранул с плазматической мембраной, существует порог скорости роста концентрации, ниже которого слияние не происходит. Так же показано что инкубация препаратов кортекса в растворах с повышенным содержанием кальция приводит к инактивации гранул, выражающейся в потере ими способности сливаться при более высоких концентрациях кальция. Полученные данные указывают на то, что опосредованное белками слияние мембран может происходить вследствие возникновения латерального стресса по типу ранее предложенного механизма слияния чисто фосфолипидных мембран.

Ключевые слова: Мембраны, кальций, латеральное натяжение, слияние, микроскопия.

Слияние клеточных мембран играет ключевую роль в передаче нервных импульсов, оплодотворении, секреции гормонов, внутриклеточном транспорте белков и проникновении вирусов в клетки. Несмотря на идентификацию ряда белков участвующих в этом процессе [1, 2], мы всё еще далеки от понимания их роли в глубокой реорганизации мембран, происходящей при слиянии. Логично предположить, что регулируемое специфическими белками слияние мембран эволюционировало из примитивных, ранних безбелковых систем и может базироваться на тех же принципах.

Исследование слияния в безбелковой системе липосомы/плоская мембрана (БЛМ) продемонстрировало зависимость порога кальций-индуцируемого слияния от заряда фосфолипидов липосом, но не от заряда БЛМ. Это различие указывает на ключевую роль латерального натяжения мембраны в запуске механизма слияния [3].

Созданные для проверки этой гипотезы компьютерные модели продемонстрировали не только возможность слияние моно- и би-слоев при определенных параметрах безбелковой модели, но и слияние белоксодержащих модельных мембран так же по механизму латерального стресса, но индуцированного молекулами белка [4].

Удобной моделью для исследования механизма слияния клеточных мембран являются яйцеклетки морских ежей. Наружная, плазматическая мембрана яйцеклетки выстлана изнутри слоем т. н. кортикальных гранул, размером порядка 1 μm . Слияние этих гранул с плазматической мембраной яйцеклетки естественным образом индуцируется сперматозоидом и необходимо для предотвращения полиспермии [5]. Для слияния *in vitro* не требуются никакие цитоплазматические факторы, кроме свободного кальция в концентрации выше 0,1–10 μM [6–8]. Более того, гранулы кортекса способны сливаться не только с плазматической мембраной, но и друг с другом что означает присутствие в них всех компонентов, которые необходимы и достаточны для слияния. Белок, безусловно, является одним из компонентов механизма слияния, поскольку модификаторы белка эффективно ингибируют слияние [9].

В данной работе представлена попытка проверить применимость к природным мембранам ранее представленной гипотезы об основной и универсальной роли латерального натяжения в механизме слияния как чисто фосфолипидных, так и белок-содержащих мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление препаратов кортекса.

Препараты кортекса производили по методу [8] с незначительными изменениями, путем помещения дежелированных яйцеклеток на полоски шириной 5–6 мм, из покровного стекла №2, обработанные поли-L-лизинном. После прилипания, яйцеклетки лизировали струей раствора РКМЕ (50 mM PIPES, 450 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, 1 mM бензамидина, pH 6,7), либо IB(220 mM глутамата калия, 500 mM глицина, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, pH-6,7), а затем помещали в раствор IB и хранили на льду.

Экспериментальная система.

В большинстве экспериментов использовалась фторопластовая ячейка, с внутренним объемом 1 мл, имеющей стеклянные стенки с двух сторон. На дне ячейки помещалась миниатюрная магнитная мешалка. В экспериментах по исследованию влияния температуры, ячейка охлаждалась при помощи тепловой помпы на элементах Пельтье; остальные эксперименты проводились при комнатной температуре 22–24 $^{\circ}\text{C}$.

Ячейка помещалась перед объективом специально сконструированного, на базе оптического конструктора (Spindler and Hoyer, Германия) горизонтального микроскопа с супер длиннофокусными объективами (ELWD - Nikon, Japan) расположенными друг против друга. 40-х, 0.5 NA использовался в качестве конденсора, для освещения, а 60х, 0.7 NA для наблюдения.

Изображение проецировалось на CCD камеру, соединенную с видеомонитором, и записывалось на видеодиск. Количественные измерения слияния кортикальных гранул (КГ) с плазматической мембраной (ПМ), производились при большой плотности кортексов на стекле, с объективом меньшего увеличения (10х, 0.2 Н.А.) и конденсором в режиме тёмного поля. Это позволяло усреднять светорассеяние с большей площади, что уменьшало ошибку измерений.

Процент слившихся гранул (F) рассчитывался по изменению светорассеяния по формуле:

$$F = 100 \cdot [1 - (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})]$$

где I – интенсивность рассеянного света; $I_{\min}$ – максимальное значение в начале эксперимента; $I_{\max}$ – минимальное значение в тёмной зоне изображения.

Непосредственно перед экспериментом полоска стекла с препаратом кортекса помещалась в микроманипулятор и её нижний конец опускался в ячейку с раствором ИМ (800 мМ глицин, 20 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 10 мМ PIPES, 1 мМ бензамидин, 10 или 30 мМ EGTA, pH - 6,7).

Раствор кальция подавался в ячейку при помощи шприца (Hamilton Co, США), поршень которого был соединён с шаговым двигателем, что позволяло варьировать скорость подачи раствора с высокой точностью и в широком диапазоне. Концентрация свободного кальция рассчитывалась по известной константе связывания Ca-EGTA комплекса с использованием стандартных формул. Кроме отдельно описанных случаев, везде в тексте приводится расчётная концентрация свободного кальция.

Реактивы, используемые в экспериментах, были приобретены у Fluka (KCl, NaCl, $CaCl_2$, EGTA, глицин, бензамидин) и Sigma chemical Co. (PIPES, К-глутамат)

РЕЗУЛЬТАТЫ

При добавлении кальция к препаратам кортекса слияние гранул наблюдалось со 100% воспроизводимостью при расчётных концентрациях свободного кальция выше 20 мкМ. Более высокие концентрации кальция (0,1–0,2 мМ) вызывали практически полное и быстрое слияние всех гранул препарата, в то время как при меньших концентрациях слияние происходило почти так же быстро, но сливалась только часть гранул (рис. 1).

Концентрации кальция в ячейке увеличена с нуля (10 мМ EGTA) до 33 мкМ через 5–10 секунд после снимка на панели А. Цифры вверху справа на панелях А–С – часы:минуты:секунды. Комнатная температура. Шкала 20 мкм. Изображения получены с использованием оптики дифференциально-интерференционной контрастности (DIC-Nomarsky).

Такое поведение препаратов кортекса наблюдалось в диапазоне температур от +2 °С до +38 °С, а при температурах выше 42 °С доля слившихся гранул резко падала. В экспериментах при пониженных температурах было отмечено, что слияние при температуре 2–4 °С начинается на 15–20 секунд позже чем при комнатной температуре, однако статистически достоверного снижения процента слившихся КГ не наблюдалось. Этой задержкой вероятно объясняются небольшие различия кинетики слияния в экспериментах с постепенным увеличением концентрации кальция при низкой температуре (рис. 2).

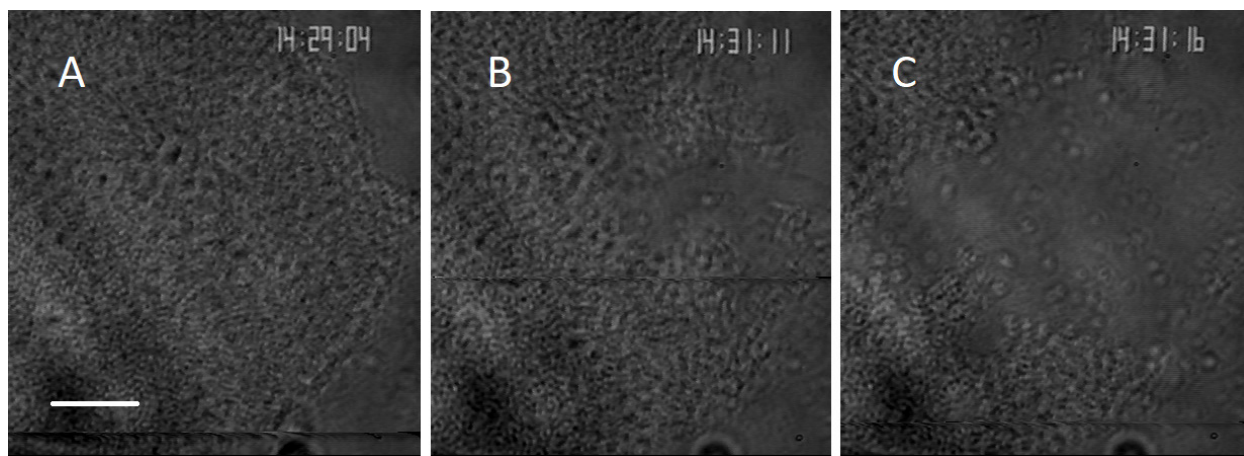


Рисунок 1. Кальций-индуцированное слияние гранул с плазматической мембраной кортекса

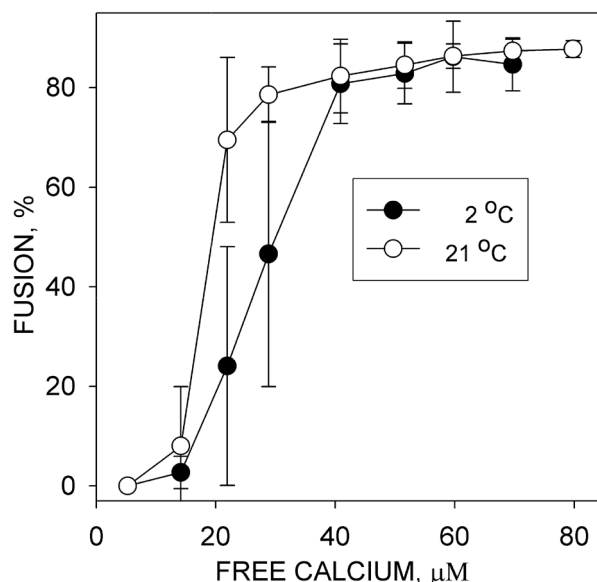


Рисунок 2. А –КГ-ПМ слияние при разных температурах. Скорость увеличения концентрации Ca^{2+} в ячейке $0.6 \mu\text{M}/\text{с}$. Здесь и далее представлены средние значения и стандартное отклонение, полученные в 3–5 экспериментах.

Поскольку значительного влияния температуры, на слияние обнаружено не было, дальнейшие эксперименты проводились при комнатной температуре $22\text{--}24^\circ\text{C}$. Было обнаружено, что при замедлении скорости подачи кальция в ячейку, наблюдается снижение процента слившихся КГ (рис. 3А). При этом, в случае остановки подачи кальция на 30 минут, препарат кортекса полностью терял способность к слиянию при последующем повышении концентрации кальция (рис. 3В). В случае 15 минутной остановки подачи кальция, ингибирования слияния не было – процент слившихся КГ рос и не отличался от контроля при концентрации кальция $60\text{--}70 \mu\text{M}$.

Поскольку медленное увеличение концентрации Ca^{2+} в ячейке требует значительного времени (более 30 минут чтобы достичь концентрации $80 \mu\text{M}$ при скорости $0.04 \mu\text{M}/\text{с}$), можно предположить, что препараты за это время инактивируются. Для проверки этого предположения, была проведена серия экспериментов, в которой увеличение концентрации Ca^{2+} в ячейке начиналось после того, как препараты кортекса длительное время находились в ней при комнатной температуре. Однако ни 20 минутная, ни 60 минутная инкубация в без кальциевых растворах не влияла на слияние при последующей подаче кальция в ячейку.

ОБСУЖДЕНИЕ

Общепризнано, что ключевую роль в слиянии клеточных мембран играют конформационные изменения мембранных белков, запускаемые изменениями в ионном составе среды. В случае вирусного слияния это

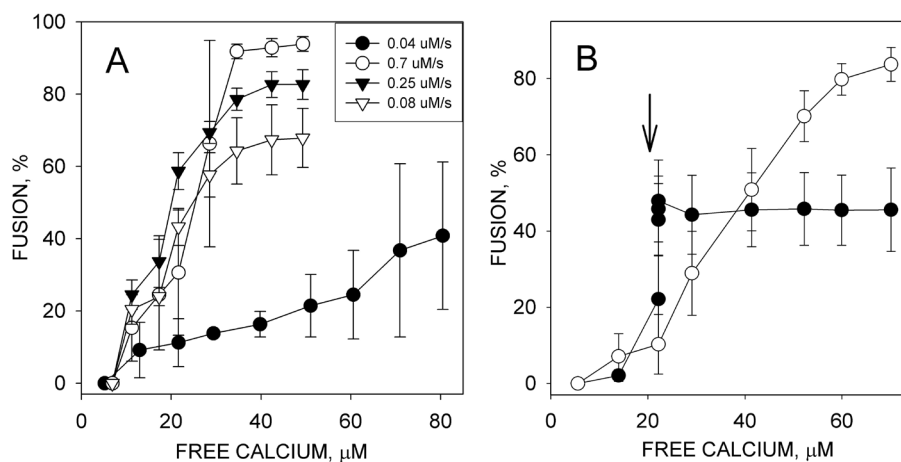


Рисунок 3. А – Зависимость слияния КГ с ПМ от скорости увеличения концентрации кальция. В – Ингибирование КГ-ПМ слияния инкубацией кортексов в кальций-содержащем растворе. Скорость увеличения концентрации Ca^{2+} в ячейке $0.9 \mu\text{M}/\text{с}$. Стрелкой отмечена концентрация, по достижении которой введение Са в ячейку было остановлено на 30 минут

изменения pH, а в синаптических окончаниях или, в исследованных в настоящей работе, яйцеклетках морских ежей - скачек концентрации кальция. При этом, несмотря на огромный прогресс в идентификации и получении детальных характеристик белков слияния, их роль в механике слияния до сих пор до конца не выяснена. На сегодняшний день доминирует модель в которой молекулы белка в области контакта, каким-то образом подтягивают мембраны друг к другу и создают условия для их слияния [2]. Это, по сути, является экстраполяцией модели, предложенной для объяснения кальций-зависимого слияния безбелковых мембран (липосом или липосом с плоскими мембранами). Для этих систем, так же предполагается, что двухвалентный ион кальция связывается с отрицательно заряженными головками фосфолипидов соседних мембран, приводя их в близкий контакт [10], а также создаёт благоприятную для слияния эффективную форму липидных молекул, связываясь с фосфатными группами в области контакта. Обе эти модели предполагают, что слияние будет происходить при достижении определённой концентрации кальция или фактора, вызывающего конформационные изменения белка, вне зависимости от пути достижения этой концентрации.

С другой стороны, ранее было показано [3], что вышеописанная модель слияния фосфолипидных мембран, не может объяснить обратимое ингибирование, наблюдаемое при инкубации липосом в кальций-содержащем растворе до приведения их в контакт с БЛМ. В качестве альтернативы была предложена и подтверждена компьютерной симуляцией модель, предполагающая латеральный стресс липосомальной мембраны как движущую силу слияния.

Обнаруженное в настоящей работе влияние скорости роста концентрации кальция на эффективность слияния (рис. 2) полностью согласуется с моделью латерального стресса [3], создаваемого, в данном случае, множеством молекул белков слияния на всей поверхности КГ.

Эта модель предполагает, что конформационное изменение мембранного белка может вести к удалению этих белков из внешнего монослоя мембраны [11], что приводит к возникновению напряжения из-за увеличения разделения между молекулами липидов. Альтернативно, конформационные изменения мембранных белков, вызванные кальцием или pH, могут привести к уменьшению площади, которую эти белки занимают во внешнем монослое везикулы. Если это произойдет, молекулы липидов должны следовать новым границам белок-липид, что так же приведет к увеличению напряжения во внешнем монослое. Очевидно, что жидкокристаллические свойства мембран, не допускают длительного сохранения энергетически невыгодного напряженного состояния. Перескок липидов из внутреннего монослоя в наружный и/или диффузия воды через бислой и ионные каналы, приведет к исчезновению напряжения в мембране.

Логично предположить, что возможная гетерогенность КГ морского ежа по числу находящихся в них белков слияния или по константе их связывания с кальцием отражается в зависимости доли слившихся гранул от концентрации ионов кальция. При возрастании концентрации, КГ с наибольшей плотностью молекул белка слияния, сольются с ПМ первыми, тогда как КГ с меньшей плотностью этого белка сольются позже. При этом, чем медленнее будет скорость роста концентрации кальция, тем больше будет влияние снижающих напряжение мембраны процессов, названных в предыдущем абзаце. При временной, полной остановке роста концентрации кальция, напряжение в мембране КГ, по-видимому, исчезает полностью и не возникает при последующем действии более высоких концентраций (рис. 3В). Последнее, можно интерпретировать как указание на то, что гетерогенность белков слияния по константе связывания с кальцием, либо отсутствует, либо не играет существенной роли в процессе слияния.

Поскольку количество белков слияния в вирусной оболочке или клеточной мембране довольно велико, относительно небольшое уменьшение их площади может создать достаточное для слияния напряжение в липидном монослое.

Модель латерального стресса не исключает возможности того, что белки в области контакта могут выполнять и более специфические функции при слиянии. Главным постулатом этой модели является то, что основная энергия для перестройки мембран поступает от белков, находящихся на вдали от места слияния.

Это позволяет предположить, что универсальное ингибирование слияния мембран лизолипидами [12] можно объяснить без привлечения представлений о геометрии фосфолипидов в зоне слияния, а как ослабление напряжения во внешнем монослое за счет включения в него лизолипидов.

Кроме того, модель латерального стресса может объяснить ряд экспериментальных данных, которые плохо поддаются объяснению на основе других моделей. Например, зависимость вирусного слияния от поверхностной плотности гемагглютинина [13,14], зависимость экзоцитоза от скорости увеличения концентрации кальция [15] и обратимость изменений, вызванных кальцием, в изолированных гранулах кортекса [8], естественным образом согласуется с этой моделью.

Список литературы / References:

1. Wang H., Zhang C., Xiao H. Mechanism of membrane fusion: protein-protein interaction and beyond. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, 2019, vol. 11, no. 6, pp. 250-225.
2. Martens S., McMahon H.T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology (online publication)*, 2008. doi: 10.1038/nrm2417
3. Chanturiya A., Scaria P., Woodle M.C. The Role of Membrane Lateral Tension in Calcium-Induced Membrane Fusion. *J. Membr. Biology*, 2000, vol. 176, pp. 67-75.
4. Chanturiya A., Scaria P., Kuksenok O., Woodle M.C. Probing the mechanism of fusion in a two-dimensional computer simulation. *Biophys. J.*, 2002, vol. 82, no. 6 pp. 3072-3080.

5. Merkle C.G. and Chandler D.E. Cortical granules matrix disassembly during exocytosis in sea urchin eggs. *Developmental biology*, 1991, vol. 148, pp. 429-441.
6. Whitaker M.J., Baker P.F. Calcium-dependent exocytosis in an *in vitro* secretory granule plasma membrane preparation from sea urchin eggs and the effects of some inhibitors of cytoskeletal function. *Proceedings of the Royal Society B.*, 1983, vol. 218, pp. 397-413.
7. Zimmerberg J., Liu J. Ionic and permeability requirements for exocytosis in vitro in sea urchin eggs. *J. Membrane Biol.*, 1988, vol. 101, pp. 199-207.
8. Walley T., Whitaker M. Exocytosis reconstituted from the sea urchin eggs is unaffected by calcium pretreatment of granules and plasma membrane. *Bioscience Report*, 1988, vol. 8, no. 4, pp. 335-343.
9. Vogel S.S., Zimmerberg J. Proteins on exocytic vesicles mediate calcium-triggered fusion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, pp. 4479-4753.
10. Cohen F.S., Akabas M.H., Zimmerberg J., Finkelstein A. 1984 Parameters affecting the fusion of unilamellar phospholipid vesicles with planar bilayer membranes. *J. of Cell Biol.*, vol. 98, pp. 1054-1062.
11. Pantazatos D.P., MacDonald R.C. Directly Observed Membrane Fusion Between Oppositely Charged Phospholipid Bilayers. *The Journal of Membrane Biology*, 1999, vol. 170, pp. 27-38.
12. Chernomordik L.V., Vogel S.S., Sokoloff A.A., Onaran H.O., Leikina E.A., Zimmerberg J. Lysolipids reversibly inhibit (Ca^{2+}), GTP- and pH dependent fusion of biological membranes. *FEBS Lett.*, 1993, vol. 318, pp. 71-76.
13. Chernomordik L.V., Frolov V.A., Leikina E., Bronk P., Zimmerberg J. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion and lipidic pore formation. *J. Cell Biol.* 1998, vol. 140, pp. 1369-1382.
14. White J. Membrane fusion. *Science*, 1993, vol. 258, pp. 917-924.
15. Knight D.E., Baker P.F. Calcium dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. of Membrane Biology*, 1982, vol. 68, pp. 107-140.

THE ROLE OF THE LATERAL TENSION IN CALCIUM-DEPENDENT PHOSPHOLIPID MEMBRANE FUSION

Chanturia A.N.

Eastern Scientific

Rockville, USA; e-mail: alexandr32@hotmail.com

Abstract. Fusion of the cortical granules of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* eggs was studied in an experimental system that allows a slow increase in the concentration of calcium in micro-molar range. It was found that in addition to the threshold concentration that trigger fusion of granules with the plasma membrane, there is a threshold for the rate of concentration growth, below which fusion does not occur. It is also shown that incubation of cortex preparations in solutions with an increased calcium content leads to inactivation of granules, which is expressed in the loss of their ability to fuse at higher concentrations of calcium. These data indicate that protein-mediated membrane fusion can be driven by the membrane lateral stress, similarly to the earlier proposed mechanism for fusion of purely phospholipid membranes.

Key words: Membranes, calcium, tension, fusion, microscopy.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЭКСТРАКТЫ В ЗАЩИТЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Дадашева С.Б., Курбанова И.М.

Институт ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана,

Бадамдарское шоссе, 40, г. Баку, 1004, Азербайджан; e-mail: sevil_fotosintez@mail.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Проведены сравнительные исследования фотосинтетических пигментов в листьях семидневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), подвергнутых в течение 24 часа действию токсических ионов солей CuSO_4 , NaCl , $\text{CuSO}_4 + \text{NaCl}$. Определены протекторные свойства экстрактов корней солодки (*Radix glycyrrhizae*), листьев шалфея *Folia Salvia officinalis*) при данных стрессах. Показано, что образующийся при окислительном стрессе реактивные формы кислорода, уменьшали содержание хлорофиллов (Хл b_{645} и Хл a_{680}). Обработка стрессовых проростков экстрактами восстанавливала поглощающую способность обоих пигментов. Можно предположить, что исследуемые экстракты обладают антиокислительными свойствами и способны тушить реактивные формы кислорода, образующейся при действии стрессоров.

Ключевые слова: хлорофилл *a* и *b*, тяжелые металлы, окислительный стресс, реактивные формы кислорода, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования последних десятилетий показали, что независимо от природных факторов, ответ растения на стресс развивается по общей схеме, что позволяет говорить о специфической стрессовой реакции на воздействие извне [1, 2]. Повышенный уровень тяжелых металлов (ТМ) может вызвать образование реактивные формы кислорода (РФК) – супероксидного анион-радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$), синглетный кислорода ($^1\text{O}_2$), перекис водорода (H_2O_2) [3-5]. В ответ на окислительный стресс в растениях активизируется система антиоксидантной защиты (АОС), запускающая работу низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов. Среди них каротиноиды, восстановленный глутатион, бетаины и основные антиоксидантные ферменты – супероксид-дисмутаза и каталаза. Относящиеся к АОС металлотионеины и фитохелатины способны не только связывать избыток ТМ, но и участвовать в нейтрализации токсических радикалов, которые разрушают макромолекулы и клеточные структуры [6, 7]. Высокие концентрации Cu^{2+} могут катализировать образование гидроксил радикала, $\cdot\text{O}_2$ и H_2O_2 . Эта катализируемая Cu реакция протекает в основном в хлоропластах. Избыток Cu^{2+} также уменьшает содержание фотосинтетических пигментов влияя на их синтез. Гидроксил радикал может привести к перекисному окислению ненасыщенных липидов мембран хлоропластов. Этот ингибиторный механизм может дать начало наблюдаемому ингибированию электронного транспорта при избытке Cu^{2+} [5]. Ингибирование биосинтеза пигментов [8] является первичным явлением в растении при стрессе, вызванном ТМ. Избыток Cu^{2+} приводит к инактивации Rubisko и фосфоэтанолпируват карбоксилазы (PEPC) путем взаимодействия с SH-группами. Кроме того, редокс активные ионы Cu вызывают липидное перекисное окисление в мембране [9], что в дальнейшем приводит к серьезным нарушениям тилакоидов. Взаимодействие между избытком меди и фотосинтезом изучается давно, но механизм его токсического действия все еще остается предметом дискуссий. Уменьшение содержания хлорофилла (Хл), которое часто наблюдается в растениях, экспонированных на высокие концентрации меди, может быть объяснено инактивацией дегидратазы аминокислотной кислоты [10]. Высокие концентрации соли провоцируют осмотический и ионный стресс. Избыточное накопление ионов Na^+ и Cl^- приводит к ионному стрессу и к обезвоживанию клеток, и к потере тургора. Происходит активизация ферментов, снижение скорости метаболических процессов, прежде всего фотосинтеза [11]. Данные о белковом составе мембран тилакоидов при действии NaCl несколько противоречивы: одни исследователи указывают на количественное уменьшение или увеличение ряда полипептидов, другие – на синтез новых (шоковых) белков [12, 13]. Скорость выделения кислорода в обоих случаях снижалась линейно с возрастанием концентрации NaCl . В более поздних работах было показано, что при NaCl -стрессе особенно разрушается белок 23 кДа кислородвыделяющего комплекса (КВК) ФС 2 частиц, который, как предположили авторы, является ключевым компонентом в солеустойчивости тилакоидных мембран [14]. Известно также, что избыток NaCl приводит к уменьшению содержания хлорофилла (Хл) и падению активности ФС 2 [15]. Действие NaCl вызывает в растениях снижение фотосинтетической активности, связанной с нарушением структуры мембран тилакоидов и снижением активности ФС II. Основной причиной повреждения активности ФС II является, вызываемой действием NaCl , окислительный стресс и образование активных форм кислорода (АФК) [16]. Ряд ученых внесли существенный вклад в исследование антиоксидантных свойств у растений, содержащих соединения, относящихся к различным классам фитохимических компонентов способных scavенджировать свободные радикалы [17, 18].

МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ

Объектом исследований служили 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Растения выращивали в водной среде. На 7-й день проростки помещали на 24 часа в растворы содержащие (10^{-3} М) CuSO_4 , NaCl и $\text{CuSO}_4+\text{NaCl}$. Полученные экстракты из листьев шалфея (*Folia Salvia officinalis*) и корней солодки (*Radix glycyrrhizae*) (5мг/мл) добавляли в среду выращивания испытуемых проростков. Исследование проводили при pH 6,8.

Содержание пигментов Хл *a* и *b* определяли по спектрам поглощения при длинах волн: Хл a_{680} нм, Хл b_{645} нм снятых на спектрофотометре фирмы Cary 50 Scan Varian при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ спектров поглощения показал, что как действие Cu^{2+} , так и соли NaCl приводят к снижению содержания хлорофилла - Хл a_{680} и Хл b_{645} по сравнению с контролем. Наблюдалось уменьшение содержания хлорофилла через 24 часа действие Cu^{2+} Хл b_{645} на 37%, Хл a_{680} на 64%. Действие соли NaCl уменьшало количество Хл b_{645} на 38%, Хл a_{680} на 73%. В условии двойного стресса ($\text{CuSO}_4+\text{NaCl}$) количество пигментов уменьшалась; Хл b_{645} на 83%, Хл a_{680} на 85% по сравнению с контролем (рис. 1).

Добавление экстрактов в среду выращивания проростков в условиях стресса оказывало положительный эффект на состояние пигментов Хл a_{680} и b_{645} . Как экстракт шалфея, так и солодки способствовали восстановлению поглощающей способности обоих пигментов, подавляемых стрессом. Действие экстракта

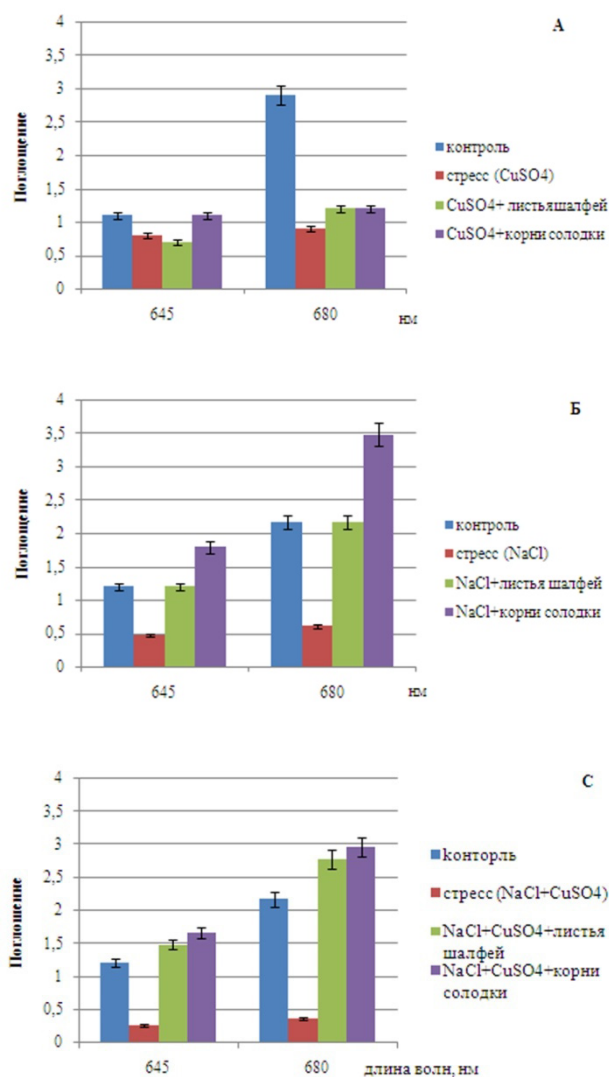


Рисунок 1. Действие (10^{-3} М) ионов Cu^{2+} (А), соли NaCl (Б), двойного стресса $\text{CuSO}_4+\text{NaCl}$ (В) на формы Хл a_{680} нм и Хл b_{645} нм при pH 6,8 среды в течении 24 часа на 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и защита их экстрактами из листьев шалфея (*Folia Salvia officinalis*) и корней солодки (*Radix glycyrrhizae*). Спектры поглощения были сняты при комнатной температуре

Таблица 1. Зависимость изменения величины отношения Хл a_{680} /Хл b_{645} от действия ионов (10^{-3} М) Cu^{2+} , NaCl, NaCl+ CuSO_4 в течении 24 часа и защита экстрактами шалфея и солодки

Условия	Хл a_{680} /Хл b_{645}			
	Контроль	Стресс	Шалфей	Солодка
CuSO_4	2,6	1,1	1,7	1,1
NaCl	1,8	1,3	1,8	1,9
NaCl+ CuSO_4	1,8	1,4	1,9	1,8

шалфея в условиях Cu^{2+} повышало содержание Хл a_{680} на 25%, при действии NaCl на 73%, при двойном стрессе (CuSO_4 +NaCl) на 87%. Действие экстракта корни солодки в условии NaCl на 83%, при двойном стрессе (CuSO_4 +NaCl) на 89% относительно стресса (рис. 1).

Как видно из таблицы 1 стрессовые факторы приводят к понижению величины отношения Хл a_{680} /Хл b_{645} . Это указывает на большую устойчивость Хл b_{645} к данным стрессам. При добавлении на 24 часа экстрактов в среду выращивания проростков содержащую Cu^{2+} наблюдается тенденция к увеличению отношения Хл a_{680} /Хл b_{645} , что предполагает больший защитный эффект шалфея по отношению к Хл a_{680} . Эффект экстракта солодки выражается в защите устойчивости Хл a_{680} при действии NaCl и CuSO_4 +NaCl (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Токсическое действие тяжелых металлов и засоление приводят к образованию РФК вызывающих окислительный стресс в растительном организме [19]. Окислительный стресс вызывает ответные стрессовые реакции, подавляющие физиологические и фотосинтетические функции [20]. Наблюдается нарушение равновесие между фотосистемами и подавляющее нарушение окислительно-восстановительных реакции. Фотосинтезирующие пигменты, Хл a_{680} и Хл b_{645} в силу деструктивных изменений снижают поглощающую способность. Для того чтобы обеспечить нормальный метаболизм в клетке растениях мобилизуются как энзиматическая так низкомолекулярная система защиты способная тушить свободные радикалы [21]. Повреждающему действию РФК противостояли испытываемые экстракты лекарственных растений корней солодки и листья шалфея. В настоящее время эти растения рассматриваются как потенциальный источник антиоксидантов натурального происхождения. Вероятно, содержащие в них фотохимические соединения: такие как у растений шалфея (*Folia Salvia officinalis*), содержащего сапонины (урсоловую, олеаноловую кислоты, каротин, витамин С) [22] и солодки (*Radix glycyrrhizae*), имеющий в составе сапонин-глицирризин [23]. В условии комплексного стресса данные экстракты были способны подавлять окислительный стресс корректируя содержание и соотношение фотосинтетических пигментов.

Список литературы / References:

1. Креславский В.Д., Карпентьер Р., Климов В.В., Мурата Н., Аллахвердиев С.И. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу. *Биол. мембраны*, 2007, т. 24, № 3, с. 195-217. [Kreslavsky V.D., Karpentier R., Klimov V.V., Murata N., Allahverdiev S.I. Molecular mechanisms of resistance of the photosynthetic apparatus to stress. *Biol. membranes*, 2007, vol. 24, no. 3, pp. 195-217. (In Russ.)]
2. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2002, vol. 7, no. 9, pp. 405-410. DOI: 10.1016/s1360-1385(02)02312-9
3. Башмаков Д.И., Лукаткин А.С. *Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений*. Под общ. ред. проф. А.С. Лукаткина, Саранск: Изд-во Мордов., 2002, 169 с. [Bashmakov D.I., Lukatkin A.S. *Ecological and physiological aspects of the accumulation and distribution of heavy metals in higher plants*. Ed. ed. prof. A.S. Lukatkina, Saransk: Publishing house of Mordov., 2002, 169 p. (In Russ.)]
4. Boominathan R., Doran P.M. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator. *Alyssum bertolonii*. *New phytologist*, 2002, vol. 156, no. 2, pp. 205-215. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00506.x
5. Gajewska E., Skłodowska M. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals*, 2007, vol. 20, no. 1, pp. 27-36. doi: 10.1007/s10534-006-9011-5
6. Малева М.Г., Некрасова Г.Ф., Борисова Г.Г., Чукина Н.В., Ушакова О.С. Влияние тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат и антиоксидантный статус элодеи. *Физиология растений*, 2012, т. 59, № 2, с. 216-224. [Maleva M.G., Nekrasova G.F., Borisova G.G., Chukina N.V., Ushakova O.S. The influence of heavy metals on the photosynthetic apparatus and the antioxidant status of elodea. *Plant physiology*, 2012, vol. 59, no. 2, pp. 216-224 (In Russ.)]
7. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты. *Рос. Хим. Ж.*, 2007, т. LI, № 1, с. 3-12. [Burlakova E.B. Bioantioxidants. *Rus. Chem. J.*, 2007, vol. LI, no. 1, pp. 3-12 (In Russ.)]

8. Prasad M.N.V., Strzalka K. (Ed.). Heavy Metal Influence on the light phase of photosynthesis. *In book Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*, 2002, pp. 229-255. doi: 10.1007/978-94-017-2660-3_9
9. Shainberg O., Rubin B., Rabinowitch H.D., Tel-Or E. Loading beans with sublethal levels of copper enhances conditioning to oxidative stress. *Journal of Plant Physiology*, 2001, vol. 158, no. 11, pp. 1415-1421. doi: 10.1078/0176-1617-00626
10. Fernandes J.C., Henriques F.S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.*, 1991, vol. 57, no. 3, pp. 246-273. doi: 10.1007/bf02858564
11. Sudhir P., Murthy S.D.S. Effect of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 2004, vol. 42, no. 4, pp. 481-486. doi:10.1007/S11099-005-0001-6
12. King G.J., Turner V.A., Hussey Jr Ch.E., Wurtele E.S., Lee M. Isolation and characterization of tomato cDNA clone which codes for a salt-induced protein. *Plant Mol.Biol.*, 1988, vol. 10, pp. 401-412. doi: 10.1007/BF00014946
13. Terjung F., Berg D., Mailer K., Otteken D. Effect of D₁/D₂ protein degradation in water stressed leaves of *Pisum sativum*. Photosynthesis: From light to biosphere. *Proc. of the X Congr. of photosynthesis. Montpellier, France*, 1995, vol. 4, pp. 709-712.
14. Sato F., Konda V., Shiga M. Characterization of OEC 23 polypeptide of NaCl – adapted photoautotrophic cultured cells of tobacco. Photosynthesis: From light to biosphere. *Proc. of the X Congr. of photosynthesis. Montpellier, France*, 1995, vol. 4, pp. 601-603.
15. Smillie R., Nott R. Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo*. *Plant Physiol.*, 1982, vol. 70, no. 4, pp. 1049-54. doi: 10.1104/pp.70.4.1049
16. Sharma N., Gupta N.K., Gupta S., Hasegawa H. Effect of NaCl salinity on photosynthetic rate, transpiration rate and oxidative stress tolerance in contrasting wheat genotypes. *Photosynthetica*, 2005, vol. 43, no. 4, pp. 609-613. doi: 10.1007/s11099-005-0095-x
17. Pajero I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Saavedra G., Murcia M.A., Jimenez A.M., Codina C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 2003, vol. 73, no. 13, pp. 1667-1681. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00488-0
18. Lin C.C., Huang P.C. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acatopanax senticosus*. *Phytother Res.*, 2000, vol. 14, no. 7, pp. 489-494. doi: 10.1002/1099-1573(200011)14:7<489::aid-ptr656>3.0.co;2-g
19. Mysliwa-Kurczak B., Strzalka K. Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. *In Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, eds Prasad M.N.V. et Strzalka K., 2002, pp. 201-226. doi: 10.1007/978-94-017-2660-3_8
20. Ганиева Р.А., Курбанова И.М., Дадашева С.Б. Флуоресценция хлорофилла и полипептидный состав тилакоидов при воздействии NaCl и полиэтиленгликоля на проростки пшеницы. *Физиология и биохимия культурных растений*, 2000, т. 32, № 4, с. 273-278. [Ganiyeva R.A., Kurbanova I.M., Dadasheva S.B. Fluorescence of chlorophyll and polypeptide composition of tylakoids under action of NaCl and polyethyleneglycol on wheat seedlings. *Physiology and biochemistry of cultured plants*, 2000, vol. 32, no. 4, pp. 273-278. (In Russ.)]
21. Dadashova S.B., Bayramova S.A., Kurbanova I.M. Protection of photosynthetic pigments from toxic action of copper by plant extracts. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 107-113
22. Керимов Ю.В. Полезные свойства растений из флоры Азербайджана. *Известие НАНА*, 1982, с. 16-21. [Kerimov, Yu.V. The useful properties of some plants from flora of Azerbaijan. *Proceeding of the National Academy of Sciences Azerbaijan*, 1982, pp. 16-21. (In Russ.)]
23. Дамиров И.А., Прилипко Л.И., Шукюров Д.З., Керимов Ю.Б. *Лекарственные растения Азербайджана*. Из-во «Маариф», Баку, 1982. [Damirov I.A., Prilipko L.I., Shukurov D.Z., Kerimov Yu.B. *Medicinal plants of Azerbaijan. "Maarif", Baku*, 1982. (In Russ)]

PLANT EXTRACTS IN PROTECTION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN OXIDATIVE STRESS

Dadashova S.B., Kurbanova I.M.

Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences
Baku, Azerbaijan; e-mail: sevil_fotosintez@mail.ru

Abstract. The comparative states of photosynthetic pigments in the leaves of seven-day wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) exposed for 24 hours to (10^{-3} M) toxic ions of CuSO₄, NaCl, CuSO₄+NaCl salts and extracts of licorice roots, sage leaves having protective properties under these stresses were carried out. It was shown that under all stresses, the formed reactive oxygen species (ROS), which causes stress, reduced the content of chlorophylls (Chl *b*₆₄₅ nm and Chl *a*₆₈₀ nm) after 24 hours. The addition of both sage and licorice extracts to the stress seedlings under study restored the absorption capacity of both pigments. It can be assumed that the studied extracts have antioxidant (AO) properties and are able to extinguish the ROS formed by the action of heavy metals (HM).

Key words: chlorophyll *a* and *b*, heavy metals, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants.

РИТМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЗГА ПРИ ВОСПРИЯТИИ МЕДИА-КОНТЕНТА И СОЗЕРЦАНИИ ПРИРОДЫ

Орехова Д.Д.¹, Каримова Е.Д.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119234, РФ

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
ул. Бутлерова, 5а, г. Москва, РФ; e-mail: dorekhova22@gmail.com

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В настоящее время всё большее количество людей склонны заполнять любые паузы «сёрфингом» в интернете и просмотром различных развлекательных видеороликов, при этом необходимое для отдыха состояние спокойного бодрствования подменяется восприятием и анализом новой информации. Целью данной работы было проанализировать изменения функционального состояния головного мозга при активном просмотре медиаконтента и пассивном созерцании природы с использованием различных математических методов обработки электроэнцефалограммы (ЭЭГ). В пилотном исследовании участвовали 16 испытуемых 21-25 лет, с каждым из них проводилось 2 тридцатиминутные экспериментальные сессии в разные дни – «активный» просмотр видеороликов и «пассивное» созерцание природы и леса, во время которых регистрировали ЭЭГ. Кроме того, в работе анализировали оптимальность применения различных методов обработки длительных записей электроэнцефалограммы без разделения на эпохи: были выполнены преобразование Гилберта, вейвлет преобразование Event-Related Spectral Perturbation (ERSP), а также рассчитаны когерентность Inter-Trial Coherence (ITC) и суммарная электрическая активность мозга относительно начала стимуляции. Обработка и предобработка, для которой использовался метод независимых компонент (ICA), осуществлялись в программах EEGLAB и Brainstorm. В результате были выявлены различия динамики биоэлектрической активности мозга: в активной сессии на протяжении всей записи преобладали бета- ритмы, во второй половине сессии увеличивалась мощность тета-ритма; в пассивной сессии амплитуда сигнала меньше, преобладают альфа- и бета- ритмы, причём мощность альфа-активности повышается вначале сессии, а бета-ритма – во второй половине. Были сделаны некоторые выводы об адекватности используемых методов для анализа длительных записей электроэнцефалограммы: наиболее информативный метод - ERSP преобразование, а преобразование Гилберта в свою очередь оказалось очень чувствительно к наличию артефактов, так как основано на выделении огибающей.
Ключевые слова: электроэнцефалограмма (ЭЭГ), метод независимых компонент, функциональное состояние, частотно-временной анализ, Вейвлет-преобразование.

ВВЕДЕНИЕ

Несколько десятилетий назад, до широкого распространения гаджетов и развития интернета, для отдыха люди выбирались на природу, слушали звуки леса и наслаждались тишиной. Это способствовало расслаблению, восстановлению нервной системы, переключению функционирования с восприятия и анализа информации на спокойное бодрствование без целенаправленной деятельности.

В современном мире все поменялось. Необходимость много работать, и нехватка времени для выезда на природу привели к тому, что среди молодого поколения все более популярным становится просмотр коротких видеороликов для заполнения «пауз» (ожидание в очереди, поездки на общественном транспорте, перерывы на работе или учёбе). Подобный досуг при этом воспринимается как простой и лёгкий способ переключиться и отдохнуть. Большую часть свободного времени молодые люди проводят за просмотром или прослушиванием блогов, подкастов, новостей, передач, фотографий в перерывах или зачастую параллельно с основной деятельностью: было показано, что среднестатистический американец тратит 8 ч 47 мин в день на просмотр видео-контента [1, 2]. При этом тот факт, что сейчас мозг человека в условиях жизни в большом городе перегружен сенсорным потоком, подтверждают многие психологи [3, 6].

Сможет ли человек качественно отдохнуть, просматривая или прослушивая СМИ, как это скажется на его работоспособности и функциональном состоянии? Так или иначе, медиа-пространство всё больше становится частью современной реальности, особенно для молодых людей, и важной задачей сегодняшней нейропсихологии является оценка воздействия погружения в медиа-пространство на функциональное состояние мозга.

Поскольку массовое вовлечение в медиа-среду с использованием гаджетов – явление достаточно новое, то серьёзных нейрофизиологических исследований этой проблемы ещё не проводилось. Однако в настоящее время все большее внимание уделяется проблеме восприятия медиа-контента и его влиянию на функциональное состояние мозга человека. Например, авторы статей [4, 5] занимаются исследованием айттрекинга при просмотре различных видеороликов, а в статье Н.Н. Лебедевой [7] рассматривается функциональное состояние человека при просмотре медиа-контента разной модальности. Авторы данной работы смогли выявить, какая информация усваивается лучше, а также провели параллель с морганием глаз.

Целью данной работы стало получение картины изменения ритмической активности мозга в течение 26 минут активного восприятия информационно-развлекательного видеоконтента и пассивного созерцания видео с кадрами и звуками природы. Данное исследование поможет не только оценить динамику активности головного мозга во время восприятия информации, но и подобрать оптимальные методы обработки длинных записей электроэнцефалограммы, что является важным результатом в области нейрофизиологии.

МЕТОДИКА

В пилотном исследовании принимали участие 16 человек – 9 женщин и 7 мужчин, в возрасте 21-25 лет. С каждым участником проводили по 2 эксперимента в два разных дня, всего в исследование вошли данные 32 экспериментов. В каждом эксперименте испытуемому предлагали просмотреть или развлекательный медиа-контент (активная сессия), или спокойный видеоряд со звуками природы (пассивная сессия). Подбор медиа-контента осуществляли при участии специалистов кафедры прикладной и экспериментальной лингвистики МГЛУ, при этом учитывали интересы исследуемой социальной группы. В связи с этим были предложены видеоролики различной тематики (интересные факты, отрывки из телепередач, эксперименты). Чтобы постоянно поддерживать высокий уровень заинтересованности и внимания, испытуемые могли переключать видео по своему усмотрению. Во время пассивной сессии испытуемому предлагался к просмотру только один видеоролик без информационного контента, содержащий кадры и звуки летнего леса, без возможности его переключить. Последовательность экспериментов рандомизировали для получения более достоверных результатов. Длительность каждой сессии составляла 30 мин (среднее время однократного просмотра медиа-контента в обычной жизни). Регистрацию ЭЭГ проводили во время восприятия стимульного материала с помощью энцефалографа-анализатора «Нейровизор» с 17 электродами (O1, O2, P3, P4, Pz, C3, C4, Cz, F3, F4, Fz, F7, F8, T3, T4, T5, T6), расположенных по системе «10-20», монополярно относительно объединенных ушных электродов A1 и A2 (рис. 1). Для всех отведений задавали частоту опроса 256 Гц, полосу пропускания 0,5-70 Гц, импеданс менее 30 кОм.

Для очистки записей применялась фильтрация сигнала (2-35 Гц), а также метод независимых компонент (ICA). Изначально сигналы ЭЭГ с разных датчиков не являются независимыми. Метод ICA (Independent Component Analysis) состоит в линейном комбинировании сигналов в компоненты так, чтобы полученные компоненты были независимы. Из полученных компонент рассчитываются удобные для анализа характеристики: частотно-мощностная, ERSP, scalpmap, ITC. Этот метод применяется при предположении, что подкомпоненты являются негауссовыми сигналами и что они статистически независимы друг от друга. Статистическая независимость означает, что измерение потенциала, произведенного в отдельном источнике, в данный момент не позволяет сделать никаких предположений относительно источника в другой области мозга. Предобработка проводилась в программе EEGLAB. Для анализа корреляции и мощности записей использовался групповой анализ, Вейвлет-преобразование, а также частотно-временной анализ (преобразование Гилберта). Обработка проводилась в программах EEGLAB, Brainstorm. Кроме того, в работе использовались методы непараметрической статистики, встроенные в программу EEGLAB. В работе выявлялись различия между активной и пассивной сессиями и их характеристиками (ERSP, ITC). При таком анализе не происходит выдвижение каких-либо предположений о характере распределения исследуемых данных. Тесты непараметрической статистики, предполагают оценивание имеющихся отношений ранговых сумм в нескольких выборках, на основании чего формулируется вывод о соотношении этих выборок.

Преобразование Гилберта осуществлялось по следующей формуле (1) [8-10]:

$$h(t) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{x(\tau)}{\tau - t} d\tau \quad (1)$$

где $x(t)$ это исходный сигнал, а $h(t)$ – само преобразование Гилберта. Данное преобразование является сверткой функции и по сути мерой огибающей сигнала. Оно указывает на активность в выбранной полосе частот.

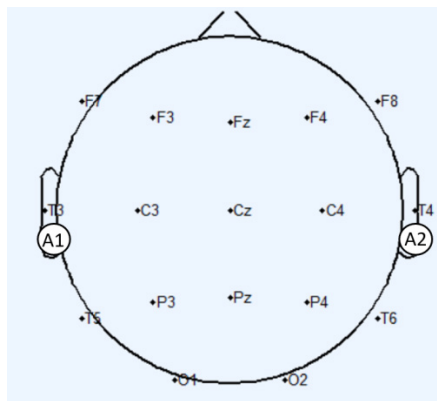


Рисунок 1. Схема расположения электродов

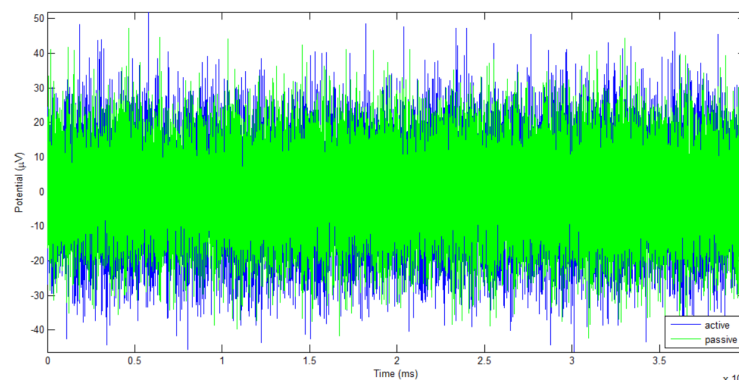


Рисунок 2. График суммарной электрической активности мозга относительно начала стимуляций – амплитуда в активной (синий) и пассивной сессии (зелёный)

ITC (Inter-Trial Coherence) – это мера того, насколько стабильна фаза в ансамбле испытаний. При исследовании колебаний данных ЭЭГ у нас может возникнуть вопрос, насколько последовательно они достигают одной и той же точки в цикле в разных испытаниях, и именно для этого мы будем пользоваться ITC. То есть по сути эта характеристика является функцией кросс-корреляции сигнала. Посчитать ITC можно с помощью коэффициентов Фурье $Z_i(f)$ (2) [11].

$$ITC(t) = \left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{Z_i(t)}{|Z_i(t)|} \right| \quad (2)$$

Фурье-преобразование возвращает коэффициенты Фурье для каждой комбинации времени и частоты – комплексные числа с действительными и мнимыми компонентами, которые описывают положение в двумерной плоскости, n – число испытаний.

ERSP (Event-Related Spectral Perturbation) – это вейвлет-преобразования ЭЭГ, которое характеризует зависимость мощности от времени и частоты. Этот метод анализа позволяет наглядно увидеть динамику колебательной активности в двух экспериментах. ERSP преобразует динамический сигнал с помощью быстрого преобразования Фурье и тем самым мы можем получить его спектрально-временное представление. С помощью этого преобразования мы можем посчитать изменение мощности (в дБ) в зависимости от частоты и времени (при этом происходит усреднение по всем испытаниям). Обычно для n испытаний применяется формула (3) [11]:

$$ERSP(f, t) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n |F_k(f, t)|^2 \quad (3)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Был построен график суммарной электрической активности мозга относительно начала стимуляции для всех каналов (рис. 2). На графике можно увидеть, что амплитуда во время активной сессии больше, чем при пассивном созерцании.

Была построена топограмма суммарной электрической активности для активной и пассивной сессии относительно начальной эпохи. Был также проанализирован уровень значимости с помощью методов непараметрической статистики в программе EEGLAB. Мы видим, что во время активной сессии наблюдалось увеличение спектральной мощности в левом теменном локусе (отведение P3), при этом спектральная мощность снижалась в правой височной области и правом центральном отведении. Во время пассивной сессии происходило менее амплитудное нарастание мощности по всем областям мозга.

Был построен график ITC для активной и пассивной сессий в зависимости от времени наблюдения и относительно начальной эпохи, а также проанализирован уровень значимости с помощью методов непараметрической статистики, встроенных в программу EEGLAB. В тета-диапазоне пассивной сессии нейронные сети работали синхронно: сигнал имеет более высокий уровень когерентности. Для бета-ритма обеих

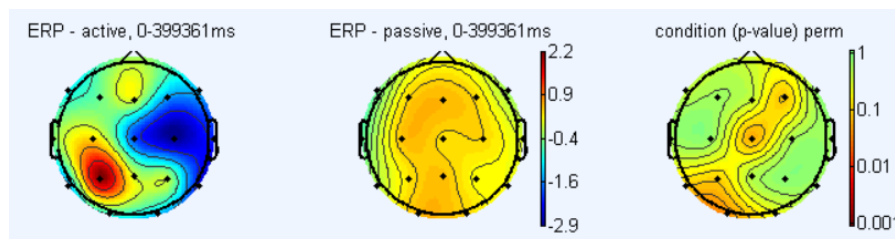


Рисунок 3. Топограммы суммарной электрической активности мозга для активной и пассивной сессий, а также уровень значимости при их сравнении

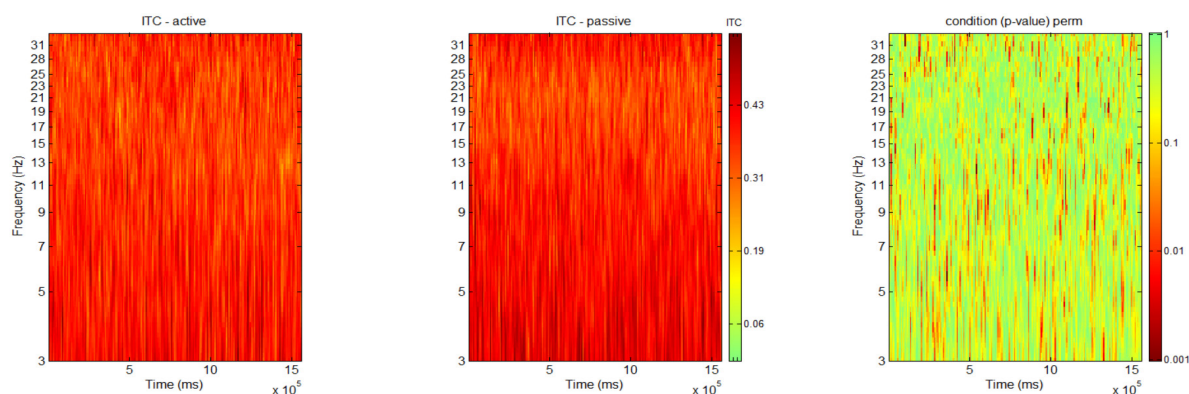


Рисунок 4. График Inter-Trial Coherence (ITC) для активной и пассивной сессий, а также уровень значимости при их сравнении

сессий, наоборот, такой синхронности не наблюдается. Кроме того, между сессиями присутствует различие (низкий уровень значимости), в основном в альфа-диапазоне.

Анализ ЭЭГ с использованием вейвлет-преобразования позволил получить спектрограммы изменения спектральной плотности во времени. График ERSР для активной и пассивной сессий в диапазоне частот 2–35 Гц в зависимости от времени наблюдения и относительно начальной эпохи, а также спектрограмма уровня значимости при сравнении двух сессий с помощью методов непараметрической статистики, представлены на рисунке 5. В активной сессии в целом наблюдался более высокий уровень мощности сигналов ЭЭГ, чем в пассивной, а при этом на протяжении всей записи преобладают бета- и тета- ритмы (в пассивной сессии же – альфа- и бета- ритмы). Присутствуют различия мощностей в бета- и тета- диапазонах.

Также было сделано преобразование Гилберта для каждого испытуемого (программа Brainstorm). Преобразование Гилберта является мерой огибающей сигнала, поэтому на графике 6 указаны максимальные (а не усредненные) значения амплитуды для всех каналов в различные моменты времени. Анализ графиков преобразования Гилберта показал, что преобразование Гилберта очень чувствительно к наличию артефактов – одномоментные всплески огибающей сигнала связаны скорее с мышечным напряжением испытуемого, чем с нейрофизиологическими изменениями активности мозга. Однако это преобразование полезно для того, чтобы оценить амплитуду сигнала отдельного человека в различных частотных диапазонах, причем сделать это наглядно и проследить динамику во время всей сессии.

На рисунке 7 представлена топограмма для отдельного человека, выполненная на основе преобразования Гилберта. Данная мера позволяет выявить локализацию областей мозга с наиболее амплитудными сигналами различных частотных диапазонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам ERSР анализа можно сказать, что в активной сессии на протяжении всей записи преобладают бета ритмы, а во второй половине сессии увеличивается мощность тета-ритма. В пассивной сессии амплитуда сигнала меньше, преобладают альфа- и бета- ритмы, причём мощность альфа-активности повышается вначале сессии, а бета-ритма – во второй половине. Повышение мощности тета- и бета-ритмов в активной сессии может указывать на повышение активности корковых системы с одной стороны, и на эмоциональное напряжение, концентрацию внимания, когнитивную активность с другой [1,4,6]. Повышение альфа- и бета-ритмов в большей

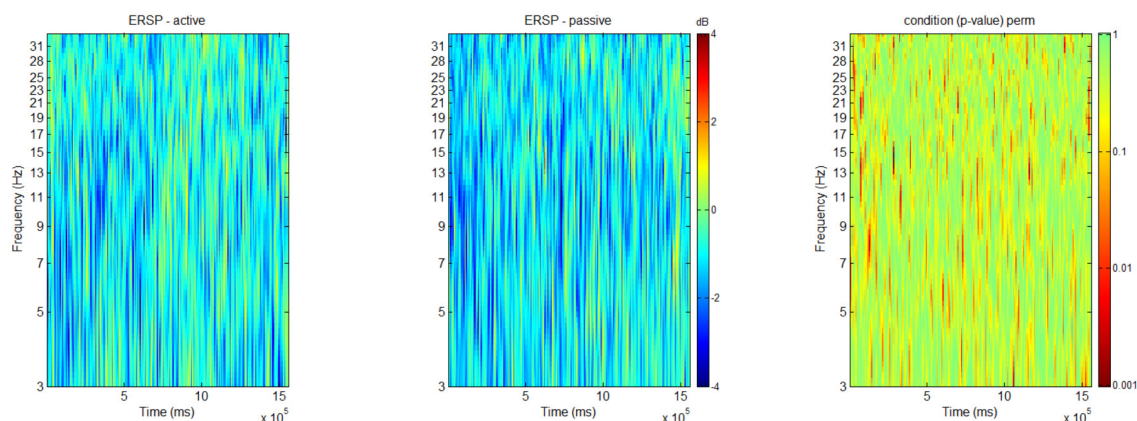


Рисунок 5. График ERSР для активной и пассивной сессий, а также уровень значимости при их сравнении

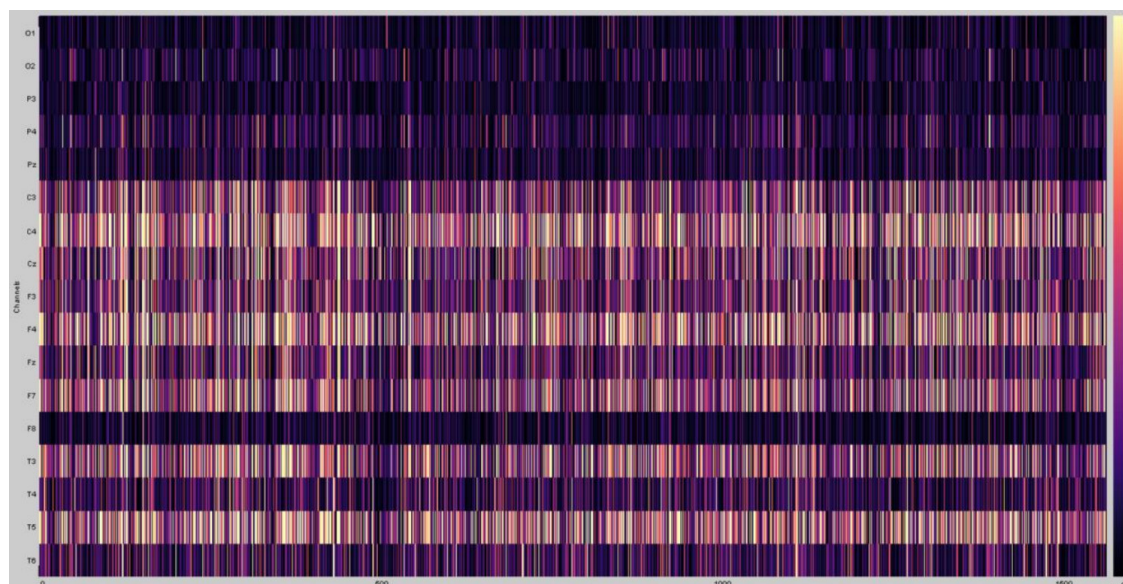


Рисунок 6. Преобразование Гилберта для отдельного испытуемого: значения амплитуды огибающей сигнала в каждый момент записи по каждому из каналов (слева вдоль оси у указаны названия каналов)

степени соответствует состоянию расслабления и отдыха сенсорных систем [1,6]. Кроме того, местами выявляется сильное различие записей (расчет по методам непараметрической статистики) в основном в бета- и тета-диапазонах. Тем самым отдых в лесу и восприятие звуков природы положительно влияет на нервную систему и способствует ее восстановлению.

График суммарной электрической активности относительно начала стимуляции свидетельствует о том, что во время активной сессии амплитуда сигнала в среднем по всем каналам выше, чем во время пассивной. Видно, что это отличие примерно составляет 10мВ. Это можно объяснить тем, что во время пассивной сессии испытуемые находятся в состоянии спокойного бодрствования, а во время активной сессии вынуждены воспринимать и обрабатывать большое количество информации.

По топограмме суммарной электрической активности можно сказать, что значительное различие между сессиями наблюдается в отведениях F4, Cz, P3, T5, O1 (уровень значимости $p \leq 0.05$). Кроме того, во время активной сессии полушария мозга работают асинхронно и потенциал относительно начальной эпохи в них сильно отличается, однако во время пассивной сессии все наоборот и полушария работают синхронно, не происходит сильных отклонений относительно начальной эпохи.

Преобразование Гилберта очень чувствительно к наличию артефактов, так как основано на выделении огибающей сигнала. В связи с этим его не рекомендуется применять к необработанным записям или же если артефакты не до конца удалены.

Применение метода ICA может быть недостаточно для первичной предобработки длительной ЭЭГ, потому что во время записи могут возникать сильные помехи, связанные с движением (нельзя сидеть полностью неподвижно в течение 26 минут), которые с помощью ICA не минимизировать. Фильтрация помогает избавиться от некоторых артефактов, при этом предварительная фильтрация ЭЭГ способствует лучшему разделению исходного сигнала на независимые компоненты.

Согласованность по фазам (ITC) свидетельствует о том, что нейронные сети работали синхронно в тета-диапазоне в пассивной сессии: сигнал имеет более высокий уровень когерентности. Для бета-ритма обеих сессий, наоборот, такой синхронности не наблюдается.

Результаты данного пилотного эксперимента тем не менее нуждаются в дальнейшем подтверждении на более крупной выборке с учётом тех методологических выводов, которые были сделаны в данной работе.

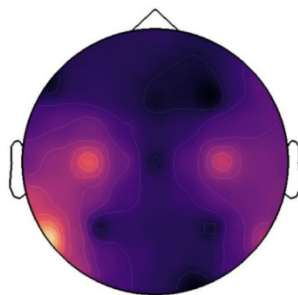


Рисунок 7. Топограмма на основе преобразования Гилберта для отдельного испытуемого – интегральное представление значений амплитуды огибающей на модели поверхности скальпа

Список литературы / References:

1. Nielsen. The Comparable Metrics Report: Q1 2016 [Internet]. 2016. Available from: <http://www.nielsen.com/us/en/insights/reports/2016/the-comparable-metrics-report-q1-2016.html>
2. Nielsen. The Total Audience Report: Q1 2016 [Internet]. 2016. Available from: <http://www.nielsen.com/us/en/insights/reports/2016/the-total-audience-report-q1-2016.html>
3. Torkel K. The Overflowing Brain: Information Overload and the Limits of Working Memory: Information Overload and the Limits of Working Memory. *Oxford University Press*, 2008, 224 p.
4. Andreu-Sanchez C., Martín-Pascual M.A., Gruart A., Delgado-García J.M. Looking at reality versus watching screens: *Media professionalization effects on the spontaneous eyeblink rate*, 2017., doi: 10.1371/journal.pone.0176030
5. Acqualagna L., Bosse S., Porbadnigk A.K., Curio G., Müller K.-R., Wiegand T., Blankertz B. EEG-based classification of video quality perception using steady state visual evoked potentials (SSVEPs). *Journal of Neural Engineering*, 2015, vol. 12, no. 2. doi:10.1088/1741-2560/12/2/026012
6. Дружилов С.А. Негативные воздействия современной информационной среды на человека: психологические аспекты. *Психологические исследования*, 2018. том 11, № 59, с. 11. [Druzhilov S.A. The negative impact of the modern information environment: the psychological aspects. *Psikhologicheskie Issledovaniya*, 2018, vol. 11, no. 59, p. 11. (In Russ.)]
7. Лебедева Н.Н., Каримова Е.Д., Потапов В.В., Потапова Р.К. Комплексное исследование изменения функционального состояния человека при восприятии медиа контента разной модальности, 2020. [Lebedeva N.N., Karimova E.D., Potapov V.V., Potapova R.K. Comprehensive study of changes in the functional state of a person when perceiving media content of different modality (In Russ.)]
8. Bertrand O., Tallon-Baudry C. Oscillatory gamma activity in humans: a possible role for object representation. *Int. J. Psychophysiol.*, 2000, vol. 38, iss. 3, pp. 211-223. doi: 10.1016/s0167-8760(00)00166-5
9. Fourier B.A. Hilbert and wavelet-based signal analysis: are they really different approaches? *Journal of Neuroscience Methods*, 2004, vol. 137, iss. 2, pp. 321-332. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.03.002
10. Le Van Quyen M., Foucher J., Lachaux J., Rodriguez E., Lutz A., Martinerie J., Varela F.J. Comparison of Hilbert transform and wavelet methods for the analysis of neuronal synchrony. *Journal of Neuroscience Methods*, 2001, vol. 111, iss. 2, pp. 83-98. doi: 10.1016/s0165-0270(01)00372-7
11. Delorme A., Makeig S. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 2004, vol. 134, iss. 1, pp. 9-21. doi: 10.1016/j.jneumeth.2003.10.009

BRAIN RHYTHMIC ACTIVITY DURING MEDIA-CONTENT PERCEPTION AND NATURE VIEWING**Orekhova D.D.¹, Karimova E.D.²**¹ Moscow State University*Str. Leninskije Gori, 1, Moscow, 119234, Russia*² Institut of higher nervous activity and neurophysiology of RAS*Str. Butlerova, 5a, Moscow, Russia*

Abstract. Currently, an increasing number of people are filling any pauses by surfing the Internet and watching various entertaining videos, while the necessary rest is replaced by the state of calm wakefulness by the perception and analysis of new information. The aim of this work was to analyze changes in the functional state of the brain during active perception of media content and passive viewing of nature using mathematical methods of processing an electroencephalogram (EEG). The pilot study involved 16 subjects aged 21–25 years, each of them underwent 2 thirty-minute experimental sessions in different days - “active” viewing of videos and “passive” contemplation of nature and forest, during which the EEG was recorded. In addition, the paper analyzes the optimality of the application of methods for processing long-term recordings of an electroencephalogram without dividing it into epochs: the Gilbert transform, the Event-Related Spectral Perturbation (ERSP), the Inter-Trial Coherence (ITC) and the effective electrical activity of the brain regarding the start of stimulation were calculated. Processing and preprocessing, which was implemented with Independent Component Analysis (ICA), were carried out in programs EEGLAB and Brainstorm. As a result, the dynamics of bioelectric activity of the brain were revealed: beta rhythms predominated throughout the work, in the second half of the session the power of the theta rhythm increased; in a passive session, the signal amplitude is less, alpha and beta rhythms prevail, and the power of the alpha activity increases at the beginning of the session, and the beta rhythm - in the second half. Some conclusions were made about the adequacy of the methods used for the analysis of long-term electroencephalogram recordings: the most informative method is the ERSP transform, but the Gilbert transform, in turn, turned out to be very sensitive to the presence of artifacts, since it is based on the envelope extraction.

Key words: *electroencephalogram (EEG), Independent Component Analysis, functional state, time-frequency analysis, Wavelet transform.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВОЛНОВОГО ТРАНСПОРТА В БИОСИСТЕМАХ

Клочков Б.Н.

Институт прикладной физики РАН

ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: klochkovbn@gmail.com

Поступила в редакцию: 11.07.2021

Аннотация. В статье рассмотрены активные волновые процессы изменения просвета сосудов и цилиндрических полых органов. Предложена математическая модель автоволнового транспорта их внутреннего содержимого на основе механохимических взаимодействий. Обсуждены самоорганизационные изменения их формы применительно к лимфатическим и кровеносным сосудам, а также другим объектам живых организмов. Представленная нелинейная математическая модель является достаточно точным приближением, позволяющим описать существование и распространение механохимических перепадных активных волн сокращения и расширения. Данная обобщенная универсальная модель описывает полный цикл сокращения–восстановления сосуда или органа. Предложенный механизм данного активного движения способен осуществлять важную транспортную функцию биологических материалов в органах цилиндрического типа: прокачку и насосные перистальтические эффекты. В рамках данной модели удалось получить понятные наглядные решения и аналитические выражения для скорости распространения автоволны сжатия (восстановления) просвета органа, для ширины её фронта и формы. Полученные с помощью формул их оценки близки экспериментальным данным и наблюдениям в лимфососудах животных. Заметим также, что описанные волны с близкими и сопоставимыми параметрами экспериментально наблюдались на других органах. С точки зрения биофизики это важно для понимания конкретных волновых физиологических процессов.

Ключевые слова: математическое моделирование, нелинейные волны, активный транспорт в сосудах и органах.

В ряде работ описаны актуальные направления развития волновых исследований биологических тканей, в том числе и сосудов, с учетом их функциональной и структурной организации. Особенно существенны активные волновые процессы с участием взаимодействующих белков в биологических системах, когда реализуются механические движения за счет биохимических реакций. В стенку различных полых биообъектов (органы, сосуды) могут входить гладкомышечные волокна (миоциты) или немышечные клеточные аналоги, за счет активности которых происходит динамическое изменение формы просвета органа и, как следствие, регуляция объёма, тока биомассы, биожидкости, биогаза [1-7]. В этой стенке возникает дополнительное активное напряжение, зависящее от радиуса органа немонотонно (колоколообразно), тогда статическая характеристика давление–радиус может приобретать падающий участок. Представлена нелинейная модель волновых процессов в биосистемах с учетом такой локальной миогенной регуляции. Механизмы её синхронизации связаны с собственной местной активацией мышечноподобных белковых структур, зависящей от геометрических и механических параметров. В этом случае возможно существование и распространение в органах перепадных автоволн просвета (волн сокращения–расширения) [8-12]. Решения модели призваны описывать и анализировать возможности активной перистальтической прокачки биоматериалов, в частности, эффективность транспорта лимфы и крови. Рассматриваемые волновые механизмы важны для переноса биоматериалов в биосистемах различного уровня функционирования.

Использованы методы математического моделирования биологических сплошных сред. Построена эволюционная нелинейная математическая модель в частных производных активного вязкоупругого цилиндрического (трубчатого) полого органа (рисунок 1). Параметры активного напряжения появляются из-за наличия в стенке слоя или слоёв возбужденных клеток. Рассматриваются достаточно медленные процессы, использовано безинерционное приближение. Полый орган – тонкостенный, материал его стенки – несжимаем. При этом перепад давления p вдоль органа мал, мала скорость течения биожидкости. Основное уравнение имеет вид:

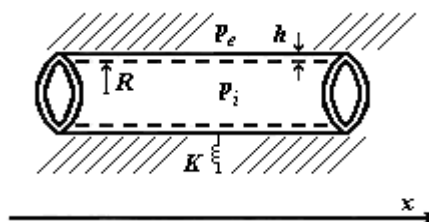


Рисунок 1. Схема цилиндрического полого органа

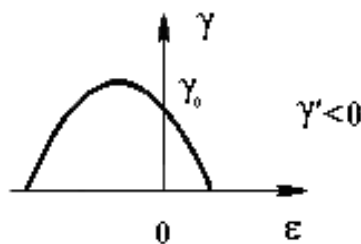


Рисунок 2. Параболическая аппроксимация нелинейной функции активности $\gamma(\varepsilon) = f(\varepsilon)$

$$q \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} + f(\varepsilon) - T \frac{\partial^2 \varepsilon}{\partial x^2} = 0. \quad (1)$$

Здесь основной переменной является деформация $\varepsilon = (R - R_0)/R_0$, причем $R(x, t)$ – текущий внутренний радиус, R_0 – недеформированный радиус. Время релаксации $q = \mu_l / \mu$, где μ – модуль сдвига материала стенки, μ_l – коэффициент вязкости материала стенки. Параметр натяжения органа $T = T_1 R_0^2 / (2\mu)$, где T_1 – коэффициент, включающий аддитивно продольное натяжение T_0 и упругий модуль μ . Нелинейная функция $f(\varepsilon) = -(A/2)\varepsilon + (\beta_2/4\mu)\varepsilon^2$, где безразмерный линейный параметр $A = (\gamma_1 - 2\mu)/\mu$, линейный параметр активного напряжения γ_1 , нелинейный квадратичный параметр β_2 (рис. 2). Ось x направлена вдоль органа, t – время. Данная модель может быть усложнена при помощи учета более тонких механизмов взаимодействия белковых структур и их возбуждения, а также дополнительных механических параметров и переменных.

При выводе уравнения (1) использованы дополнительно к обычным напряжениям активные напряжения с соответствующими параметрами и модулями. В частности, добавляется активный модуль γ_1 , который может менять знак параметра A в функции $f(\varepsilon)$, то есть может менять знак модуля общей упругости. При этом возникает длинноволновая неустойчивость, ограничивающаяся нелинейностью $f(\varepsilon)$, и автоволна. В случае отсутствия активных напряжений $\gamma_1 = 0$, уравнение (1) переходит в обычное уравнение для трубки из обычного вязкоупругого материала, не имеющее представленных решений и эффектов. Уравнение (1) специально представлено в таком общем универсальном каноническом виде, чтобы продемонстрировать фундаментальность рассматриваемого волнового транспортного процесса в биососудах и органах. Функция $f(\varepsilon)$ выбрана достаточной для аппроксимации экспериментальных данных и аналитического анализа решений. Эффекты, связанные с влиянием динамики биожидкости внутри органа, в данной модели не рассматриваются. Вся динамика органа определяется только движением его стенки. Наличие жидкости не принципиально, представленная модель справедлива и в случае, когда сосуд или орган заполнен газом или воздухом как, например, в лёгочных сосудах. Заметим, что для более сложной модели дополнительно учитывались гидродинамические уравнения в гидравлическом приближении, и было показано, что постоянство давления внутри сосуда – приемлемое приближение. Характерное гидродинамическое время существенно меньше, чем характерное время релаксации материала стенки, то есть гидродинамика – быстрая, а вязкоупругая релаксация – медленная. Кроме этого, у лимфатических сосудов нет внешнего насоса, трансмуральное давление мало меняется вдоль сосуда [2, 7, 8].

Рассмотрим данную модель активного трубчатого органа на основе нелинейного уравнения в частных производных (1). Исследуем нелинейный режим. Для стационарных волн решение зависит от автомоделльной бегущей переменной, причем уравнение сводится к нелинейному обыкновенному уравнению. В этом случае решения выглядят следующим образом:

$$\delta(y, \tau) = \frac{1}{(1 + D e^z)^2}, \quad z = -\frac{5}{6} A \tau \pm y \sqrt{\frac{A}{6}}, \quad (2)$$

$(A > 0, \text{ волна сокращения}).$

$$\delta(y, \tau) = \frac{1 + 2 D e^z}{(1 + D e^z)^2}, \quad z = -\frac{5}{6} A \tau \pm y \sqrt{-\frac{A}{6}}, \quad (3)$$

$(A < 0, \text{ волна восстановления}).$

$$t = \tau 2q, \quad x^2 = y^2 2T, \quad \delta = \varepsilon \beta_2 / (2\mu A). \quad (4)$$

Здесь введены безразмерные время τ , пространство y и функция $\delta(y, \tau)$, знаки (+) и (–) связаны с направлением движения волны, z – волновая автомоделльная переменная, D – постоянная, определяемая условиями задачи. Графически решения представлены на рисунке 3. Для стационарных волн получены аналитические решения в виде перепадов радиуса (просвета) органа. Это связано с автоволновой природой неустойчивости на нелинейной стадии.

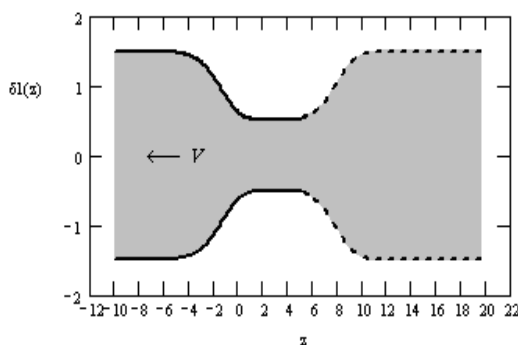


Рисунок 3. Перепадные автоволны просвета цилиндрического органа в безразмерных переменных: фаза волнового сокращения (прокачки, $A > 0$) – сплошная кривая, фаза волновой релаксации (восстановления, $A < 0$) – пунктирная кривая, $\delta l(z) = \delta(z) \pm 0,5$, $D = 2$

Безразмерные скорости автоволн равны $V = 5(\pm A/6)^{1/2}$. Выражения для размерной скорости V_r распространения геометрической автоволны и для размерной характерной ширины l_r её фронта по пространственной координате x имеют следующий вид (их произведение не зависит от активности A):

$$V_r = \frac{5R_0}{2\theta_1} \sqrt{\frac{|A|}{6}}, \quad l_r = \frac{R_0}{\sqrt{|A|}} \sqrt{\frac{6T_1}{\mu}}, \quad V_r l_r = \frac{5R_0^2}{2\theta}, \quad (5)$$

где $\theta = \mu_l / T_1$ и $\theta_1 = \mu_l / \sqrt{\mu T_1}$ – характерные времена пассивной релаксации радиуса.

Отсюда следуют выражения для характерной скорости распространения волны V_0 и характерной ширины фронта волны l_0 (при $|A| \sim 1$), которые можно использовать для числовых оценок:

$$V_0 = \frac{5R_0}{\theta_1 2\sqrt{6}}, \quad l_0 = R_0 \sqrt{\frac{6(\mu + T_0)}{\mu}}. \quad (6)$$

Максимальная относительная величина (амплитуда) ε_m перепада радиуса R цилиндрического органа в автоволне определяется формулой:

$$\varepsilon_m = \frac{R_0 - R_1}{R_0} = \frac{2\mu A}{\beta_2}, \quad \varepsilon_0 = \frac{2\mu}{\beta_2}. \quad (7)$$

Здесь R_1 и R_0 – соответственно минимальный и недеформированный радиусы органа в волне. На рисунке 4 представлены функциональные безразмерные зависимости скорости распространения волны $Vn = V_r / V_0$, её ширины $Ln = l_r / l_0$ и амплитуды $En = \varepsilon_m / \varepsilon_0$ от безразмерной активности A . Отсюда видно, что скорость волны медленно увеличивается с активностью, а в то же время её ширина медленно уменьшается. Одновременно с этим амплитуда (величина перепада) растет с активностью быстрее (линейно). Автоволновой режим, близкий к описанному стационарными формулами (2), (3), осуществляется в достаточно длинном органе, когда его длина L существенно больше характерной ширины фронта волны l_r ($L \gg l_r$). Нестационарные процессы описываются численно. Найденное решение бегущей стационарной волны в виде перепада просвета органа подтверждается

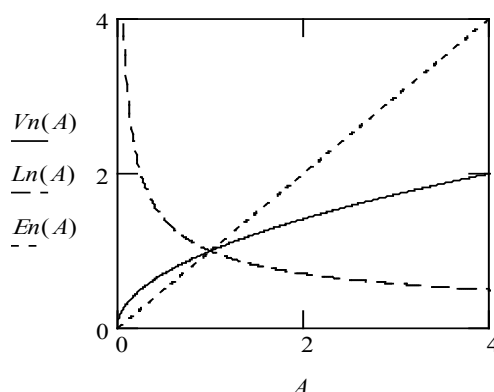


Рисунок 4. Безразмерные скорость (сплошная линия), ширина фронта (штрих) и амплитуда (пунктир) автоволны от активности

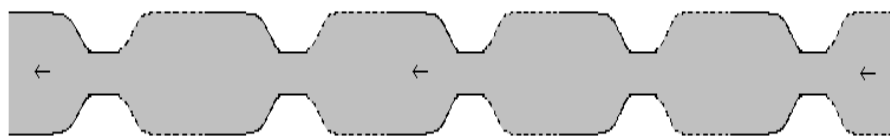


Рисунок 5. Распространение во времени автоволны справа налево

численными расчетами исходных уравнений в частных производных. На рисунке 5 изображено периодическое временное распространение данной автоволны.

При распространении такой автоволны вдоль органа его содержимое выдавливается этой волной (эффект нелинейного транспорта). Подсчитаем производительность Q_r такого активного насоса, вызванного распространяющейся механохимической автоволной сжатия органа. Она вычисляется при помощи уравнения неразрывности. Тогда получить численную оценку величины производительности насоса Q_r можно при помощи следующей формулы: $Q_r = \pi V_r (R_0^2 - R_1^2)$. Доля фракции инъекции может быть рассчитана как $E_f = (R_0^2 - R_1^2)/R_0^2$.

В экспериментах на лимфатических сосудах [8] представлены следующие значения рассматриваемых параметров (рис. 6). Скорость распространения волны изменения диаметра (просвета) лимфососуда $V_r = 4\text{--}5$ мм/с, ширина фронта этой волны $l_r \sim 5R_0$ ($R_0 = 0,2\text{--}1,5$ мм), частота волновых сокращений (возбуждающие пейсмекеры располагаются вблизи клапанов) $f_i = 4\text{--}6$ мин⁻¹, фракция изгнания $E_f = 45\text{--}65$ %. При этом перепад давления вдоль лимфососуда мал, мала скорость течения лимфы, поскольку мало производство лимфы в организме, определяемое медленными фильтрационными и другими процессами [2, 3, 7, 8].

Из представленных выражений (5) для значений $R_0 = 1$ мм, $q = 0,2$ с, $A = 0,4$, $T_0 = \mu$ получаем $V_r \approx 4,6$ мм/с, $l_r \approx 5,5$ мм. Отсюда с учетом $R_1 = 0,6$ мм можно вычислить производительность такого активного насоса, вызванного распространяющейся автоволной сжатия, $Q_r \approx 9,2$ мм³/с (мг/с). Величина инъекции составляет $E_f = 64$ %. Т. е. волна может давать существенный прокачивающий эффект. Параметры автоволны достаточно близки наблюдаемым и измеряемым. При осуществлении транспорта диссипация энергии De на волновом перепаде вычисляется при помощи интегрирования по объёму стенки сосуда v с учётом вязкости материала стенки μ_i и скорости изменения радиуса $\dot{R}$, а также дополнительных значений толщины стенки $h = 0,1$ мм и модулей упругости $\mu = 5 \cdot 10^3$ Н/м², $\beta_2 = \mu$ для оценки её величины следующим образом:

$$De = - \int [2\mu_i (\dot{R})^2] dv = -0,04 \text{ г} \cdot \text{см}^4/\text{с}^3. \quad (8)$$

В заключение отметим, что представленная нелинейная математическая модель является достаточно точным приближением, позволяющим описать существование и распространение механохимических перепадных активных волн сокращения и расширения. Данная обобщенная универсальная модель описывает полный цикл сокращения–восстановления сосуда или органа. Предложенный механизм данного активного

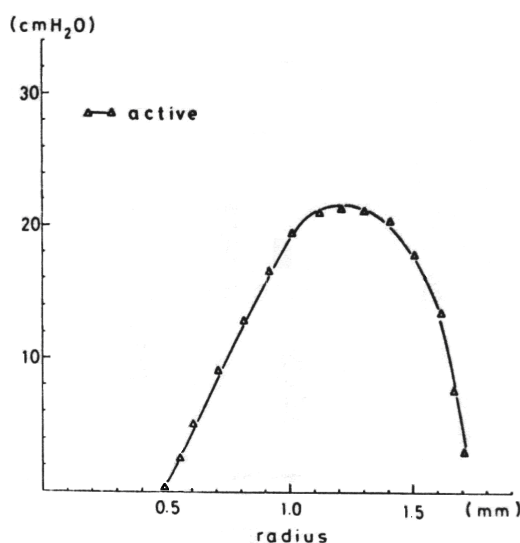


Рисунок 6. Экспериментальная активная кривая из работы [8] для лимфатического сосуда, определяющая напряжение гладких мышц в зависимости от радиуса, $\gamma(R)$. Эту кривую достаточно аппроксимировать параболой рисунка 2

движения способен осуществлять важную транспортную функцию биологических материалов в органах цилиндрического типа: прокачку и насосные перистальтические эффекты. В рамках данной модели удалось получить понятные наглядные решения и аналитические выражения для скорости распространения автоволны сжатия (восстановления) просвета органа, для ширины её фронта и формы. Полученные с помощью формул их оценки близки экспериментальным данным и наблюдениям в лимфососудах животных. Заметим также, что описанные волны с близкими и сопоставимыми параметрами экспериментально наблюдались на других органах. С точки зрения биофизики это важно для понимания конкретных волновых физиологических процессов.

Данные самоподдерживающиеся волны возможно могут также играть важную практическую роль и в некоторых других объектах, например, в венах, в мочеточнике, в сердцах различной природы, в аксонном транспорте, в органах трубчатого типа с тонусом у живых организмов, хотя пока не всегда существуют соответствующие экспериментальные данные, наблюдения и указания. При этом форма активного органа, в общем, непринципиальна, для органов нецилиндрического типа данный механизм может действовать аналогично. Принципиальным является наличие в стенке органа гладкомышечных волокон или немышечных аналогов в активном возбуждённом состоянии за счет энергии, вырабатываемой биохимическими реакциями. При этом волна, которая дает насосный эффект, может быть чётко выраженной или не явно выраженной. В настоящей работе представлен новый общий фундаментальный принцип перемещения биоматериалов в полых органах, как альтернативный механизм транспорта, который может быть приложен к конкретным сосудам, сердцам и другим объектам.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИПФ РАН, проект № 0035–2019-0014.

Список литературы / References:

1. Sarvazyan A., Rudenko O., Aglyamov S., Emelianov S. Muscle as a molecular machine for protecting joints and bones by absorbing mechanical impacts. *Medical Hypotheses*, 2014, vol. 83, no. 1, pp. 6-10.
2. *Физиология человека*. Под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. М.: Мир, 1985, том 1, 272 с. [*Human physiology*. Ed. R.F. Schmidt, G. Thews. Berlin: Springer-Verlag, 1983, vol. 1, 272 p. (In Russ.)]
3. *Физиология кровообращения: физиология сосудистой системы. Руководство по физиологии*. Л.: Наука, 1984, 656 с. [*Circulation physiology: vessel system physiology. Guide on physiology*. L.: Nauka, 1984, 656 p. (In Russ.)]
4. Фолков Б., Нил Э. *Кровообращение*. М.: Медицина, 1976, 464 с. [Folkow B., Neil E. *Circulation*. New York: Oxford University Press, 1971, 464 p. (In Russ.)]
5. Fung Y.C. *Biodynamics. Circulation*. New York: Springer-Verlag, 1984, 404 p.
6. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. *Механика кровообращения*. М.: Мир, 1981, 642 с. [Caro C.G., Pedley T.J., Schroter R.C., Seed W.A. *The mechanics of the circulation*. Oxford: Oxford University Press, 1978, 643 p. (In Russ.)]
7. Орлов Р.С., Борисов А.В., Борисова Р.П. *Лимфатические сосуды*. Л.: Наука, 1983, 254 с. [Orlov R.S., Borisov A.V., Borisova R.P. *Lymphatic vessels*. L.: Nauka, 1983, 254 p.]
8. Ohhashi T., Azuma T., Sakaguchi M. Active and passive mechanical characteristics of bovine mesenteric lymphatics. *Amer. J. Physiol.*, 1980, vol. 239, pp. H88-H95.
9. Hilton S.M. A peripheral arterial conducting mechanism underlying dilation of the femoral artery and concerned in functional vasodilation in skeletal muscle. *J. Physiol.*, 1959, vol. 149, p. 93-111.
10. Duling B.R., Berne R.M. Propagated vasodilation in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Circulation Research*, 1970, vol. 26, pp. 163-170.
11. Burrows M.E., Johnson P.C. Arteriolar responses to elevation of venous and arterial pressures in cat mesentery. *Amer. J. Physiol.*, 1983, vol. 245, p. H796-H807.
12. Colantuoni A., Bertuglia S., Intaglietta M. Quantitation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation. *Amer. J. Physiol.*, 1984, vol. 246, no. 4, pt. 2, pp. H508-H517.

MODELING OF WAVE TRANSPORT DYNAMICS IN BIOSYSTEMS

Klochkov B.N.

Applied Physics Institute, Russian Academy of Sciences

Ulyanova str., 46, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: klochkovbn@gmail.com

Abstract. The paper considers active wave processes in changes in the lumina of vessels and cylindrical hollow organs. A mathematical model is proposed for autowave transport of their internal contents of based on mechanochemical interactions. The self-organization of changes in their shapes are discussed in application to lymphatic and blood vessels and other objects of living organisms. The presented nonlinear mathematical model is a sufficiently accurate approximation making it possible to describe the existence and propagation of mechanochemical kink contraction and extension waves. The given generalized universal model describes the complete contraction–restoration cycle of a vessel or organ. The proposed mechanism of the given active motion is capable of carrying out an important transport function of biological materials in cylindrical organs: pumping and pump peristaltic effects. Using the given model, it was possible to obtain clear visual solutions and analytic expressions for the autowave propagation velocity for the compression (recovery) of the lumen of an organ, the width of its front, and its shape. Their estimates obtained with the formulas are close to the experimental data and observations in animal lymphatic vessels. Note also that the described waves with close and comparable parameters were experimentally observed in other organs. From the viewpoint of biophysics, this is important for understanding specific physiological wave processes.

Key words: *mathematical modeling, nonlinear waves, active transport in vessels and organs.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРЕД-ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ ФАЗЫ РОСТА В КУЛЬТУРЕ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Тренкеншу Р.П., Ширяев А.В., Горбунова С.Ю.

ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»
ул. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: svetlana_8423@mail.ru

Поступила в редакцию: 12.07.2021

Аннотация. В данной статье рассмотрен рост микроводорослей в накопительной культуре до экспоненциальной фазы. Использована упрощённая модель для описания динамики ресурсной и структурной компонент. Математически модель представлена системой дифференциальных уравнений. Получены решения для данной системы. Представлены модельные кривые для различных начальных соотношений ресурсной и структурной компонент. Показано, что динамика биомассы существенно зависит не только от внешних условий культивирования микроводорослей, но и от начального соотношения компонент биомассы. При определенных начальных соотношениях компонент наблюдается также и отрицательная динамика роста на начальном этапе. Такое поведение обусловлено высоким относительным содержанием ресурсов в биомассе. Из решения уравнений следует, что необходимым условием перехода в экспоненциальную фазу является постоянство соотношения компонент во времени. Таким образом, пред-экспоненциальная фаза является переходным, или адаптационным, процессом периодической культуры. При этом удельные скорости биохимических процессов и биохимический состав в клетках микроводорослей постоянно изменяются. С течением времени должен сформироваться определенный биохимический состав, который соответствует заданным световым условиям.

Ключевые слова: микроводоросли, биохимический состав, скрытая фаза роста, адаптация, удельная скорость роста, экспоненциальный рост, моделирование.

Периодическая (накопительная) культура является наиболее распространенным способом культивирования и исследования роста микроводорослей, главным достоинством которых, как модельного объекта являются их высокая скорость размножения и малые размеры. Культура микроводорослей представляет собой популяцию клеток. Накопительная культура характеризуется последовательностью фаз роста, причём первая фаза – пред-экспоненциальная – наименее изученная. В этой фазе роста клетки микроводорослей адаптируются к новым заданным условиям среды [1]. Другими словами, при переводе микроводорослей из условий лимитирования по питательным веществам на свежую (полную по составу) питательную среду, они либо не размножаются, либо отстают по скорости размножения от обычного, свойственного данному виду темпу размножения. Детальное изучение переходных процессов в клетках микроводорослей, позволяет сделать количественную оценку адаптационных явлений. Количественное описание пред-экспоненциальной фазы позволит контролировать процесс адаптации или сводить его к минимуму. Для микроводорослей продолжительность этой фазы составляет от одного до нескольких дней, при этом длительность зависит от количества инокулята и фазы роста, на которой инокулят был взят для культивирования, а также внешних условий выращивания [2]. Далее, при заданных условиях минерального и светового обеспечения, культура растёт экспоненциально с максимальной удельной скоростью роста всех компонентов клеток и биомассы в целом. [3] Отметим, что экспоненциальный рост микроводорослей возможен и в случае лимитирования культуры питательными веществами или светом, но при условии их постоянства.

В рамках данной статьи рассмотрим биомассу микроводорослей, состоящую из двух компонент: ресурсной и структурной частей. Такой подход впервые был использован в работе [4] для количественного описания процессов трансформации макромолекулярных форм биомассы микроводорослей в темноте.

Цель работы – используя упрощённую математическую модель исследовать динамику структурной и резервной форм биомассы микроводорослей в период пред-экспоненциальной фазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представим биомассу в виде суммы двух компонент: структурная форма (B_{str}) и ресурсная (B_{res}):

$$B = B_{str} + B_{res}$$

Система уравнений, описывающая фотосинтез ресурсных форм и их переход в структурные формы биомассы [5] в упрощённом виде может быть представлена как:

$$\begin{cases} \frac{dB_{res}}{dt} = \mu_m i_o B_{str} - \mu_{mrs} B_{res} \\ \frac{dB_{str}}{dt} = \mu_{mrs} q_{rs} B_{res} - \mu_r B_{str} \end{cases}, \quad (1)$$

где μ_{mrs} – максимальная удельная скорость трансформации ресурсных веществ в структурные,
 μ_m – максимальная удельная скорость синтеза продуктов световой стадии,
 q_{rs} – экономический коэффициент этого перехода,
 μ_r – удельная скорость естественного распада структур.

Решение такого типа систем уравнений сводится к преобразованию системы в дифференциальное уравнение второго порядка через выражение одной переменной в другую путём подстановок.

$$\frac{d^2 B_{res}}{dt^2} + (\mu_{mrs} + \mu_r) \frac{dB_{res}}{dt} + \mu_{mrs} (\mu_r - i_0 \mu_m q_{rs}) B_{res} = 0 \quad (2)$$

где введены обозначения:

$$\mu_1 = -\frac{(\mu_r + \mu_{mrs})}{2} + \sqrt{\left(\frac{\mu_r + \mu_{mrs}}{2}\right)^2 + \mu_{mrs} \mu_m q_{rs} i_0}$$

$$\mu_2 = -\frac{(\mu_r + \mu_{mrs})}{2} - \sqrt{\left(\frac{\mu_r + \mu_{mrs}}{2}\right)^2 + \mu_{mrs} \mu_m q_{rs} i_0}$$

Введем величину для описания динамики структурной и резервной форм биомассы – отношение резервной формы к структурной:

$$\varepsilon = \frac{B_{res}}{B_{str}} \quad (3)$$

Решение системы уравнений будет иметь вид:

$$B_{res} = B_{0res} \frac{1}{\varepsilon_0} (k_1 e^{\mu_1 t} + k_2 e^{\mu_2 t}), \quad (4)$$

$$B_{str} = B_{0str} \frac{1}{\mu_m i_0} [(\mu_1 + \mu_{mrs}) k_1 e^{\mu_1 t} + (\mu_2 + \mu_{mrs}) k_2 e^{\mu_2 t}]$$

где $B_{res} = B_{0res}$, $B_{str} = B_{0str}$, $\varepsilon_0 = \frac{B_{0res}}{B_{0str}}$ – начальные условия при $t = 0$,

$$k_1 = \frac{\mu_m i_0 - \mu_2 \varepsilon_0 - \mu_{mrs} \varepsilon_0}{\mu_1 - \mu_2}, \quad k_2 = \varepsilon_0 - k_1 = \frac{\mu_1 \varepsilon_0 + \mu_{mrs} \varepsilon_0 - \mu_m i_0}{\mu_1 - \mu_2},$$

Концентрация биомассы в культуре представляет собой сумму концентраций резервных и структурных биохимических составляющих:

$$B = B_0 \frac{1}{\mu_m i_0 (\varepsilon_0 + 1)} [(\mu_1 + \mu_{mrs} + \mu_m i_0) k_1 e^{\mu_1 t} + (\mu_2 + \mu_{mrs} + \mu_m i_0) k_2 e^{\mu_2 t}] \quad (5)$$

Для отношения составляющих биомассы получим выражение:

$$\varepsilon = \mu_m i_0 \frac{k_1 e^{\mu_1 t} + k_2 e^{\mu_2 t}}{(\mu_1 + \mu_{mrs}) k_1 e^{\mu_1 t} + (\mu_2 + \mu_{mrs}) k_2 e^{\mu_2 t}} \quad (6)$$

Соотношение ресурсной/структурной форм биомассы имеет стационарную величину во времени ε_{ln} для всех начальных ε_0 . Это стационарное состояние обусловлено экспоненциальным ростом, когда наблюдаются постоянные соотношения компонентов клеток. Данное соотношение можно вычислить по формуле:

$$\varepsilon_{ln} = \lim_{t \rightarrow \infty} \mu_m i_0 \frac{k_1 e^{\mu_1 t} + k_2 e^{\mu_2 t}}{(\mu_1 + \mu_{mrs}) k_1 e^{\mu_1 t} + (\mu_2 + \mu_{mrs}) k_2 e^{\mu_2 t}} = \frac{\mu_m i_0}{\mu_1 + \mu_{mrs}} \quad (7)$$

Графическое представление.

Для построения всех кривых будем использовать коэффициенты из работы [4]:

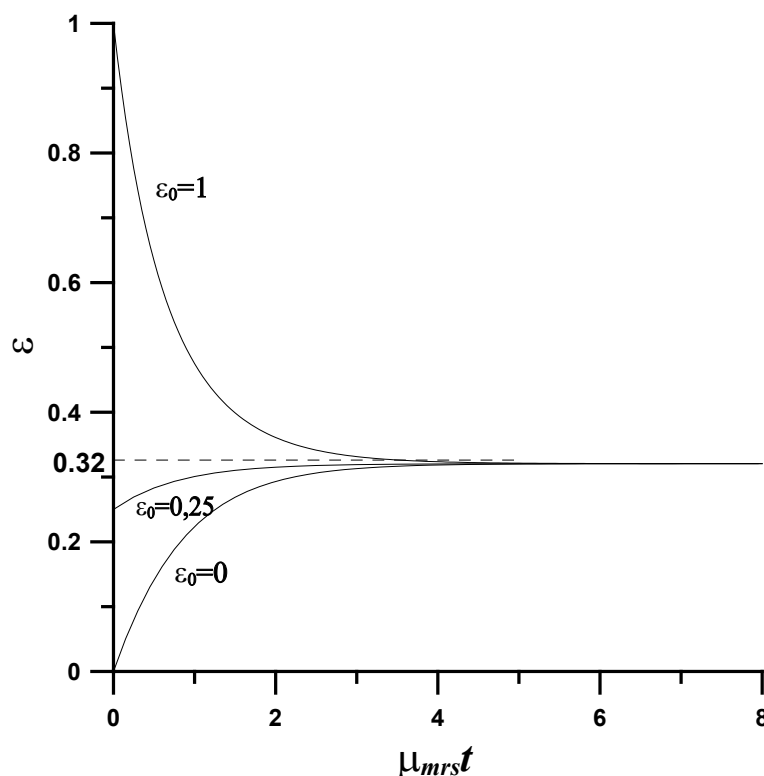


Рисунок 1. Динамика структурной и резервной форм биомассы микроводорослей в зависимости от начальной величины ε_0 : 0; 0,25; 1

$$\frac{\mu_r}{\mu_{mrs}} = 0,05; \quad \frac{\mu_m}{\mu_{mrs}} = 1,2; \quad q_{rs} = 0,4.$$

Заметим, что данные величины являются специфическими для культуры, а также зависят от внешних условий: освещение, температура и т.д.

Пусть интенсивность света будет составлять 30% от интенсивности насыщения. Такое значение рассчитано на основании заданных условий культивирования:

$$i_0 = 0,3$$

Динамика соотношения ресурсные/структурные формы биомассы представлена на рисунке (рис. 1). Кривые построены в зависимости от начальной величины ε_0 : 0; 0,25; 1.

Из рисунка видно, что это соотношение имеет стационарную величину во времени ε_{ln} для всех начальных ε_0 . Это стационарное состояние обусловлено экспоненциальным ростом, когда наблюдаются постоянные соотношения компонентов клеток. Данное соотношение можно вычислить по формуле:

$$\varepsilon_{ln} = \lim_{x \rightarrow \infty} \mu_m i_0 \frac{k_1 e^{\mu_1 t} + k_2 e^{\mu_2 t}}{(\mu_1 + \mu_{mrs}) k_1 e^{\mu_1 t} + (\mu_2 + \mu_{mrs}) k_2 e^{\mu_2 t}} = \frac{\mu_m i_0}{\mu_1 + \mu_{mrs}}$$

Для указанных выше значений коэффициентов и относительной освещённости $\varepsilon_{ln} \approx 0,32$.

Графическая иллюстрация динамики концентрации биомассы с нормированием относительно значения начальной биомассы B_0 представлена на рисунке (рис. 2). Кривые также построены в зависимости от начальной величины ε_0 .

Из представленного рисунка видно, что отличительной особенностью обладает кривая с начальным значением $\varepsilon_0 = 1$. Наблюдается падение биомассы на начальном участке. Это обусловлено интенсивным переходом ресурсной формы в структурную с потерей биомассы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная модель описывает период адаптации клеток микроводорослей. Суть адаптации заключается в переходе на стационарное состояние, при котором удельные скорости составляющих биомассы и соотношение ε постоянны.

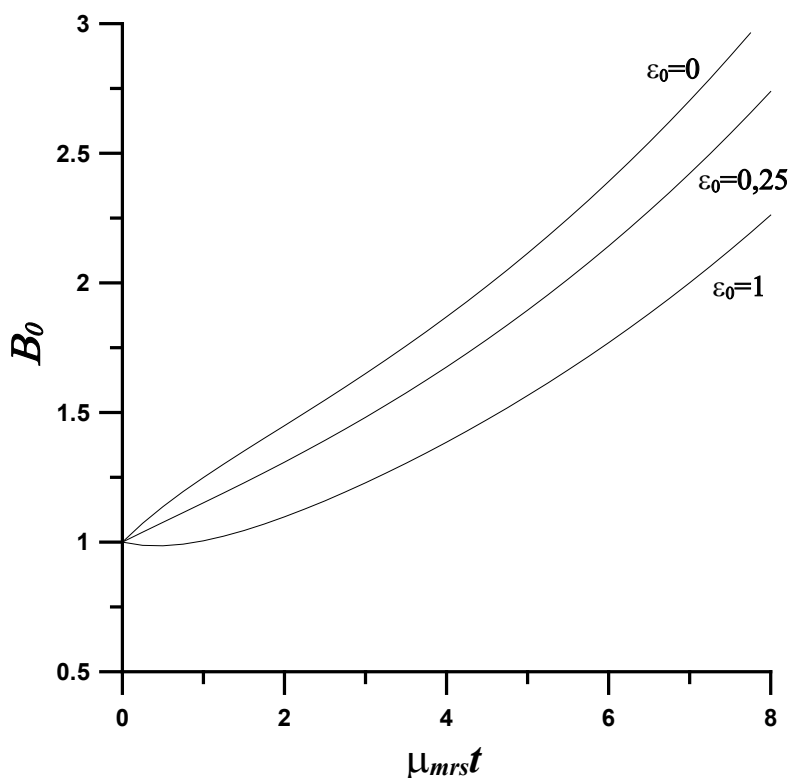


Рисунок 2. Динамика концентрации биомассы микроводорослей в зависимости от начальной величины ε_0

Показано, что динамика биомассы существенно зависит не только от внешних условий культивирования микроводорослей, но и от начального соотношения компонент биомассы. Из решения уравнений следует, что необходимым условием перехода в экспоненциальную фазу является постоянство соотношения компонент во времени. Таким образом, пред-экспоненциальная фаза является переходным, или адаптационным, процессом периодической культуры. При этом удельные скорости биохимических процессов и биохимический состав в клетках микроводорослей постоянно изменяются. С течением времени должен сформироваться определенный биохимический состав, который соответствует заданным световым условиям выращивания.

При определенных начальных соотношениях компонент наблюдается также и отрицательная динамика роста на начальном этапе выращивания, что обусловлено высоким относительным содержанием ресурсов в биомассе.

Исследования выполнены в рамках Госзадания ФИЦ ИнБЮМ № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Anning T., MacIntyre H.L., Pratt S.M., Sammes P.J., Gibb S., Geider R.J. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnology & Oceanography*, 2000, vol. 45, pp. 1807-1817.
2. Pirt S. John *Principles of microbe and cell cultivation*. Halsted Press, Division of John Wiley and Sons, New York, 274 p.
3. Тренкеншу Р.П. Культура микроводорослей как модельный объект в гидроэкологии. *Морской экологический журнал*, 2009, № 8, вып. 4, с. 41-52. [Trenkenshu R.P. Microalgae culture as a model object in hydroecology. *Morskoj ekologicheskij zhurnal*, 2009, no. 8, iss. 4, pp. 41-52. (In Russ.)]
4. Тренкеншу Р.П. Модификация уравнений динамики макромолекулярного состава микроводорослей. *Морские биологические исследования: достижения и перспективы. Севастополь: Экоси-гидрофизика*, 2016, с. 448-451. [Trenkenshu R.P. Modification of the equations of dynamics of the macromolecular composition of microalgae. *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy. Sevastopol': Ekosi-gidrofizika*, 2016, pp. 448-451. (In Russ.)]
5. Тренкеншу Р.П. Влияние света на макромолекулярный состав микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности (Часть 1). *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 2 (14). [Trenkenshu R.P. The effect of light on the macromolecular composition of microalgae in a continuous culture of low density (Part 1). *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2017, no. 2 (14). (In Russ.)]

MODELING THE PRE-EXPONENTIAL GROWTH PHASE IN MICROALGAE CULTURE PIGMENTS

Trenkenshu R.P., Shiryayev A.V., Gorbunova S.Yu.

Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences
av. Nahimova 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: svetlana_8423@mail.com

Abstract. This article discusses the growth of microalgae in a batch culture before reaching the exponential phase. A simplified model is used to describe the dynamics of the reserve and structure. The model is represented by a system of differential equations. Solutions for this system have been obtained. Model curves for various initial ratios of the resource and structural components have been presented. It was shown that the biomass dynamics significantly depends not only on the external microalgae cultivation conditions but also on the initial reserve/structure ratio. At certain initial ratios, negative growth dynamics is also observed at the initial phase. This behavior is due to the high relative quantity of reserve in the biomass. It is shown that the reserve/structure ratio constancy is a necessary condition for the transition to the exponential phase. Thus, the pre-exponential phase is a transitional stage or adaptation process. During this stage, the specific rates of biochemical processes and the biochemical composition are constantly changing. Over time, a certain biochemical composition should be formed, which corresponds to the given light conditions.

Key words: *microalgae; biochemical composition; latent growth phase; adaptation; specific growth rate; exponential growth; modeling.*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОЗБУЖДЕННОЙ МОЛЕКУЛЫ КРАСИТЕЛЯ ЛАЗУРНОГО А С ВОДНЫМ ОКРУЖЕНИЕМ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Костюкова Л.О.¹, Воронин Д.П.², Рыбакова К.А.², Савченко Е.В.², Костюков В.В.²

¹Черноморское высшее военно-морское училище им. П.С. Нахимова

ул. Дыбенко, 1а, г. Севастополь, 299028, РФ

²Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viktorkostukov@gmail.com

Поступила в редакцию: 12.07.2021

Аннотация. При помощи нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) на уровне X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD вычислен вибранный спектр поглощения тиазинового красителя лазурного А (Azure A, AA) в водном растворе. Данное исследование является логическим продолжением опубликованной ранее работы [L.O. Kostjukova et al. Int. J. Quantum Chem. (2021) e26662], в которой водное окружение AA задавалось неявно в приближении сплошной среды при помощи модели SMD. В настоящей работе использовалось комбинированное задание водного окружения: явным образом описывались три молекулы воды, образующие сильные водородные связи с молекулой красителя; остальная водная среда задавалась неявно, также методом SMD. Данный подход применялся с целью выяснения влияния сайт-специфических взаимодействий с растворителем как на основное, так и на возбужденное состояние молекулы красителя, и на переход между ними (сольватохромизм). Представляло интерес также и обратное влияние возбуждения молекулы AA на ее ближайшую гидратную оболочку. Расчеты показали, что имеет место усиление этих Н-связей при фотовозбуждении красителя. При этом максимум вибранный спектр поглощения AA испытывает батохромный сдвиг на 15 нм. Данные результаты проанализированы с точки зрения сольватохромной теории. Построены граничные молекулярные орбитали, между которыми происходит электронный переход, карты распределения электронной плотности и электростатического потенциала основного и возбужденного состояний системы «AA+3H₂O». Выполнен анализ фотоиндуцированной поляризации молекулы красителя.

Ключевые слова: лазурный А, водный раствор, возбужденное состояние, вибранный спектр поглощения, сольватохромизм, водородная связь, нестационарная теория функционала плотности.

ВВЕДЕНИЕ

Лазурный А (3-амино-7-(диметиламино)фенотиазин, AA, рис. 1) – тиазинный краситель, который широко применяется в биологии и медицине для фотодинамической терапии бактериальных инфекций [1,2], окрашивания клеток [3], а также используется в биосенсорах [4,5], солнечных батареях [6,7] и в качестве фотокатализатора [8].

При помощи оптических методов было установлено, что молекула AA способна нековалентно связываться различными молекулярными системами: гликозаминогликанами [9-13], квантовыми точками [14], РНК [15-18], ДНК [19-21] и дезоксирибонуклеопротеином [19], белками [22], глиной [23], циклодесктринами [24], поверхностно-активными веществами [25,26] и наночастицами золота [27] и серебра [28]. Выполнено множество экспериментальных оптических исследований самого AA – агрегации [29-31], полимеризации [32], фото- [33,34] и химической [35,36] деградации, фотофизических свойств в растворах, в том числе, сольватохромизма [37-40], а также на мицеллах [38], электродах [39] и в ПВА-пленках [42]. При этом теоретические исследования фотофизических свойств AA до недавнего времени были представлены всего лишь тремя работами [36,42,43]. В них при помощи нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) были вычислены видимые спектры поглощения красителя в газовой фазе ($\lambda_{\max}=500$ нм) [42], в ДМФ и в ПВА-матрице [43], а также в водном растворе [36]. В [36] была вычислена энергия возбуждения 555 нм. Рассчитанный в [43] спектр имел максимум на $\lambda_{\max}\approx 630$ нм, что отлично совпало с экспериментальным значением $\lambda_{\max}=632$ нм для мономера AA в водном растворе [29]. Однако форма теоретического спектра в [43] существенно отличалась от экспериментальной: коротковолновый склон расчетного пика получился круче длинноволнового, в то время как в экспериментальной

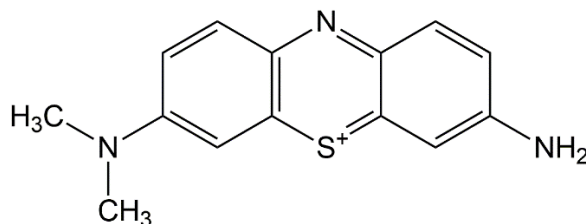


Рисунок 1. Химическая структура лазурного А

полосе поглощения наблюдалась противоположная ситуация. Возможно, причиной такого несоответствия теоретического спектра эксперименту являлся учет в [43] вибронных переходов. Вместе с тем, в специализированных работах было показано, что учет вибронной связи очень важен для корректного воспроизведения электронных спектров органических красителей [44–47]. В недавней работе [48] нами впервые был вычислен вибронный спектр поглощения АА в водном растворе, хорошо совпавший с экспериментальным по положениям главного максимума и плеча. Поскольку АА, как и остальные тиациновые красители, относятся к классу цианинов (т.е. содержат углеродную цепь с атомами азота на обоих концах), для них характерна т.н. «цианиновая проблема», заключающаяся в систематической недооценке расчетных длин волн максимумов поглощения при использовании TD-DFT с моделью растворителя PCM (Polarizable Continuum Model). Однако в [48] было показано, что использование модели SMD [49] вместо PCM позволяет преодолеть это затруднение (впервые этот подход был использован другими авторами [50] для оксазиновых красителей). Наилучшее совпадение расчетного спектра с экспериментальным продемонстрировал функционал X3LYP [51]. Однако влияние сайт-специфических взаимодействий (водородных связей) с водным окружением в [48] на возбуждение молекулы красителя осталась невыясненным, поскольку использованная в этой работе модель сплошной среды позволяет усредненно учесть лишь соответствующие диполь-дипольные взаимодействия. Вместе с тем, известно, что это влияние в целом на органические молекулы существенно [52,53]. Важно также и обратное влияние возбуждения молекулы красителя на ее Н-связи с растворителем. В настоящей работе этот анализ выполнен путем комбинированного задания растворителя: три молекулы воды, образующие сильные Н-связи с молекулой АА, задаются явно (рис. 3), а остальное водное окружение – неявно, при помощи модели SMD.

ТЕОРИЯ И МЕТОДИКА

При поглощении фотона изменяется как электронная, так и колебательная энергия молекулы растворенного вещества, т.е. в ней происходит вибронный переход (рис. 2).

Согласно принципу Франка-Кондона [54], электронный переход от основного (GS) к возбужденному (ES) состоянию происходит при постоянных координатах ядер растворенной молекулы, а также ядер ближайшей сольватной оболочки (вертикальный переход E_{vert} на рис. 2). В этом случае молекула находится в возбужденном неравновесном (франк-кондоновском, FC) состоянии. Эта неравновесность приводит к активации колебательных уровней энергии (зеленая волна на рис. 2). Поскольку последние подчиняются распределению Больцмана, происходит множество переходов с различных колебательных уровней основного электронного состояния на различные колебательные уровни электронно-возбужденного состояния.

Для расчета вибронных спектров однофотонного поглощения использовался обобщенный подход [55], реализованный в программном пакете Gaussian16. Этот метод представляет собой нестационарное обобщение стационарной вибронной спектроскопии, в которой интенсивность вибронного перехода рассчитывается как

$$I = \alpha \omega \sum_m \sum_n \rho_m \mu_{mn}^2 \delta \left(\frac{E_n - E_m}{\hbar} - \omega \right), \quad (1)$$

где $\alpha = \frac{10\pi N_A}{3\epsilon_0 \ln(10)\hbar c}$, ω – частота поглощенного фотона, суммирование ведется по всем m колебательным уровням основного состояния и n колебательным уровням возбужденного состояния, ρ_m – больцмановская заселенность колебательных уровней основного состояния, μ_{mn} – дипольный момент перехода, δ – функция распределения Дирака.

Основная проблема (1) заключается в том, что аналитическое выражение для μ_{mn} остается неизвестным. Поэтому на практике используется ряд Тейлора вблизи равновесной геометрии основного электронного состояния:

$$\mu_{mn}(\mathbf{Q}) = \mu_{mn}(\mathbf{Q}_{\text{GS}}) + \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial \mu_{mn}}{\partial Q_i} \right)_0 Q_i + \dots, \quad (2)$$

где $\mathbf{Q}$ – нормальные координаты, взвешенные по массе. Член нулевого порядка в (2) соответствует приближению Франка-Кондона (сильные разрешенные переходы) [54] и поправке первого порядка к подходу Герцберга-

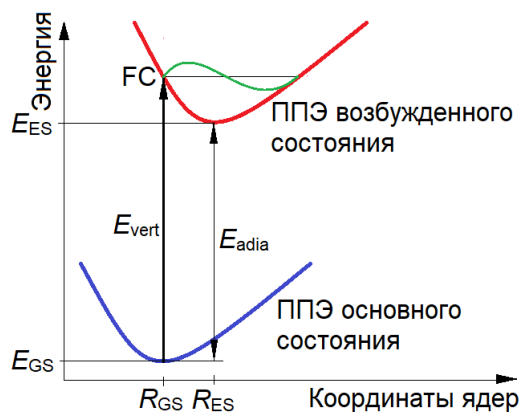


Рисунок 2. Энергетическая диаграмма вибронного перехода

Теллера (слабые запрещенные переходы) [56]. В настоящей работе для расчета вибронных спектров использовался общий метод Франка-Кондона-Герцберга-Теллера [57].

Расчет электронно-колебательных спектров требует вычисления интегралов перекрытия, которые зависят от нормальных колебательных мод основного и возбужденного состояний. Для интегрирования используется линейное преобразование Душинского [58]:

$$Q_{GS}=JQ_{ES}+K \quad (3)$$

где J – матрица Душинского, K – вектор сдвига. Выражения для J и K зависят от модели электронного перехода (адиабатический или вертикальный) и уровня аппроксимации (считаются ли ППЭ основного и возбужденного состояний одинаковыми (см. рис. 2) или нет).

Переход от нестационарного подхода к стационарному осуществляется путем замены суммирования по состояниям интегрированием по времени. Для этого функция распределения Дирака δ в (1) заменяется выражением $\delta = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i\omega t} dt$. В конечном итоге спектр поглощения вычисляется как преобразование Фурье следа экспоненциального оператора:

$$I = \alpha' \omega \int_{-\infty}^{+\infty} \chi(t) e^{i(\omega_{\text{adia}} - \omega)t} dt, \quad (4)$$

где $\alpha' = \frac{\alpha}{Z}$, $Z = \prod_{i=1}^N \left[2 \sinh \left(\frac{\hbar \omega_i}{2k_B T} \right) \right]^{-1}$ – полная больцмановская населенность колебательных уровней основного состояния, $\omega_{\text{adia}} = \frac{E_{\text{adia}}}{\hbar}$, E_{adia} – адиабатическая энергия (разность энергий основных колебательных состояний основного состояния) и возбужденные электронные состояния, см. рис. 2), $\chi(t)$ – колебательная волновая функция. Моделировалась температура $T=298$ К. Для численного интегрирования (4) использовались 2^{18} шагов и временной интервал $\Delta t = 2^{18} \times 10^{-17} = 2,62 \times 10^{-12}$ с. Для уширения полос использовались гауссианы с полушириной на полувысоте $\text{HWHM} = 400 \text{ см}^{-1}$, которая выбиралась таким образом, чтобы расчетный спектр лучше всего соответствовал экспериментальному.

Спектр рассчитывался с использованием модели адиабатического гессиана, в которой основное и возбужденное состояния рассматриваются с одним основанием, а гармонические ППЭ рассчитываются вблизи их равновесной геометрии (R_{GS} и R_{ES} , соответственно, на рис. 2). Первые производные электронных моментов перехода по координатам $\frac{\partial \mu_{mn}}{\partial Q_i}$ рассчитывались численно. Матрицы силовых констант рассчитывались из аналитических градиентов. Использовался базисный набор Поупла 6-31++G(d,p). Визуализация расчетных структур, электронной плотности и электростатических потенциалов проводилась с помощью программы Gaussview.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчетная структура комплекса «АА+3H₂O» представлена на рисунке 3. Согласно нашим расчетам, водородные связи АА с водой в возбужденном состоянии сильнее, чем в основном, что проявляется в их укорочении. Явление усиления водородных связей с растворителем при фотовозбуждении различных органических молекул было впервые обнаружено Zhao и Nan (см., например, [52]).

Вибронный спектр поглощения системы «АА+3H₂O» показан на рисунке 4. Из него видно, что расчетный максимум поглощения находится на $\lambda_{\text{vibron}} = 647 \text{ нм}$, в то время как экспериментальный спектр имеет $\lambda_{\text{max}} = 632 \text{ нм}$. Эта же величина была также получена нами теоретически в [48] для одиночной молекулы АА на том же уровне теории X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD. При этом форма спектра остается практически такой же. Таким образом, четыре сильные водородные связи молекулы красителя с его ближайшей гидратной оболочкой вызывают длинноволновый (батохромный сдвиг) максимума поглощения на 15 нм. Эта закономерность имела место при расчете энергий вертикальных переходов профлавина в воде [53]. Ее можно объяснить следующим образом.

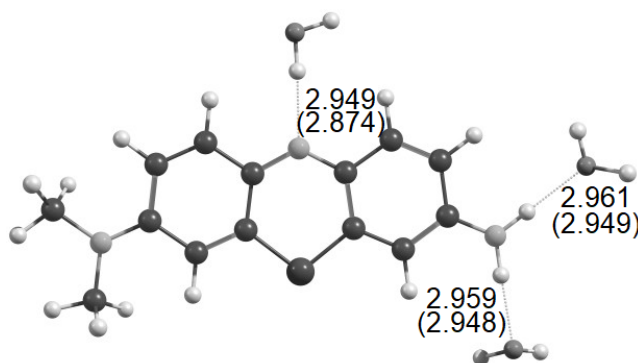


Рисунок 3. Расчетная структура гидратного комплекса АА с тремя молекулами воды. Водородные связи показаны пунктирными линиями. Их длины в Å (расстояния между тяжелыми атомами) указаны для основного и равновесного возбужденного (в скобках) состояний

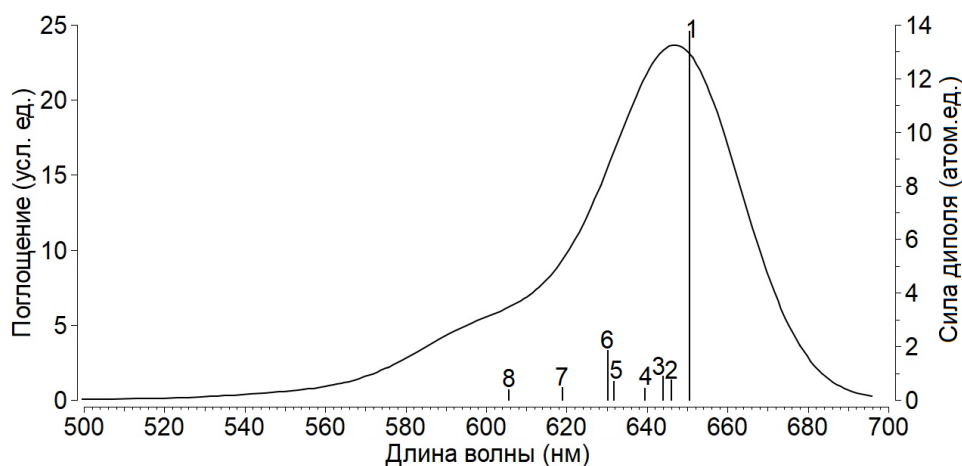


Рисунок 4. Расчетный спектр поглощения гидратного комплекса «AA+3H₂O». Вертикальными линиями показаны силы диполя вибронных переходов из таблицы 1

Таблица 1. Вибронные переходы поглощения в комплексе «AA+3H₂O»

№	Переход	λ (нм)	E (эВ)	ν (см ⁻¹)	I	p (атом. ед.)	Описание колебаний
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	651	1,91	0	174600	13,8	-
2	$0_0 \rightarrow 10^1$	646	1,92	109	9277	0,726	Маятниковые колебания молекул воды в плоскости хромофора
3	$0_0 \rightarrow 14^1$	644	1,93	158	11080	0,865	Крутильные колебания метильной группы
4	$0_0 \rightarrow 26^1$	640	1,94	265	5645	0,437	Изгибные колебания хромофора перпендикулярно его плоскости
5	$0_0 \rightarrow 36^1$	632	1,96	457	8712	0,667	Крутильные колебания хромофора вокруг его длинной оси
6	$0_0 \rightarrow 37^1$	630	1,97	498	24110	1,84	Изгибные колебания хромофора вдоль его длинной оси
7	$0_0 \rightarrow 51^1$	619	2,00	784	5979	0,448	
8	$0_0 \rightarrow 67^1$	606	2,05	1142	4892	0,359	Сдвиговые колебания хромофора в его плоскости

λ – длина волны перехода, E – его энергия, ν – соответствующая частота колебания в возбужденном состоянии, I – интенсивность, p – сила диполя.

Поскольку энергия взаимодействия с молекулами воды для АА в возбужденном состоянии больше, чем в основном, ППЭ возбужденного состояния расположена ниже, чем при неявном задании водного окружения (рис. 2). Сближение ППЭ основного и возбужденного состояний приводит к уменьшению значений E_{adia} и E_{vert} и, как следствие, к увеличению λ_{vibron} .

Расчетные ИК спектры системы «AA+3H₂O» в основном и возбужденном состояниях показаны на рисунке 5.

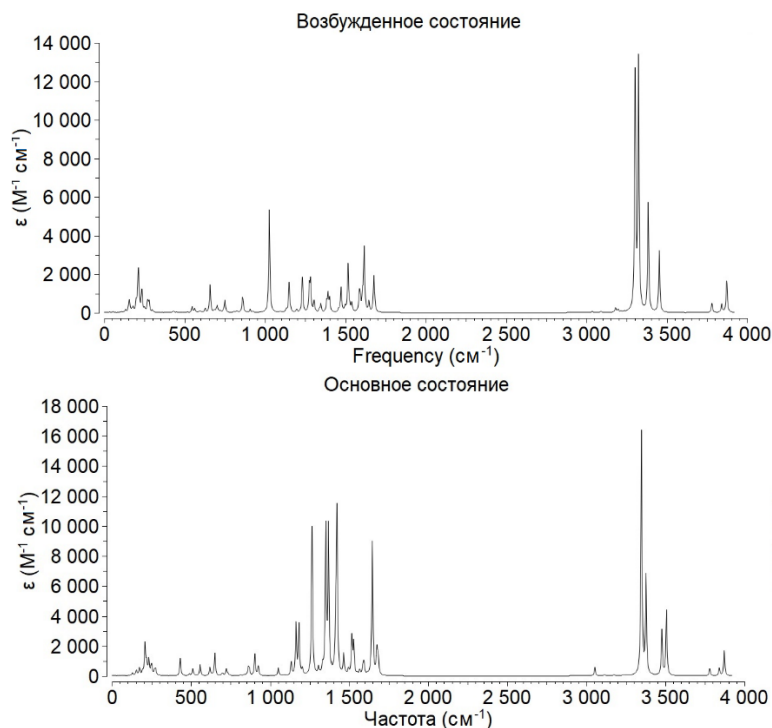


Рисунок 5. Теоретические спектры колебаний гидратного комплекса «AA+3H₂O»

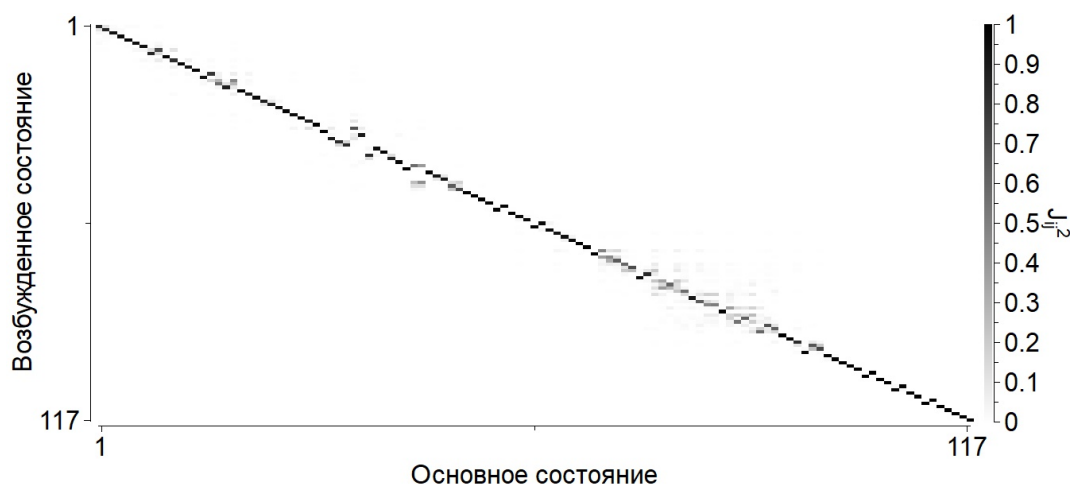


Рисунок 6. Матрица Душинского для системы «AA+3H₂O»

Из рисунка 5 видно, что электронное возбуждение гидратного комплекса существенно влияет на его колебания: значительно возрастает их интенсивность в целом, некоторые из них смещаются по частоте. Эти изменения можно наглядно показать при помощи матрицы Душинского (рис. 6). Количество атомов в системе «AA+3H₂O» составляет 41, соответственно, число нормальных мод колебаний $N=3 \times 41 - 6 = 117$.

Как и в случае одиночной молекулы AA в неявно заданной водной среде [48], полоса поглощения комплекса «AA+3H₂O» в видимой области соответствует синглет-синглетному переходу HOMO→LUMO. Комплекс содержит 164 электрона и, соответственно, 82 занятых молекулярных орбитали (МО). При этом МО №82 является HOMO, а МО №83 – LUMO (рис. 6). Однако, в целом, добавление сильно связанных молекул воды не изменяет существенно конфигураций данных граничных МО. Сумма франк-кондоновских факторов составила 99,87 %, вкладом Герцберга-Теллера из (2) можно пренебречь.

При этом два других электронных перехода в видимой области спектра имеют очень малые силы осциллятора f , и поэтому практически не вносят вклада в спектр поглощения (табл. 2).

Изменение $\Delta\rho$ электронной плотности при возбуждении гидратного комплекса (рис. 8) показывает, что фотоиндуцированный перенос заряда имеет весьма сложный характер, и затрагивает практически всю молекулу красителя – как хромофор, так и боковые группы. Однако наибольшее перераспределение заряда все же происходит в центральном кольце хромофора. Интересно отметить, что из четырех сильно связанных с красителем молекул воды заметная поляризация при фотовозбуждении AA имеет место только для одной – образующей водородную связь с гетероциклическим атомом кислорода О9 в центральном кольце хромофора (см. рис. 8 сверху). Данный атом претерпевает значительное изменение электронной плотности.

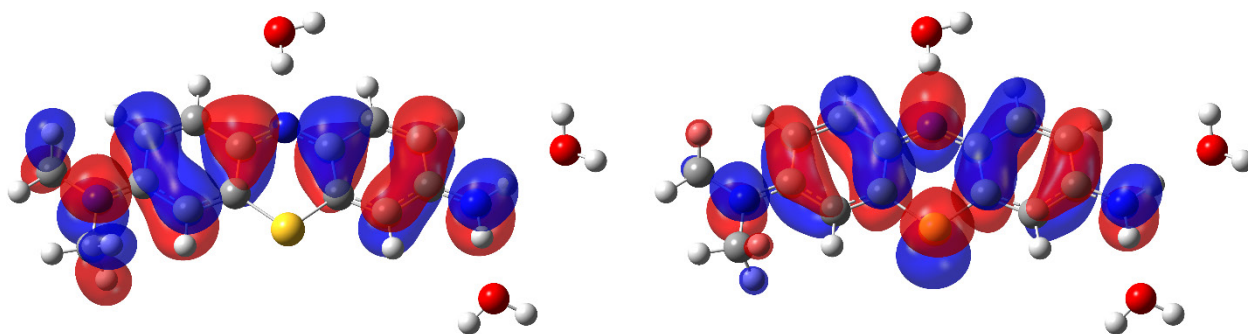


Рисунок 7. Граничные МО системы «AA+3H₂O», между которыми происходит рассматриваемый электронный переход: HOMO (слева) и LUMO (справа)

Таблица 2. Три наиболее низкоэнергетичных электронных перехода в системе «AA+3H₂O»

№	Переход	λ_{vert} , нм	E_{vert} , эВ	f	Задетствованные МО
1	$S_0 \rightarrow S_1$	612	2,03	1,35	HOMO→LUMO
2	$S_0 \rightarrow S_2$	490	2,53	0,0152	(HOMO-1)→LUMO
3	$S_0 \rightarrow S_3$	343	3,61	0,0023	(HOMO-4)→LUMO

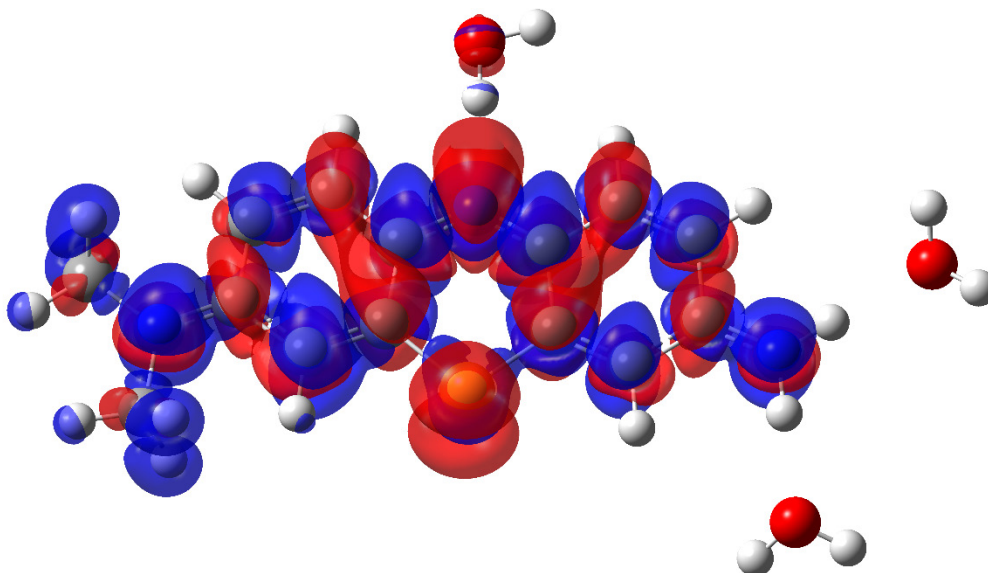


Рисунок 8. Разность $\Delta\rho$ электронных плотностей во франк-кондоновском и основном состояниях комплекса «AA+3H₂O». Положительные значения $\Delta\rho$ показаны красным цветом, отрицательные – синим

Карта распределения электростатического потенциала по ван-дер-ваальсовской поверхности гидратного комплекса в равновесном возбужденном состоянии показана на рисунке 9. Из нее следует, что при фотовозбуждении положительный заряд системы локализован на ее боковых кольцах и связанных с боковыми группами молекулах воды, а отрицательный – на центральном кольце и связанной с ним молекулой воды.

ВЫВОДЫ

Явное задание трех молекул воды, образующих сильные водородные связи с молекулой AA, вызывает батохромный сдвиг максимума и расчетного спектра поглощения в целом на 15 нм. При этом форма теоретического спектра при таком комбинированном задании водного окружения практически не изменяется. Фотовозбуждение вызывает существенные изменения в ИК спектре молекулы красителя. Фотоиндуцированное перераспределение электронной плотности носит весьма сложный характер и охватывает практически всю молекулу красителя – как хромофор, так и боковые группы. Однако из трех сильно связанных молекул воды существенно поляризуется только одна – локализованная вблизи гетероциклического атома кислорода. Согласно расчетам, в возбужденном состоянии положительный заряд гидратного комплекса локализуется на боковых кольцах хромофора, боковых группах и связанных с ними двух молекулах воды, а отрицательный – на центральном кольце хромофора и связанной с ним третьей молекулой воды.

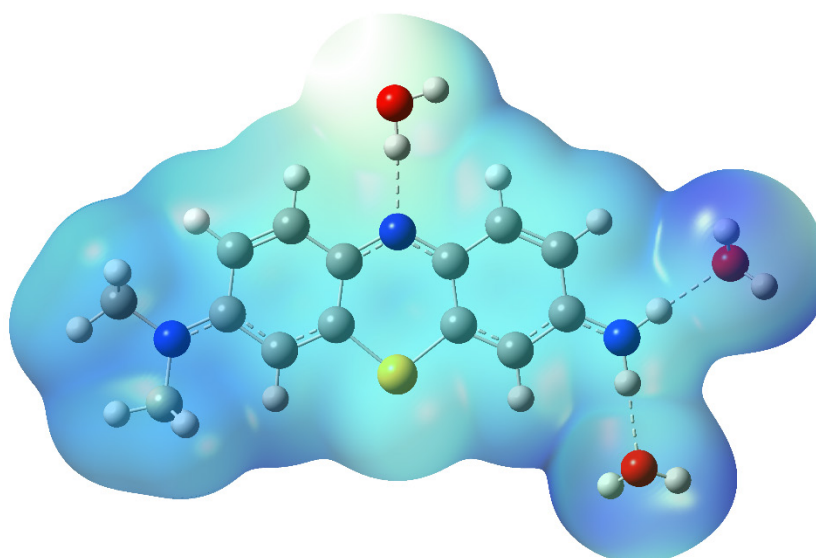


Рисунок 9. Карта распределения электростатического потенциала по ван-дер-ваальсовской поверхности системы «AA+3H₂O» (равновесное возбужденное состояние). Более темный синий цвет соответствует большему значению положительного потенциала

Список литературы / References:

1. Moreira L.M., Lyon J.P., Tursi S.M.S., Trajano I., Felipe M.P., Costa M.S., Rodrigues M.R., Codognoto L., de Oliveira H.P.M. Azure dyes as new photosensitizer prototypes to application in photodynamic therapy against *Candida* spp. *Spectroscopy*, 2010, vol. 24, pp. 621-628.
2. Francisco C.M.L., Goncalves J.M.L.A., Brum B.S., Santos T.P.C., Lino-dos-Santos-Franco A., Silva D.F.T., Pavani C. The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. *New J. Chem.*, 2017, vol. 41, pp. 14438-14443.
3. Marshall P.N. The composition of stains produced by the oxidation of Methylene Blue. *Histochem. J.*, 1976, vol. 8, pp. 431-442.
4. Li N., Yuan R., Chai Y., Chen S., An H., Li W. New Antibody Immobilization Strategy Based on Gold Nanoparticles and Azure I/Multi-Walled Carbon Nanotube Composite Membranes for an Amperometric Enzyme Immunosensor. *J. Phys. Chem. C*, 2007, vol. 111, pp. 8443-8450.
5. Gomez-Anquela C., Garcia-Mendiola T., Abad J.M., Pita M., Pariente F., Lorenzo E. Scaffold electrodes based on thioctic acid-capped gold nanoparticles coordinated Alcohol Dehydrogenase and Azure A films for high performance biosensor. *Bioelectrochemistry*, 2015, vol. 106, pp. 335-342.
6. Orak I., Toprak M., Turut A. Illumination impact on the electrical characterizations of an Al/Azure A/p-Si heterojunction. *Phys. Scr.*, 2014, vol. 89, p. 115810.
7. Jana A.K., Bhowmik B.B. Enhancement in power output of solar cells consisting of mixed dyes. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1999, vol. 122, pp. 53-56.
8. You Y., Gao S., Xu B., Li G., Cao R. Self-assembly of polyoxometalate-azure A multilayer films and their photocatalytic properties for degradation of methyl orange under visible light irradiation. *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, vol. 350, pp. 562-567.
9. Jiao Q., Liu Q. A mathematical model for interaction of spectroscopic probe with polysaccharides - the binding interaction between azure A and heparin. *Spectrosc. Lett.*, 1998, vol. 31, pp. 1353-1365.
10. Thuy L.P., Nyhan W.L. A new quantitative assay for glycosaminoglycans. *Clin. Chim. Acta*, 1992, vol. 212, pp. 17-26.
11. Templeton D.M. General occurrence of isosbestic points in the metachromatic dye complexes of sulphated glycosaminoglycans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1988, vol. 10, pp. 131-136.
12. Young M.D., Phillips G.O., Balazs E.A. Polyanions and their complexes. I. Thermodynamic studies of heparin-azure A complexes in solution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, vol. 141, pp. 374-381.
13. Liu Q., Jiao Q.C., Liu Z.L., Chen H. The interaction of polysaccharides with a spectroscopic probe: the anion effect on the binding site of heparin. *Spectrosc. Lett.*, 2001, vol. 34, pp. 25-34.
14. Zvyagin A.I., Smirnov M.S., Ovchinnikov O.V. Enhancement of nonlinear optical response of Methylene blue and Azure A during association with colloidal CdS quantum dots. *Optik*, 2020, vol. 218, p. 165122.
15. Rajan D., Ilanchelian M. Exploring the interaction of Azure dyes with t-RNA by hybrid spectroscopic and computational approaches and its applications toward human lung cancer cell line. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, vol. 113, pp. 1052-1061.
16. Paul P., Mati S.S., Bhattacharya S.C., Kumar G.S. Exploring the interaction of phenothiazinium dyes methylene blue, new methylene blue, azure A and azure B with tRNA^{Phe}: spectroscopic, thermodynamic, voltammetric and molecular modeling approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, vol. 19, pp. 6636-6653.
17. Paul P., Kumar G.S. Photophysical and calorimetric investigation on the structural reorganization of poly(A) by phenothiazinium dyes azure A and azure B. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, vol. 13, pp. 1192-1202.
18. Khan A.Y., Kumar G.S. Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes, azure A and azure B to double stranded RNA polynucleotides. *Spectrochim. Acta A*, 2016, vol. 152, pp. 417-425.
19. Klein F., Szirmai J.A. Quantitative studies on the interaction of azure A with deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, vol. 72, pp. 48-61.
20. Paul P., Kumar G.S. Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B to DNA. *Spectrochim. Acta A*, 2013, vol. 107, pp. 303-310.
21. Paul P., Kumar G.S. Thermodynamics of the DNA binding of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B. *J. Chem. Thermodynamics*, 2013, vol. 64, pp. 50-57.
22. Das S., Islam M., Jana G.C., Patra A., Jha P.K., Hossain M. Molecular binding of toxic phenothiazinium derivatives, azures to bovine serum albumin: A comparative spectroscopic, calorimetric, and in silico study. *J. Mol. Recogn.*, 2017, vol. 30, e2609.
23. Czimerova A., Ceklovsky A., Bujdak J. Interaction of montmorillonite with phenothiazine dyes and pyronin in aqueous dispersions: A visible spectroscopy study. *Cent. Eur. J. Chem.*, 2009, vol. 7, pp. 343-353.
24. Maafi M., Laassis B., Aaron J.-J., Photochemically Induced Fluorescence Investigation of β -Cyclodextrin: Azure A Inclusion Complex and Determination of Analytical Parameters. *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.*, 1995, vol. 22, pp. 235-247.
25. Bhowmik B.B., Mukhopadhyay M. Spectral and photophysical studies of thiazine dyes in Triton X-100. *Colloid Polym. Sci.*, 1988, vol. 266, pp. 672-676.
26. den Tonkelaar W.A.M., Bergshoeff G. Use of azure A instead of methylene blue for determination of anionic detergents in drinking and surface waters. *Water Res.*, 1969, vol. 3, pp. 31-38.

27. Narband N., Uppal M., Dunnill C.W., Hyett G., Wilson M., Parkin I.P. The interaction between gold nanoparticles and cationic and anionic dyes: enhanced UV-visible absorption. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, vol. 11, pp. 10513-10518.
28. Yu M.-E., Cheong B.-S., Cho H.-G. SERS Spectroscopy and DFT Studies of Thionine and its Derivatives Adsorbed on Silver Colloids: Which N Atom is Used for Coordination of a Phenothiazine-Based Natural Dye to Electron-Deficient Metal Surface? *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2017, vol. 38, pp. 928-934.
29. Ghanadzadeh Gilani A., Ghorbanpour T., Salmanpour M. Additive effect on the dimer formation of thiazine dyes. *J. Mol. Liquids*, 2013, vol. 177, pp. 273-282.
30. Ghanadzadeh Gilani A., Dezhampanah H., Poormohammadi-Ahandani Z. A comparative spectroscopic study of thiourea effect on the photophysical and molecular association behavior of various phenothiazine dyes. *Spectrochim. Acta A*, 2017, vol. 179, pp. 132-143.
31. Chakraborty A., Ali M., Saha S.K. Molecular interaction of organic dyes in bulk and confined media. *Spectrochim. Acta A*, 2010, vol. 75, pp. 1577-1583.
32. Kalyoncu E., Alanyalioglu M. Chronoamperometric and morphological investigation of nucleation and growth mechanism of poly(azure A) thin films. *J. Electroanal. Chem.*, 2011, vol. 660, pp. 133-139.
33. Marban G., Vu T.T., Valdes-Solis T. A simple visible spectrum deconvolution technique to prevent the artefact induced by the hypsochromic shift from masking the concentration of methylene blue in photodegradation experiments. *Appl. Catalysis A*, 2011, vol. 402, pp. 218-223.
34. Aarthi T., Narahari P., Madras G. Photocatalytic degradation of Azure and Sudan dyes using nano TiO₂. *J. Hazard. Mater.*, 2007, vol. 149, pp. 725-734.
35. Mills A., Hazafy D., Parkinson J., Tuttle T., Hutchings M.G. Effect of alkali on methylene blue (C.I. Basic Blue 9) and other thiazine dyes. *Dyes Pigments*, 2011, vol. 88, pp. 149-155.
36. Wang X.-L., Sun R., Zhu W.-J., Sha X.-L., Ge J.-F. Reversible Absorption and Emission Responses of Nile Blue and Azure A Derivatives in Extreme Acidic and Basic Conditions. *J. Fluoresc.*, 2017, vol. 27, pp. 819-827.
37. Ghanadzadeh Gilani A., Salmanpour M., Ghorbanpour T. Solvatochromism, dichroism and excited state dipole moment of azure A and methylene blue. *J. Mol. Liquids*, 2013, vol. 179, pp. 118-123.
38. Bertolotti S.G., Previtali C.M. The excited states quenching of phenothiazine dyes by p-benzoquinones in polar solvents. *Dyes Pigments*, 1999, vol. 41, pp. 55-61.
39. Havelcova M., Kubat P., Nemcova I. Photophysical properties of thiazine dyes in aqueous solution and in micelles. *Dyes Pigments*, 2000, vol. 44, pp. 49-54.
40. Parkanyi C., Boniface C. A quantitative study of the effect of solvent on the electronic absorption and fluorescence spectra of substituted phenothiazines: evaluation of their ground and excited singlet-state dipole moments. *Spectrochim. Acta*, 1993, vol. 49A, pp. 1715-1725.
41. Agrisuelas J., Gimenez-Romero D., Garcia-Jareno J.J., Vicente F. Vis/NIR spectroelectrochemical analysis of poly-(Azure A) on ITO electrode. *Electrochem. Commun.*, 2006, vol. 8, pp. 549-553.
42. Snehalatha M., Hubert Joe I., Ravikumar C., Jayakumar V.S. Azure A chloride: computational and spectroscopic study. *J. Raman Spectrosc.*, 2009, vol. 40, pp. 176-182.
43. Shahab S., Filippovich L., Kumar R., Darroudi M., Borzehandani M.Y., Gomar M., Hajikolaee F.H. Photochromic properties of the molecule Azure A chloride in polyvinyl alcohol matrix. *J. Mol. Structure*, 2015, vol. 1101, pp. 109-115.
44. Jacquemin D., Bremond E., Planchat A., Ciofini I., Adamo C. TD-DFT vibronic couplings in anthraquinones: from basis set and functional benchmarks to applications for industrial dyes. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, vol. 7, pp. 1882-1892.
45. Adamo C., Jacquemin D. The calculations of excited-state properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, vol. 42, pp. 845-856.
46. Jacquemin D., Bremond E., Ciofini I., Adamo C. Impact of Vibronic Couplings on Perceived Colors: Two Anthraquinones as a Working Example. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, vol. 3, pp. 468-471.
47. Lopez G.V., Chang C.-H., Johnson P.M., Hall G.E., Sears T.J., Markiewicz B., Milan M., Teslja A. What Is the Best DFT Functional for Vibronic Calculations? A Comparison of the Calculated Vibronic Structure of the S₁-S₀ Transition of Phenylacetylene with Cavity Ringdown Band Intensities. *J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 116, pp. 6750-6758.
48. Kostjukova L.O., Leontieva S.V., Kostjukov V.V. TD-DFT absorption spectrum of Azure A in aqueous solution: vibronic transitions and electronic properties. *Int. J. Quantum Chem.*, 2021, e26662.
49. Marenich A.V., Cramer C.J., Truhlar D.G. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 6378-6396.
50. Fleming S., Mills A., Tuttle T. Predicting the UV-vis spectra of oxazine dyes. *Beilstein J. Org. Chem.*, 2011, vol. 7, pp. 432-441.
51. Xu X., Goddard W.A. The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, pp. 2673-2677.
52. Zhao G.J., Han K.L. Effects of hydrogen bonding on tuning photochemistry: Concerted hydrogen-bond strengthening and weakening. *ChemPhysChem*, 2008, vol. 9, pp. 1842-1846.

53. Qin Z., Lib X., Zhou M. A Theoretical Study on Hydrogen-Bonded Complex of Proflavine Cation and Water: The Site-dependent Feature of Hydrogen Bond Strengthening and Weakening. *J. Chin. Chem. Soc.*, 2014, vol. 61, pp. 1199-1204.
54. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.
55. Baiardi A., Bloino J., Barone V. General Time Dependent Approach to Vibronic Spectroscopy Including Franck-Condon, Herzberg-Teller, and Duschinsky Effects. *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, vol. 9, pp. 4097-4115.
56. Herzberg G., Teller E. Schwingungsstruktur der Elektronenübergänge bei mehratomigen Molekülen. *Z. Phys. Chem., Abt. B*, 1933, vol. 21, pp. 410-446.
57. Santoro F., Lami A., Imbrota R., Bloino J., Barone V. Effective method for the computation of optical spectra of large molecules at finite temperature including the Duschinsky and Herzberg-Teller effect: The Qx band of porphyrin as a case study. *J. Chem. Phys.*, 2008, vol. 128, p. 224311.
58. Duschinsky F. The importance of the electron spectrum in multi atomic molecules. Concerning the Franck-Condon principle. *Acta Physicochim.*, URSS, 1937, vol. 7, p. 551.

INTERACTION OF AN EXCITED MOLECULE OF AZURE A DYE WITH A AQUEOUS ENVIRONMENT: A THEORETICAL STUDY

Kostjukova L.O.¹, Voronin D.P.², Rybakova K.A.², Savchenko E.V.², Kostjukov V.V.²

¹Nakhimov Black Sea Higher Naval School

Dybenko st. 1a, Sevastopol, 299028, Russia

²Sevastopol State University

Universitetskaya, st. 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viktorkostukov@gmail.com

Abstract. Using the time-dependent density functional theory at the X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD level, the vibronic absorption spectrum of the thiazine dye Azure A (AA) in an aqueous solution was calculated. This study is a logical continuation of the previously published work [L.O. Kostjukova et al. *Int. J. Quantum Chem.* (2021) e26662], in which the water environment of AA was set implicitly in the continuum approximation using the SMD model. In the present work, we used a combined setting of the aqueous environment: three water molecules were explicitly described, forming strong hydrogen bonds with a dye molecule; the rest of the aqueous medium was set implicitly, also by the SMD method. This approach was used to elucidate the effect of site-specific interactions with a solvent on both the ground and excited states of the dye molecule and on the transition between them (solvatochromism). The reverse effect of excitation of the AA molecule on its nearest hydration shell was also of interest. Calculations have shown that there is an increase in these H-bonds upon photoexcitation of the dye. In this case, the maximum of the vibronic absorption spectrum AA undergoes a bathochromic shift by 15 nm. These results were analyzed from the point of view of the solvatochromic theory. Frontier molecular orbitals, between which an electronic transition occurs, and maps of the distribution of electron density and electrostatic potential of the ground and excited states of the "AA+3H₂O" system have been built. The photoinduced polarization of the dye molecule was analyzed.

Key words: azure A, aqueous solution, excited state, vibronic absorption spectrum, solvatochromism, hydrogen bond, time-dependent density functional theory.

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОННОЙ СЕТИ ГИППОКАМПА С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ РЕЦЕПТОРОВ NMDA

Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований
ул. Жолио Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: kgyr@mail.ru
Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В настоящей работе нами предложен модельный подход для анализа свойств нейронных сетей гиппокампа с различными типами NMDA-рецепторов: GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2B. Проведены исследования свойств нейронной сети CA3-области гиппокампа с модифицированной структурой NMDA-рецепторов и получены электрофизиологические характеристики модели нейронной сети в зависимости от строения ионного канала рецептора NMDA. Анализ сетевой активности нейронов с различными типами NMDA выявил незначительные изменения проводимости ионного канала и локального потенциала в зависимости от субъединиц, входящих в состав рецептора. В случае модели GluN1/GluN2A NMDA-рецептора в нейронной сети наблюдались уменьшение величины тэта-ритма и рост гамма-ритма по сравнению с нативными формами NMDA-рецептора. Для тригетеромера GluN1/GluN2A/GluN2B не обнаружено значимых изменений в активности нейронной сети по сравнению с GluN1/GluN2B.

Ключевые слова: гиппокамп, рецептор NMDA, молекулярная динамика, нейронная сеть.

Ионотропные рецепторы N-метил-D-аспартат (NMDA) играют важную роль в формировании синаптической пластичности, являющейся основой процессов обучения и формирования различных видов памяти. Дисфункция NMDA-рецепторов может сопровождаться рядом патологических процессов, которые приводят к развитию различного рода неврологических и ментальных заболеваний, таких как шизофрения, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, биполярное расстройство и других когнитивных нарушений [1, 2]. Обычно NMDA представляют собой лиганд-управляемые неселективные ионотропные рецепторы (iGluR), обнаруживаемые преимущественно в синапсах гиппокампа и коры головного мозга. Эти рецепторы являются гетеротетрамерными белковыми комплексами, чаще всего состоящими из двух классов родственных субъединиц GluN1 и GluN2A-D [3].

Состав субъединиц тетрамера NMDA не является постоянным и изменяется во время развития в ответ на нейрональную активность или сенсорный опыт. Эта пластичность, которая долгое время считалась происходящей исключительно во время развития, также может проявляться во взрослых синапсах. Изменения в составе субъединиц могут быть быстрыми (время в минутах) и могут оказывать глубокое влияние на функционирование синапсов и сетей [4].

Во время раннего постнатального развития рецепторы NMDA меняют состав своих субъединиц с преимущественно содержащих субъединицы GluN2B на преимущественно содержащих субъединицы GluN2A. Эта замена субъединиц происходит по всей центральной нервной системе, эволюционно сохраняется от земноводных до млекопитающих и происходит в течение временного окна, которое совпадает с созреванием синапсов, детализацией цепи и приобретением способностей к обучению [5].

В связи с этим, целью настоящей работы является изучение свойств синаптических рецепторов с различным составом субъединиц и исследование их влияния на функционирование нейронных сетей мозга.

Исследование проводилось в несколько этапов (рис. 1а). Первым этапом было моделирование структуры рецептора и активация ионного канала методом молекулярной динамики. Далее проводились расчёты проводимости канала и других параметров различных типов рецептора NMDA. На заключительном этапе нашего исследования было изучено поведение нейронной сети с каждым типом NMDA, произведен расчёт локального потенциала и определены значения коллективных колебаний (ритмов) нейронной сети гиппокампа. Для изучения поведения нейронной сети применялся пакет NEURON [5]. Наибольший интерес представляет исследование тэта- и гамма-ритмов мозга, т.к. они оказывают определяющее влияние на формирование памяти. Гиппокамп вносит наибольший вклад в их генерацию.

Метод молекулярной динамики. В данной работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование процесса активации ионного канала (рис. 1б) различных типов NMDA (GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2B). Моделирование проводилось в среде NAMD 2.13, с использованием силового поля Charmm 27. Моделировались три структуры рецептора NMDA. Каждая из них была встроена в фосфолипидную мембрану, которая аналогична по свойствам мембране в области синаптического контакта. Первая структура была выбрана нативной (NR1/NR2B). Молекулярная структура тетрамеров, образованных парами субъединиц NR1/NR2B и NR1/NR2A/NR2B, была построена на основе кристаллических структур 5FXJ и 5UP2 соответственно из архива банка данных белков (PDB), добавленных путем восстановления недостающих аминокислотных остатков с помощью программного обеспечения MODELLER. Модель рецептора GluN1/GluN2A основана на кристаллической структуре тригетеромера с заменой субъединицы GluN2B на GluN2A.

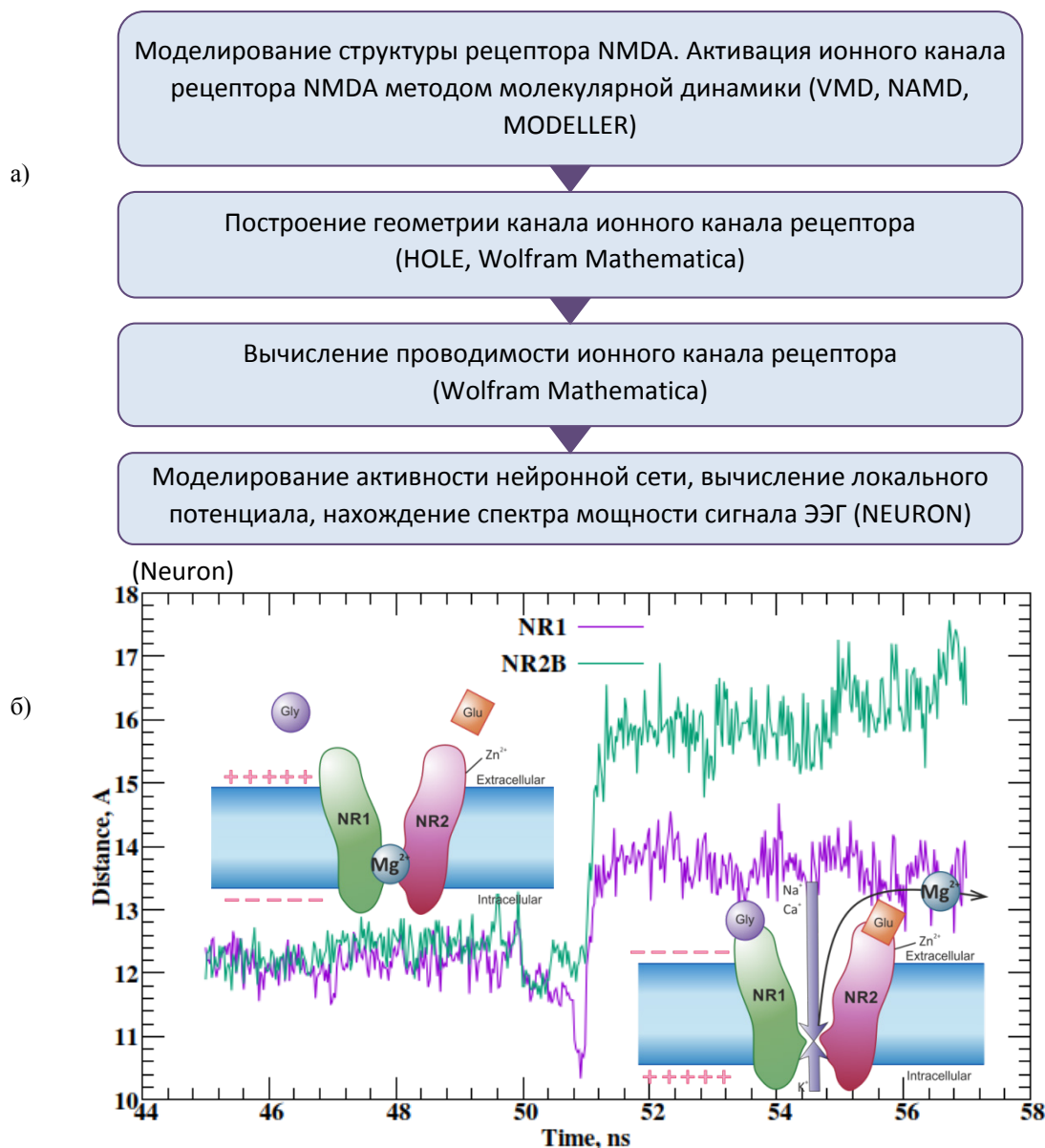


Рисунок 1. а) Этапы моделирования. б) Процесс активации рецептора NMDA. Рецептор, состоящий из двух субъединиц, в неактивном состоянии связывает магниевый блок в области TMD. Молекулы медиатора GLY и GLU связываются с рецептором, в области LBD, одновременно с этим происходит деполяризация постсинаптической мембраны и удаляется ион магния из ионного канала рецептора. На рисунке показаны изменения дистанции между атомами Ca внешнего M4 сегмента в процессе активации утилитой Telforces в среде NAMD

Этапы молекулярно динамического моделирования проводились с температурой $T = 310$ K. Процесс, происходящий при активации инотропных рецепторов, был смоделирован с помощью утилиты TclForces в среде NAMD. Суть такой модели активации заключается в том, что модельная структура лиганд-связывающего домена неактивного рецептора приводится к активному состоянию, заданному шаблоном, прикладывая соответствующие силы к атомам Ca.

Проводимость ионного канала вычислялась по данным, полученным с помощью программы HOLE, а также исходя из анализа связывания ионов магния в ионном канале рецептора. Анализ полученных структур позволил определить изменение проводимостей ионного канала.

Моделирование нейронной сети. Полученные в этапе молекулярной динамики данные использовались в модели нейронной сети гиппокампа с рецепторами AMPA, GABA и различными типами NMDA. Для изучения поведения подобной нейронной сети применялся пакет NEURON [6].

Мы использовали модель [7], воспроизводящую колебания нейронной популяции области CA3 гиппокампа и содержащую в общей сложности 1200 нервных клеток: 800 пирамидных нейронов, 200 oriens lacunosum-molecularis (OLM) и 200 интернейронов корзинки. Модель пирамидного нейрона учитывает некоторые морфологические особенности клетки и, следовательно, делится на отдельные составляющие: один для

базальных дендритов, второй для сомы (тела) клетки, остальные три для апикальных дендритов. Интернейроны описываются моделями с одним составляющим ввиду достаточности такого представления для воспроизведения основного типа поведения этих клеток.

Динамика единичного элемента модели определяется уравнениями типа Ходжкина-Хаксли. Выбор токов и их параметров не изменился по сравнению с предыдущими работами [8].

Чтобы измерить специфические ритмы, генерируемые нейронными сетями, мы рассчитали потенциал локального поля (LFP) как сумму разностей мембранного потенциала между наиболее удаленным апикальным и базальным дендритным составляющим по всем пирамидным клеткам. Постоянная составляющая тока удалена. Мощность в полосе частот рассчитывалась путем интегрирования спектральной мощности в соответствующих частотных диапазонах (4-7 Гц для тета и 30-50 Гц для гамма).

Код в среде моделирования NEURON (модель 139421 в Neuron ModelDB) был модифицирован для изменения свойств рецепторов NMDA. А именно, ионный ток через одиночный рецептор NMDA был взят в виде

$$I_{NMDA} = \frac{G P(V_{pre})(V - V_e)}{1 + c[Mg^{2+}] \exp[-qV]}, \quad (1)$$

где G – максимальная проводимость для определенного типа иона (модель учитывает токи Na^+ , поэтому мы использовали их по умолчанию), P – вероятность открытия канала в зависимости от пресинаптического потенциала V_{pre} и макроскопическая кинетика состояний рецептора, V – постсинаптический мембранный потенциал с равновесным напряжением V_e , c и q – феноменологические константы [9], которые отражают связывание магния и электрохимические свойства соответственно. Эти параметры обычно получают из экспериментальных данных.

Изучение сетевой активности нейронов с различными типами NMDA выявило незначительные изменения проводимости ионного канала и локального потенциала в зависимости от субъединиц, входящих в состав рецептора. В случае ди-гетеромерной модели GluN1/GluN2A NMDA-рецептора наблюдалось уменьшение величины сигнала в тета-диапазоне и рост гамма-диапазоне по сравнению с нативными формами NMDA-рецептора. Для три-гетеромера GluN1/GluN2A/GluN2B при анализе спектров не обнаружено значимых изменений по сравнению с GluN1/GluN2B, но наблюдается заметная тенденция, подчеркивающий ди-гетеромер/три-гетеромер/ди-гетеромер переход рецептора из GluN1/GluN2B типа на GluN1/GluN2A тип (рис. 2).

Ранее проведенные исследования [8] показали влияние мутационных изменений в структуре на процесс активации ионного канала NMDA. Полученные характеристики структур с мутациями имеют согласие с

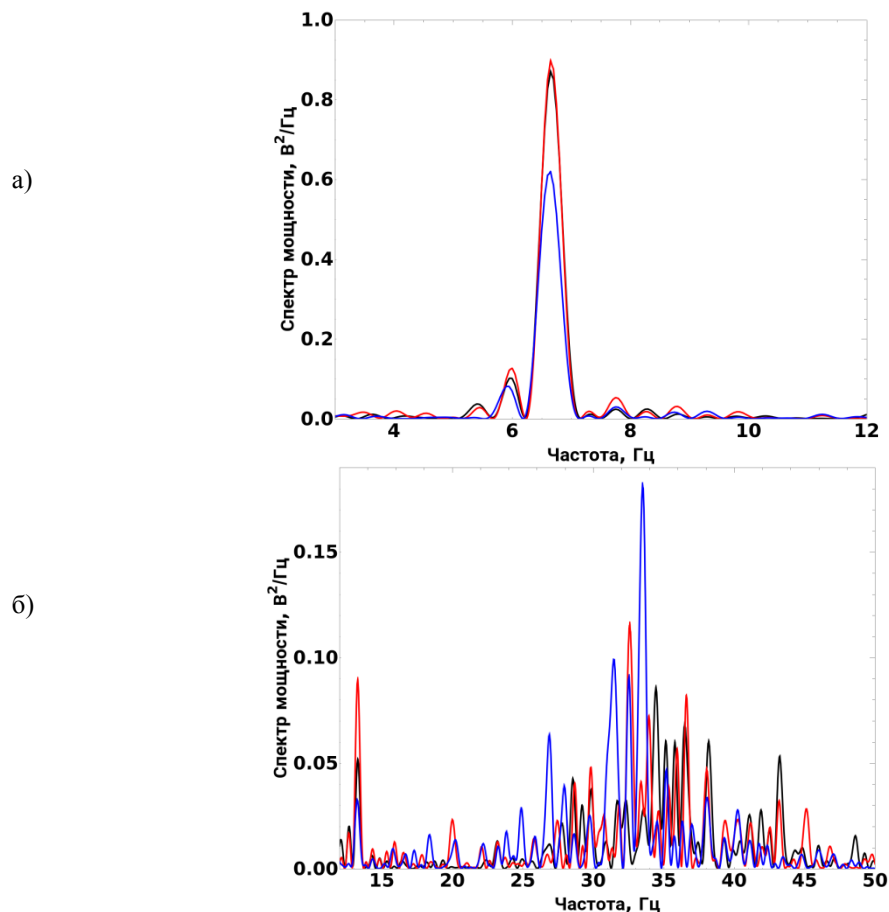


Рисунок 2. Частотный спектр осцилляций а) θ и б) γ -ритмов для NR1A/NR2A (синий), NR1A/NR2A/NR2B (красный) и NR1A/NR2B (черный)

экспериментальными показателями. Результаты настоящего исследования могут быть использованы для выявления изменения состава субъединиц NMDA рецептора с учетом возрастных процессов или индивидуальных особенностей организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке ОМУС ОИЯИ (грант № 21-702-01).

Список литературы / References:

1. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. *Pharmacological Reviews*, 1999, vol. 51, no. 1, pp. 7-62.
2. Collingridge G.L., Volianskis A., Bannister N., France G., Hanna L., Mercier M., Tidball P., Fang G., Irvine M.W., Costa B. M., Monaghan D.T., Bortolotto Z.A., Molnár E., Lodge D., and Janea D.E. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology*, 2013, vol. 64, pp. 13-26. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.051
3. Kumar A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. *Front. Neurosci.*, 2015. doi: 10.3389/fnins.2015.00473
4. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature*, 2013, vol. 14, pp. 383-400. doi: 10.1038/nrn3504
5. Dumas TC. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog. Neurobiol.*, 2005, vol. 76, pp. 189-211. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.08.002
6. Hines M.L., Carnevale N.T. The NEURON simulation environment. *Neural Comput.*, 1997, vol. 9, pp. 1179-1209. doi: 10.1162/neco.1997.9.6.1179
7. Neymotin S.A., Lazarewicz M.T., Sherif M., Contreras D., Finkel L.H., Lytton W.W. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus. *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, pp. 11733-11743.
8. Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B. Effect of mutant NMDA receptors on oscillations in a model of Hippocampus. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019, vol. 17, no. 01. doi: 10.1142/S0219720019400031
9. Jahr C., Stevens C. Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductance predicted by single-channel kinetics. *J. Neurosci.*, 1990, vol. 10, pp. 3178-3182.

MODELING OF THE HIPPOCAMPUS'S NEURAL NETWORK WITH DIFFERENT TYPES OF NMDA RECEPTORS

Aksenova S.V., Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

Joliot Curie str., 6, Dubna, 141980, Russia; e-mail: kgvr@mail.ru

Abstract. In this paper, we have proposed a model for analyzing the properties of neural networks in the hippocampus with different types of NMDA receptors: GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B and GluN1/GluN2A/GluN2B. The properties of the neural network of the hippocampus's CA3 region with modified structure of NMDA receptors were studied and the electrophysiological characteristics of the neural network model were obtained depending on the structures of the NMDA receptor's ion channel. Analysis of the network activity of neurons with different types of NMDA revealed insignificant changes in the conductivity of the ion channel and local potential depending on the subunits that make up the receptor. In the case of the GluN1/GluN2A NMDA receptor model, a decrease in the amplitude of theta-rhythm and increase of gamma-rhythm was observed in comparison with the native forms of the NMDA receptor. For the triheteromer GluN1/GluN2A/GluN2B, no significant changes of neural network activity were found in comparison with GluN1/GluN2B.

Key words: *hippocampus, NMDA receptor, molecular dynamics, neural network.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПОРТА ИОНОВ K^+ ПО КАНАЛАМ ИОННЫХ ОБМЕННИКОВ В ПРИСУТСТВИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ – АКТИВАТОРОВ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

Масленникова О.М.¹, Сибирев А.Л.², Криштоп В.В.³, Шипко М.Н.², Степович М.А.⁴, Ленчер О.С.⁵

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации
ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А, г. Москва, 121359, РФ; e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

² Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина
ул. Рабфаковская, 34, г. Иваново, 153003, РФ; e-mail: alsibirev@mail.ru, michael-1946@mail.ru

³ Национальный исследовательский университет ИТМО, Международный научный центр SCAMT
(Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies)

ул. Ломоносова, 9, г. Санкт-Петербург, 191002, РФ; e-mail: chrishtop@mail.ru

⁴ Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

⁵ Ивановская государственная медицинская академия
Шереметевский пр., 8, г. Иваново, 153012, РФ; e-mail: chrishtop@mail.ru

Поступила в редакцию:

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Изучены информативные возможности метода газоразрядной визуализации для оценки биологического эффекта, вызванного агонистами калиевых каналов эритроцитов. Эффективность транспорта электронов зависит от многих факторов, однако по изменению энергетического спектра вылетающих электронов можно судить о степени изменения проводимости водных сред K^+ каналов для электронов а, следовательно, ионов K^+ к соответствующим каналам. Это позволяет оценивать оптимальное количество лекарственного средства в водной среде организма для получения максимального эффекта от его применения. Полученные данные указывают на заметные различия в процессе каналирования зарядов при наличии в суспензиях эритроцитов никорандила. Установлено, что в результате взаимодействия катионов никорандила с молекулярными комплексами водной среды и стенок канала наблюдается отталкивание электронов от стенок, что обеспечивает высокую эффективность транспорта зарядов.
Ключевые слова: газоразрядная визуализация, лекарственные средства, транспорт ионов K^+ , калиевые каналы.

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени в понимании фармакологических эффектов лекарственных препаратов остается ряд вопросов, так как отсутствуют прямые методы оценки особенностей перестройки молекулярных комплексов, обеспечивающих протекание биологических процессов в организме. Косвенно информацию о таких процессах дают методы энергифльтрационной электронной микроскопии, Cryo-ЕМ визуализации, позволяющие оценивать вклад белков ионных обменников в транспорт катионов K^+ , Ca^{2+} , Na^{2+} , H и др. [1]. При этом для описания механизмов транспорта ионов в ион-проводящих каналах используют различные модели структурно-функциональной организации молекулярных комплексов биологической жидкости. В большинстве из них важная роль отводится водной среде, лигандным образованиям и мембранному потенциалу [2]. Попытки стереохимического представления о структуре и состоянии каналов для описания особенностей транспорта заряженных частиц между водными компартаментами клеток и тканей оказались безуспешными. Поэтому распространенными моделями являются модели каналирования ионов, учитывающими межмолекулярное и кулоновское взаимодействие в объеме цитоплазмической мембраны при наличии воды [3]. Эти модели применимы для описания биохимических и биофизических реакций, протекающих в организмах при использовании водно-спиртовых растворов, так как наличие воды определяет характер изменения знака и интенсивности межмолекулярного взаимодействия между жидкими компартаментами организма и лекарственными средствами [4]. В таком случае предполагается, что знак потенциальной энергии каналирующего иона определяется разностью электрической восприимчивости взаимодействующих атомов лекарственного препарата и молекул водной среды, присутствующей в канале [5]. При этом учитывается состояние молекулярных комплексов, формирующих стенки каналов, по которым осуществляется транспорт ионов и электронов.

Полноценная верификация биохимических и биофизических клеточных реакций возможна лишь при наличии данных, полученных физико-химическими методами, обеспечивающими получение информации об эффективности транспорта зарядов по каналам ионных обменников, которые лимитируют большинство внутриклеточных биохимических каскадов. Такие данные могут быть получены на примере изучения особенностей каналирования электронов в суспензиях биологических объектов, характеризующихся различным

функциональным состоянием калиевых и кальциевых каналов клеточной оболочки эритроцитов, вызванных действием агонистов и антагонистов этих каналов [6-10].

Целью настоящей работы являлось изучение возможностей использования параметров углового и энергетического распределения киловольтных электронов, проходящих через растворы эритроцитов с лекарственными средствами, для оценки биофизических эффектов таких средств.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Цельную кровь получали путем пункции сердца у наркотизированного животного в вакуумные пробирки с 3,8% цитратом натрия. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин. при 3000 об./мин.), клетки трижды отмывали в изотоническом растворе с фосфатным буфером (PBC, «Sigma», USA). Для получения рабочей суспензии 0,06 мл трехкратно отмытых эритроцитов ресуспендировали в 12 мл 0,9% NaCl для последующей их инкубации с препаратами. В эксперименте было изучено влияние никорандила ($C_8H_9N_3O_4$, 2-Nicotinamidoethyl Nitrate) – активатора АТФ-зависимых калиевых каналов. Всего в эксперименте было выполнено две серии исследований. Контрольное исследование выполнено с 1 мл суспензии эритроцитов. Для второй серии экспериментов было использовано 5 мл суспензии эритроцитов, в которую вносили никорандил для получения конечных концентраций активатора калиевых каналов 0,01; 0,1; 1, 10, 100 мМ. Суспензии эритроцитов инкубировали с препаратами в течение 30 мин. при комнатной температуре.

Для исследования проводимости калиевых каналов клеточной оболочки эритроцитов был использован серийный прибор «ГРВ-камера», аттестованный в качестве прибора медицинского назначения [11-13]. Его блок-схема показана на рисунке 1. Прибор состоит из металлического электрода, эмитирующего электроны (5), оптически прозрачного кварцевого электрода с токопроводящим покрытием (2), находящимся на объективе фотокамеры (4) цифрового видео-преобразователя и устройства визуализации изображения, генератора импульсов электрического напряжения (3), модифицированного шприца, позволяющего сформировать на его конце каплю биологической жидкости (1). Электрические биполярные импульсы от генератора амплитудой 9 кВ, длительностью $2 \cdot 10^{-6}$ с стимулируют эмиссию электронов из металлического электрода (5), которые проходят через каплю раствора (1), попадают в воздушное пространство между мениском капли и плоским кварцевым электродом, вызывая скользящий газовый разряд. Его свечение регистрируется фотокамерой, оцифровывается видео-преобразователем и визуализируется на экране компьютера в виде светящего диска и стримеров, представляющих картину стереографических проекций следов движения электронов через каплю раствора и ее поверхности.

Параметрический анализ этих картин с использованием программы GDV Scientific Laboratory позволяет получить угловое распределение электронов, которое воспроизводит стереографические проекции направлений облегченного движения электронов (каналов), сформированных молекулярными комплексами биологической жидкости [14, 15]. Последующая обработка картин углового распределения электронов с помощью специальной программы позволяет получить распределение стримеров рассматриваемого разряда по длине, что коррелирует с распределением электронов по энергиям. В результате по угловому и энергетическому распределению электронов можно судить о количестве и особенностях каналов облегченного движения электронов, а также о взаимодействии электронов с молекулярными комплексами, формирующими стенки каналов. Объектами для исследования служили суспензии эритроцитов с лекарственными средствами, являющимися агонистами ионных каналов клеточной оболочки.

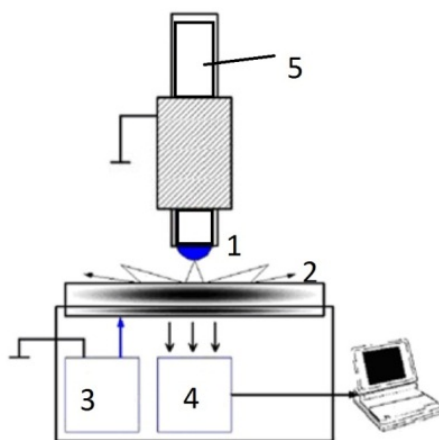


Рисунок 1. Блок-схема прибора газоразрядной визуализации «ГРВ-камера»: 1 – мениск жидкости; 2 – кварцевый электрод с токопроводящим покрытием; 3 – генератор импульсов напряжения; 4 – оптическая система; 5 – металлический электрод [11, 12]

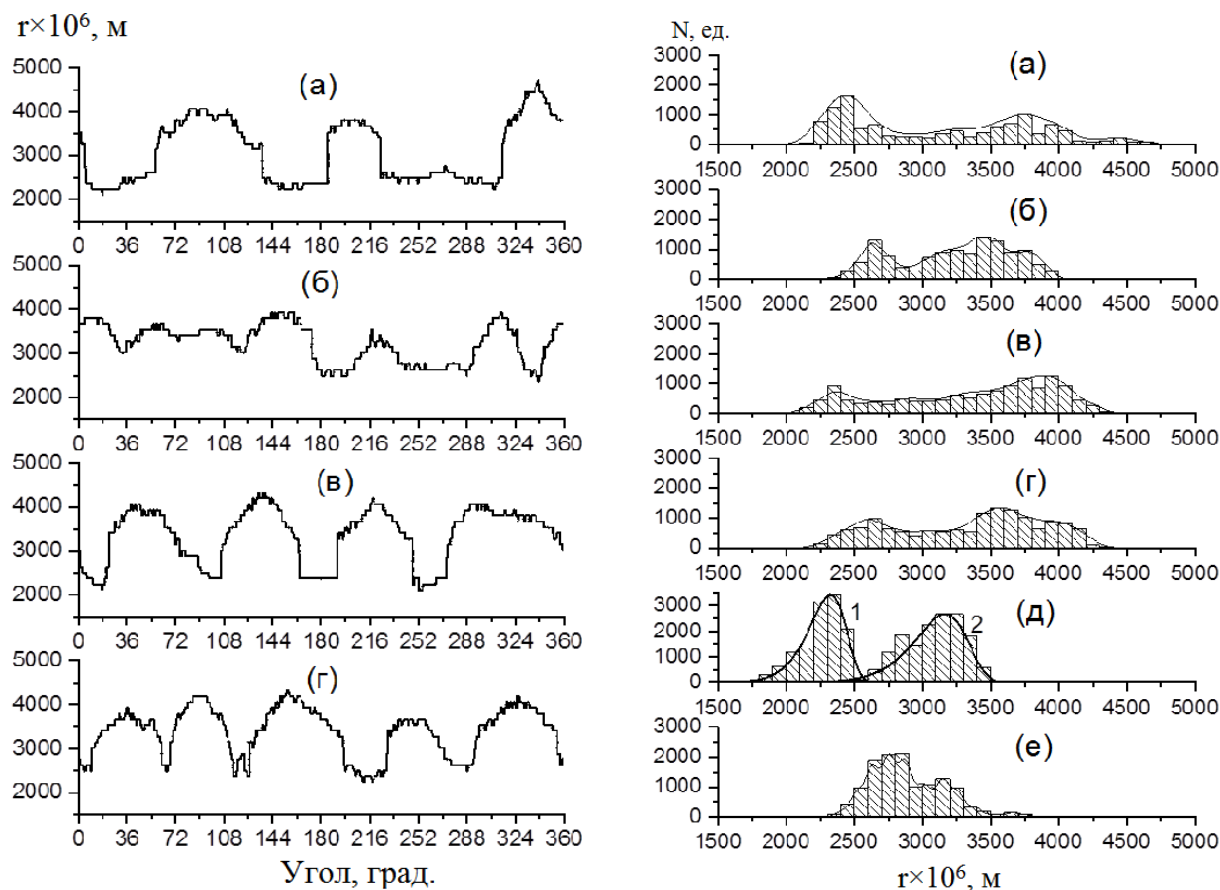


Рисунок 2. Слева – угловое распределение электронов, прошедших через суспензии эритроцитов с различной концентрацией никорандила; справа – распределение стримеров поверхностного барьерного разряда по длине после каналирования электронов через суспензии эритроцитов с различной концентрацией никорандила. Концентрация никорандила, мМ: а – 100; б – 1,0; в – 0,1; г – 0. На правом рисунке показаны также соответствующие зависимости для: д – бидистиллированной воды (кривая 1) и физиологического раствора хлорида натрия (кривая 2); е – физиологического раствора хлорида натрия с никорандилом концентрации 100 мМ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 2 приведено угловое распределение электронов, проходящих через суспензию эритроцитов, содержащую активаторы калиевых каналов при различных концентрациях. Видно, что концентрация лекарственного средства влияет на количество, параметры и положение максимумов углового распределения электронов.

С уменьшением концентрации активатора калиевых каналов увеличивается количество и ширина максимумов, что свидетельствует об увеличении количества направлений облегченного движения электронов через раствор [16]. Наличие пологих склонов наблюдаемых максимумов указывает на интенсивное взаимодействие электронов с молекулярными комплексами, образующими стенки каналов их облегченного движения. Полученные данные свидетельствуют о заметном влиянии активатора калиевых каналов на эмиссионные свойства суспензии эритроцитов. Наиболее отчетливо такое изменение прослеживается на распределении электронов по энергиям, которое коррелирует с распределением различных стримеров по длине. Видно, что на кривых распределения стримеров по длине отчетливо прослеживается 2 максимума: низкоэнергетический и высокоэнергетический – положения и параметры которых зависят от концентрации активатора калиевых каналов в растворе. Они указывают на различный характер взаимодействия электронов с микроокружением во время их движения через суспензию эритроцитов. Это может быть вызвано различным характером молекулярных комплексов, образующих каналы облегченного транспорта. Такой эффект может быть обусловлен гетерогенностью водных сред, вызванный компартментализацией проводящих сред мембранами эритроцитов.

Для идентификации картин углового распределения электронов были получены аналогичные картины для физиологического раствора хлорида натрия и водного раствора с активатором калиевых каналов. На картине углового распределения электронов, проходящих через физиологический раствор хлорида натрия, не наблюдается максимумов, указывающих на наличие направлений их облегченного движения, т.е. на изотропный характер жидкостей. При изучении физиологического раствора, содержащего активатор калиевых каналов

(никорандил) на картине углового распределения наблюдается 3 максимума малой интенсивности, свидетельствующих о взаимодействии молекулярных комплексов активатора калиевых каналов с молекулами воды. При внесении в суспензию эритроцитов активатора калиевых каналов изменяются форма, положение и ширина максимумов на картинах углового распределения электронов, что может быть обусловлено взаимодействием никорандила со специфическими белками-переносчиками [17, 18]. Это указывает на изменение особенностей взаимодействия электронов с молекулярными комплексами, формирующими стенки каналов облегченного транспорта последних через суспензию эритроцитов. Наиболее отчетливо такие изменения проявляются на картинах распределения стримеров по длине.

Из рисунка 2 также видно, что с увеличением концентрации активатора калиевых каналов в суспензии эритроцитов до 1 мМ увеличивается интенсивность максимумов, длина которых находится в интервале $(3,2-4,5) \times 10^{-3}$ м, соответствующих суспензии эритроцитов в физиологическом растворе. При этом интенсивность максимумов для стримеров длиной $(2,7-3,2) \times 10^{-3}$ м уменьшается, что указывает на отсутствие в суспензии молекул активатора калиевых каналов, не взаимодействующих с соответствующими ионными обменниками эритроцитами. При увеличении концентрации никорандила в суспензии эритроцитов до 10 мМ наблюдается повышение интенсивности максимумов, соответствующих длине стримеров $(3,5-4,0) \times 10^{-3}$ м, что указывает на повышение эффективности транспорта зарядов при введении никорандила, которая может быть обусловлена транспортом нерелятивистских электронов через ион-проводящих каналы в эритроцитах [13]. Однако даже при концентрации никорандила в суспензии с эритроцитами 100 мМ не обнаружено стримеров, свойственных свободным состояниям его молекулярных комплексов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования указывают на возможность применения метода газоразрядной визуализации для оценки биологического эффекта, вызванного агонистами калиевых каналов эритроцитов. Такие возможности связаны с тем, что при движении через эритроциты электронов, способных ионизировать воздух, происходит их торможение внутренним электрическим полем каналов, а также молекулярными комплексами, образующими стенки. Большое влияние на оба фактора оказывает водная среда, которая определяет степень торможения зарядов. Несмотря на тот факт, что эффективность транспорта зарядов зависит от многих факторов, по изменению энергетического спектра вылетающих электронов можно судить о степени изменения проводимости водных сред K^+ каналов для электронов а, следовательно, ионов K^+ к соответствующим каналам, а также оценивать оптимальное количество лекарственного средства в водной среде организма для получения максимального эффекта. Приведенные данные указывают на заметные различия специфики каналирования зарядов при наличии никорандила в суспензиях эритроцитов. В результате взаимодействия катионов никорандила с молекулярными комплексами водной среды и стенок канала наблюдается отталкивание электронов от стенок, что обеспечивает высокую эффективность транспорта зарядов.

Список литературы / References:

1. Fay J.F., Aleksandrov L.A., Jensen T., Cui L., Kousouros J.N., He L., Aleksandrov A.A., Gingerich D., Riordan J.R., Chen J. Cryo-EM visualization of an active high open probability CFTR anion channel. *Biochemistry*, 2018, vol. 57, no. 43. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00763
2. Мельников К.Н., Вислобоков А.И., Колпакова М.Э., Борисова В.А., Игнатов Ю.Д. Калиевые ионные каналы клеточных мембран. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2009, т. 7, № 1, с. 3-27. [Melnikov K.N., Vislobokov A.I., Kolpakova M.E., Borisova V.A., Ignatov Yu.D. Potassium ion channels of cell membranes. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2009, vol. 7, no. 1, pp. 3-27. (In Russ.)]
3. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, 2010, № 12, с. 64-71. [Vysotsky V.I., Karlash A.Yu. Features of selective transport and channeling of ions in the aquatic environment in the channels of biological membranes. *Surface. X-ray, synchrotron and neutron research*, 2010, no. 12, p. 64-71. (In Russ.)]
4. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science*, 1998, vol. 280, no. 5360, pp. 69-77. DOI: 10.1126/science.280.5360.69
5. Горбунов А.М., Ильенко В.А., Владимирова Е.С. Фармакологическое действие водных растворов лекарственных препаратов и воды, модифицированной электромагнитным полем. *Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: Научные труды VII международного конгресса*, СПб, 2015, т. 7, с. 31. [Gorbunov A.M., Ilenko V.A., Vladimirova E.S. Pharmacological action of aqueous solutions of drugs and water modified by an electromagnetic field. Weak and superweak fields and radiation in biology and medicine: Proceedings of the VII International Congress, St. Petersburg, 2015, vol. 7, p. 31. (In Russ.)]
6. Пушкарев Б.С., Витковский Ю.А. Кальциевые ионные каналы. Ч. II. *Забайкальский медицинский вестник*, 2016, № 1, с. 93-104. [Pushkarev B.S., Vitkovsky Yu.A. Calcium ion channels. Part II. *Zabaikalsky Medical Bulletin*, 2016, no. 1, pp. 93-104. (In Russ.)]
7. Горбунов А.М., Ильенко В.А., Владимирова Е.С. Исследование фармакологической активности препаратов методом оптической спектроскопии. *Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине:*

Научные труды VIII международного конгресса, СПб, 2018, т. 8, с. 167-168. [Gorbunov A.M., Ilienkov V.A., Vladimirova E.S. Study of the pharmacological activity of drugs by optical spectroscopy. *Weak and superweak fields and radiation in biology and medicine: Proceedings of the VIII International Congress*, St. Petersburg, 2018, vol. 8, pp. 167-168. (In Russ.)]

8. Zhou Y., MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.*, 2003, no. 7, vol. 333, no. 5, pp. 965-75. PMID: 14583193

9. Frieden M., Malli R., Samardzija M., Demareux N., Graier W.F. Subplasmalemmal endoplasmic reticulum controls K(Ca) channel activity upon stimulation with a moderate histamine concentration in a human umbilical vein endothelial cell line. *J. Physiol.*, 2002, vol. 540, pt. 1, pp. 73-84.

10. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 2001, vol. 414, no. 1, no. 6859, pp. 43-48. PMID: 11689936

11. Коротков К.Г., Орлов Д.В., Величко Е.Н. Применение метода газоразрядной визуализации для анализа различных жидкостей. *Известия высших учебных заведений. Приборостроение*, 2011, т. 54, № 12, с. 40-46. [Korotkov K.G., Orlov D.V., Velichko E.N. Application of the gas-discharge visualization method for the analysis of various liquids. *Proceedings of higher educational institutions. Instrument making*, 2011, vol. 54, no. 12, pp. 40-46. (In Russ.)]

12. Коротков К.Г. *Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии*. Санкт-Петербург: Реноме, 2007, 286 с. [Korotkov K.G. *Principles of GDV bioelectrography analysis*. St. Petersburg: Renome, 2007, 286 p. (In Russ.)]

13. Hartmann H.A., Kirsch G.E., Drewe J.A. et al. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science (Wash. DC)*, 1991, vol. 251, pp. 942-944.

14. Шипко М.Н., Степович М.А., Сибирев А.Л., Усольцева Н.В., Масленникова О.М., Смирнова А.И. Магнитоимпульсное воздействие на структурное состояние растворов поверхностно-активных веществ. *Известия РАН. Серия физическая*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 1058-1062. [Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Usoltseva N.V., Maslennikova O.M., Smirnova A.I. Magneto-pulse effect on the structural state of solutions of surfactants. *Izvestiya RAN. Physical series*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 1058-1062. (In Russ.)] doi: 10.1134/S0367676518080367.

15. Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Usoltseva N.V., Maslennikova O.M. Smirnova A.I. Impact of Magnetic Pulses on the Structural State of Surfactant Solutions. *Bull. Russ. Acad. Sci.: Phys.*, 2018, vol. 82, no. 8, pp. 956-960. DOI: 10.3103/S1062873818080361

16. Рябов В.А. *Эффект каналирования*. М.: Энергоатомиздат, 1994, 239 с. [Ryabov V.A. *Channeling effect*. Moscow: Energoatomizdat, 1994, 239 p. (In Russ.)]

17. Escande D., Cavero I. K⁺ channel openers and “natural” cardioprotection. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1992, vol. 13, pp. 269-272. doi: 10.1016/0165-6147(92)90083-I

18. Hegermann J., Overbeck J., Schrempf H. In vivo monitoring of the potassium channel KcsA in *Streptomyces lividans* hyphae using immuno-electron microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. *Microbiology*, 2006, vol. 152, pt. 9, pp. 2831-2841.

STUDY OF THE EFFICIENCY OF K⁺ ION TRANSPORT THROUGH ION EXCHANGER CHANNELS IN THE PRESENCE OF DRUGS – POTASSIUM CHANNEL ACTIVATORS

Maslennikova O.M.¹, Sibirev A.L.², Krishtop V.V.³, Shipko M.N.², Stepovich M.A.⁴, Lencher O.S.⁵

¹Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs,
st. Marshal Timoshenko, 19, bld. 1A, Moscow, 121359, Russia; e-mail: o.m.maslennikova@gmail.com

²Lenin Ivanovo State Power Engineering University,
Rabfakovskaya st. 34, Ivanovo, 153025 Russia; e-mail: alsibirev@mail.ru, michael-1946@mail.ru

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Международный научный центр SCAMT (Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies),
st. Lomonosov, 9, St. Petersburg, 191002, Russia; e-mail mail: chrishtop@mail.ru

⁴Tsiolkovsky Kaluga State University,
Stepan Razin st. 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

⁵Ivanovo State Medical Academy,
Sheremetevsky Ave., 8, Ivanovo, 153012, Russia; e-mail: chrishtop@mail.ru

Abstract. The informative capabilities of the gas-discharge visualization method for assessing the biological effect caused by agonists of potassium channels of erythrocytes were studied. The efficiency of electron transport depends on many factors; however, by the change in the energy spectrum of the emitted electrons, one can judge the degree of change in the conductivity of aqueous media K⁺ channels for electrons and, consequently, K⁺ ions to the corresponding channels. This allows to evaluate the optimal amount of a drug in the aquatic environment of the body to maximize the effect of drug usage. The data obtained indicate noticeable differences in the process of charge channeling in the presence of nicorandil in erythrocyte suspensions. It was found that as a result of the interaction of nicorandil cations with molecular complexes of the aqueous medium and the channel walls, the repulsion of electrons from the walls is observed, which ensures a high efficiency of charge transport.

Key words: *gas-discharge imaging, drugs, K⁺ ion transport, potassium channels.*

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКАЯ АНГАРМОНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И ИК СПЕКТР 2-БЕНЗИЛФЕНОЛА

Бабков Л.М.¹, Москвитин М.Д.¹, Давыдова Н.А.², Баран Я.³

¹ Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, г. Саратов, 410012, РФ; e-mail: lmbabkov@gmail.com

² Институт физики НАН Украины
г. Киев, Украина

³ Институт исследования низких температур и структуры ПАН
г. Вроцлав, Польша

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В статье представлены результаты комплексных исследований структуры и колебательного ИК спектра 2-бензилфенола. В области 400–4000 см⁻¹ в интервале температур 11–335 К измерены ИК спектры 2-бензилфенола в стабильной, метастабильной и жидкой фазах на Фурье-спектрометре модели IFS-88 фирмы Bruker. С помощью метода теории функционала плотности, реализованного в программных комплексах GAUSSIAN, с использованием функционала B3LYP и базиса 6-31g(d) построены структурно-динамические модели одного из конформеров молекулы 2-бензилфенола в гармоническом и ангармоническом приближениях. Рассчитаны параметры адиабатических потенциалов конформера молекулы 2-бензилфенола: минимальная энергия, оптимальная геометрия, механические параметры (силовые постоянные), электрооптические параметры (компоненты дипольного момента и сам дипольный момент). Рассчитанные геометрические параметры конформера молекулы 2-бензилфенола соответствуют принятым в структурной химии и согласуются с аналогичными параметрами, вычисленными другими авторами. Рассчитаны частоты и формы нормальных колебаний конформера молекулы 2-бензилфенола и их интенсивности в ИК спектре. Установлено, что ИК спектр, рассчитанный в ангармоническом приближении, в большей степени согласуется с измеренным, по сравнению со спектром, рассчитанным в рамках гармонической модели. На основе сравнения и анализа рассчитанных и измеренных ИК спектров 2-бензилфенола дана их интерпретация.

Ключевые слова: 2-бензилфенол, ИК спектр, молекула, структура, молекулярное моделирование, ангармоническое приближение, нормальное колебание, частота, форма, интенсивность, водородная связь.

2-бензилфенол (C₁₃H₁₂O), относящийся к классу одноатомных спиртов, на протяжении ряда лет является объектом теоретических и экспериментальных исследований, предмет которых разнообразен. Его вводят в состав супрамолекулярных ансамблей, с помощью которых распознают цезий [1]: эксперименты по экстракции показывают, что 2-бензилфенол является эффективным и селективным экстрагентом Cs⁺, что позволяет эффективно использовать его при очистке ядерных отходов. Структура и ИК спектры 2-бензилфенола комплексно (теория, эксперимент) исследовались в работе [2]: показано, что в твердокристаллической фазе конформация молекулы 2-бензилфенола соответствует одному из четырех минимумов потенциальной энергии, предсказанных неэмпирическими квантово-химическими расчетами для изолированной молекулы. В работе [3] экспериментально, методом колебательной спектроскопии, исследованы кристаллический полиморфизм и водородная связь в 2-бензилфеноле.

В данной работе впервые решена задача построения структурно-динамических моделей молекулы 2-бензилфенола в гармоническом и ангармоническом приближениях с целью оптимизации результатов моделирования и предложена интерпретация измеренного ИК спектра этого соединения. Исследования носили комплексный характер и основывались на методах квантовой химии и колебательной ИК спектроскопии (эксперимент, теория).

ИК спектры 2-бензилфенола измерены в области 400–4000 см⁻¹ в интервале температур 11–335 К в стабильной метастабильной и жидкой фазах на Фурье-спектрометре модели IFS-88 фирмы Bruker с разрешением 2 см⁻¹. В моделировании использован метод теории функционала плотности, ТФП, B3LYP/6-31G(d) [4, 5], реализованный в программных пакетах GAUSSIAN [6]. Минимизирована энергия, оптимизирована геометрия, вычислены механические (силовые постоянные) и электрооптические (компоненты дипольного момента и сам дипольный момент) параметры конформера молекулы 2-бензилфенола, рассчитаны частоты и формы ее нормальных колебаний и их интенсивности в ИК спектре.

Минимизированная энергия конформера молекулы составила –577,831463 Хартри, дипольный момент равен 1,27 Дебая. Строение конформера молекулы, соответствующее этой энергии приведено на рисунке 1. Геометрические параметры конформера молекулы находятся в пределах, принятых в структурной химии, и согласуются с данными работы [2].

Основное внимание в исследовании было уделено анализу измеренных и рассчитанных ИК спектров 2-бензилфенола, в которых отражены особенности структуры и ангармонизм колебаний. Измеренный в

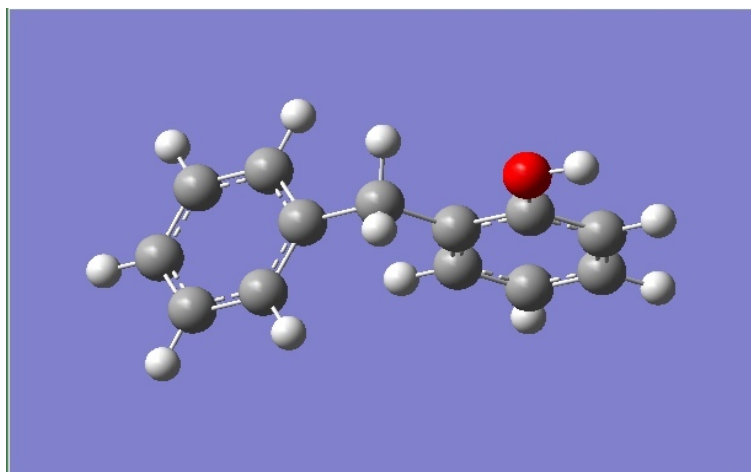


Рисунок 1. Строение молекулы 2-бензилфенола

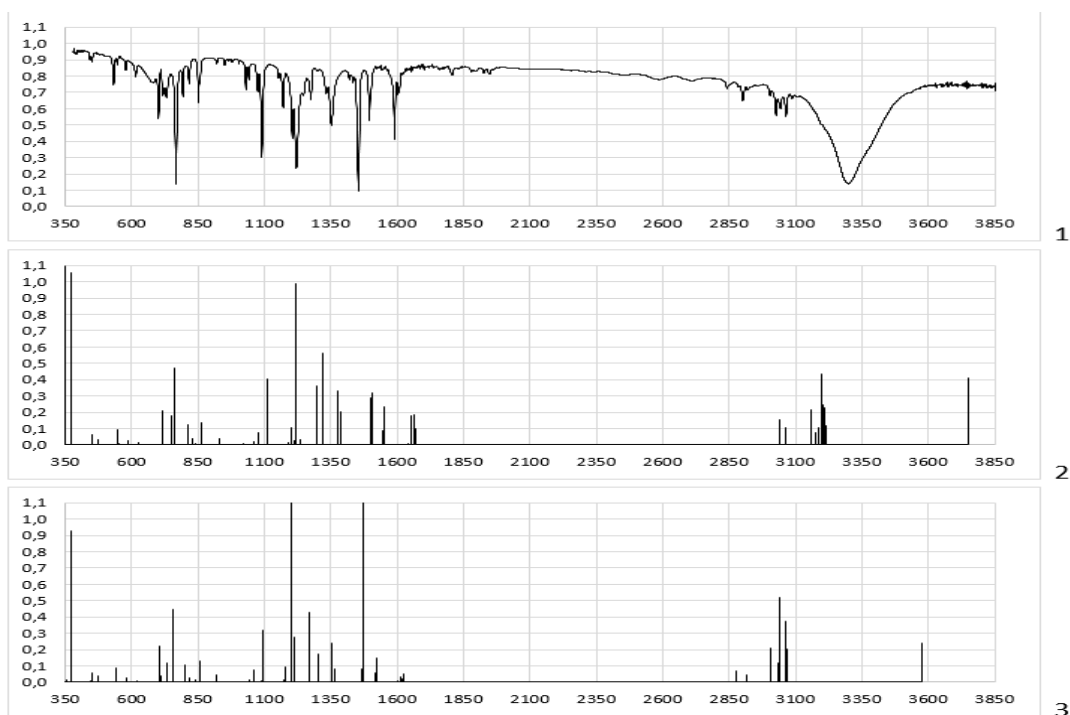


Рисунок 2. ИК спектры 2-бензилфенола: измеренный – 1; рассчитанные в гармоническом – 2 и ангармоническом – 3 приближениях

твердокристаллической стабильной фазе в области $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ и рассчитанные ИК спектры 2-бензилфенола приведены на рисунке 2 (здесь и далее, на рисунках 3 и 4, значение частот даны по горизонтали в см^{-1} , интенсивностей – по вертикали в относительных единицах). Их предварительный анализ указывает в целом, как и ожидалось, на значительное улучшение согласия измеренного спектра с рассчитанным при учете ангармонизма колебаний. В этом можно убедиться с гораздо большей очевидностью, анализируя конкретные области ИК спектров.

В качестве примера на рисунках 3 и 4 приведены измеренный и рассчитанные ИК спектры в двух областях: $1100\text{--}1600$ и $2850\text{--}3250\text{ см}^{-1}$. Из их анализа видно, что существенные улучшения имеют место в области проявления колебаний легких атомов (валентные колебания связей C-H) $2850\text{--}3250\text{ см}^{-1}$. Здесь сдвиги частот нормальных колебаний в длинноволновую сторону достигают $150\text{--}200\text{ см}^{-1}$. Интенсивности также изменяются, но не столь значительно, как, например, в области $1100\text{--}1600\text{ см}^{-1}$. В указанной области проявляются валентные колебания фенильных колец, смешанные с деформационными плоскими колебаниями, нормальные колебания сильно делокализованы. Их интенсивности значительно изменяются, частоты колебаний сдвигаются в длинноволновую область, но не столь значительно по сравнению частотами в области $2850\text{--}3250\text{ см}^{-1}$: ангармонизм сказывается на них в меньшей степени. Спектр, рассчитанный с учетом ангармонизма, как уже отмечалось, гораздо ближе к экспериментальному.

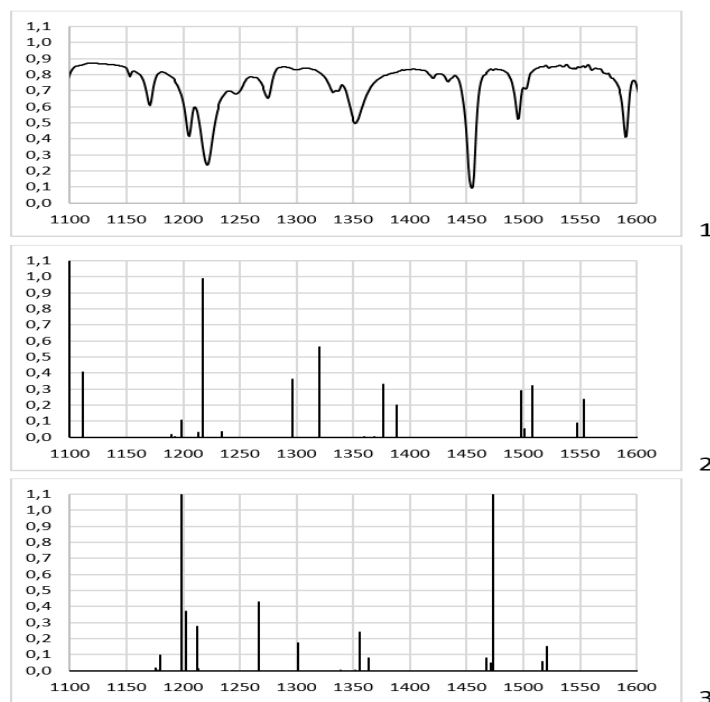


Рисунок 3. Измеренный – 1 и рассчитанные – 2, 3 ИК спектры 2-бензилфенола в области 1100-1600 cm^{-1}

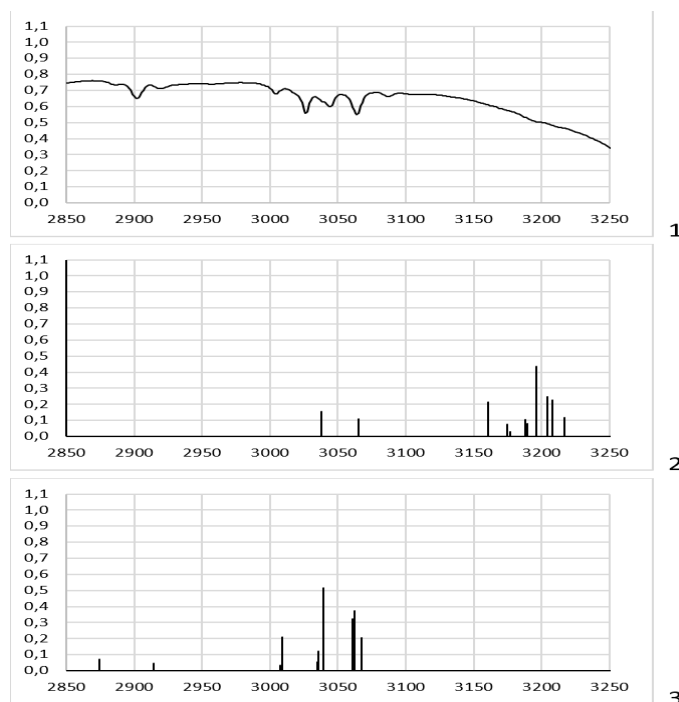


Рисунок 4. Измеренный – 1 и рассчитанные – 2, 3 ИК спектры 2-бензилфенола в области 2850-3250 cm^{-1}

В измеренном ИК спектре обращает на себя внимание полоса в области 3100-3500 cm^{-1} . Она проявляется в виде широкого контура с аномально большой интенсивностью. Ее центр тяжести соответствует положению $\approx 3200 \text{ cm}^{-1}$ (рис. 1). Ее наличие в спектре указывает на образование в образце 2-бензилфенола комплексов с водородной связью. Согласно данным работы [1] в твердокристаллическом образце могут реализовываться Н-комплексы в виде тетрамеров молекулы 2-бензилфенола. В работе [3] на основе анализа измеренных ИК спектров высказано предположение о возможности образования цепочечных Н-ассоциатов в образце 2-бензилфенола. В обоих случаях образование Н-комплексов в 2-бензилфеноле должно приводить к существенному сдвигу полосы, соответствующей валентному колебанию связи О-Н изолированной молекулы, в длинноволновую сторону спектра. В соответствии с расчетом, проведенном в ангармоническом приближении, частота этого колебания в спектре изолированной молекулы составляет 3570 cm^{-1} . Из анализа измеренного и рассчитанного ИК спектров в данной области можно оценить сдвиг этой полосы, $\Delta\nu_{\text{OH}}$, при комплексообразовании: он составил $\approx 370 \text{ cm}^{-1}$. По этому сдвигу можно оценить энергию самой водородной связи, $-\Delta H$, используя известную эмпирическую формулу Иогансена [7]:

$$- \Delta H = 0,3(\Delta\nu_{OH} - 40)^{1/2}.$$

Энергия водородной связи в таком случае составляет $\approx -5,5$ ккал/моль, что в соответствии с классификацией [8] позволяет отнести ее к водородным связям средней силы. Более детальный анализ этой области спектра и других областей может быть осуществлен на основе результатов построения структурно-динамических моделей 2-бензилфенола с учетом водородной связи (тетрамер молекулы, цепочечный ассоциат).

Основной вывод, следующий из результатов проведенных исследований, заключается в том, что построение структурно-динамической модели 2-бензилфенола в ангармоническом приближении оказалось возможным и весьма эффективным. Оно приблизило рассчитанный ИК спектр молекулы к измеренному спектру образца и позволило избежать часто используемой при моделировании колебательных спектров многоатомных молекул процедуры масштабирования рассчитанных частот, улучшающей их согласие с измеренными частотами, весьма полезной при интерпретации спектров, но лишенной физического смысла по сравнению с учетом ангармонизма.

Список литературы / References:

1. Bryan J.C., Delmau L.H., Hay B.P., Nicholas J.B., Rogers L.M., Rogers R.D., Moyer B.A. Cesium Recognition by Supramolecular Assemblies of 2-Benzylphenol and 2-Benzylphenolate. *Structural Chemistry*, 1999, vol. 10, no. 3, pp. 187-203.
2. Katsyuba S., Chernova A., Schmutzler R. Vibrational spectra and conformational isomerism of calixarene building blocks: 2-benzylpheno. *Org. Biomol. Chem.*, 2003, no. 1, pp. 714-719.
3. Baran J., Davydova N.A., Drozd M. Hydrogen-bonded 2-benzylphenol and its crystalline polymorphism. *Phys. Scr.*, 2019, no. 94, 085403.
4. Кон В. Электронная структура вещества – волновые функции и функционалы плотности. *УФН*, 2002, т. 172, № 3, с. 336-348. [Kon V. Electronic structure of matter - wave functions and density functionals. *UFN*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 336-348. (In Russ.)]
5. Попл Дж.А. Квантово-химические модели. *УФН*, 2002, том 172, № 3, с. 349-356. [Popl J.A. Quantum-chemical models. *UFN*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 349-356. (In Russ.)]
6. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. *Gaussian03, Revision B.03*; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA. 2003, 302 p.
7. Иогансен А.В. ИК спектроскопия и определение энергии водородной связи. *Водородная связь*. М.: Наука, 1981, с. 112-155. [Iogansen A.V. *IR spectroscopy and determination of hydrogen bond energy*. Hydrogen bond. Moscow: Nauka, 1981, pp. 112-155. (In Russ.)]
8. Бабков Л.М., Пучковская Г.А., Макаренко С.П., Гаврилко Т.А. ИК спектроскопия молекулярных кристаллов с водородными связями. Киев: Наукова думка, 1989, 160 с. [Babkov L.M., Puchkovskaya G.A., Makarenko S.P., Gavrilko T.A. *IR spectroscopy of molecular crystals with hydrogen bonds*. Kiev: Naukova Dumka, 1989, 160 p. (In Russ.)]

STRUCTURAL- DYNAMIC ANHARMONIC MODEL AND IR SPECTRUM OF 2-BENZYLPHENOL

Babkov L.M.¹, Moskvitin M.D.¹, Davydova N.A.², Baran J.³¹ Saratov State Chernyshevsky University*Astrakhanskaya str., 83, Saratov, 410012, Russia; e-mail: lmbabkov@gmail.com*² Institute of Physics NAS of Ukraine*Kiev, Ukraine*³ Institute for Low Temperature and Structure Research PAS*Wroclaw, Poland*

Abstract. The article presents the results of comprehensive studies of structure and vibrational IR spectrum of 2-benzylphenol. The IR spectra of 2-benzylphenol were measured on a Bruker IFS-88 Fourier spectrometer in the region of 400 - 4000 cm⁻¹ in the temperature range of 11 - 335 K in stable, metastable, and liquid phases. Structural-dynamic models of one of the conformers of the 2-benzylphenol molecule were constructed in harmonic and anharmonic approximations using the density functional theory method implemented in the GAUSSIAN software packages, using the B3LYP functional and the 6-31g (d) basis. The parameters of the adiabatic potentials of the conformer of the 2-benzylphenol molecule were calculated: minimum energy, optimal geometry, mechanical parameters (force constants), electro-optical parameters (components of the dipole moment and the dipole moment itself). The calculated geometrical parameters of the conformer of the 2-benzylphenol molecule correspond to those accepted in structural chemistry and agree with similar parameters calculated by other authors. The frequencies and forms of normal vibrations of the conformer of the 2-benzylphenol molecule and their intensities in the IR spectrum were calculated. It was found that the IR spectrum calculated in the anharmonic approximation is in greater agreement with the measured one, in comparison with the spectrum calculated within the harmonic model. Based on the comparison and analysis of the calculated and measured IR spectra of 2-benzylphenol, their interpretation is given.

Key words: 2-benzylphenol, IR spectrum, molecule, structure, molecular modeling, anharmonic approximation, normal vibration, frequency, shape, intensity, hydrogen bond.

МОДЕЛИРОВАНИЕ НАРУШЕНИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА ПОСЛЕ ОСТРОГО ОБЛУЧЕНИЯ МЫШЕЙ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ

Глебов А.А., Колесникова Е.А., Бугай А.Н.

Объединенный институт ядерных исследований
ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: glebov.atth@gmail.com
Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Эксперименты по радиационно-индуцированному нарушению нейрогенеза взрослых, характеризующегося гибелью радиочувствительных популяций клеток, рассматривают влияние эффектов радиации либо для популяций нервных стволовых клеток и амплифицирующих нейрональных предшественников, либо для нейробластов и незрелых нейронов. Данные типы клеток являются предшественниками астроцитов, олигодендроцитов и зрелых нейронов, однако влияние эффектов облучения на зрелые типы клеток после гибели клеток-предшественников рассмотрено не было. Чтобы смоделировать влияние рентгеновского излучения на продуцирование зрелых типов клеток, мы модифицировали разработанную нами математическую модель нейрогенеза взрослых с учетом радиационно-индуцированной гибели всех четырех радиочувствительных популяций клеток-предшественников. В результате впервые рассчитаны доли выживших астроцитов, олигодендроцитов и зрелых нейронов после облучения рентгеновскими лучами мышей возрастом 45 дней. Моделируемые дозы облучения составили 0, 1, 5 Гр. Рассчитанные кривые возрастной динамики популяции демонстрируют, что исходная численность всех трех популяций зрелых клеток не восстанавливается в течении всей жизни мыши.

Ключевые слова: нейрогенез, математическое моделирование, радиационно-индуцированные нарушения, лучевая терапия.

Применение лучевой терапии головного мозга для лечения онкологических заболеваний вызывает долгосрочные нарушения памяти у пациентов всех возрастов [1]. Одним из факторов развития подобных нарушений является радиационно-индуцированная гибель клеток, участвующих в процессе нейрогенеза взрослых в зубчатой извилине гиппокампа мозга. Из-за сложности изучения действия радиации на нейрогенез у людей учёные-радиобиологи используют облучение лабораторных мышей.

При изучении нарушения нейрогенеза у мышей при облучении рентгеновскими лучами было обнаружено, что краткосрочным эффектом действия облучения является гибель радиочувствительных популяций клеток-предшественников: амплифицирующих нейрональных предшественников (АНП), нейробластов, незрелых нейронов и, в меньшей степени, покоящихся нервных стволовых клеток (пНСК) [2,3]. При этом остаётся неизвестным, как краткосрочный эффект гибели клеток-предшественников влияет на прирост новообразованных зрелых нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, образующихся в результате дифференциации клеток-предшественников.

Для моделирования эффектов гибели клеток после острого облучения рентгеновскими лучами мы использовали разработанную нами модель нейрогенеза у взрослых, в которой учтены популяции как клеток-предшественников, так и зрелые типы клеток [4, 5]. Математическая модель нейрогенеза базируется на схеме асимметричного деления одноразовых стволовых клеток [6] модифицированной с учётом популяции

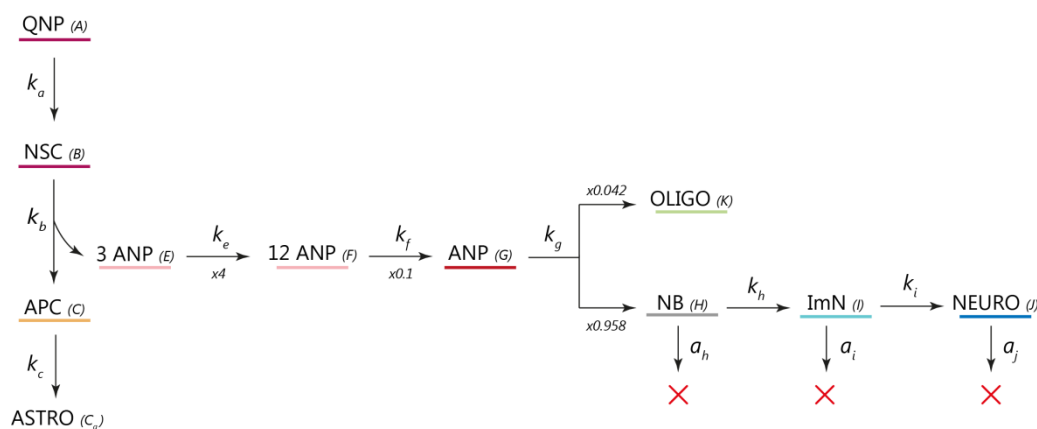


Рисунок 1. Модифицированная схема нейрогенеза взрослых, где QNP – покоящиеся нервные стволовые клетки, NSC – нервные стволовые клетки, ANP – амплифицирующие нейрональные предшественники, APC – клетки-предшественники астроцитов, ASTRO – астроциты, NB – нейробласты, ImN – незрелые нейроны, NEURO – зрелые нейроны, OLIGO – олигодендроциты, апоптоз обозначен красным крестом. Параметры k_{a-i} – скорости производства (активации, деления или дифференциации), a_{h-j} – скорости апоптоза.

олигодендроцитов, незрелых нейронов, а также апоптоза зрелых нейронов (рис. 1) и представляет собой систему из одиннадцати дифференциальных уравнений

$$\frac{dA(t)}{dt} = -k_a A(t) \quad (1)$$

$$\frac{dB(t)}{dt} = k_a A(t) - k_b B(t) \quad (2)$$

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_b B(t) - k_c C(t) \quad (3)$$

$$\frac{dC_a(t)}{dt} = k_c C(t) \quad (4)$$

$$\frac{dE(t)}{dt} = 3 \times k_b B(t) - k_e E(t) \quad (5)$$

$$\frac{dF(t)}{dt} = 4 \times k_e E(t) - k_f F(t) \quad (6)$$

$$\frac{dG(t)}{dt} = 0.1 \times k_f F(t) - k_g G(t) \quad (7)$$

$$\frac{dH(t)}{dt} = 0.985 \times k_g G(t) - k_h H(t) - a_h H(t) \quad (8)$$

$$\frac{dI(t)}{dt} = k_h H(t) - k_i I(t) - a_i I(t) \quad (9)$$

$$\frac{dJ(t)}{dt} = k_i I(t) - a_j J(t) \quad (10)$$

$$\frac{dK(t)}{dt} = 0.042 \times k_g G(t) \quad (11)$$

где, $A-K$ – доля выживших клеток популяции: A – покоящихся нервных стволовых клеток, B – нервных стволовых клеток, C – клеток-предшественников астроцитов, C_a – астроцитов, E, F, G – амплифицирующих нейрональных предшественников, H – нейробластов, I – незрелых нейронов, J – зрелых нейронов, K – олигодендроцитов, k_{a-i} – скорость производства (активации, деления или дифференциации), a_{h-j} – скорость апоптоза. Скорости процессов активации, деления и дифференциации рассчитаны в приближении постоянства скорости по уравнениям

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{X_0}{X} \quad (12)$$

$$k = \frac{1}{\tau} \quad (13)$$

где, k – скорость производства (активации, деления или дифференциации), X – доля выживших клеток в момент времени t , X_0 – доля выживших клеток в момент времени t_0 , τ – средняя продолжительность жизни клеток в популяции. Уравнение (12) используется для оценки параметров производства в популяции нервных стволовых клеток, амплифицирующих нейрональных предшественников, незрелых нейронов и нейробластов по данным из [6, 7]. Уравнение (13) – для популяций делящихся клеток, средняя продолжительность жизни которых интерпретируется как среднее время жизни клетки до вступления в процесс деления или дифференциации. Параметры апоптоза подобраны вручную. Численные значения скоростей производства и апоптоза приведены в таблице 1 в единицах $1/\tau$ для наглядного сравнения параметров средней продолжительности жизни различных популяций клеток.

Влияние острого облучения рентгеновскими лучами моделируется вводом дополнительного члена в уравнения с параметром радиационной гибели клеток для расчёта начального значения числа клеток, согласно схеме, описанной в работе [8]. Начальные условия для уравнений (1)–(11) рассчитываются по формуле

$$n(t) = n_0(t) \times e^{-\frac{D}{D_0}} \quad (14)$$

где, $n(t)$ – число выживших клеток после облучения, n_0 – число клеток до облучения, D – поглощенная доза облучения, D_0 – характеристическая доза облучения. Характеристические дозы облучения для пНСК и АНП составляют 24 и 3.83 Гр, соответственно. Расчет и проверка параметров основаны на данных из работы [3]. Соответствующие результаты приведены на рисунке 2.

Таблица 1. Скорости производства (активации, деления или дифференциации) и апоптоза

Параметр	Скорость производства (день ⁻¹)	Источник
k_a	1/90	Аппроксимация результатов из [6]
k_b	1/4,48	Экспериментальные данные из [6]
k_c	1/8,41	Экспериментальные данные из [6]
k_e	1/2,9	Экспериментальные данные из [6]
k_f	1/206	Аппроксимация результатов из [6]
k_g	1/100	Подгоночный параметр
k_h	1/53	Аппроксимация результатов из [7]
k_i	1/81	Аппроксимация результатов из [7]
a_h	1/35	Подгоночный параметр
a_i	1/81	Подгоночный параметр
a_j	1/1800	Подгоночный параметр

Характеристические дозы для нейробластов и незрелых нейронов определены на основе перерасчёта характеристических доз из работы [8] в приближении линейной аппроксимации и составляют 1,4 и 7,5 Гр, соответственно. Для остальных популяций экспоненциальный член в уравнении (14) приближенно равен 1, так как рентгеновские лучи существенно не влияют на их численность после облучения.

В результате впервые рассчитаны доли выживших клеток-предшественников (рис. 3) и зрелых типов клеток (рис. 4) после острого облучения в 45 день жизни мыши дозами 0, 1, 5 Гр. Данные по временной динамике численности пНСК не приведены из-за низкой радиочувствительности популяции в сравнении с популяциями АНП, нейробластов и незрелых нейронов. Все графики демонстрируют уменьшение числа выживших клеток с увеличением дозы излучения.

Уменьшение числа астроцитов составляет порядка 7% при высоких дозах излучения (рис. 4-г), что напрямую связано с гибелью покоящихся нервных стволовых клеток, являющихся предшественниками данного типа клеток. Влияние рентгеновских лучей на производство олигодендроцитов самое маленькое среди зрелых типов клеток — порядка 2-3% (рис. 4-д). Это объясняется низкой радиочувствительностью покоящихся нервных стволовых клеток, из которых образуются амплифицирующие нейрональные предшественники, лишь 4,2% которых дифференцируется в зрелые олигодендроциты. Популяция зрелых нейронов теряет порядка 15% числа новообразованных клеток при высоких дозах излучения, что является максимальным среди рассмотренных типов зрелых клеток (рис. 4-е). Это связано с совокупным эффектом уменьшения численности всех клеток-предшественников (рис. 3-г, д, е), а также с высокой радиочувствительностью нейробластов, чья популяция гибнет более чем на 95% при дозах порядка 5 Гр относительно необлученной популяции клеток.

Таким образом, в настоящей работе математическое моделирование влияния рентгеновского излучения на клетки-предшественники астроцитов, олигодендроцитов и зрелых нейронов показало, что численность зрелых типов клеток после облучения не восстанавливается в течение всей жизни мыши, составляющей порядка 900 дней (рис. 4-а, б, в).

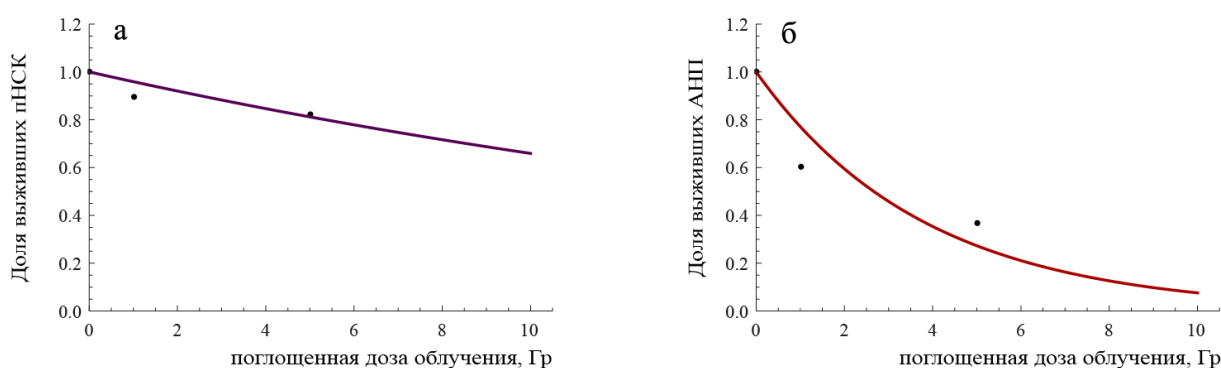


Рисунок 2. Кривые выживаемости популяций клеток (а - пНСК и б – АНП) через 24 часа после облучения рентгеновскими лучами мышей возрастом 45 дней. Характеристические дозы составили $D_0(\text{пНСК}) = 24$ Гр и $D_0(\text{АНП}) = 3.83$ Гр

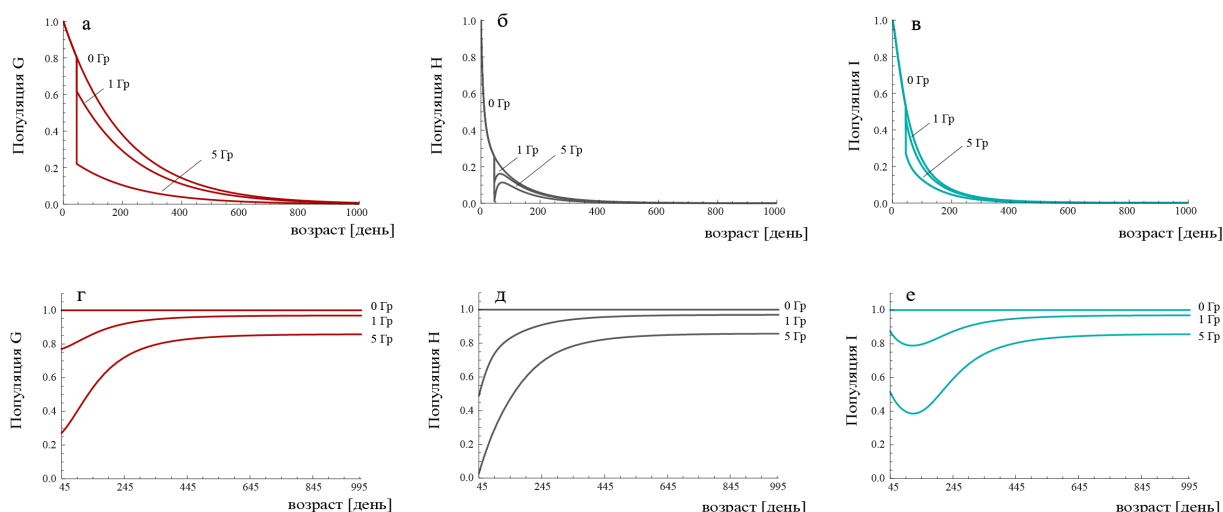


Рисунок 3. Временная динамика численности популяций: а, г – АНП, б, д – нейробластов, в, е – незрелых нейронов, после острого облучения дозами 1 и 5 Гр в 45 день жизни мыши. Кривые на графиках г-е нормированы относительно динамики численности необлученных мышей после действия рентгеновского излучения

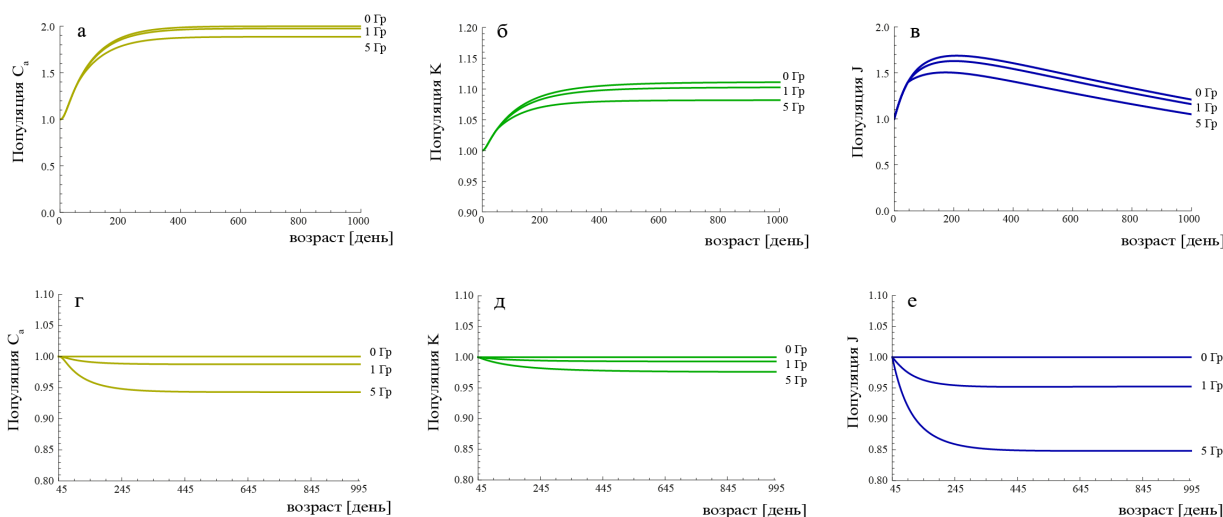


Рисунок 4. Временная динамика численности популяций: а, г – астроцитов, б, д – олигодендроцитов, в, е – зрелых нейронов, после острого облучения дозами 1 и 5 Гр в 45 день жизни мыши. Кривые на графиках г-е нормированы относительно динамики численности необлученных мышей после действия рентгеновского излучения

Список литературы:

1. Smith M.A. et al. *Principles and practice of pediatric oncology*. Edited by: Pizzo P, Poplack GD, 2002.
2. Mizumatsu S. et al. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer research*, 2003, vol. 63, no. 14, pp. 4021-4027.
3. Mineyeva O.A. et al. Radiation induces distinct changes in defined subpopulations of neural stem and progenitor cells in the adult hippocampus. *Frontiers in neuroscience*, 2019, vol. 12, p. 1013.
4. Глебов А.А., Колесникова Е.А., Бугай А.Н. Математическое моделирование нейрогенеза взрослых с учётом предшественников олигодендроцитов. *Медицинская и радиационная биофизика: сборник трудов XXVIII Международной конференции «Математика. Компьютер. Образование»*, 2021, с. 126. [Glebov A.A., Kolesnikova E.A., Bugay A.N. Mathematical modeling of adult neurogenesis taking into account the oligodendrocyte progenitor cells. *Medicinskaya i radiacionnaya biofizika: sbornik trudov XXVIII Mezhdunarodnoj konferencii «Matematika. Komp'yuter. Obrazovanie»*, 2021, p. 126. (In Russ.)]
5. Глебов А.А., Колесникова Е.А., Бугай А.Н. Математическая модель нейрогенеза взрослых с учётом популяции зрелых нейронов. *Математика и математическое моделирование: Сборник материалов XV Всероссийской молодёжной научно-инновационной школы (13–15 апреля 2021 г.)*, с. 123-124. [Glebov A.A., Kolesnikova E.A., Bugay A.N. Mathematical model of adult neurogenesis taking into account the population of mature neurons. *Matematika i matematicheskoe modelirovanie: Sbornik materialov XV Vserossijskoj molodyozhnoj nauchno-innovacionnoj shkoly (13–15 April 2021)*, p. 123-124. (In Russ.)]

6. Encinas J.M. et al. Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell*, 2011, vol. 8, no. 5, pp. 566-579.
7. Andres-Mach M., Rola R., Fike J. R. Radiation effects on neural precursor cells in the dentate gyrus. *Cell and tissue research*, 2008, vol. 331, no. 1, pp. 251-262.
8. Cacao E., Cucinotta F.A. Modeling impaired hippocampal neurogenesis after radiation exposure. *Radiation research*, 2016, vol. 185, no. 3, pp. 319-331.

MODELING IMPAIRMENT OF NEUROGENESIS DUE TO ACUTE X-RAY EXPOSURE OF MICE

Glebov A.A., Kolesnikova E.A., Bugay A.N.

Joint Institute for Nuclear Research

Joliot-Curie. str., 6, Dubna, 141980, Russia; e-mail: glebov.atth@gmail.com

Abstract. Experiments on radiation-induced impairment of adult neurogenesis, characterized by the death of radiosensitive cell populations, consider the effect of radiation either on populations of neural stem cells and amplifying neuronal progenitor, or for neuroblasts and immature neurons. These cell types are the progenitors of astrocytes, oligodendrocytes, and mature neurons, but the effect of radiation on mature cell types after the death of progenitor cells has not been considered. To simulate the effect of X-ray radiation on the production of mature cell types, we modified the mathematical model of adult neurogenesis developed by us, taking into account the radiation-induced death of all four radiosensitive populations of progenitor cells. As a result, the survival rate of astrocytes, oligodendrocytes, and mature neurons after X-ray irradiation of mice aged 45 days was calculated for the first time. The simulated radiation doses were 0, 1, 5 Gy. The calculated age-related dynamics curves demonstrate that the initial number of all three populations of mature cells does not recover during the entire life of the mice.

Key words: neurogenesis, mathematical modeling, radiation-induced effects, radiation therapy.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЕВ ФОСФОЛИПИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ *E. COLI* K-12

Зубова К.В., Кузнецова В.А., Аль-Альвани А.Ж., Глинская Е.В., Каневский М.В., Глуховской Е.Г.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, г. Саратов, 410012, РФ; e-mail: zubovaksushechka@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе представлены исследования ленгмюровских монослоев нативных фосфолипидов, выделенных из клеточных мембран тест-культуры *E.coli* K-12. В составе липида А бактерий *E. coli* K-12 обнаружены шесть метиловых эфиров жирных кислот: метил гексадеканоеат, метил транс-9-октадеканоеат, метил цис-9-гексадеценоеат, метил цис-9,10-метиленгексадеканоеат, метил октадеканоеат и метил тетрадеканоеат. Для формирования монослоя готовили рабочий раствор нативных фосфолипидов в хлороформе с концентрацией $C=10^{-4}$ М. Для исследования влияния объема аликвоты рабочего раствора на формирование монослоя фосфолипиды вносили на поверхность воды в количествах $V=50, 100$ и 150 мкл. Монослои исследовали методом изотерм сжатия, анализ которых показал наличие как минимум трех устойчивых плотно упакованных состояний с высокой механической прочностью.

Ключевые слова: нативные фосфолипиды, ленгмюровские монослои, устойчивые состояния.

Фосфолипиды являются важнейшими структурными компонентами клеточной стенки бактерий, участвуют в адаптации микроорганизмов к среде обитания, обладают биологической активностью и могут выступать в качестве биомаркеров на изменение окружающей среды и одним из компонентов экологического мониторинга [1].

Известно, что строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий сложнее, чем грамположительных, она состоит из наружной и внутренней (цитоплазматической) мембран, а также периплазмы, состоящей из пептидогликана. Большая часть наружной мембраны представлена двойным слоем липидов, основным компонентом которых являются фосфолипиды. Бимолекулярная природа и амфипатический характер позволяют клеточным мембранам формировать двуслойную структуру, защищающую бактерии от влияния негативных факторов, но не препятствующую поступлению необходимых для роста питательных веществ [2].

Несмотря на значительное разнообразие в клетках прокариот фосфолипидных структур, большинство из них являются глицеролипидами, содержащими две цепи жирных кислот. Типичные молекулы фосфолипидов состоят из обращенной наружу отрицательно заряженной гидрофильной фосфатной головной группы, присоединенной к глицерину, и двух гидрофобных ацильных цепочек-хвостов – неполярных жирных кислот, обращенных внутрь клетки. Подобное расположение амфипатических фосфолипидов обеспечивает образование плотной физико-химической мембранной структуры, непроницаемой для водорастворимых веществ внеклеточной среды и требуемой для концентрации необходимых для жизнедеятельности молекул в цитоплазме. Кроме того, длина цепи и степень насыщенности жирных кислот, входящих в структуру фосфолипидов, модулируют толщину и текучесть биомембран [3].

Синтезируемый бактериями спектр фосфолипидов представлен фосфатидилэтаноламином, фосфатидилглицерином, дифосфатидилглицерином, отличающимися количеством и длиной ацильных цепей, числом, положением и геометрией ненасыщенных связей, а также структурой, полярностью и зарядом головных частей. Кроме основных групп, бактерии синтезируют дополнительные, менее распространенные фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол [4].

Целью настоящей работы являлось выделение и характеристика нативных фосфолипидов клеточных мембран бактерий *E.coli* K-12 с использованием метода ленгмюровских монослоев.

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета, лаборатории пленочных наноструктурированных материалов ОНИ наноструктур и биосистем Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского, лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

В исследовании использовали стандартную тест-культуру *E. coli* K-12. Бактерии культивировали в стерильном режиме на термостатируемой качалке IS-OS 20 (Phoenix Instrument, Германия) в колбах с жидкой средой Лэнди (в расчете на 100 мл среды: глюкоза 3 г, глутамат натрия 0,5 г, сульфат магния 0,05 г, дигидрофосфат калия 0,1 г, сульфат марганца 0,5 г, хлорид калия 0,05 г, сульфат железа 0,015 г, сульфат меди 0,016 г, дрожжевой экстракт 0,1 г, pH = 7-7,2) при температуре 37 °C в течение 24 ч. Далее клетки центрифугировали при 10000 g в течение 30 минут на центрифуге Eppendorf 5804 r (Германия). К полученным 2 г образцам биомассы добавляли 3 мл смеси хлороформа и метанола в соотношении 1:2. Далее образец выдерживали на холоду в течение 1 часа, периодически помешивая. Повторно центрифугировали в течение 5 минут при 10000 g, добавляли в образец смесь хлороформа и метанола (1:2). Далее образец подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 минут. В качестве источника ультразвука использовали УЗ излучатель

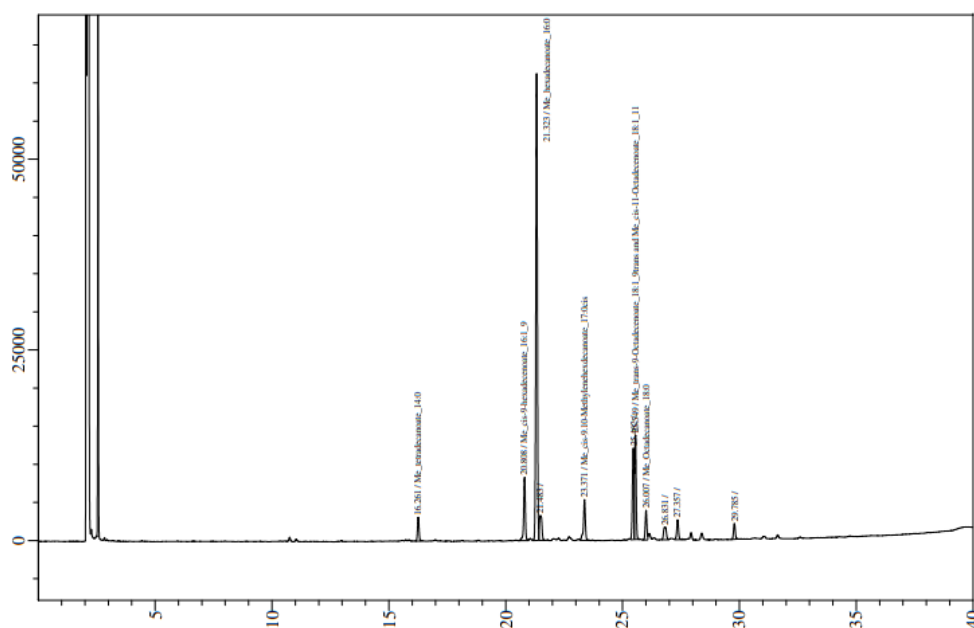


Рисунок 1. Результаты МЭЖК

Dinatron 125 (Dinatronics, США). Частота УЗ - 1 МГц, плотность мощности – 1,5 Вт/см² в непрерывном режиме. После центрифугирования (10000 g, 5 мин) к супернатанту добавляли смесь воды и хлороформа в соотношении 1:1, центрифугировали 15 минут при 6000 g. Отбирали нижний слой фосфолипидов. Экстракцию и отбор фосфолипидов проводили повторно три раза. С помощью методики определения общего фосфора по Беренблему и Чейну [5] установили, что концентрация фосфора в 100 мкл образца составляет 53,1 мкг/мл.

Определение состава и соотношения жирных кислот липида А осуществляли методом ГЖХ метиловых эфиров ЖК (МЭЖК). Метилирование жирных кислот липида А выполняли согласно методике, описанной в работе Mayer et al. [6]. Идентификацию жирных кислот липида А проводили по эталонным образцам фирмы Sigma (США) в процентах от суммы всех МЭЖК. Программирование температурного режима осуществляли в интервале от 130 до 250 °С со скоростью нагрева 4 °С/мин. Температура испарителя – 250 °С, температура детектора – 270 °С, скорость газа-носителя (He) 1,3 см³/мин; сброс 1:50.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) выполняли на газовом хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном капиллярными колонками DB-5 (Hewlett-Packard, США) и EQUITY-1 (Supelco, США) (рис. 1, табл. 1).

Результаты показали, что в составе липида А бактерий *E. coli* K-12 обнаружены шесть метиловых эфиров жирных кислот: метил гексадеканоеат, метил транс-9-октадеканоеат, метил цис-9-гексадеценоеат, метил цис-9,10-метиленгексадеканоеат, метил октадеканоеат и метил тетрадеканоеат. Более 60 % от общего объема всех эфиров жирных кислот составляет метил гексадеканоеат.

Для формирования монослоя готовили рабочий раствор нативных фосфолипидов в хлороформе с концентрацией $C=10^{-4}$ М [2]. Для исследования влияния объема аликвоты на формирование монослоя раствор вносили на поверхность воды в количествах $V=50, 100$ и 150 мкл. Монослой исследовали методом изотерм сжатия [7], рассчитанные зависимости модуля сжатия от удельной площади представлены на рисунке 2.

На зависимости давления и модуля сжатия от удельной площади можно видеть 3-4 участка, которые соответствуют состояниям молекул с плотной упаковкой.

Диапазоны удельных площадей, на которых формируются эти состояния $A = 0,58-0,64; 0,78-0,85; 0,98-1,10$ нм².

Таблица 2. Характеристика МЭЖК

Метиловые эфиры жирных кислот	Встречаемость в образце (%)
Метил гексадеканоеат	62,74
Метил транс-9-октадеканоеат	14,08
Метил цис-9-гексадеценоеат	9,11
Метил цис-9,10-метиленгексадеканоеат	6,75
Метил октадеканоеат	4,11
Метил тетрадеканоеат	3,21

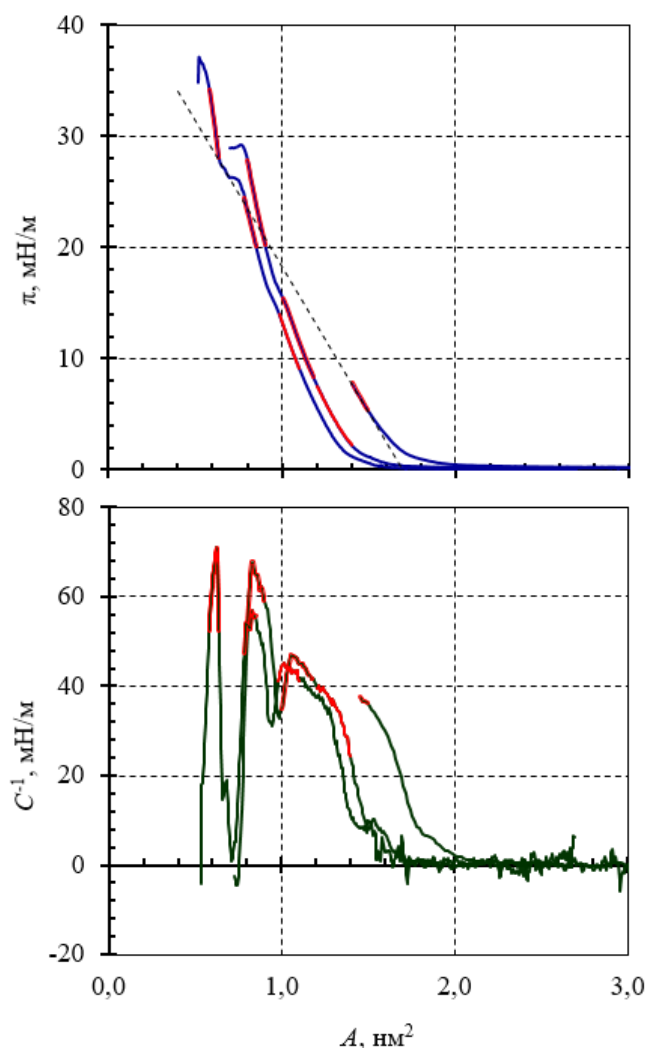


Рисунок 2. Изотермы (вверху) и модуль сжатия (внизу) монослоев

На рисунке 2 видно, что самое плотное первое (на изотерме слева направо) из плотноупакованных состояний формируется при минимальных значениях удельных площадей $A = 0,58-0,64 \text{ nm}^2$, для которых модуль сжатия максимален $C^{-1} = 97 \text{ мН/м}$, а рассчитанное A_0 в этом состоянии имеет величину около $0,90$ при очень низких давлениях порядка $2-5 \text{ мН/м}$ и при сжатии до величины удельной площади порядка $1,5-1,9 \text{ nm}^2$. Полученные значения для этого состояния имеют величины модуля сжатия меньше, чем для типичных фосфолипидов (дипальмитоил фосфатидилхолина) или классических ПАВ, например, из ряда жирных кислот (стеариновой, арахидиновой, олеиновой). Кроме того, по приведенным зависимостям видно, что существуют как минимум еще три состояния, в которых молекулы монослоя упаковываются в плотные структуры. На этих участках модуль сжатия имеет локальные максимумы, свидетельствующие о повышении механической прочности монослоя и его высокой стабильности. Площадь, приходящаяся на молекулу изучаемого фосфолипида, примерно в 4,5 раза больше сечения алифатической цепи $-(C_nH_{2n})-$ ($0,2 \text{ nm}^2$).

Таблица 2. Параметры монослоев нативных фосфолипидов

Параметры	V050ul	V100ul	V150ul
A_{min}	1,4	0,8	0,58
A_{max}	1,5	0,9	0,64
a	26,31	76,29	108,94
b	44,65	88,81	97,51
A_0	1,697	1,164	0,895
$C_0=K_0$	0,0224	0,0113	0,0103
$C_0^{-1}=\chi$	44,645	88,805	97,508

Таким образом, проведены исследования ленгмюровских монослоев нативных фосфолипидов, выделенных из клеточных мембран тест-культуры *E. coli* K-12. Результаты МЭЖК выявили, что в составе липида А исследуемых бактерий наиболее часто встречаются метил гексадеcanoат и метил транс-9-октадеcanoат, составляя 76,82 % от общего объема всех исследуемых эфиров жирных кислот. Исследование монослоев методом изотерм сжатия показало наличие как минимум трех устойчивых плотно упакованных состояний с высокой механической прочностью.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-73-20057).

Список литературы / References:

1. Ахметшина А.Э., Сироткин А.С. Анализ фосфолипидных жирных кислот микроорганизмов как биомаркеров окружающей среды. *Вестник казанского технического университета*, 2014, т. 17, № 19, с. 233-236. [Akmetshina A.E., Sirotkin A.S. Analysis of phospholipid fatty acids of microorganisms as biomarkers of the environment. *Bulletin of Kazan Technical University*, 2014, vol. 17, no. 19, pp. 233-236. (In Russ.)]
2. Sastre D.E., Basso L.G.M. et al. Membrane fluidity adjusts the insertion of the transacylase PlsX to regulate phospholipid biosynthesis in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.*, 2020, vol. 295, no. 7, pp. 2136-2147. doi: 10.1074/jbc.RA119.011122
3. Shrivastava R., Jiang X., Chng S.S. Outer membrane lipid homeostasis via retrograde phospholipid transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2017, vol. 106, no. 3, pp. 395-408. doi: 10.1111/mmi.13772
4. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*, 2020, т. 97, № 6, с. 594-603. [Andryukov B.G., Lyapun I.N. The importance of membrane phospholipids in the implementation of protective strategies in bacteria. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*, 2020, vol. 97, no. 6, pp. 594-603. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-10
5. Berenblum Y., Chain E. An improved method for colorimetric determination of phosphate. *Biochem. G.*, 1938, vol. 32, no. 2, pp. 295-298. doi: 10.1042/bj0320295
6. Mayer H., Tharanathan R.N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Meth. Microbiol.*, 1985, vol. 18, pp. 157-207. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70475-6
7. Qassime M.M. et al. A studying of subphase temperature and dissolved ascorbic acid concentration influence on the process of Langmuir monolayer formation. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2018, vol. 1124, p. 031010. doi: 10.1088/1742-6596/1124/3/031010

CHARACTERISTICS OF LANGMUIR MONOLAYERS OF PHOSPHOLIPIDS ISOLATED FROM CELL MEMBRANES *E. COLI* K-12 TEST CULTURES

Zubova K.V., Kuznetsova V.A., Al-Alvani A.Zh., Glinskaya E.V., Kanevsky M.V., Glukhovskaya E.G.

Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky
Astrakhan str., 83, Saratov, 410012, Russia; e-mail: zubovaksushechka@mail.ru

Abstract. The paper presents studies of Langmuir monolayers of native phospholipids isolated from the cell membranes of the *E. coli* K-12 test culture. Six fatty acid methyl esters were found in the composition of *E. coli* K-12 bacteria lipid A: methyl hexadecanoate, methyl trans-9-octadecanoate, methyl cis-9-hexadecenoate, methyl cis-9,10-methylene hexadecanoate, methyl octadecanoate and methyl tetradecanoate. To form a monolayer, a working solution of native phospholipids in chloroform with a concentration of $C=10^{-4}$ M was prepared. To study the effect of the aliquot volume of the working solution on the formation of the monolayer, phospholipids were introduced to the water surface in quantities $V=50, 100$ and $150 \mu\text{l}$. Monolayers were studied by the method of compression isotherms, the analysis of which showed the presence of at least three stable densely packed states with high mechanical strength.

Key words: native phospholipids, Langmuir monolayers, stable states.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ОКСИДА АЗОТА

Титов В.Ю.^{1,2}, Осипов А.Н.¹, Кочиш И.И.²

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова
ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: vtitov43@yandex.ru

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К.И. Скрябина
ул. Акад. Скрябина, 23, г. Москва, 109472, РФ; e-mail: kochish.i@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2021

Аннотация. При помощи высокочувствительного и высокоспецифичного ферментного сенсора показано, что в норме большинство живых тканей содержит не более 50-100 нМ нитрита и нитрозоаминов, но единицы и десятки микромолей соединений – доноров NO: S-нитрозотиолов (RSNO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), высокомолекулярные нитросоединения, способные трансформироваться в ДНКЖ (RNO₂). Следовательно, в норме живые ткани имеют механизмы предотвращения окисления NO кислородом до токсических продуктов. Доноры NO – стабильные соединения и, практически, не распадаются спонтанно с высвобождением NO. Основной пул доноров NO в большинстве тканей представлен ДНКЖ. NO может переходить с комплекса на мишень в момент деструкции комплекса под действием более эффективных хелаторов железа, чем лиганды, входящие в состав комплекса. При этом переход осуществляется с минимальным пребыванием NO в свободном состоянии. В случае, если комплекс подвергается воздействию эффективного хелатора железа, но мишень отсутствует, образуется железо-нитрозильный комплекс, содержащий этот хелатор. Мы предполагаем, что части апофермента некоторых ферментов – физиологических мишеней NO могут выступать в роли хелаторов – конкурентов. Таким образом, физиологический эффект соединений – доноров NO зависит не от их способности диссоциировать с высвобождением NO, но, прежде всего от наличия и состояния физиологической мишени. Не NO случайно находит мишень, а мишень, взаимодействует с донором – NO, вызывая его деструкцию и присоединяя NO. Также эффективность ДНКЖ как донора NO зависит от состава комплекса. Комплекс, содержащий лиганды с высоким сродством к железу, труднее разрушается хелатором железа, что необходимо для переноса NO к мишени. Это показано как на модельных системах, так и на живых организмах.

Ключевые слова: Оксид азота, динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ), лиганды ДНКЖ.

До сих пор отсутствуют методы, позволяющие осуществлять оперативный контроль содержания метаболитов NO в живых тканях и его изменения в ходе физиологических и патологических процессов. Предполагается, что основную часть соединений – депо (или соединений – доноров NO) в клетках составляют динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). Считается, что они продлевают физиологическое время жизни NO и непосредственно взаимодействуют с его физиологической мишенью [1-3]. Большинство ДНКЖ находятся в биядерной форме, не являющейся парамагнитной, и не могут быть определены методом ЭПР [1,3]. Прочие методы, основанные на использовании различных ловушек на NO, а также образовании комплексов с реагентами, не являются высокоспецифичными и не способны зафиксировать весь спектр метаболитов NO в живых тканях [4].

Разработанный нами ферментный сенсорный метод основан на обратимом ингибировании каталазы всеми нитрозосоединениями, исходно имеющими NO⁺ - группу, или приобретающими ее под действием ряда факторов. Галоид-ионы увеличивают эффективность ингибирования на два порядка. Нитрозосоединения теряют ингибирующие свойства под действием ряда веществ, специфичных для каждой их группы. Такой подход позволяет определять концентрацию S-нитрозотиолов, ДНКЖ, нитрита и нитрозоаминов с точностью до 50 нМ. Ингибирующий эффект других известных ингибиторов каталазы не обладает зависимостью от концентрации галоид – ионов. Прочие ингибиторы не содержатся в норме в живых тканях в количествах, достаточных для значительного ингибирования фермента [5,6]. Так как разложение перекиси водорода каталазой – высокоэкзотермичный процесс, контролировать его кинетику и определять активность фермента возможно с помощью высокочувствительного динамического калориметра. Такая методика не требует предварительной очистки образца, так как его окрашенность и мутность не являются помехами [6]. Нитрат определялся посредством восстановления хлоридом ванадия до нитрита и определения как последнего [6].

Таким образом мы имеем возможность оперативного контроля общей концентрации нитро- и нитрозосоединений и их состава, а также изменения этих параметров при различных физиологических и патологических процессах. Очевидно, что физиологический эффект, опосредуемый NO, должен быть сопряжен с переносом NO на какую-то мишень, что, в свою очередь, неизбежно приведет к изменению состава нитро – и нитрозосоединений. Имея возможность контролировать эти изменения, мы можем количественно определить расход NO в процессе, и изменение состава нитро- и нитрозосоединений, как эндогенно синтезированных, так и экзогенно введенных. На основании этих данных возможно предположить роль тех или иных структур в передаче NO на мишень. И ответить на вопросы: как обеспечивается специфичность воздействия NO и предохранение от

токсического воздействия продуктов его окисления кислородом – нитрита, диоксида азота, пероксинитрита. Это является целью данного исследования.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовался однозамещенный фосфат калия, цитрат калия, хлорид натрия, трилон Б, пероксид водорода "Лаверна" (Россия), каталаза, нитрит калия, глутатион, цистеин, L-аргинин, L-нитроаргинин (НА), гемоглобин "Sigma" (США). Препарат ДНКЖ/GSH получали по описанной ранее методике [6, 7]. Путем инкубации 0,1 М нитрита калия с 0,12 М водным раствором глутатиона и 0,1 М HCl (1:1:2, v/v) в течение 15 минут получали препарат S-нитрозоглутатиона (GSNO). Полученный препарат разводился 40 мМ Na-фосфатным буфером, pH 6,0, до концентрации 10 мМ. К полученному раствору GSNO добавлялся FeSO₄ до конечной концентрации 10 мМ, раствор центрифугировался при 2000 г для отделения и удаления излишка железа. Препарат ДНКЖ/Cys получали по аналогичной методике, но вместо глутатиона использовался цистеин. Препарат нитрозильного комплекса железа, содержащего цитрат, (НКЖ/цитрат) получали путем добавления к 10 мМ раствору ДНКЖ/GSH цитрата калия до конечной его концентрации 20 мМ [6]. Препарат Fe (NO)_n получали путем окисления ДНКЖ/GSH в системе пероксидазы хрена – H₂O₂ [8].

Гомогенаты эмбрионов на 5 сутки получали путем обработки содержимого яйца без скорлупы в стеклянном гомогенизаторе в присутствии физиологического раствора (8 мин, 40 фрикций/мин, 6 °C).

Для определения содержания нитро- и нитрозосоединений использовался ферментный сенсор [5, 6, 8]. Он основан на уникальной способности нитрита и других нитрозосоединений, имеющих в составе NO⁺-группу или приобретающую ее под воздействием ряда реагентов, ингибировать каталазу в присутствии галоид – ионов с примерно равной эффективностью, одинаково зависящей от pH – среды. Другие известные ингибиторы каталазы не обладают такими особенностями и в норме не встречаются в биообъектах в концентрациях, способных привести артефакты [6].

Определение активности каталазы осуществлялось калориметрическим методом, основанным на контроле кинетики теплопродукции, сопровождающей разложение пероксида водорода. Использовалась установка на основе прибора "Dithermanal" (Венгрия). Активность каталазы определялась по величине наклона начального прямолинейного участка кинетики. Концентрация нитрозосоединений определялась по степени ингибирования каталазы, согласно калибровочной кривой, полученной с использованием нитрита в различных концентрациях. [5,6].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) теряют ингибирующую способность в среде, содержащей хелатор железа и ловушку NO (гемоглобин). Именно по этому свойству судили о их наличии и концентрации. Ингибирование каталазы в присутствии хлорида говорит о наличии NO⁺-группы [5]. Эффект хелаторов железа – о связи нитрозо – группы с железом. Концентрацию ДНКЖ/GSH и ДНКЖ/Cys в маточных растворах определяли спектрофотометрически, используя $\varepsilon_{310} = 3000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [5]. Известно, что S-нитрозотиолы (RSNO) трансформируются в ДНКЖ под воздействием закисного железа [1,2,7]. Нами показано, что S-нитрозотиолы не теряют способности ингибировать каталазу в системе гемоглобин – хелатор железа, но теряют их в такой системе, если предварительно было добавлено закисное железо, так как трансформируются в ДНКЖ и приобретают их свойства [6]. S-нитрозотиолы определялись как соединения, трансформирующиеся в ДНКЖ/SH под воздействием закисного железа и тиолов и приобретающие их свойства. Нитрит (NO₂⁻) и нитрозоамины (R₁R₂NNO), практически, не продуцируют ДНКЖ в нейтральной среде и сохраняют ингибирующие способности при последовательном добавлении закисного железа, глутатиона, ловушки NO и хелатора железа. Их совокупное определение основано на этих свойствах [5,6]. Нитрозильные комплексы железа, не содержащие лиганды, кроме NO, либо содержащие таковые, но с очень низкой константой связывания (Fe-(NO)_n), определялись как соединения, исходно лишённые свойства ингибировать каталазу, но приобретающие ингибирующие свойства (ДНКЖ/SH) после добавления глутатиона в реакционную среду [8]. Высокомолекулярные нитросоединения, способные трансформироваться в ДНКЖ (RNO₂), определялись как соединения, приобретающие ингибирующие свойства ДНКЖ/SH под воздействием закисного железа и глутатиона [6]. Для определения общего пула нитросоединений использовалась их способность восстанавливаться треххлористым ванадием до нитрозо – состояния, в котором они приобретают способность ингибировать каталазу. Метод не нуждается в какой-либо предварительной подготовке образца, поскольку не основан на фотометрии. Чувствительность метода – 40 нМ [6].

Концентрация гемоглобина также определялась спектрофотометрически, используя $\varepsilon_{540} = 1,5\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [9].

Реакционная среда во всех случаях содержала 40 мМ фосфатный буфер, 158 мМ NaCl, 9,0 нМ каталазы, pH 6,0. Реакция запускалась путем добавления в среду 10 мМ пероксида водорода. Концентрация всех исследуемых соединений в реакционной среде – 0,25 мкМ; добавляемых реагентов: глутатиона (GSH), цистеина (Cys) о-фенантролина (о-фен) и прочих хелаторов железа – 0,5 мМ; гемоглобина (HbO₂) – 100 мкМ; FeSO₄ – 10,0 мМ. К 5,0 мкМ раствору исследуемого вещества в 40 мМ фосфатном буфере, pH 6,0 добавлялись реагенты с интервалом в 1 мин. После 5 мин. инкубации раствор переносили в реакционную среду. При этом исследуемое вещество разбавлялось в 20 раз.

Оплодотворенные куриные яйца породы мини-мясная и кросса Хайсекс белый, а также взрослые куры кросса Хайсекс белый получали в ООО «Генофонд». Для разведения вводимых в яйцо препаратов использовался

стерильный физиологический раствор. 10 мМ растворы препаратов вводились в яйца за 1 ч. до закладки на инкубацию через воздушную камеру в объеме 0,3 мл. Развитие эмбриона контролировалось путем овоскопии на 5 и 7 дни инкубации. Яйца, в которых не было развития эмбриона или имели место дефекты развития: отставание в развитии, кровь-кольцо, отбраковывались. Для инкубации использовался инкубатор ИПХ-10 (Россия). Температура в инкубационный период – 37,6 °С.

В экспериментах на взрослых курах забор крови осуществлялся в состоянии натошак после 16-часового голодания из подкрыльцовой вены в количестве 2-3 мл. В качестве антикоагулянта использовали 3,8%-й раствор цитрата натрия. Препараты вводились также в подкрыльцовую вену.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ BIOSTAT. Данные представлены в виде: среднее $\pm$ стандартное отклонение. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В большинстве тканей концентрация нитрита менее 50 нМ [6], в то время как концентрация соединений – доноров NO – единицы и десятки мкМ [3, 6]. Это можно объяснить либо тем, что нитрит быстро исчезает из тканей, либо тем, что он не образуется. Но нитрит в концентрации несколько мкМ может в течение по крайней мере часа инкубироваться в растворе гемоглобина – известной ловушки NO. При этом он не утрачивал присущих ему ингибирующих свойств, на основании которых определялся как нитрит (табл. 1(6)). Следовательно, он не окисляется до нитрата, который не ингибирует каталазу [6], и не восстанавливается с выделением NO. Основной пул доноров NO в большинстве тканей составляют ДНКЖ [2, 3, 6]. ДНКЖ, содержащие две молекулы глутатиона и две молекулы цистеина в качестве лигандов (соответственно, ДНКЖ/GSH и ДНКЖ/Cys), также не теряли соответствующих свойств ингибировать каталазу при инкубации с ловушкой NO гемоглобином (табл. 1 (1,2)). Следовательно, спонтанного распада с высвобождением NO эти соединения, практически, не испытывают.

Деструкция ДНКЖ может произойти под воздействием хелаторов железа. Так ДНКЖ/GSH теряет ингибирующие свойства в система гемоглобин – цистеин, гемоглобин – цитрат, гемоглобин – ЭДТА (табл. 1 (1)). ДНКЖ/Cys теряет способность ингибировать только в системах гемоглобин – цитрат и гемоглобин – ЭДТА (табл. 1 (2)). В случае добавления хелатора в отсутствие гемоглобина ДНКЖ сохраняли способность ингибировать каталазу, но теряли ее в системе, содержащей гемоглобин и более эффективный, чем прежде добавленный, хелатор железа. Так продукт, получаемый при инкубации ДНКЖ/GSH и цистеина терял ингибирующие свойства в системах гемоглобин – цитрат и гемоглобин – ЭДТА, а продукт, полученный в системе ДНКЖ/GSH+цитрат – только в системе гемоглобин + ЭДТА (табл. 1 (3 и 4)). Следовательно, в отсутствие гемоглобина под действием хелатора происходит не высвобождение NO с дальнейшим образованием нитрита, а образование нового комплекса с более мощным хелатором.

В гомогенате мышечных каркасов 1 дневных цыплят пул нитрозосоединений, практически, полностью представлен ДНКЖ с ингибирующими свойствами, аналогичными ДНКЖ/GSH (табл. 1 (5)).

Нитрит, не содержащий железа, не утрачивал ингибирующие свойства в системе ловушка NO – хелатор железа (табл. 1 (6)).

При окислении ДНКЖ/GSH пероксидазой [8], при воздействии на него видимого света [6], образуется не нитрит, а соединение, исходно не имеющее способности ингибировать каталазу, но приобретающее свойство

Таблица 1. Ингибирование каталазы S-нитрозотиолами и динитрозильными комплексами железа различного состава в присутствии ловушки NO (HbO₂) и различных хелаторов железа*

№	Соединение	Добавляемые реагенты					
		Контроль	HbO ₂	HbO ₂ + GSH	HbO ₂ + Cys	HbO ₂ + цитрат	HbO ₂ + ЭДТА
1	ДНКЖ/GSH	57,4 $\pm$ 2,1	58,2 $\pm$ 3,4	60,8 $\pm$ 4,3	101,3 $\pm$ 3,4	101,3 $\pm$ 3,4	101,3 $\pm$ 3,4
2	ДНКЖ/ Cys	56,8 $\pm$ 3,7	59,1 $\pm$ 2,9	58,9 $\pm$ 3,1	57,8 $\pm$ 3,8	102,2 $\pm$ 3,2	102,2 $\pm$ 3,2
3	ДНКЖ/GSH+Cys	58,1 $\pm$ 3,1	59,9 $\pm$ 4,0	59,9 $\pm$ 4,0	58,2 $\pm$ 4,2	99,4 $\pm$ 4,2	99,4 $\pm$ 4,2
4	ДНКЖ/GSH+цитрат	56,2 $\pm$ 3,7	57,2 $\pm$ 4,1	56,8 $\pm$ 3,9	58,1 $\pm$ 3,5	59,8 $\pm$ 3,9	100,8 $\pm$ 4,1
5	Гомогенат мышечного каркаса 1 дневного цыпленка**	56,4 $\pm$ 4,1	57,2 $\pm$ 3,8	58,3 $\pm$ 4,2	99,5 $\pm$ 3,7	99,5 $\pm$ 3,7	98,5 $\pm$ 3,7
6	NO ₂ ⁻	56,3 $\pm$ 3,1	57,7 $\pm$ 4,2	55,6 $\pm$ 3,9	56,8 $\pm$ 4,2	57,9 $\pm$ 3,4	56,6 $\pm$ 3,9
7	Fe(NO) _n	101,2 $\pm$ 5,1	99,8 $\pm$ 4,8	56,8 $\pm$ 3,7	58,7 $\pm$ 4,0	57,4 $\pm$ 4,1	57,9 $\pm$ 4,2
8	Fe(NO) _n + GSH	56,2 $\pm$ 3,6	56,7 $\pm$ 3,7	58,3 $\pm$ 3,8	100,3 $\pm$ 4,2	98,5 $\pm$ 4,3	102,2 $\pm$ 4,9

* В таблице приведены данные активности каталазы (%) в реакционной среде, содержащей исследуемые соединения и указанные реагенты. За 100% активность принималась активность фермента в реакционной среде в отсутствие исследуемых соединений.

** Использовался гомогенат мышечного каркаса и печени в физиологическом растворе в концентрации 600 нг. ткани/мл.

Таблица 2. Концентрация доноров NO и нитрата в гомогенатах птичьих эмбрионов (мкМ) на пятые сутки инкубации. Влияние препаратов ДНКЖ/GSH и ДНКЖ/Cys, добавленных перед инкубацией. *

№	Объект	RSNO	ДНКЖ	Fe(NO)n	RNO ₂	NO ₃ ⁻
1.	Эмбрион породы мини-мясная + 0,3 мл физраствора	<0,1	<0,1	1,5±0,7	4,1±0,9	121,1 ± 5,1
2.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра ДНКЖ/GSH	<0,1	<0,1	5,8±1,3	7,6±0,7	177,9±8,8
3.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра ДНКЖ/Cys	<0,1	54,8±4,9	1,4±0,9	4,4±1,5	126,1±7,7
4.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра НКЖ/цитрат	<0,1	56,3±4,1	1,6±0,8	4,2±0,8	120,5±8,1
5.	Эмбрион породы Хайсекс белый + 0,3 мл физраствора	4,8±0,6	<0,1	12,5±2,6	128,3±6,1	<0,1
6.	+0,3 мл 10,0 мМ р-ра ДНКЖ/GSH	3,1±0,8	44,6±6,3	18,3±3,3	132,1±5,1	<0,1

*Концентрация NO₂ + RNO во всех образцах <0,1 мкМ.

ингибировать каталазу при добавлении хелаторов железа и теряет его в системе гемоглобин – более эффективный хелатор (табл. 1 (7, 8)). Такие соединения обнаружены нами в крови некоторых животных [6]. Так как мы не можем количественно определить состав этих соединений, но, очевидно, что они содержат NO-группу и железо, мы представляем их как Fe(NO)n.

В гомогенатах эмбрионов разных пород линий и кроссов птиц примерно одинаково общее содержание нитро- и нитрозосоединений, но различно соотношение доноров NO и нитрата. Так на пятые сутки инкубации в гомогенате эмбриона породы мини – мясная преобладает нитрат, а в составе нитро- и нитрозосоединений гомогената кросса Хайсекс белый преобладали соединения – доноры NO (табл. 2 (1 и 5)). Нами показано, что синтезируемый в эмбрионе оксид азота включается в состав соединений – доноров, но с вторых – третьих суток эти соединения в эмбрионах одних пород, линий и кроссов претерпевают окисление до нитрата, а в других накапливаются. Степень окисления NO коррелирует со скоростью постэмбрионального роста мышечной ткани [10]. ДНКЖ/GSH, экзогенно введенный в эмбрион мини – мясной породы до закладки на инкубацию, полностью окислился к пятым суткам до нитрата (табл. 2 (2)). Это видно по соотношению общего пула доноров NO (RSNO, ДНКЖ/SH, Fe(NO)n и RNO₂) и нитрата. В то же время ДНКЖ/Cys и продукт взаимодействия ДНКЖ/GSH и цитрата (НКЖ/цитрат) не окислялись. Они сохранялись как соединения, теряющие ингибирующие свойства в системе гемоглобин – ЭДТА. Концентрация нитрата не увеличивалась (табл. 2 (3, 4)). Но в эмбрионе Хайсекс белый ДНКЖ/GSH к пятым суткам, практически, полностью сохранился как ДНКЖ. Концентрация нитрата не увеличилась (табл. 2 (6)).

В крови взрослых кур пул доноров NO представлен соединениями типа Fe (NO)n. Внутривенный ввод аргинина – субстрата NO – синтазы вызывал кратковременное увеличение их концентрации. При этом достоверного увеличения концентрации других соединений – доноров оксида азота зарегистрировано не было (табл. 3). Но кратковременное увеличение содержания Fe (NO)n вызывало кратковременное впадение животного в обморочное состояние, вызванное, по-видимому, снижением тонуса сосудов под действием NO. Под действием L-нитроаргинина (НА) происходило, наоборот, снижение содержания Fe (NO)n (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных данных следует, что оксид азота в живых тканях в свободном состоянии находится минимальное время. Он находится в составе соединений – доноров, в которые включается, по-видимому,

Таблица 3. Содержание доноров NO и нитрата в крови 7 месячных несушек Хайсекс белый. Влияние внутривенных введений аргинина, нитроаргинина (НА)*

Вводимый препарат (0,5 мл)	Концентрация, мкМ					
	Fe (NO)n	нитрат	Fe (NO)n	нитрат	Fe (NO)n	нитрат
	До ввода		Через 7 минут		Через 20 минут	
ф-р	10,4±0,3	123,5±8,7	10,8±0,4	126,5±8,8	10,6±0,4	125,7±9,5
40 мМ НА	9,8±0,4	119,5±9,4	4,9±0,5	78,2±9,4	9,3±0,5	110,6±9,6
140 мМ аргинин	10,9±0,5	121,6±8,9	75,9±5,8	129,4±10,1	12,9±0,5	137,9±10,6

* Концентрация RSNO, ДНКЖ, RNO₂, NO₂ + RNO во всех образцах <0,1 мкМ

сразу после синтеза, что предохраняет его от окисления кислородом до нитрита. В норме большинство тканей содержит нитрит в концентрации не более 50 нМ (табл. 2). Резкая интенсификация синтеза NO в крови после ввода аргинина не сопровождалась ростом концентрации нитрита. Увеличивалась концентрация соединений – доноров NO (табл. 3).

Доноры NO спонтанно, практически, не диссоциируют с высвобождением NO. В модельной системе показана способность ДНКЖ, составляющих основной пул доноров NO в большинстве тканей [2,3], лишаться NO группы под действием хелаторов железа, сродство которых к нему превышает сродство лигандов, находящихся в составе комплекса, если в системе присутствует ловушка NO: гемоглобин (табл. 1). Это следует из факта утраты способности ингибировать каталазу в такой системе. В случае, если ловушки нет, образуется комплекс, который не лишается способности ингибировать фермент, то есть NO – группа существует и доступна для каталазы (табл. 1). Образовавшийся комплекс теряет способность ингибировать в системе ловушка NO – хелатор, имеющий еще большее сродство к железу (табл.1). То есть комплекс сохранил NO – группу и железо. В реакционной среде после добавления хелатора к комплексу не появляется нитрит. Следовательно, происходит перестройка комплекса без выхода, или с минимальным, по времени, выходом NO в окружающую среду. NO – группа способна перейти на мишень, имеющую к ней химическое сродство, в момент ослабления ее связи с железом. Последнее происходит в момент перестройки комплекса под действием хелатора железа. Заметим, что игра хелаторов типа глутатион - цистеин вполне может иметь место в условиях *in vivo*. Мы предполагаем, что в роли хелаторов – конкурентов могут выступать части апофермента тех энзимов, на которые оказывает воздействие NO: гуанилат – циклаза [7, 11], каспаза [12-14]. Переход оксида азота через биологические мембраны может осуществляться путем такого же взаимодействия со структурой, выполняющей функцию переносчика.

Нитрозотиолы не теряют ингибирующие свойства при инкубации с гемоглобином. Но при добавлении железа они приобретают все свойства ДНКЖ, поскольку трансформируются в динитрозильные комплексы железа [6, 8]. Высокмолекулярные нитросоединения типа нитроглицерина, нитротирозина (RNO_2) приобретают свойства ДНКЖ под воздействием железа и тиолов [6, 15, 16]. Показано, что физиологическая эффективность соединений – доноров NO зависит от концентрации железа в тканях [14]. Это тоже говорит о том, что структурой, взаимодействующей с физиологической мишенью, является ДНКЖ.

Таким образом, физиологическая эффективность соединений – доноров NO зависит прежде всего от наличия физиологических мишеней NO, или их состояния. Не NO случайно находит мишень, а мишень, взаимодействует с донором – NO, вызывая его деструкцию и присоединяя NO. Это продемонстрировано на куриных эмбрионах. В таблице 2 представлены данные о концентрации доноров NO и нитрата в гомогенатах эмбрионов кур породы мини – мясная и кросса Хайсекс белый. Экзогенно введенный перед закладкой на инкубацию ДНКЖ/GSH, практически, не окислялся в эмбрионе кросса Хайсекс белый и, практически, полностью окислялся до нитрата в эмбрионе кросса Смена 8. В то же время ДНКЖ/Cys не окислялся, а сохранялся в виде ДНКЖ/SH. Следовательно, какой-то физиологический эффект NO в составе ДНКЖ/Cys в данном случае производить не может. По-видимому, комплекс, имеющий лиганды с высоким сродством к железу, труднее поддается деструкции, необходимой для передачи NO на мишень. ДНКЖ, содержащиеся в гомогенате тканей цыпленка, по способности терять способность ингибировать в системе ловушка – хелатор, соответствуют ДНКЖ/GSH, но не ДНКЖ/Cys (табл.1).

С этой точки зрения интерес представляет комплекс, не содержащий тиоловых лигандов Fe(NO)_n . Он исходно не способен ингибировать каталазу, но при добавлении указанных в таблице 1 хелаторов железа приобретает способность ингибировать, аналогичную ДНКЖ с соответствующими лигандами. Следовательно, комплекс исходно содержит железо и NO – группы. В дистиллированной воде этот комплекс быстро распадается, но в фосфатном буфере, а также в живых тканях относительно стабилен [6]. По-видимому, для его существования необходимы какие-то лиганды железа, пусть и с относительно низким сродством к нему.

Комплексы типа Fe(NO)_n были обнаружены нами в крови птиц. Там они составляют основу пула доноров NO. Их концентрация достигает нескольких мкМ (табл.3). При резкой интенсификации синтеза NO, вызванной введением субстрата его синтеза аргинина наблюдается резкое увеличение концентрации Fe(NO)_n (табл.3). Заметим, что внутриклеточный пул доноров NO представлен, преимущественно, ДНКЖ, имеющими ингибирующие свойства ДНКЖ/GSH (табл.1). Вполне возможно, что соединения типа Fe(NO)_n , проникая в клетки, где содержится глутатион в концентрации нескольких мМ [17], превращаются в ДНКЖ, содержащие тиоловые лиганды и способные взаимодействовать с физиологическими мишенями NO. Сами Fe(NO)_n , исходя из предложенного нами механизма взаимодействия NO с мишенью, не могут осуществлять такое взаимодействие (табл. 1).

Таким образом, не NO случайно находит мишень, а мишень, взаимодействует с донором – NO, вызывая его деструкцию и присоединяя NO. Так может обеспечиваться специфичность физиологического воздействия NO. Спонтанно соединения – доноры NO, практически, не диссоциируют с образованием свободного NO. Этим обеспечивается защита от образования токсичного нитрита. Также эффективность ДНКЖ как основного донора NO зависит от состава комплекса. Комплекс, содержащий лиганды с высоким сродством к железу, труднее разрушается хелатором железа, что необходимо для переноса NO к мишени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 20-016-00204-а.

Список литературы / References:

1. Vanin A., Borodulin R., Mikoyan V. Dinitrosyl iron complexes with natural thiol-containing ligands in aqueous solutions: Synthesis and some physico-chemical characteristics (A methodological review). *Nitric Oxide*, 2017, vol. 66, pp. 1-9. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.005.
2. Vanin A. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a "working form" of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, 2016, vol. 54, pp. 15-29. doi: 10.1016/j.niox.2016.01.006
3. Hickok J.R., Sahni S., Shen H., Arvind A., Antoniou C., Fung L.W., Thomas D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, vol. 51, no. 8, pp. 1558-1566. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.030
4. Tarpey M., Wink D., Grisham M., Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2004, vol. 286, pp. R431-R444. doi:10.1152/ajpregu.00361.2003.
5. Titov V., Osipov A. Nitrite and Nitroso Compounds can serve as Specific Catalase Inhibitors. *Redox Rep*, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 91-97. doi: 10.1080/13510002.2016.1168589.
6. Titov V. The Enzymatic Technologies Open New Possibilities for Studying Nitric Oxide (NO) Metabolism in Living Systems. *Current Enzyme Inhibition*, 2011, vol. 7, no. 1, pp. 56-70. doi: 10.2174/157340811795713774.
7. Severina I., Bussygina O., Pyatakova N., Malenkova I., Vanin A. Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors--S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2003, vol. 8, pp. 155-163. doi: 10.1016/s1089-8603(03)00002-8
8. Titov V.Y., Kosenko O.V., Starkova E.S., Kondratov G.V., Borkhunova E.N., Petrov V.A., Osipov A.N. Enzymatic Sensor Detects Some Forms of Nitric Oxide Donors Undetectable by Other Methods in Living Tissues. *Bull Exp Biol Med.*, 2016, vol. 162, no. 1, pp. 107-110. doi: 10.1007/s10517-016-3557-1.
9. Титов В.Ю., Петренко Ю.М., Петров В.А., Владимиров Ю.А. Механизм окисления оксигемоглобина, индуцированного перекисью водорода. *Бюлл. exper. биол. мед.*, 1991, том 112, № 7, с. 46-49.
[Titov V., Petrenko Yu., Petrov V., Vladimirov Yu. Mechanism of oxyhemoglobin oxidation induced by hydrogen peroxide. *Biull Eksp Biol Med.*, 1991, vol. 112, no. 7, pp. 46-49. (In Russ)]
10. Titov V., Dolgorukova A., Fisinin V., Borkhunova Ye., Kondratov G., Slesarenko N., Kochish I. The role of nitric oxide (NO) in the body growth rate of birds. *World Poultry Science Journal*, 2018, vol. 74, pp. 675-686. doi: org/10.1017/S0043933918000661
11. Stalmer J., Singel D., Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 1992, vol. 258, pp. 1898-1902. doi: 10.1126/science.1281928.
12. Rossig L., Fichtlscherer B., Breitschopf K., Haendeler J., Zeiher A., Mulsch A., Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 11, p.6823-6826. doi: 10.1074/jbc.274.11.6823.
13. Dimmeler S., Haendeler J., Nehls, M., Zeiher A. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 185, no. 4, pp. 601-607. doi: 10.1084/jem.185.4.601.
14. Kim Y-M., Chung H-T., Simmons R., Billiar T. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, no. 15, pp. 10954-10961. doi: 10.1074/jbc.275.15.10954.
15. Schopfer F., Baker P., Giles G., Chumley Ph., Batthyany C., Crawford J., Patel R., Hogg N., Branchaud B., Lancaster J., Freeman B. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 19, pp. 19289-19297. doi: 10.1074/jbc.M414689200
16. Lima E., Bonini M., Augusto O., Barbeiro H., Souza H., Abdalla D. Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic. Biol. & Med.*, 2005, vol. 39, no. 4, pp. 532-539. doi: 10.1016/j.freeradbiomed
17. Forman H., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.*, 2009, vol. 30, no. 1-2, pp. 1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006

PROPOSED MECHANISM OF REGULATION OF THE PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF NITRIC OXIDE

Titov V.Yu.^{1,2}, Osipov A.N.¹, Kochish I.I.²¹ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovityanova str. 1, Moscow, 117997, Russia; e-mail: vtitov43@yandex.ru² Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA n. a. K.I. Skryabin
Scryabina str. 23, Moscow, 109472, Russia; e-mail: kochish_i@mail.ru

Abstract. By means of highly sensitive and specific enzyme sensor it was shown, that most of living tissues contain less than 50-100 nM of nitrite and nitrosamines and up to tens of μM of NO donors – S-nitrosothiols (RSNO), dinitrosyl iron complexes (DNIC) and high molecular weight nitrocompounds, that can turn to DNIC (RNO_2). This fact means that living tissues can prevent NO oxidation to produce toxic compounds. NO donors – are stable compounds and they are not spontaneously decomposed with free NO release. The main pool of NO donors in most tissues is represented by DNIC. NO can transfer from the complex to the target at the moment of the complex destruction under the action of more effective iron chelators than the ligands of the DNIC. The transition is carried out with a minimum stay of NO in the free state. If the complex is exposed to an effective iron chelator, but there is no target, an iron-nitrosyl complex containing this chelator is formed. We assume, that some parts of the apoenzymes of NO targets can play the role of competitive chelators. Therefore, the physiological effect of NO donors depend not on their ability to produce free NO, but on the presence and characteristics of the physiological target. Not free NO accidentally finds the target, but the target, interacts with the NO donor causing its destruction and attaching NO. The effectiveness of DNIC as NO donor also depends on the DNIC structure and the ligand type. DNIC containing ligands with a high affinity for iron is more difficult to destroy by an iron chelator, which is necessary for the transfer of NO to the target. These effects were demonstrated both in model systems and living organisms.

Key words: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes (DNIC), DNIC ligands.

АППАРАТ ХРОНОФИЗИОТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПУТЁМ УСТРАНЕНИЯ ДЕСИНХРОНОЗА

Зарубин В.Н.

ООО «Международный центр «Рубин»

Ул. Иванова, д. 30А, оф. 94, г. Новосибирск, 630117, РФ; e-mail: mcrubin@bk.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2021

Аннотация. В работе рассматриваются вопросы повышения эффективности и безопасности лечения широкого спектра заболеваний на базе хронобиологического подхода к управлению функциональным состоянием организма путём воздействия на его биоритмы определённой частотой ЭМП. В основе подхода лежат следующие закономерности: принцип ритмичности биологических процессов; принцип сопряжения биопроцессов и биоритмов; и явление усвоения внешних ритмов живыми организмами. Согласно принципу ритмичности, все биопроцессы имеют свои биоритмы. Поэтому при заболевании нарушение биопроцессов в организме сопровождается отклонением их биоритмов от нормы – десинхронозом. Таким образом, лечить болезни можно не только методами фармакотерапии, но и хронофизиотерапии путём устранения десинхроноза. Однако на рынке нет аппаратных методов лечения десинхроноза. На основе явления усвоения внешних ритмов и принципа сопряжения биопроцессов и биоритмов разработан метод ресинхронизации биоритмов: лечения заболеваний путём коррекции отклонений, возникших в биоритмах больного организма. В качестве внешнего синхронизатора используется соответствующая частота ЭМП. Для внедрения метода в медицинскую практику создан аппарат хрономагнитотерапии, который одновременно реализует две функции лечения: хронотерапию и магнитотерапию. Функция хронотерапии реализует новый принцип лечения, лечебным фактором в котором является частотная составляющая ЭМП из определённого диапазона биоритмов здорового организма. А функция магнитотерапии реализует вспомогательный метод, лечебным фактором которого является магнитная составляющая ЭМП. Аппарат не оказывает побочного действия на организм, и эффективность лечения на нём, по сравнению с методами фармакотерапии, увеличивается на 15%.

Ключевые слова: биопроцесс, биоритм, хронопатология, десинхроноз, хронофизиотерапия, метод ресинхронизации биоритмов, аппарат хрономагнитотерапии.

Согласно свойству ритмичности живой материи все биопроцессы, протекающие в организме, периодически повторяются, т.е. имеют свои биоритмы [1]. Таким образом, принцип ритмичности биопроцессов это проявление свойства ритмичности живой материи на всех структурных уровнях организации биологических системах. В общем случае под биоритмами понимаются автоколебания различных процессов, явлений, состояний организма в определённых диапазонах частот, пределы которых ограничиваются существующими в биологических системах обратными связями. На органном уровне это частота дыхания или сердечных сокращений, на тканевом уровне – интегральная частота определённого типа клеток, например, альфа-ритм, бета-ритм отдельных участков коры головного мозга. На клеточном уровне это частота чередования циклов химических реакций синтеза и расщепления веществ.

Вся совокупность биоритмов в организме объединяется одним понятием «хроном». Исходя из выше изложенного, дадим ему следующее определение: хроном это комплексная многоуровневая иерархическая мульти частотная синхронизированная автоколебательная система в структуре организма, которая синхронизована с внешними ритмами. Из этого следует, что организм человека, как единое целое, может существовать только при определенном соотношении разных колебательных процессов в клетках, тканях, органах, функциональных системах и их синхронизации с условиями окружающей среды. Ключевым словом в этом определении является «синхронизация». Синхронизация этих ритмов иерархически осуществляется эндокринной и нервной системами. Основными синхронизаторами ритмики организма принято считать супрахиазматические ядра (СХЯ) гипоталамуса и эпифиз, которые, в свою очередь, подстраивают свою ритмическую активность под внешние ритмы, обеспечивая организму оптимальные условия функционирования.

В норме между ритмическими процессами внутри организма, либо между биоритмами и средовыми задающими ритм факторами существуют установившиеся фазовые соотношения. Рассогласование их получило название десинхроноза. Возникновение десинхронии на любом уровне и между ними сопровождается функциональными нарушениями в организме

Из принципа ритмичности следует взаимозависимость биологических процессов и их биоритмов. Эта взаимосвязь реализует фундаментальный принцип «сопряжения», который отражает взаимное влияние процессов и явлений, происходящих на всех уровнях структурной и функциональной организации биологической формы развития материи. Согласно этому принципу при заболевании в организме возникают две взаимосвязанные (сопряжённые) патологии: физиопатология – нарушение биопроцессов, которая сопровождается хронопатологией – отклонением их биоритмов от нормы – десинхронозом. Таким образом, все заболевания сопровождается десинхронозами и представляют собой комбинацию двух взаимозависимых

патологий: хронофизиопатологию, лечить которую можно как методами фармакотерапии, так и хронофизиотерапии. Согласно сопряжению этих патологий, устранение одной из них будет сопровождаться устранением другой. Это открывает новые возможности в области медицинской биофизики: лечение заболеваний путём коррекции отклонений, возникших в биоритмах больного организма, и устранения десинхронозов.

В настоящее время методы фармакотерапии являются основными при лечении большинства заболеваний, в т.ч. и десинхронозов. На практике это происходит следующим образом. В результате медикаментозной терапии происходит восстановление нарушенных биопроцессов, которое, согласно принципу сопряжения, сопровождается нормализацией их биоритмов, устранением десинхроноза и выздоровлением организма. Недостатком этих методов является значительное побочное воздействие на организм снижающее эффективность и безопасность лечения. В связи с полипрагмазией, смертность от развития побочных лекарственных реакций, по данным ВОЗ, выходит на 4-е место после смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы, онкозаболеваний и травм. В свою очередь, существующие методы физиотерапии, использующие аппараты электромагнитного воздействия, разработанные без учёта роли биоритмов в организме, не позволяют лечить десинхронозы. Таким образом, проблема заключается в отсутствии аппаратных методов коррекции биоритмов больного организма.

С целью решения этой проблемы разработан и запатентован метод ресинхронизации (восстановления) биоритмов больной ткани на основе явления усвоения ритма живыми организмами [2]. Явление усвоения ритма это механизм адаптации живых организмов к периодическим изменениям внешней среды, позволяющий им эффективно функционировать в ритмично изменяющемся мире и регулировать их биоритмы внешними синхронизаторами. Оно характеризует способность тканей, органов и организма в целом перестраивать свои биоритмы под воздействием внешних ритмов и сохранять эти изменения после окончания воздействия.

Это явление можно наблюдать в организме на следующих примерах. После перелёта на самолёте нескольких часовых поясов в организме происходит нарушение циркадного (суточного) биоритма, возникает недомогание, слабость, сонливость и т. д. Такое отклонение от нормы биоритмов функциональных систем называется острым десинхронозом (джетлаг). Считается, что нормализация нарушенных процессов происходит в результате приспособления организма к функционированию в новых географических условиях. Однако сам механизм такого приспособления научного объяснения не получил. В действительности же лечение десинхроноза осуществляется суточными ритмами в данной географической точке земли, куда человек прилетел. В течение нескольких суток, в результате «геофизической хронотерапии», происходит усвоение ритма, и организм перестраивается на новый суточный ритм. Сначала перестраиваются биоритмы центральной нервной системы, затем гормональной, пищеварительной и в последнюю очередь мочеполовой. Таким образом, происходит устранение десинхроноза и связанных с ним дисфункций.

Второй пример связан с лечением диссинхронии сердца. В здоровом сердце сокращения предсердий и желудочков происходят последовательно и синхронно. На фоне различных заболеваний эта синхронизация нарушается и возникает сердечная недостаточность. Одним из наиболее эффективных методов лечения диссинхронии является электрокардиостимуляция сердца. Суть методики заключается в использовании внешнего синхронизатора. В организм имплантируется кардиостимулятор, который через прикреплённые электроды контролирует работу сердца и помогает его камерам сокращаться синхронно. Этот метод носит название «сердечная ресинхронизирующая терапия» (СРТ). При этом вопрос о механизме влияния СРТ на диссинхронию сердца до сих пор остаётся не ясным, и решение сводится к подбору оптимальных параметров стимулятора. На самом деле ответ лежит на поверхности: благодаря усвоению заданного базального ритма, оптимизируется работа сердца и восстанавливается его насосная функция.

В нашем случае в качестве источника внешних ритмов используется электромагнитное поле (ЭМП) частотой биоритмов здоровой ткани, в которой возник патологический процесс [3]. Принцип лечения заключается в следующем. Если на больную ткань подействовать ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, то, в результате явления усвоения ритма, биоритмы больной ткани перестроятся на частоту биоритмов здоровой ткани, произойдёт синхронизация биоритмов и устранение десинхроноза, а это, согласно сопряжению патологий, приведёт к восстановлению нарушенных биопроцессов (устранению физиопатологии) и выздоровлению [4]. Использование частотной составляющей ЭМП из диапазона биоритмов здоровой ткани, в которой возникла патология, является необходимым и достаточным условием для возникновения явления усвоения ритма только в больной ткани. Таким образом, в результате прямого (целевого) частотного воздействия на биоритмы больной ткани в организме отсутствует побочный терапевтический эффект. Метод относится к прорывным технологиям и реализует одну из сквозных технологий НТИ: «Управление свойствами биологических объектов».

Для реализации этого метода разработан и запатентован аппарат хронофизиотерапии [5], который представляет собой аппаратно-программный комплекс (АПК) хрономагнитотерапии (ХМТ) с двумя функциями лечения: хронотерапии и магнитотерапии. Функция хронотерапии реализует основной метод лечения: аппарат генерирует заданную частоту из соответствующего диапазона биоритмов здорового организма, в результате чего в больной ткани возникает явление усвоения ритма, запускается процесс ресинхронизации биоритмов и устранения десинхроноза. Это сопровождается восстановлением нарушенных биопроцессов и выздоровлением организма. Функция магнитотерапии реализует вспомогательный метод лечения, который за счёт реологического эффекта оказывает на организм дополнительное стимулирующее воздействие и тем самым ускоряет процесс выздоровления. На аппарат получено регистрационное удостоверение Росздравнадзора.

Следует отметить, что в медицинской практике давно известна зависимость эффективности лечения методами электро- и магнитотерапии от частоты ЭМП. Врачи физиотерапевты хорошо знают, что при обычной магнитотерапии или электротерапии динамика лечения любого заболевания на разных частотах разная: на одних частотах она положительная и достигает 60%, на других вообще отсутствует и составляет порядка 30%, а на третьих отрицательный эффект наблюдается в 10% случаев. С позиции магнитотерапии или электротерапии, без учёта роли биоритмов в организме, такую частотную зависимость специалисты объяснить не могли, поскольку магнитная или электрическая составляющие ЭМП присутствуют на любой частоте.

При отсутствии теоретического обоснования, разработчики эмпирическим путём стали подбирать, так называемые, целебные резонансные частоты и появились методы биорезонансной терапии, структурно-резонансной (электро- и электромагнитной) терапии, частотно-резонансной и т. п. с высокой положительной динамикой лечения отдельных заболеваний. Этот факт нашёл своё отражение, в частности, в методических рекомендациях и медицинских пособиях по применению метода биорезонансной терапии утверждённых МЗ РФ. В них указывается на наличие эффективных резонансных частот для лечения отдельных нозологий. Проведённый нами анализ этих частот показал, что они находятся в соответствующих диапазонах биоритмов здоровых тканей, в которых возникли патологические процессы. Таким образом, эффективность разработанной нами хронотехнологии (метод + аппарат) подтверждается не только теоретическими исследованиями и клиническими испытаниями, но и результатами, полученными при лечении различных заболеваний методом биорезонансной терапии в медицинских учреждениях МЗ РФ. А высокая эффективность лечения, которая с позиции явления резонанса объяснения не находит, объясняется явлением усвоения больным организмом биоритмов здорового организма.

Разработчики метода биорезонансной терапии утверждают, что лечение осуществляется частотами, вызывающими резонансный отклик в организме при воздействии ЭМП на соответствующие биологически активные точки. Но это косвенный метод и резонансный отклик могут вызывать частоты, как из диапазона биоритмов здоровой, так и больной ткани. Во втором случае такие частоты, в результате усвоения ритма, вызовут в здоровой ткани десинхроноз или обострение заболевания. Таким образом, эти методы уже по определению не могут гарантировать отсутствие побочного эффекта на организм.

С этой же позиции частотная зависимость эффективности лечения объясняется следующим образом. При воздействии на организм рабочей (резонансной) частотой ЭМП из диапазона биоритмов здоровой ткани, происходит усвоение ритма здоровой ткани и наблюдается положительная динамика лечения. При воздействии частотой ЭМП из диапазона биоритмов больной ткани, происходит усвоение ритма больной ткани и наблюдается отрицательная динамика лечения (ухудшение состояния пациента). Если частота ЭМП не попадает в эти диапазоны биоритмов, то происходит воздействие на ткань только магнитной (или электрической) составляющей ЭМП, которая оказывает оздоравливающее воздействие на организм в результате реологического эффекта.

Разработанный аппарат ХМТ обладает следующими конкурентными преимуществами.

1. На рынке отсутствуют аппараты с функцией хронотерапии, в которых лечебным фактором является частотная составляющая ЭМП (нет прямых аналогов).

2. В результате целевого частотного воздействия на биоритмы больной ткани, отсутствует побочное действие на организм и обеспечивается безопасность лечения.

3. Отсутствие побочных эффектов и многофакторное воздействие на больной организм позволяет повысить эффективность лечения на 15% по сравнению с методами фармакотерапии.

4. Аппарат находится в одном ценовом диапазоне с функциональными аналогами: аппаратами магнитотерапии такого же класса.

Хронофизиотерапевтический подход к лечению заболеваний характеризует хрономедицину как новое направление в медико-биологической науке и практике, и является основой для перехода медицины в целом на более высокий качественный уровень.

Научная новизна и отсутствие конкурентов на рынке подтверждаются заключением международной Экспертной коллегии Фонда развития инновационного центра «Сколково», НП ТП «Медицина будущего» и финского экспертного центра Kasve Ltd.

Список литературы / References:

1. Загускин С.Л. *Ритмы клетки и здоровье человека*. Монография. Южный федеральный ун-т. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2010, 292 с. [Zaguskin S.L. *Cell Rhythms and Human Health*. Monograph. Southern Federal University. Rostov-on-Don: SFedU Publishing House, 2010, 292 p. (In Russ.)]
2. Ухтомский А.А. *Усвоение ритма в свете учения о парабозе*. Избранные труды. Под редакцией Е.М. Крепса. Серия «Классики науки». Ленинград: Издательство «Наука», 1978, 360 с. [Ukhtomskiy A.A. *Assimilation of rhythm in the light of the doctrine of parabiosis*. Selected works. Edited by E.M. Krepsa. Series "Classics of Science". Leningrad: Publishing house "Science", 1978, 360 p. (In Russ.)]
3. Бабич П.И., Зарубин В.Н. Управление биопроцессами путём воздействия ЭМП на их биоритмы. *VI Международная конференция молодых учёных: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов*, 2020. Раздел 2. «Биофизика»: Сб. тез. АНО «Инновационный центр Кольцово». Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2020. с. 191-192. [Babich P.I., Zarubin V.N. Management of bioprocesses by the impact of EMFs on their biorhythms. *VI International Conference of Young Scientists: Biophysicists, Biotechnologists, Molecular Biologists and*

Virologists, 2020. Section 2. "Biophysics": Sat. thesis. ANO "Koltsovo Innovation Center". Novosibirsk: IPC NSU, 2020, pp. 191-192. (In Russ.)]

4. Зарубин В.Н. *Способ терапевтического воздействия низкочастотным импульсным ЭМП*. Патент РФ на изобретение № 2616330. [Zarubin V.N. *Method of therapeutic exposure to low-frequency pulsed EMF*. RF patent for invention no. 2616330. (In Russ.)]

5. Зарубин В.Н., Семин М.М. *Магнитоимпульсный низкочастотный терапевтический аппарат*. Патент РФ на полезную модель № 120878. [Zarubin V.N., Semin M.M. *Magnetic impulse low-frequency therapeutic apparatus*. RF patent for a useful model № 120878. (In Russ.)]

CHRONOPHYSIOTHERAPY DEVICE FOR TREATMENT OF DISEASES BY ELIMINATING DESYNCHRONOSIS

Zarubin V.N.

International Center "Rubin" LLC

Ivanova str., 30A, office 94, Novosibirsk, 630117, Russia; e-mail: mcrubin@bk.ru

Abstract. The paper discusses the issues of increasing the effectiveness and safety of treatment of a wide range of diseases on the basis of a chronobiological approach to managing the functional state of the body by influencing its biorhythms with a certain frequency of EMF. The approach is based on the following regularities: the principle of the rhythm of biological processes; the principle of conjugation of bioprocesses and biorhythms; and the phenomenon of assimilation of external rhythms by living organisms. According to the principle of rhythm, all bioprocesses have their own biorhythms. Therefore, in case of a disease, a violation of bioprocesses in the body is accompanied by a deviation of their biorhythms from the norm – desynchronization. Thus, diseases can be treated not only by pharmacotherapy methods, but also by chronophysiotherapy by eliminating desynchronization. However, there are no hardware-based methods for treating desynchronization on the market. On the basis of the phenomenon of assimilation of external rhythms and the principle of conjugation of bioprocesses and biorhythms, a method of resynchronization of biorhythms has been developed: treatment of diseases by correcting deviations that have arisen in the biorhythms of a sick organism. The corresponding EMI frequency is used as an external synchronizer. To introduce the method into medical practice, a chronomagnetotherapy apparatus has been created, which simultaneously implements two treatment functions: chronotherapy and magnetotherapy. The chronotherapy function implements a new principle of treatment, the therapeutic factor in which is the frequency component of the EMF from a certain range of biorhythms of a healthy organism. And the function of magnetotherapy is realized by an auxiliary method, the therapeutic factor of which is the magnetic component of the EMF. The device has no side effects on the body, and the effectiveness of treatment on it, in comparison with the methods of pharmacotherapy, increases by 15%.

Key words: *bioprocess, biorhythm, chronopathology, desynchronization, chronophysiotherapy, biorhythm resynchronization method, chronomagnetotherapy apparatus.*

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ АОРТОКОРОНАРНОЕ ШУНТИРОВАНИЕ

Милютин Н.П.¹, Сидоров Р.В.², Долтмурзиева Н.С.², Ананян А.А.¹, Внуков В.В.¹

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванова

ул. Стачки 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ

² Ростовский государственный медицинский университет

Нахичеванский пер., 29, г. Ростов-на-Дону, 344000, РФ; e-mail: nrmilutina@sfedu.ru

Поступила в редакцию: 12.07.2021

Аннотация. В ходе работы обследованы больные с ИБС по клиническим показаниям направленные на аортокоронарное шунтирование (АКШ). Наблюдения и лабораторную диагностику проводили до и на 1, 3, 5, 7, 10 сутки после операции. По медицинскому заключению больные были разделены на 2 группы. В первую вошли пациенты, у которых в послеоперационном периоде не было осложнений, во вторую – перенесшие постперикардиотомный синдром. Для оценки состояния пациентов определяли содержание и активность ряда показателей крови. Полученные результаты свидетельствуют, что информативными диагностическими и, возможно, прогностическими тестами при исследуемых патологиях могут быть определение содержания глутатиона в эритроцитах, активности глутатионпероксидазы и церулоплазмينا в плазме крови и определение бета-адренореактивности организма.

Ключевые слова: аортокоронарное шунтирование, постперикардиотомный синдром, церулоплазмин, гемоглобин, пероксидаза, глутатион.

В последнее время резко возрос интерес к исследованиям механизмов патогенеза заболеваний, определяющих основную прирост инвалидизации и смертности населения, к которым, в первую очередь относятся сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), онкологические, заболевания опорно-двигательного аппарата и другие. Кроме того, резко увеличилось число современных, высокотехнологичных методов профилактики и лечения заболеваний, определяемых ВОЗ как ведущие, использование которых может и должно повысить продолжительность и уровень жизни. Все это требует детального и всестороннего исследования интимных механизмов причин и развития заболевания на всех уровнях от клеточного до молекулярного.

В сфере наших интересов лежат ССЗ, которые по данным ВОЗ, занимают первое место. Ведущим сердечно-сосудистым заболеванием является ИБС, в патогенезе которой - нарушение ряда сторон биохимического обмена и, в первую очередь липидного, что приводит к образованию бляшек, закупорке сосудов и, как следствие, стенозу вен и артерий. На ранних стадиях этого процесса в ряде случаев можно применять медикаментозные способы профилактики и лечения. Однако, в сложных вариантах при показаниях кардиографии необходимо проводить кардиостенирование или АКШ. Последний способ (АКШ) является весьма травматичным и требует высококвалифицированных специалистов и сложной аппаратуры, а также постоянного наблюдения за больным как во время операции, так и в послеоперационном периоде. Кроме того, не исключено проявление осложнений после операции, таких как постперикардиотомный синдром (ПКС), при котором резко ухудшается состояние больного. Все вышеизложенное требует разработки высокоинформативных биохимических и биофизических методов контроля и прогнозирования состояния пациентов с ИБС после АКШ в послеоперационном периоде, что и явилось целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 76 пациентов с ИБС в возрасте $58,0 \pm 1,5$ лет, которым по клиническим показаниям было проведено АКШ в Центре кардиологии и кардиохирургии ГБОУ ВПО Ростовского ГМУ. Больные были разделены на 2 группы. Первую группу составили 66 пациентов без постперикардиотомного синдрома (ПКС), вторую – 10 пациентов с ПКС.

Биохимические показатели были исследованы в динамике в момент операции, на 1, 3, 5, 7, 10 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля использовали кровь 20 практически здоровых людей доноров обоего пола в том же возрасте, что и пациенты.

Материалом для биохимических исследований явились плазма крови и эритроциты. Кровь собирали утром натощак из локтевой вены. Пробу цельной крови центрифугировали при 3000 об/мин 20 минут. Плазму крови отделяли от плотного осадка эритроцитов. Из осадка эритроцитов готовили гемолизат, который использовали для исследований. Для получения 1% гемолизата эритроциты лизировали дистиллированной водой в соотношении 1:100, встряхивали и инкубировали при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут.

Определение оксидазной активности церулоплазмينا по окислению пара-фенилендиамина [1]. Оптическую плотность регистрировали при 540 нм с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter США).

Определение содержания восстановленного глутатиона (GSH) по взаимодействию GSH с 5,5-дитиобис 2-нитробензойной кислотой [2]. Оптическую плотность регистрировали при 412 нм с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter США).

Определение активности глутатионпероксидазы (ГПО) проводили по скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидроперекиси трет-бутила [3]. Оптическую плотность регистрировали при 412 нм с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter США).

Определение концентрации общего белка проводили с помощью тест-набора производства ЭКО-сервис (Россия).

Оптическую плотность регистрировали при 540 нм с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter США).

Определение содержания гемоглобина и внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) в гемолизате и в плазме крови проводили с помощью стандартного клинического набора реактивов Олвекс Диагностиум (Россия). Оптическую плотность регистрировали при 540 нм с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter США).

Определение суммарной пероксидазной активности плазмы крови [4] по окислению бензидин-сульфата перекисью водорода. Оптическую плотность регистрировали при 600 нм с использованием спектрофотометра DU-800 (Beckman Coulter США).

Определение бета-адренореактивности организма по изменению осморезистентности эритроцитов выполняли с помощью клинического набора реагентов «Бета – АРМ – Агат» фирмы Агат-Москва (Россия)

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Office 2007 (MS Excel 2007) и STATISTICA 6.0. Различия считали достоверными при $P < 0,05$. При $P < 0,01$ вероятность различия 99%, при $P < 0,001$ – 99,9% При $P > 0,1$ изменения полагали статистически неверными [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе установлено, что уровни ВЭГ на 156-166% и СПА на 206% в плазме крови обеих групп больных ИБС выше, чем у доноров

Во все сроки послеоперационного периода содержание ВЭГ оставалось выше на 112-165% в 1 группе пациентов без ПКТС и на 134-154% во 2 группе пациентов, чем в контрольной группе и не отличалось от показателей до АКШ.

СПА также, как и ВЭГ оставалась значительно выше нормы в обеих группах обследуемых на 170-208% в плазме крови пациентов без ПКТС и на 115-249% у 2 группы в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Максимальных значений показатель достигал в обеих группах больных на 5-е послеоперационные сутки. Следует отметить, что уровни ВЭГ и СПА в плазме крови рассматриваются как чувствительные показатели стабильности мембран эритроцитов [4] и их прирост отражает повышение проницаемости эритроцитарных мембран и возрастание проокислительного потенциала плазмы. Известно, что взаимодействие ВЭГ и H_2O_2 , смесь которых называют "биологическим реактивом Фентона", приводит к образованию гидроксильного радикала и феррил- и перферрил-радикалов гемоглобина, которые являются эффективными индукторами ПОЛ [6,7]. Совпадение направленности динамики ВЭГ и СПА в плазме крови больных ИБС после АКШ может быть связано с тем, что нарушение стабильности мембран эритроцитов приводит к выходу в плазму крови гема, продуктов его деструкции, Fe^{2+} , которые вносят существенный вклад в СПА.

Полученные результаты могут свидетельствовать о нарушении стабильности эритроцитов и высвобождении гемоглобина.

Ранее нами изучен большой спектр показателей окислительного стресса у больных ИБС доказано развитие его нитрозильной и свободнорадикальной составляющей в процессе АКШ и в послеоперационный период [8]. Одной из задач, решаемых в ходе проведенного исследования явилось определение наиболее информативных и доступных методов лабораторной диагностики. В таблице представлена динамика показателей крови у пациентов с ИБС и после АКШ.

Так, содержание GSH у пациентов без ПКТС до операции на 33% выше, чем у доноров. В 1-е, 3-е, 5-е, 7-е, 10-е сутки после проведения аортокоронарного шунтирования у пациентов без ПКТС наблюдается возрастание содержания GSH в эритроцитах по сравнению с донорами. У пациентов 2-й группы с ПКТС по сравнению с донорами до операции также наблюдается возрастание содержания GSH в эритроцитах. Данная тенденция сохраняется во все сроки послеоперационного периода. Кроме того, у пациентов с ПКТС по сравнению с пациентами без ПКТС содержание GSH в эритроцитах возрастает до операции, что позволяет рекомендовать использовать данный показатель в качестве возможного прогностического теста развития ППКС.

Глутатион как антиоксидант занимает центральное место в антирадикальной и антиперекисной защите клетки. Глутатион эффективно нейтрализует свободные радикалы (гидроксильный, пероксинитрил и перекись водорода), радикалы перекисей липидов непосредственно и опосредованно путем ферментативных реакций. Можно предположить, что содержание глутатиона в эритроцитах пациентов с ИБС после АКШ миокарда повышается за счет ключевого фермента его биосинтеза глутаматцистеинлигазы, экспрессия которого показана [9] в крови больных сердечно-сосудистыми патологиями.

Таблица 1. Содержание GSH, активность ГПО, церулоплазмينا в эритроцитах и плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ

Группы, сутки	GSH, эритроциты (мкмоль/г Hb)	ГПО, эритроциты (МЕ/г Hb)	ГПО, плазма (МЕ/г белка)	ЦП, плазма крови (мкмоль/л)
Контрольная группа	3,39±0,14	87,04±7,49	33,32±2,67	1,34±0,03
Пациенты без ПКТС				
В момент операции	4,52±0,16 33*	67,16±3,14 -23*	35,26±2,99	0,81±0,06
1-е сутки	4,71±0,23 39*	64,55±2,94 -26*	41,36±3,16	0,68±0,05 -50*
3-е сутки	4,90±0,25 45*	66,15±3,09 -24*	37,85±2,82	0,88±0,05 -34*
5-е сутки	4,75±0,27 40*	59,16±3,16 -32*	40,66±2,74 25*	0,95±0,06 -29*
7-е сутки	4,24±0,27 25*	65,33±3,38 -25*	41,42±2,36 24*	0,95±0,03 -29*
10-е сутки	4,55±0,30 34*	65,60±3,00 -25*	41,04±3,27	0,99±0,08 -26*
Пациенты с ПКТС				
В момент операции	5,35 ±0,53 58* 18*	79,59±6,03	49,45±5,79 48* 40*	0,94±0,49
1-е сутки	4,33±0,27 28*	60,64±10,32 -30*	54,23±5,58 63* 31*	1,05±0,15
3-е сутки	4,76±0,47 40*	86,28±7,39	42,47±5,23	0,95±0,29
5-е сутки	5,01±0,25 48*	55,57±9,49 -36*	40,24±2,83	1,28±0,26
7-е сутки	4,37±0,55 29*	71,72±5,96	40,21±2,26 21*	0,82±0,17 -39*
10-е сутки	4,55±0,68 34*	75,89±2,87	37,67±6,42	0,91±0,11 -32*

Известно, что воспалительная реакция, развивающаяся в послеоперационном периоде у больных ИБС, сопровождается повышением продукции провоспалительных цитокинов и, в том числе, фактора некроза опухоли. В свою очередь, сверхпродукция фактора некроза опухоли приводит к увеличению концентрации молекул межклеточной адгезии ICAM-1, которые способны модулировать экспрессию ключевого фермента биосинтеза глутатиона-глутаматцистеинлигазы, что может обуславливать прирост глутатиона. [9].

Антиоксидантный эффект глутатиона будет неполным без ГПО - сопряженного фермента, катализирующего разложение перекиси водорода и органических гидроперекисей в соответствующие спирты, с использованием глутатиона в качестве косубстрата. Эритроцитарная изоформа - ГПО-1 локализована практически во всех тканях и классифицирована как фермент противодействия окислительному стрессу.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что активность ГПО в эритроцитах больных ИБС 1-й группы ниже, чем у доноров до операции и остается сниженной во все сроки послеоперационного периода

У пациентов 2 группы с ПКТС активность ГПО в эритроцитах как до операции, так и на 3-е, 7-е, 10-е сутки остается неизменной по сравнению с донорами. Лишь на 1-е и 5-е сутки после аортокоронарного шунтирования также, как у пациентов 1-й группы, активность ГПО в эритроцитах больных с ППКС снижается по сравнению с донорами. Сравнение данного показателя у пациентов 1-й и 2-й групп свидетельствует о том, что активность ГПО в группе больных с ПКТС на 3-е сутки послеоперационного периода возрастает на 30 % и остается повышенной на 10-е сутки по сравнению с пациентами без ПКТС.

Исходя из полученных данных можно судить об интенсификации свободнорадикальных процессов и компенсаторной активации редокс-чувствительного фермента – глутатионпероксидазы

Наблюдалась напряженность в функционировании компонентов глутатион-зависимой системы в крови больных ИБС после АКШ миокарда. Так, изменение уровня глутатиона и активность ГПО в эритроцитах больных ИБС, перенесших АКШ, характеризовались разнонаправленной динамикой. Фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний является изменение активности сопряженного с глутатионом фермента-глутатионпероксидазы. Снижение активности ГПО в эритроцитах пациентов 1-й и 2-й групп может быть вызвана интенсификацией продукции пероксида водорода в результате высокой активности СОД [10].

В эритроцитах обследованных пациентов наблюдается разнонаправленная динамика уровня глутатиона и активности ГПО. Снижение активности ГПО на фоне повышенного содержания глутатиона возможно объясняется ингибированием фермента перекисью водорода, значительный прирост которой в эритроцитах пациентов обусловлен резкой активацией СОД [8].

Активность ГПО в плазме крови (таблица) больных ИБС 1-й группы как до, так и после операции на 1-е и 3-и сутки остается неизменной по сравнению с донорами. Однако, на 5-е, 7-е сутки послеоперационного периода активность фермента возрастает на 25%, 24%, и на 10-е сутки после операции активность ГПО возвращается к уровню доноров.

У пациентов 2 группы активность ГПО в плазме крови больных ИБС до операции выше на 48%, а через сутки после операции активность возрастает на 63% по сравнению с донорами. На 3-е, 5-е, 10-е сутки послеоперационного периода активность фермента возвращается к уровню доноров. Но на 7-е сутки послеоперационного периода вновь наблюдается кратковременное повышение активности ГПО у пациентов с ПКТС по сравнению с донорами.

В плазме крови источником ГПО являются клетки крови и других тканей, одной из изоформ является ГПО-3, характерная для тромбоцитов. Показано в эксперименте, что у животных с низкой активностью ГПО-3 в плазме крови наблюдается повышение продукции тромбоцитами тромбоксана и, как следствие, развитие тромбоза. В эксперименте на животных показано, что дефицит ГПО в плазме крови повышает смертность от тромбоза [11].

Глутатионовая система имеет исключительно важное значение в регуляции редокс-потенциала кардиомиоцитов. В условиях свободнорадикального окисления изменения редокс-статуса имеют патологическую направленность и обуславливают усиление провоспалительных процессов в миокарде.

Прямая реваскуляризация миокарда (АКШ), несмотря на терапевтическую эффективность, сопряжена с существенными изменениями редокс-гомеостаза в крови больных, которые в свою очередь могут повлиять на развитие послеоперационных осложнений.

Данные представленные в таблице свидетельствуют о том, что оксидазная активность церулоплазмينا у больных ИБС 1-й группы на 39% ниже, чем у доноров и остается сниженной во все сроки послеоперационного периода.

Оксидазная активность ЦП в плазме крови пациентов 2 группы с ПКТС через 1 сутки после аортокоронарного шунтирования возрастает и не отличается от таковой у доноров, отмеченная тенденция сохраняется на 3 и 5 сутки послеоперационного периода.

При сравнении оксидазной активности ЦП в плазме крови пациентов 1 и 2 групп выявлена следующая закономерность: через 1 сутки после операции у пациентов 2 группы с ПКТС данный показатель на 55% выше, чем в 1-й группе. Во все другие этапы обследования оксидазная активность ЦП в плазме крови пациентов 2 группы не отличается от таковой у пациентов 1 группы.

Имеются противоречивые данные о динамике ЦП в крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В ряде работ показано повышение концентрации ЦП в плазме крови при атеросклерозе, стенокардии, аневризме аорты [12,13]. Другими авторами установлено снижение уровня ЦП в плазме крови после АКШ [14]. В данном исследовании доказано снижение оксидазной активности ЦП в плазме крови пациентов с ИБС обеих обследованных групп после реваскуляризации миокарда. Одной из возможных причин инактивации ЦП может быть агрегация ЦП перекисью водорода [15]. Снижение антиоксидантных свойств ЦП может способствовать развитию СВО и возникновению различных послеоперационных осложнений.

Сложность оценки роли ЦП в механизмах окислительного стресса заключается в возможном проявлении им ферроксидазных и оксидазных свойств. Ферроксидазные свойства ЦП, которые ряд авторов определяют как защитные, проявляются в ингибировании ПОЛ [4], в деструкции ДНК, углеводов и аминокислот, катализируемой ионами железа и меди, возможность «перехватывать и тушить» супероксидный анион-радикал, препятствовать гемолизу эритроцитов, индуцированного системой ксантиноксидаза-ксантин.

С другой стороны, окислительный стресс может в значительной степени усиливать оксидазные свойства ЦП. В модельных экспериментах *in vitro* показано увеличение оксидазной активности ЦП при добавлении к плазме крови низких, физиологических концентрациях гемоглобина, а также продуктов его деструкции – гемина и ионов железа.

Для ответа на вопрос, какие свойства ЦП являются определяющими в развитии оксидативных патологий, были проведены эксперименты по введению животным ДЭДТК – ингибитора оксидазных свойств ЦП. Введение крысам препарата вызывает пропорциональное введенной дозе ингибирование оксидазной активности ЦП, что прямо указывает на участие оксидазных свойств ЦП в механизмах окислительного стресса [16].

Учитывая вышеизложенное, снижение оксидазной активности ЦП в плазме крови обследованных пациентов с ИБС после АКШ можно рассматривать как высокоинформативный интегральный показатель позитивного состояния пациентов в послеоперационном периоде.

При сравнении 1 и 2 групп пациентов с ПКТС и пациентов без ПКТС до операции осморезистентность эритроцитов не отличается от доноров. Через 1-е сутки после операции у пациентов 1 группы без ПКТС осморезистентность эритроцитов увеличивается на 31% по сравнению пациентами 2 группы, что можно расценить и использовать в качестве прогноза благоприятного течения послеоперационного процесса. На 3-и сутки послеоперационного периода в сравнении между пациентами с ПКТС и без ПКТС осморезистентность эритроцитов не изменяется, что продолжается и на 5-е, 7-е, 10-е сутки после аортокоронарного шунтирования.

Оценка адренореактивности организма широко используется в клинической практике. Согласно литературным данным [17] возрастание адренореактивности наблюдается при инфаркте миокарда. Отсутствие изменений бета-адренореактивности организма у обследованных пациентов ИБС после АКШ свидетельствует о благополучном течении послеоперационного восстановления, отсутствии стресс-реакции и правильной индивидуальной тактике лечения пациентов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о проявлении у группы пациентов быстрой формы ПКТС, характеризующейся развитием патологии в первые 7 суток после реваскуляризации миокарда. Предложенные биохимические показатели крови проявили высокую информативность, адекватны поставленной задаче оценки состояния пациентов с ИБС после АКШ, и могут быть перспективны для проведения клинко-лабораторной диагностики развития ПКТС.

Список литературы / References:

1. Камышников В.С. *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика*. Справочник. В 2 томах. Издательство: Мн: Интерпрессервис, 2003, 958 с. [Kamishnikov V.S. *Kliniko-biochemical laboratory diagnostics*. Reference. In 2 volumes. Publisher: Minsk: Interpresservis, 2003, 958 p. (In Russ.)]
2. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.*, 1959, vol. 82, pp. 70-77.
3. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*, 1986, № 12, с. 724-727. [Moin V.M. Simple and specific method of determining activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Laboratornoe delo*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
4. Лукаш А.И., Внуков В.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Кваша П.Н. *Металлосодержащие соединения плазмы крови при гипербарической оксигенации*. (Экспериментальные и клинические аспекты). – Ростов-на-Дону, 1996, 88 с. [Lukash A.I., Vnukov V.V., Ananyan A.A., Miliutina N.P., Kvasha P.N. *Metal-containing blood plasma compounds with hyperbaric oxygenation*. (Experimental and clinical aspects) Rostov-on-Don, 1996, 88 p. (In Russ.)]
5. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа. – 1990. – 293 с. [Lakin G.F. *Biometrics*. M. High school. - 1990. -293 p. (In Russ.)]
6. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. *Итоги науки и техники. Сер. Биофизика*. – М., 1991, т. 29, 252 с. [Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deev A.I. et al *Results of Science and Technology. Ser. of Biophysics*. M., 1991, vol. 29, 252 p. (In Russ.)]
7. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б. и др. Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода. *Вопросы медицинской химии*, 1997, т. 43, с. 87-93. [Teselkin Yu., O., Babenkova I.V., Liubitskiy O.B. et al. Inhibition by serum antioxidants of luminol oxidation in the presence of hemoglobin and hydrogen peroxide. *Problems of Medical Chemistry*, 1997, vol. 43, pp. 87-93. (In Russ.)]
8. Внуков В.В., Сидоров Р.В., Милютин Н.П., Гвалдин Д.Ю., Ананян А.А., Пospelов Д.Ю. Показатели окислительно-нитрозильного стресса в крови и перикардальной жидкости больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда. *Актуальн. вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 2, с. 388-395. [Vnukov V.V., Sidorov R.V., Miliutina N.P., Gvaldin D.Yu., Ananyan A.A., Pospelov D.Yu. Indicators of the oxidation and nitrosyl stress in the blood and the pericardial fluid of patients with IBC, which have undergone direct revascularization of myocardium. *Actual. Affairs of biological physics and chemistry*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 388-395. (In Russ.)]
9. Kevil C.G., Pruitt H., Kavanagh T.J. Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1: implications for inflammation. *FASEB J.*, 2004, vol. 18, no. 11, pp. 1321-1323.
10. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2013, vol. 1830, no. 5, pp. 3217-3266.
11. Buijsse B., Lee D.-H., Steffen L. et al. Low Serum Glutathione Peroxidase Activity Is Associated with Increased Cardiovascular Mortality in Individuals with Low HDLc's. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6, pp. 1-6.
12. Panichi V., Taccola D., Rizza G.M. et al. Ceruloplasmin and acute phase protein levels are associated with cardiovascular disease in chronic dialysis patients. *J Nephrol*, 2004, vol. 17, no. 5, pp. 715-20.
13. Ziakas A., Gavriliadis S., Souliou E. et al. Ceruloplasmin is a better predictor of the long-term prognosis compared with fibrinogen, CRP, and IL-6 in patients with severe unstable angina. *Angiology*, 2009, vol. 60, no. 1, pp. 50-59.
14. Meng Q.H., Zhu S., Sohn N. et al. Release of cardiac biochemical and inflammatory markers in patients on cardiopulmonary bypass undergoing coronary artery bypass grafting. *J Card Surg*, 2008, vol. 23, no. 6, pp. 681-687.
15. Aouffen M., Paquin J., Furtos A. et al. Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide is prevented by pyruvate. *Free Radic Res.*, 2004, vol. 38, no. 1, pp. 19-26.
16. Внуков В.В. *Роль металлосодержащих белков в генезе механизмов действия ППДК у животных и человека*. Дисс.-ра биол. Наук, Ленинград 1993, 316 с. [Vnukov V.V. *The role of metal-containing proteins in the genesis of mechanisms of the action of (increased partial pressure of oxygen) HOP in animals and humans*. Dissertation of Doctor of Biology, Leningrad, 1993, 316 p. (In Russ.)]
17. Шамратова В.Г., Хазипова И.Р., Багаутдинова Р.Ш. *Способ оценки адренореактивности эритроцитов*, Патент на изобретение №2471189 от 27.12.2012. Патентообладатель ГОУ ВПО Башкирский госуниверситет, РФ. [Shamratova V.G., Hazipova I.R., Bagautdinova R.Sh. *Method for assessing erythrocyte Adrenoreactivity*. Patent for the invention №2471189 от 27.12.2012 Patent Holder Bashkirian State University (In Russ.)]

ASSESSMENT OF THE CONDITION OF PATIENTS WHO HAVE UNDERGONE CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING**Milutina N.P.¹, Sidorov R.V.², Doltmurzieva N.S.², Ananyan A.A.¹, Vnukov V.V.¹**¹ Southern Federal University*B. Sadovaya st., 105/42, Rostov-on-Don, 344006, Russia; e-mail: npmilutina@sfedu.ru*² Rostov state medical University*Nakhichevan lane, 29, Rostov-on-Don, 344022*

Abstract. The aim of the work was biochemical assessment of patients after myocardial revascularization. The patients with CHD under clinical indications referred for aortocoronary bypass surgery were examined. The observation and laboratory diagnostics were carried out before and on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th day after the operation. According to medical report the patients were divided into 2 groups. The first group included patients with no complications in the postoperative period, the second group included those who had postpericardiotomy syndrome. The content and activity of a number of blood parameters were determined to assess the patients' condition. The results obtained indicate that informative diagnostic and, possibly prognostic tests in the studied pathologies, glutathione content in red blood cells, glutathione peroxidase activity and ceruloplasmin in plasma can be determined.

Key words: coronary artery bypass grafting, oxidative stress, postpericardiotomic syndrome, antioxidant enzymes.

ИЗУЧЕНИЕ ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТИ Skp ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* ПРИ РАЗНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH СРЕДЫ

Киселева Д.А.^{1,2}, Сидорин Е.В.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: sev1972@mail.ru

² Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук
г. Владивосток, 690090, РФ; e-mail: kiseleva.diana99@mail.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. Представленная работа посвящена изучению шаперонной активности рекомбинантного белка Skp (rSkp) *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью методов динамического рассеяния света и иммуоферментного анализа. В качестве белков-субстратов использовали коммерческие образцы антител поликлонального IgG кролика и моноклональные иммуноглобулины мыши, изотип IgG1. На основании полученных результатов можно сказать о том, что rSkp способен замедлять процессы самоассоциации и агрегации иммуноглобулинов, сохраняя их антигенсвязывающую способность. Для антител каждого вида животного шаперонные свойства белка проявляются индивидуально. Шаперонная активность rSkp существенно зависит от значения pH среды, в которой находятся антитела.

Ключевые слова: шаперон Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, иммуноглобулин G, антитела, агрегация.

Благодаря разработке гибридной технологии широкое распространение в лабораторной диагностике получили моноклональные антитела (МКА). МКА имеют значительные преимущества перед поликлональными сыворотками – это высокая специфичность и активность, стандартность, возможность получения в неограниченном количестве. Благодаря своим уникальным свойствам, МКА широко используются в медицине и ветеринарии, в диагностических и лечебно-профилактических целях. Однако, широкое применение МКА ограничивается тем, что наиболее удобные для использования водные растворы антител при хранении являются достаточно нестабильными. Причина этого заключается в том, что МКА могут подвергаться разнообразным способам деградации [1, 2] Одним из наиболее распространенных путей нестабильности является образование олигомеров антител и агрегатов с более высокой молекулярной массой [3]. Агрегация антител может представлять значительную проблему при разработке, хранении и доставке лекарств. В связи с вышесказанным, решение проблемы сохранения функциональной активности МКА является актуальной задачей.

Многие коммерчески доступные реагенты антител содержат одну или несколько добавок, которые предназначены для увеличения стабильности антител при длительном хранении [4]. Ранее было показано, что Skp *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать IgG кролика и человека, как в виде мономера (Skp) [5, 6] так и в форме гомотримера (Skp₃) [7]. Цель данной работы являлось изучение влияния шаперона Skp *Y. pseudotuberculosis* на агрегацию иммуноглобулинов мыши и кролика при разных значениях pH среды. Белок Skp *Y. pseudotuberculosis* экспрессировали в *E. coli*, рекомбинантный белок (rSkp) выделяли из клеток и очищали, как описано нами ранее [7]. В качестве модельных белков-мишеней для связывания с шапероном rSkp использовали коммерческие препараты поликлональных IgG кролика (РАН Alb, «Имтек», Россия) и моноклональные антитела мыши («HyTest», Россия), изотип IgG1. В течении 90 дней, используя метод динамического рассеяния света (ДРС), мы изучали поведение образцов белков-мишеней, а также влияние шаперона Skp на агрегацию антител в водных растворах при различных значениях pH (рис. 1 и 2 а, б). Для количественного и качественного описания процессов, связанных с изменением размеров частиц, которые образуются при самоассоциации и агрегации иммуноглобулинов, были использованы два метода анализа полученных корреляционных функций: анализ распределения (определяет распределение фактического размера и процент для каждого из пиков распределения) и анализ кумулянтов (определяет средний гидродинамический размер частиц). Расчет среднего гидродинамического радиуса частиц всего образца (Z-average) и гидродинамических радиусов (R_h) частиц при анализе их объемного распределения проводили с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS “Malvern”, Великобритания).

В условиях растворения поликлональных IgG кролика в кислых средах в растворе преобладали частицы размером меньше 10 нм (97-98%). Спустя 6 дней при pH 4,0 происходило значительное уменьшение содержания мелких частиц (от 97 до 17%) (рис. 1 а). Спустя 90 дней содержание частиц с гидродинамическим радиусом (R_h) меньше 10 нм составляло 51,8 %, что может быть объяснено седиментацией агрегатов. Основной объем раствора при pH 5,0 через 6 дней занимали частицы с размером до 10 нм. Их процентное содержание уменьшается на 3,2 % по сравнению с первым часом наблюдения. После окончания эксперимента в образце значительно увеличилось содержание крупных частиц с R_h больше 200 нм (90,8%). Величина среднего гидродинамического радиуса (Z-Average) увеличивалась с момента разбавления и к 6 и 90 дням составила 677 и 940 нм соответственно (рис. 1 а). Спустя 90 дней заметно шел рост образования агрегатов IgG кролика, что позволяет предположить о необратимости этого процесса. Незначительно возрастание содержания частиц размером больше 200 нм (от 0,4 до 15,1%) при pH 6,0 через 5 дней. Дальнейшее наблюдение показало, что их вклад в основной объем раствора

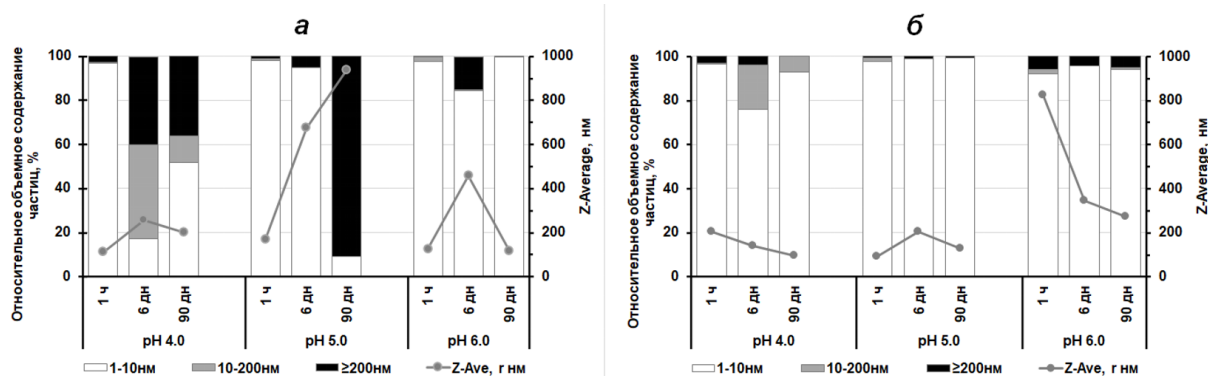


Рисунок 1. Относительное объемное содержание (%) по размеру (R_n) и Z-average частиц, образованных IgG кролика в растворе при разных значениях pH среды и времени инкубации: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

снижался (0,3%) (рис. 1 а). Вероятным объяснением такого поведения иммуноглобулинов кролика может быть медленная скорость процесса оседания крупных частиц. В случае кумулянтного анализа Z-Average к 6 дню составил 459,7 нм, при дальнейшем наблюдении его значение уменьшилось до 117,3 нм (рис. 1 а), что так же свидетельствует о седиментации частиц.

В присутствии rSkp скорость самоассоциации и агрегации IgG кролика заметно уменьшается. В условиях кислой среды при pH 4,0 в присутствии шаперона происходило снижение содержания частиц размером больше 10 нм к 6 и 90 дням (23,8 и 7,2% соответственно) (рис. 1 б), по сравнению с их содержанием в образце без rSkp (рис. 1 а). Наряду с уменьшением числа крупных частиц, происходит постепенное снижение значения Z-Average (от 204,2 до 96,6 нм). На протяжении всего времени наблюдения при pH 5,0 в присутствии rSkp в образце преобладали частицы с R_n до 10 нм (97,8-99,4%). Содержание rSkp в образце к 90 дню способствовало замедлению образования частиц с размером больше 200 нм (0,7%), это так же заметно по изменению среднего гидродинамического радиуса частиц образца (при анализе кумулянтов). Значение Z-Average находилось в интервале (91,5-205,3 нм) (рис. 1 б). Основной объем при pH 6,0 составляли мелкие частицы в течение всего времени проведения эксперимента (92,2-94,3 %) (рис. 1 б). Несмотря на постоянство объемного распределения размеров частиц, величина Z-Average уменьшалась с момента растворения (825,9 нм) и к 6 и 90 дням составила 343,9 и 271,6 нм соответственно. Для объяснения резкого падения значения Z-Average в присутствии шаперона необходимо проведение дополнительных экспериментов другими методами исследования. Наиболее активное проявление шаперонных свойств rSkp наблюдается при pH 4,0 и 5,0. В результате образования комплекса rSkp с IgG кролика происходит значительное уменьшение скорости протекания процесса самоассоциации и агрегации.

На протяжении всего времени наблюдения при кислых и нейтральных значениях pH среды в растворах моноклональных IgG1 мыши преимущественно преобладали размеры частиц до 10 нм (98,8-99,7%) (рис. 2 а). При этих же временных интервалах величина Z-Average для образца белка постепенно уменьшалась при pH 5,0 и 6,0 (от 93 до 58 нм и 97 до 29 нм, соответственно). Вероятнее всего, подобные изменения значений среднего гидродинамического радиуса могут быть объяснены медленной скоростью оседания крупных частиц в этих условиях. Величина Z-Average при pH 7,0 возрастала (от 40,3 до 182,1 нм) (рис. 2 а), что говорит о медленном процесс самоассоциации и агрегации до крупных частиц. Скорость образования агрегатов при растворении IgG1 мыши в щелочном буфере pH 8,0 была значительно выше (рис. 4 а). После 6 суток в образце не были зафиксированы частицы размером до 10 нм, основной объем составляли белковые молекулы с R_n больше 200 нм (94,7%). Спустя 90 дней содержание крупных частиц снизилось до 28,3 %. Наряду с крупными частицами в

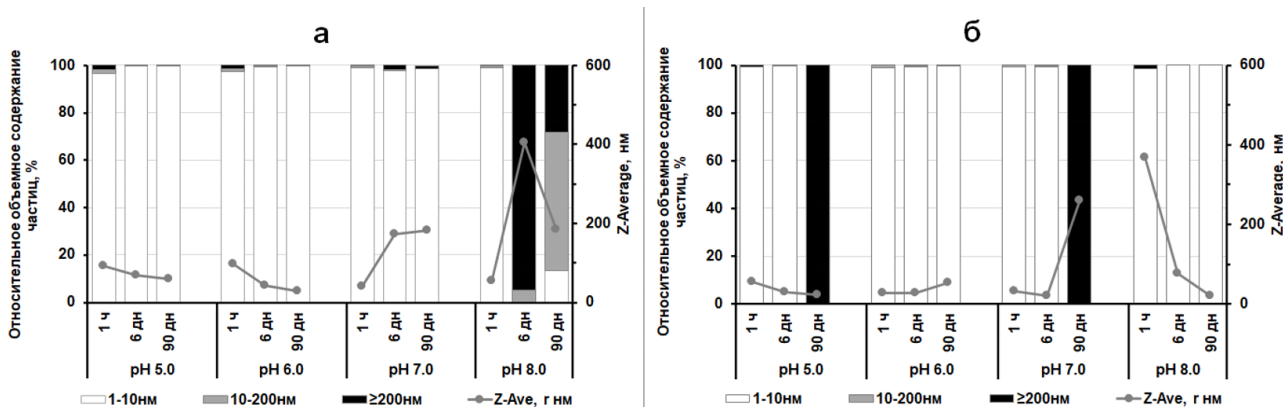


Рисунок 2. Относительное объемное содержание (%) по размеру (R_n) и Z-average частиц, образованных IgG1 мыши в растворе при разных значениях pH среды и времени инкубации: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

растворе увеличилось процентное содержание частиц размерами до 10 нм и 10-200 нм до 13,5 и 58,2% соответственно. Величина Z-Average к 6 дню составляла 404,9 нм, хотя спустя 90 дней ее значение уменьшилось до 184,7 нм (рис. 2 а). Такое перераспределение между крупными и мелкими частицами, скорее всего, происходит за счет седиментации крупных агрегированных частиц.

Присутствие rSkp в образце при разных значениях pH среды оказывало различное влияние на процесс агрегации иммуноглобулинов. В течение 6 дней действие шаперона в растворе при pH 5,0 и 7,0 не заметно, преимущественно содержались мелких частиц (99,5%) (рис. 2 б). Спустя 90 дней в образцах не были обнаружены частицы с размером меньше 10 нм. Белковые молекулы агрегировали и в растворах содержались только частицы размером больше 200 нм (100%). В данных условиях присутствие шаперона в образце приводило к ускорению образования крупных белковых агрегатов. Возможно, подобный результат может быть связан со структурными изменениями (вторичной и третичной структур) моноклоальных IgG1 мыши при связывании с rSkp, но для объяснения этого эффекта требуется проведение дополнительных исследований. На протяжении всего эксперимента при pH 6,0 действие шаперона незаметно, содержание мелких частиц в образце были постоянным (99,5) (рис. 2 б). Шаперон при pH 8,0 заметно проявлял активность спустя 6 дней, в образце преобладали частицы с размером до 10 нм (100%) (рис. 2 б). Такое содержание мелких частиц сохранялось и к 90 дню. Однако, Z-Average в первый час наблюдения имел высокое значение 369,7 нм с последующим уменьшением в течение 90 дней до 19,5. Для объяснения резкого падения значения среднего гидродинамического радиуса в присутствии шаперона необходимо проведение дополнительных экспериментов другими методами исследования.

Оценить влияние rSkp на агрегацию антител так же удалось с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигенов использовали сывороточные альбумины человека (HSA) и быка (BSA). Согласно литературным данным HSA и BSA имеют аминокислотную последовательность гомологичную на 76% [8, 9]. Антигенсвязывающая активности, в случае HSA, при раститровки антител моноклоального IgG1 мыши показала более высокую специфичность в сравнение с поликлональным IgG кролика (рис. 3 а, б). В случае использования в качестве антигена BSA при концентрации антител 5 мкг/мл поликлональные IgG кролика демонстрируют одинаковую перекрестную реакцию (рис. 3 а) этих же антител к HSA и более высокую в сравнении с моноклоальными IgG1 мыши (рис. 3 б).

В представленной работе, используя метод ИФА, было определено влияние pH среды и шаперона rSkp на антигенсвязывающую способность иммуноглобулинов кролика и мыши при их длительном хранении (90 дней). Самое низкое значение доли связывания IgG кролика с HSA наблюдалось при pH 4,0 (0,73) (рис. 4 а). Антигенсвязывающая способность IgG кролика заметно возрастает при pH 5,0 и 6,0 (0,95 и 1 соответственно). Возможное объяснение кажущегося роста антигенсвязывающей активности IgG кролика может быть связано с агрегацией иммуноглобулинов в этих условиях как было нами показано выше (рис. 1 а). В присутствии rSkp при pH 4,0 и 5,0 не изменяется доля связывания IgG кролика с HSA, в сравнении с образцом без шаперона (рис. 4 а). Снижение антигенсвязывающей способности иммуноглобулинов кролика при добавлении rSkp при pH 6,0, по сравнению с таковой активностью без шаперона, скорее всего, обусловлено отсутствием агрегированных форм антител. Влияние rSkp на сохранение активной формы IgG кролика наблюдалось только при pH 6,0.

Среди серии проведенных экспериментов наименьшая доля связывания IgG кролика с BSA наблюдалась при pH 4,0 (0,47) (рис. 4 б). При взаимодействии с BSA антигенсвязывающая активность IgG кролика заметно возрастает при pH 5,0 и 6,0 (0,69). В образце, содержащем rSkp, при pH 4,0 антигенсвязывающая способность иммуноглобулина кролика изменялась в пределах ошибки (рис. 4 б). В присутствии шаперона при pH 5,0 и 6,0 антитела кролика активнее взаимодействуют с BSA (1 и 0,86 соответственно). Рост в присутствии rSkp антигенсвязывающей способности IgG кролика может быть объяснен преимущественным преобладанием неагрегированных форм иммуноглобулина, как было показано нами выше методом ДПС (рис. 1 а, б).

Доля связывания IgG1 мыши с HSA при кислых и нейтральных значениях pH среды отличалась в пределах ошибки и составляла от 0,97 до 0,99 (рис. 5 а). В случае щелочного значения pH 8,0 антигенсвязывающая способность IgG1 мыши заметно ниже, доля связывания с HSA равна 0,74. Изменения антигенсвязывающей активности моноклоальных иммуноглобулинов мыши в присутствии rSkp не происходили в кислых и нейтральных средах (рис. 5 а). В образце, содержащем шаперон, при pH 8,0 наблюдалось сохранение способности антитела связываться с антигеном, что хорошо согласуется с результатами ДПС (рис. 2 а, б).

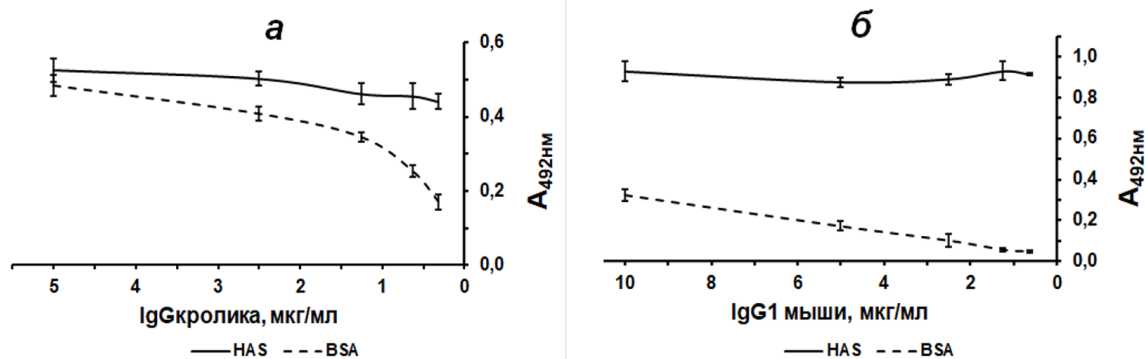


Рисунок 3. Антигенсвязывающая активность поликлонального IgG кролика (а) и моноклоального IgG1 мыши (б) при разных концентрациях

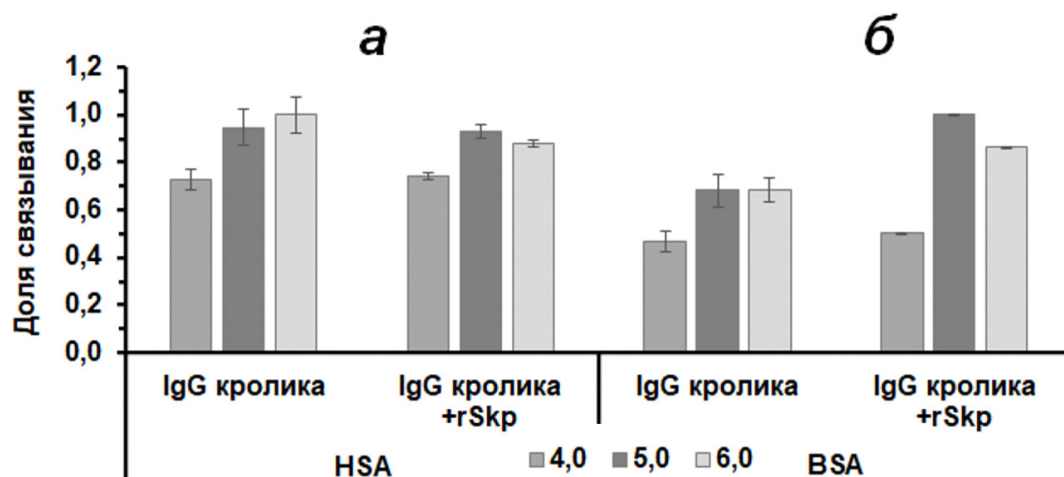


Рисунок 4. Доля связывания поликлональных IgG кролика с антигенами HSA и BSA при разных значениях pH среды после длительного хранения (90 дней) в растворе при разных значениях pH среды: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

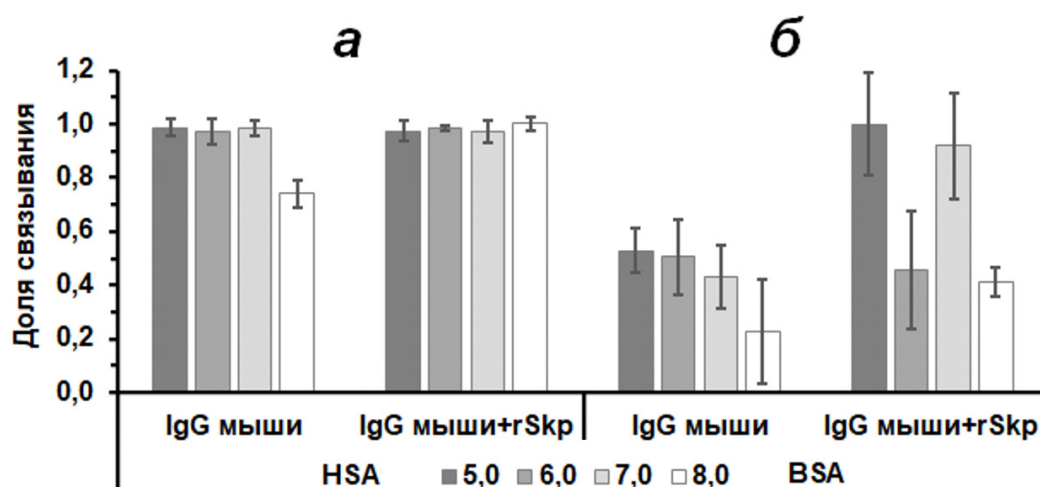


Рисунок 5. Доля связывания поликлональных IgG кролика с антигенами HSA и BSA при разных значениях pH среды после длительного хранения (90 дней) в растворе при разных значениях pH среды: (а) в отсутствии и (б) в присутствии *Y. rSkp pseudotuberculosis*

Взаимодействию IgG1 мыши с BSA привело к одинаковым результатам, отличающихся в пределах ошибки, при всех значениях pH среды (рис. 5 б). В присутствии rSkp при pH 5,0 и 7,0 антигенсвязывающая способность иммуноглобулина мыши возрастает до 1 и 0,92 соответственно. Возможное объяснение кажущегося роста антигенсвязывающей активности моноклональных IgG1 мыши в присутствии rSkp, может быть связано с аномальной агрегацией иммуноглобулинов мыши в этих условиях, как было нами показано выше методом ДРС (рис. 2 б). Иммуноглобулины мыши работают точно так же, как и без шаперона при pH 6,0 и 8,0.

Влияние rSkp на сохранение активных форм иммуноглобулинов мыши и кролика, способных связываться с HSA, заметно при pH 8,0 и 6,0 соответственно (табл. 1), что обусловлено замедлением процесса агрегации шапероном. Аналогичный эффект rSkp наблюдается в случае BSA при pH 8,0 для IgG1 мыши, при pH 5,0 и 6,0 для IgG кролика.

Таблица 1. Доля связывания иммуноглобулинов с антигенами при разных значениях pH среды при длительном хранении (90 дней)

pH	IgG1 мыши		IgG1 мыши с Skp		IgG кролика		IgG кролика с Skp	
	HSA	BSA	HSA	BSA	HSA	BSA	HSA	BSA
4,0	-	-	-	-	0,73	0,47	0,74	0,51
5,0	0,99	0,53	0,97	1,00	0,95	0,68	0,93	1,00
6,0	0,97	0,50	0,98	0,46	1,00	0,69	0,88	0,86
7,0	0,98	0,43	0,97	0,92	-	-	-	-
8,0	0,74	0,22	1,00	0,41	-	-	-	-

В результате проведенной работы было установлено, что при длительном хранении антител, интенсивность процесса агрегации различна в зависимости от значения pH среды. Активное проявление шаперонных свойств rSkp в случае IgG кролика наблюдалось при всех проверенных значениях pH среды, для IgG1 мыши аналогичный эффект был отмечен при pH 6,0 и 8,0. Полученные результаты говорят о том, что rSkp способен замедлять процессы агрегации иммуноглобулинов, проявление его шаперонной активности зависит от среды, в которой инкубируются антитела.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-04-00777).

Список литературы / References:

1. Wang W., Singh S., Zeng DL, King K., Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J. Pharm. Sci.*, 2007, vol. 96, no. 1, pp. 1-26.
2. Shire S.J. Formulation and manufacturability of biologics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, vol. 20, no. 6, pp. 708-714.
3. Joubert M.K., Luo Q., Nashed-Samuel Y., Wypych J., Narhi L.O. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, pp. 25118-25133.
4. Johnson M. *Antibody Storage and Antibody Shelf Life*, 2019. DOI: 10.13070/mm.en.2.120
5. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастук С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G. *Биохимия*, 2009, том 74, № 4, с. 501-514. [Sidorin E.V., Ziganshin R.Kh., Naberezhnyk, G.A., Likhatskaya G.N., Trifonov E.V., Anastyuk S.D., Chernikov O.V., Solovyeva T.F. Chaperone protein Skp from *Yersinia pseudotuberculosis* is able to bind immunoglobulins G. *Biochemistry* (Moscow), 2009, vol. 74, № 4, pp. 501-514. (In Russ.)]
6. Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Соловьева Т.Ф. Шаперонная и иммуноглобулинсвязывающая активности Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2020, том 85, № 1, с. 93-103. [Sidorin E.V., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Solov'eva T.F. The chaperone and immunoglobulin binding activities of Skp protein from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry* (Moscow), 2020, vol. 85, no. 1, pp. 93-103 (In Russ.)] doi: 10.31857/S0320972520010078
7. Сидорин Е.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Исаева М.П., Дмитренко П.С., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Молекулярное клонирование, выделение и характеристика шаперона Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2012, том 77, № 11, с. 1571-1583. [Sidorin E.V., Tishchenko N.M., Khomenko V.A., Isayeva M.P., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu., Likhatskaya G.N., Solovyeva T.F. Molecular cloning, isolation and characterization of chaperone Skp from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry* (Moscow), 2012, vol. 77, no. 11, pp. 1571-1583. (In Russ.)]
8. Peters T.Jr. Serum albumin. *Adv. Protein. Chem.*, 1985, vol. 37, pp. 161-245.
9. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein. Chem.*, 1994, vol. 45, pp. 153-203.

STUDY OF THE CHAPERONIC ACTIVITY OF Skp PROTEIN FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* AT DIFFERENT pH VALUES

Kiseleva D.A.^{1,2}, Sidorin E.V.¹

¹ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
prosp. 100 Let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: sev1972@mail.ru

² Far Eastern Federal University, School of Natural Sciences
Vladivostok, 690090, Russia; e-mail: kiseleva.diana99@mail.ru

Abstract. The presented work is devoted to the study of the chaperone activity of the recombinant protein Skp (rSkp) *Yersinia pseudotuberculosis* using dynamic light scattering and enzyme-linked immunosorbent assay. Commercial samples of rabbit polyclonal IgG antibodies and mouse monoclonal immunoglobulins, IgG1 isotype, were used as substrate proteins. It was found that rSkp is able to slow down the processes of self-association and aggregation of immunoglobulins, while maintaining their antigen-binding ability. For antibodies of each animal species, the chaperonic properties of the protein are manifested individually. The chaperone activity of rSkp significantly depends on the pH value of the medium in which the antibodies are located.

Key words: chaperone Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, immunoglobulin G, antibodies, aggregation.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ КРОВИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ ПРИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Гайдабура Е.А., Золотавина М.Л., Братова А.В.

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: gajdabura.alena@mail.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В работе исследовались методы оценки степени поражения лёгочной ткани у больных с диагностированной новой коронавирусной инфекцией. Для этого использовались физические методы – метод компьютерной томографии, а также альтернативные биохимические методы: оптические и иммунологические методы исследования сыворотки крови. Целью исследования стало определение биохимических маркеров воспаления крови: ферритина, фибриногена, СРБ, ПКТ, ИЛ-6, D-димера, лактата в сыворотке крови больных новой коронавирусной инфекцией, как альтернативного способа оценки степени поражения лёгких. В ходе работы нами была исследована сыворотка крови и показания компьютерной томографии 554 пациентов, находящихся на лечении в реанимационном отделении Краевой клинической больницы №1 с диагностированной новой коронавирусной инфекцией. Практическая значимость работы заключается в рекомендации использования иммунологических и оптических методов для определения состояния пациентов, страдающих COVID-19. Для реализации поставленной цели были определены изменения биохимических показателей в сыворотке крови при первой, второй, третьей и четвертой степенях поражения лёгких у людей разного возраста и пола; в ходе работы был проведен корреляционный анализ между биохимическими показателями крови и степенью поражения лёгких, оцененных по показаниям компьютерной томографии, на основании которого нами были сделаны выводы о том, что оптические и иммунологические методы для определения в сыворотке крови показателей ИЛ-6 и ферритина, изменение концентраций которых коррелировало с увеличением процента поражения лёгочной ткани, могут служить альтернативным способом оценки тяжести заболевания и прогнозирования дальнейшего течения COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, оптические методы, иммунологические методы, метод компьютерной томографии

В декабре 2019 в КНР был зарегистрирован новый штамм коронавирусов – SARS-COV-2, и уже в феврале 2020 года мир охватила волна пандемии COVID-19. Вирус оказался способным проникать в клетки организма, связываясь с клеточными рецепторами – ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ-2) и протеазами, вызывая массовое заражение и гибель клеток, и, как следствие, развитие системного воспаления, в редких случаях, приводящего к повреждению легких в результате избыточного синтеза цитокинов, полиорганной недостаточности и сепсису что, по данным ВОЗ, в 6,82 % случаев заканчивалось летальным исходом.

К особенностям протекания COVID-19 следует отнести быстрый переход от первой стадии к более тяжелым третьей и четвертой степеням двусторонней пневмонии. Для контроля процесса поражения легочной ткани и раннего прогнозирования развития тяжелой формы течения COVID-19 нами были исследованы методы компьютерной томографии, а также оптические и иммунологические методы определения биохимических показателей сыворотки крови у больных с подтвержденной коронавирусной инфекцией.

В настоящее время метод компьютерной томографии является наиболее часто используемым для оценки процента задействованных в патологическом процессе участков легких. Компьютерная томография позволяет визуализировать участки, пострадавшие в результате возникающего при COVID-19 цитокинового шторма. Однако такой метод исследования является весьма дорогостоящим и при частом применении, которое важно при оценке тяжести больного с новой коронавирусной инфекцией, оказывает негативное влияние на организм человека, а также требует обязательного присутствия пациента.

В связи с этим появилась необходимость поиска альтернативных методов определения процента поражения легких для прогнозирования течения заболевания. Главную роль в воспалительном процессе играют биологические вещества – биохимические маркеры воспаления, выделяемые лимфоидными клетками и запускающими каскад биохимических реакций, отслеживание которых с помощью оптических и иммунологических методов, могло бы указать на степень активности этих воспалительных процессов.

В связи с актуальностью данной темы целью нашего исследования стало определение биохимических методов маркеров воспаления крови как альтернативы методу компьютерной томографии при выявлении степени поражения легочной ткани при новой коронавирусной инфекции.

Контингент исследования был разделен на группы мужчин (М) и женщин (Ж), а также три возрастные группы: М1/Ж1 (от 18 до 44 лет), М2/Ж2 (от 45 до 64 лет) и М3/Ж3 (от 65 до 74 лет), что позволило оценить

Таблица 1. Контингент исследования

Экс. Группа исследования	КТ легких пациентов с COVID-19			
	КТ-1	КТ-2	КТ-3	КТ-4
М1	13	25	26	18
М2	16	38	29	22
М3	11	31	36	31
Ж1	13	19	20	13
Ж2	14	21	28	22
Ж3	16	24	35	29

относительную диагностическую значимость выбранных тестов. Также были выделены группы, характеризующиеся по степени поражения лёгких, а именно: КТ1 (до 25% поражения легких), КТ-2 (25-50%), КТ-3 (50-75%), КТ-4 (>75%) (табл. 1).

Для достижения цели работы в качестве предполагаемой альтернативы нами были использованы оптические и иммунологические методы, основанные на взаимодействии исследуемого показателя с мобилизованными специфическими антителами, для определения тяжести протекания заболевания. Использовались оригинальные реагенты иммунохимического анализатора Architect 2000, Advia 1800, а также гематологического анализатора ACL TOP 700.

В результате использования спектрофотометрических и иммунологических методов определения биохимических показателей в сыворотке крови больных COVID-19 была определена концентрация ферритина, которая повышалась в 3,78–6,22 раза в сравнении с физиологической нормой. Значимые отклонения концентрации наблюдались в сыворотках крови групп М3 и М2, в группе М3, равняясь $448,23 \pm 0,76$ нг/мл что, вероятно могло быть связано с физиологически более высоким уровнем ферритина в крови больных мужского пола. При этом концентрация данного биохимического показателя отклонялась от референсных значений на значительные значения в сыворотках крови больных с поражением лёгочной ткани, соответствующей результатам КТ-3 степени и 4 степени.

Концентрация фибриногена увеличивалась в среднем в 2,1 раз. Повышение, вероятно, было связано с развивающимся на фоне заболевания воспалительным процессом, где данный биохимический показатель являлся белком острой фазы. Наиболее значительные отклонения, выявленные при исследовании крови больных были обнаружены среди сывороток крови с поражением лёгких, соответствующих КТ-3, однако в некоторых группах наблюдалось понижение уровня данного биохимического показателя в 1,5-2 раза, что, вероятно, оказалось следствием референтных методов лечения больных с тяжелым течением COVID-19.

Уровень фибриногена сыворотки крови в группе, соответствующей М3 и Ж3 возрасту, был в 1,3 раза больше и достигал уровня $5,12 \pm 0,12$ г/л ($p \leq 0,01$). Причиной таких результатов, как мы можем отметить и предположить, был факт возможного высокого риска развития атеросклеротических бляшек и повреждений кровеносных сосудов.

Уровень СРБ повышался в 15,2 раз в группах крови больных группы КТ-1, что возможно связано с началом острофазового ответа организма и, соответственно, отмечался рост уровня белков острой фазы. СРБ является биохимическим маркером воспаления и относится к белкам, играющим важную роль в формировании первой неспецифической защиты организма. В дальнейшем, при КТ-3 и КТ-4 концентрация СРБ в крови больных была повышена в 3,8 раз или оставалась в пределах допустимых значений. Подобная биохимическая картина крови, как мы считаем, была связана с особенностями исследуемого белка, который обладает как провоспалительными свойствами, участвуя в начальной стадии заболевания, так и противовоспалительными свойствами, которые проявляются при увеличении в сыворотке крови других белков острой фазы: фибриногена, ферритина и ИЛ-6.

Часто на фоне протекания инфекционного заболевания новой коронавирусной инфекции развивается сепсис, потому нами была определена концентрация ПКТ, концентрация которого в крови групп КТ1 и КТ-2 не превышала верхнюю границу референсных значений, в то время как в сыворотках крови групп М3 и Ж3 отмечался значительный рост концентрации ПКТ. Концентрация ПКТ продолжительное время оставалась в кровотоке в стабильном состоянии, что позволяет использовать, как удобный маркер патологического состояния организма в лабораторной диагностике системных воспалительных реакций, в том числе COVID-19. Изменение концентрации ПКТ, предположительно, было связано с влиянием цитокинов на процессы образования кальцитонина, то приводило к скоплению его предшественника, усиливающего иммунный ответ организма.

Другим наиболее важным биохимическим показателем в нашем исследовании был выбран ИЛ-6. Данный биохимический маркер синтезируется иммунными клетками в ответ на появление в организме повышенного содержания в крови СРБ. В связи с поздним иммунным ответом, синтез ИЛ-6 происходил, как правило, в больших количествах, вызывая в организме аутоагрессию, направленную не только на поражение клеток, пораженных вирусом, но и на здоровые клетки, вызывая гибель или повреждение стенок альвеол лёгких. При оценке тяжести заболевания COVID-19 с помощью метода КТ наблюдались очаги поражения по типу «матовое стекло». При исследовании иммунологическими методами, было обнаружено, что концентрация ИЛ-6 коррелировала с увеличением процента поражения легочной ткани, что, предположительно, свидетельствовало о развитии в группах с КТ-3 «цитокинового шторма», приводящего к быстрому переходу КТ-3 в степень КТ-4,

являющуюся для организма критической. При этом более высокие показатели были отмечены в сыворотках крови групп мужчин и женщин более старшей возрастной категории, а именно МЗ и ЖЗ.

Повышение концентрации D-димера в сыворотке крови достигало в исследовании $444,20 \pm 0,12$ нг/мл FEU ($p \leq 0,05$) нг/мл FEU. Концентрация показателя коррелировала с изменениями уровня фибриногена в крови больных. Значительные отклонения в уровне фибриногена наблюдались при поражении лёгочной ткани, соответствующих показателям КТ-3 и КТ-4.

Уровень лактата повышался в 1,3–2,6 раз относительно референсных значений. Изменение концентрации показателей молочной кислоты коррелировало с прогрессированием поражения лёгочной ткани. Повышение концентрации лактата являлось предиктором развития сепсиса и увеличения вероятности смертности.

Зависимость использования оптических методов (спектрофотометрия) от степени поражения легких при COVID-19 (метод компьютерной томографии) была оценена с помощью корреляционного анализа. В сыворотке крови группы мужчин (М1) коэффициент корреляции между концентрацией ферритина в сыворотке крови и КТ составил 0,96, в сыворотке группы М2 – 0,96, в сыворотке крови МЗ – 0,97, что в соответствии с критериями оценивания по шкале Чеддока показывало высокую связь и на про слеживающуюся зависимость между результатами использования оптического метода и степенью поражения лёгких по данным КТ.

Для оценки возможности использования иммунологических методов в диагностике и сопровождении течения COVID-19 исследовалась концентрация ИЛ-6 (повышение в 126–981 раз). В сыворотке крови группы женщин (Ж1) коэффициент корреляции между концентрацией ИЛ-6 в сыворотке крови и КТ во всех возрастных группах составлял 0,99.

Исходя из данных отмеченных зависимостей, можно сделать вывод, что оптические и иммунологические методы исследования являются точными, не оказывают влияние на организм человека, и при этом позволяют оценить тяжесть протекания новой коронавирусной инфекции, как альтернатива метода КТ легких. Более того, исследования сыворотки крови больных с COVID-19 с помощью оптических и иммунологических методов не требует обязательного присутствия больного, что является преимуществом данных методов в условиях распространения пандемии.

Список литературы / References:

1. Беляков Н.А., Рассомин В.В., Ястребова Е.Б. Коронавирусная инфекция COVID-19. Природа вируса, патогенез, клинические проявления. *Иммунология*, 2020, том 12, № 1, с. 7-21. [Belyakov N.A., Rassomin V.V., Yastrebova E.B. Coronavirus infection COVID-19. The nature of the virus, pathogenesis, clinical manifestations. *Immunology*, 2020, vol. 12, no. 1, pp. 7-21. (In Russ.)]
2. Бородин Е.А. Современные методы клинической лабораторной диагностики при COVID-19. *Лабораторная диагностика*, 2012, № 2, с. 16-22. [Borodin E.A. Modern methods of clinical laboratory diagnostics for COVID-19. *Laboratory diagnostics*, 2012, no. 2, pp. 16-22. (In Russ.)]
3. Войтенков В.Б., Марченко Н.В., Скрипниченко Н.В. и др. Значение инструментальных методов в диагностике пневмонии при коронавирусной инфекции. *Педиатрия*, 2020, № 1, с. 20-25. [Voitenkov V.B., Marchenko N.V., Skripnichenko N.V. et al. The value of instrumental methods in the diagnosis of pneumonia in coronavirus infection. *Pediatrics*, 2020, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]
4. Котляров П.М., Панышин Г.А., Гваришвили А.А. и др. Компьютерная томография в динамическом мониторинге вирусной пневмонии, ассоциированной с COVID-19 (клиническое наблюдение). *Вестник Российского Научного Центра Рентгенодиагностики*, 2020, том. 20, № 4, с. 90-105. [Kotlyarov P.M., Panshin G.A., Gvarishvili A.A. et al. Computed tomography in dynamic monitoring of viral pneumonia associated with COVID-19 (clinical observation). *Bulletin of the Russian Scientific Center for Roentgenoradiology*, 2020, vol. 20, no. 4, pp. 90-105. (In Russ.)]
5. Иванова В.В., Говорова Л.В., Тихомирова О.В. Особенности биохимических изменений в клетках и плазме крови при COVID-19. *Педиатрия*, 2020, № 9, с. 38-43. [Ivanova V.V., Govorova L.V., Tikhomirova O.V. Features of biochemical changes in cells and blood plasma in COVID-19. *Pediatrics*, 2020, no. 9, pp. 38-43. (In Russ.)]
6. Романова М.А. Методы лабораторной диагностики новой коронавирусной инфекции. *Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии: материалы Международной научной конференции*, 2020, № 2, с. 74-77. [Romanova M.A. Methods for laboratory diagnosis of a new coronavirus infection. *Physics and radio electronics in medicine and ecology: materials of the International scientific conference*, 2020, no. 2, pp. 74-77. (In Russ.)]
7. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А. и др. COVID-19: Этиология, клиника, лечение. *Инфекция и иммунитет*, 2020, том 10, № 3, с. 421-445. [Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A. and others. COVID-19: Etiology, clinic, treatment. *Infection and immunity*, 2020, vol. 10, no. 3, pp. 421-445. (In Russ.)]
8. Samray, R.S., Zingarelli B., Wong H.R. Role of biomarkers in sepsis care. *Shock*, 2016, no. 40, pp. 58-65. ISBN 1073-2322.
9. Zou L., Ruan F., Huang M. et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.*, 2020, no. 17, pp. 773-775. DOI: 10.1056/NEJMc2001737

BIOCHEMICAL METHODS OF BLOOD INFLAMMATION MARKERS AS AN ALTERNATIVE TO COMPUTER TOMOGRAPHY METHODS FOR DETERMINING THE DEGREE OF PULMONARY TISSUE DAMAGE IN NEW CORONAVIRUS INFECTION**Gajdabura E.A., Zolotavina M.L., Bratova A.V.**

Kuban State University

Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: gajdabura.alena@mail.ru

Abstract. In a scientific research work, methods were studied and selected to assess the degree of damage to the lung tissue in patients with a diagnosed new coronavirus infection. For this, physical methods were used – the method of computed tomography, as well as alternative optical and immunological methods for examining blood serum. The aim of the study was to determine biochemical markers of blood inflammation, such as ferritin, fibrinogen, CRP, PCT, IL-6, lactate, in the blood serum of patients with new coronavirus infection as an alternative way to assess the degree of lung damage. In the course of our work, we examined the blood serum and computed tomography readings of 554 patients in the intensive care unit of the Research Institute - Regional Clinical Hospital No. 1 "diagnosed with a new coronavirus infection. The practical significance of the research work lies in the recommendation of the use of immunological and optical methods to study the condition of patients with COVID-19. To achieve this goal, changes in biochemical parameters in blood serum were determined at the first, second, third and fourth degrees of lung damage in people of different ages and sex; In the course of the work, a correlation analysis was carried out between the biochemical parameters of blood and the degree of lung damage, assessed according to the indications of computed tomography, on the basis of which we concluded that optical and immunological methods for the determination of IL-6 and ferritin in blood serum, a change concentrations of which correlated with an increase in the percentage of lung tissue damage, can serve as an alternative way to assess the severity of the disease and predict the further course of COVID-19.

Key words: *COVID-19, optical methods, immunological methods, computed tomography method.*

ДИФФУЗИЯ ТОЛУИДИНОВОГО СИНЕГО В ГИДРОГЕЛЕВЫХ СРЕДАХ: ДАННЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ЗАДАЧИ ДЛЯ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Емельянова А.Ю., Игнатьева М.М., Черенков И.А., Кривилев М.Д.

Удмуртский государственный университет

ул. Университетская, 1, г. Ижевск, 426034, РФ; e-mail: ivch75@udsu.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В работе обобщены данные электрохимических экспериментов по исследованию диффузии толуидинового синего в гидрогелевых средах на основе биосовместимых гелеобразователей (желатина и альгината) и их комбинаций. Приведены расчеты коэффициентов диффузии на основании данных электрохимических экспериментов. Экспериментальные данные использованы для расчетов диффузионной задачи в модели, описывающей связь геометрии гелевой капли, коэффициента диффузии с временем формирования отклика и насыщением поверхности электрода электроактивными молекулами. Показаны ограничения диффузионной модели для описания экспериментальных данных. Сформулированы направления дальнейшего развития модели.

Ключевые слова: толуидиновый синий, циклическая вольтамперометрия, альгинат, желатин, гидрогели, COMSOL Multiphysics

Для создания органов-на-чипе, тканеинженерных конструкций, а также для моделирования гистофизиологических процессов, происходящих в межклеточном матриксе, необходимы сравнительно простые и информативные модели, которые позволяют количественно описать диффузионные, адсорбционные и биокаталитические свойства гидрогелевых сред [1-3]. Представляется перспективным использовать для этого электрохимические методы, в последние десятилетия все шире применяемые для решения биомедицинских задач [4-6].

В предыдущих работах мы представили результаты серии экспериментов, иллюстрирующих концепцию биоэлектрохимического моделирования [7,8]. На некоторых ее аспектах хотелось бы остановиться подробнее.

Как правило, для биоэлектрохимических систем используют электроактивную молекулу-медиатор, способную к электрохимическим окислительно-восстановительным превращениям на поверхности рабочего электрода [9]. Медиатор должен обладать обратимым электрохимическим поведением, которое характеризуется воспроизводимыми вольтамперными кривыми циклической вольтамперометрии (ЦВА). В биоэлектрохимическом моделировании в гидрогелевых средах медиатору отводится две основных роли. Во-первых, с помощью анализа вольтамперных зависимостей можно оценить диффузионные свойства среды, отражающие проницаемость гидрогеля для конкретного медиатора. Например, для катионного красителя толуидинового синего (ТС) диффузия красителя зависима от наличия и количества анионных групп в составе геля. Учитывая, что углеводные компоненты межклеточного матрикса представляют собой полианионы [10], ТС как компонент электрохимической модели позволит количественно оценить их содержание. Используя анионные или незаряженные медиаторы в одной и той же среде с последующим сопоставлением вольтамперограмм можно получить представление о составе гидрогелевого матрикса в отношении анионных и катионных групп без существенных повреждающих воздействий на образец.

Учитывая обратимое электрохимическое поведение медиатора, можно провести расчет эффективного коэффициента диффузии, используя уравнение Рейнлдса-Шевчика. Такие данные востребованы для детализации фармакокинетики лекарственных средств. Токи ЦВА для диффузионно контролируемого электрохимического процесса пропорциональны коэффициенту диффузии, а, следовательно, могут быть использованы для оценки проницаемости среды, а если анализируется белоксодержащий гидрогель, то и для оценки протеолиза – поскольку активность протеаз снимает диффузионные ограничения и способствует ускорению роста пиковых значений силы тока [7,8]. Еще одной задачей медиатора в биоэлектрохимической модели является оценка окислительно-восстановительного равновесия среды. Как правило, медиатор способен к окислительно-восстановительным превращениям не только в электрохимических процессах, но и под действием ферментов (оксидаз, дегидрогеназ и др.). Это приводит к изменению соотношения окисленной и восстановленной форм медиатора независимо от электродных процессов и отразится на характере вольтамперных кривых ЦВА. Отметим, что многие фармакологические субстанции и биологически активные молекулы обладают электроактивностью и могут непосредственно использоваться в биоэлектрохимических моделях [11,12]. Таким образом, анализ электрохимического поведения медиатора в гидрогелях методом ЦВА может дать информацию о составе и свойствах среды и позволяет моделировать ряд биологически значимых процессов.

Многие вопросы биоэлектрохимического моделирования можно решать с помощью расчетных моделей, учитывающих диффузионные параметры и геометрию электрода и гидрогелевой капли. Расчетные методы необходимы для рационального планирования биоэлектрохимического эксперимента. Их применение позволит

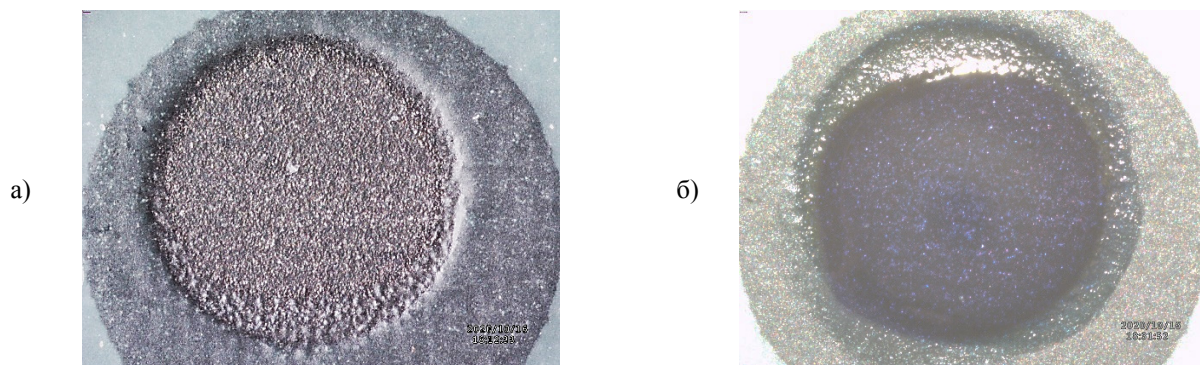


Рисунок 1. Поверхность рабочего электрода (а) с каплей гидрогеля (б)

оптимизировать объем и концентрацию гидрогеля, облегчить подбор медиатора с необходимыми диффузионными и электрохимическими свойствами, определить концентрации медиатора в системе, каталитическую активность биологических компонентов (ферментов и клеток).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались планарные электродные системы («Автоком», Москва, Россия), включающие рабочий и вспомогательный электроды (графитовые), а также электрод сравнения – хлорсеребряный. Для формирования гидрогелевой среды на поверхности рабочего электрода использовали альгинат натрия и желатин в виде 3% (масс.) растворов на забуференном физиологическом растворе (ЗФР), которые готовили непосредственно перед экспериментом.

Перед измерениями электроды подвергали циклированию в диапазоне потенциалов +1200...–1200 мВ в среде ФСБ для стабилизации характеристик. Для полимеризации альгината использовали 2 М раствор хлорида кальция, наносимый непосредственно на рабочий электрод при подготовке. Избыток раствора через некоторое время удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Наличие и локализацию гелевой капли на электроде контролировали с помощью цифрового микроскопа «Биолаб В-3 LCD» (рис. 1).

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовался диапазон потенциалов 0...–450 мВ (отн. Ag/AgCl) со скоростью развертки потенциала 100 мВ/с. Измеряемым параметром были значения силы тока на рабочем электроде. Для оценки диффузии измерения проводились в течение 50 минут с интервалами в 5 минут. Концентрация толуидинового синего во всех измерениях была постоянной и составила 0,1 мМ. Фоновым электролитом служил ФСБ.

Для моделирования диффузии ТС в капле гидрогеля использованы возможности пакета COMSOL Multiphysics 5.5, интерактивной среды для моделирования и расчетов различных физических задач, основанных на дифференциальных уравнениях в частных производных.

В соответствии с геометрией рабочего электрода была выбрана аксиально-симметричная расчетная область (*Axial 2D*). Форму капли наносимого на электрод гидрогеля определяли как полуэллипсоид, высота которого зависит от объема наносимого гидрогеля и площади рабочего электрода ($S = 3 \times 10^{-6} \text{ м}^2$, в модели задавали через радиус рабочей области электрода, $R = 9,75 \times 10^{-4} \text{ м}$). Так, для гидрогелей объемами 0,1, 0,5 и 1 мкл высоты капли равны $5,02 \times 10^{-5}$, $2,51 \times 10^{-4}$ и $5,02 \times 10^{-4} \text{ м}$ соответственно. Геометрия капли представлена на рисунке 2.

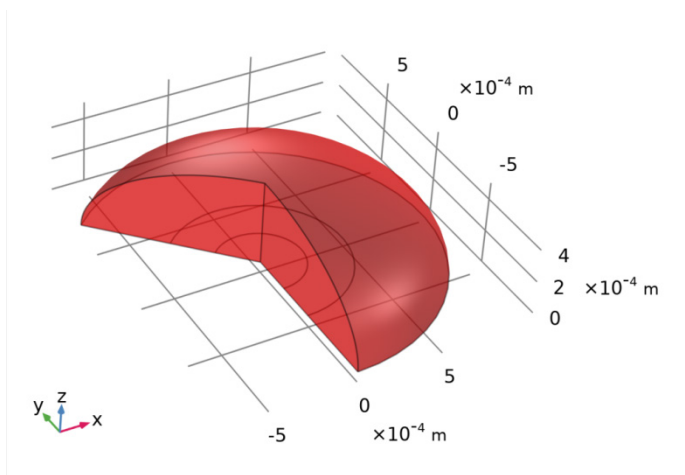


Рисунок 2. Геометрические параметры гидрогелевой капли, наносимой на рабочий электрод

Рассмотрен вариант простой диффузии, подчиняющейся закону Фика (использован физический интерфейс *Transport of Diluted Species* раздела *Chemical Species Transport*), в отсутствие как конвективного переноса, так и движения электроактивной метки в электрическом поле. Таким образом, в данной модели рассматривается исключительно диффузионная задача, гель представлен пассивным, а процесс диффузии описывается следующими уравнениями:

$$\partial C / \partial t + \nabla J = R$$

$$J = -D \nabla C$$

Коэффициенты диффузии D задаются в параметрах модели и характеризуют проницаемость гидрогелей разных концентраций. Для системы без гелеобразователя использован коэффициент диффузии ТС в водных растворах приведенный в литературе ($D_{\text{зфр}} = 1,42 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$) [13], а для альгинатного гидрогеля – рассчитанные на основании экспериментальных данных ЦВА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вольтамперные кривые, характеризующие электрохимическое поведение ТС подробно описаны нами в предыдущих работах [7,8]. В диапазоне потенциалов 0...-450 мВ они имеют два отчетливых пика, соответствующих электровосстановлению и электроокислению ТС. По модулю значения пиковых токов близки, а соответствующие им потенциалы сближены, что может служить критериями обратимого электрохимического процесса [14]. Для таких условий применимо уравнение Рендлса-Шевчика:

$$I_p = -0,446cA \sqrt{\frac{n^3 F^3 v D}{RT}},$$

где I_p – пиковые значения силы тока (А); c – концентрация ТС (моль/ м^3); A – площадь рабочего электрода (м^2); n – число электронов, участвующих в электрохимической реакции; F – постоянная Фарадея (Кл/моль), v – скорость развертки потенциала (В/с), D – коэффициент диффузии ($\text{м}^2/\text{с}$), R – универсальная газовая постоянная (Дж/моль·К), T – температура (К) [14], Позволяющее по значениям пиковых токов рассчитать коэффициент диффузии красителя.

Расчетное значение коэффициента диффузии ТС в среде желатинового гидрогеля составило $0,4 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$, что заметно ниже оценочных значений коэффициента диффузии ТС для водных сред, полученных по данным расчетов на основе приближения Стокса-Эйнштейна, приведенных в литературе ($1,42 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$) [13]. Гидрогель альгината, стабилизированный ионами кальция, существенно замедляет диффузию красителя ($D = 0,08 \times 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}$). Смешивая при подготовке гелевой среды растворы альгината и желатина в равных пропорциях, удается повысить коэффициент диффузии ($D = 0,7 \times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$), а инкубация этой смеси с ионами кальция способствует существенному повышению коэффициента диффузии ($D = 1 \times 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$), приближая его к расчетным значениям, полученным для водных растворов. При этом время формирования сигнала в среде желатинового гидрогеля (появление пиков на вольтамперных кривых после внесения раствора ТС) составило около 30 с, и за время эксперимента не происходило выхода показателей силы тока на постоянные значения, соответствующие насыщению электродной поверхности. В среде альгинатного гидрогеля различаемые токи также появились на первом цикле (30 с), а через 300 секунд показатели пиковых токов приняли относительно постоянное значение, что можно рассматривать как установление равновесия у электродной поверхности. При этом максимальные значения токов в среде альгината не достигали показателей, полученных в гидрогеле желатина.

Экспериментальные данные использовали для расчетов в диффузионной модели с разными объемами геля на электроде и разными коэффициентами диффузии. В связи с тем, что объем наносимого раствора электроактивной метки во много раз больше объема геля, на боковой границе полуэллипсоида была задана постоянная концентрация ТС в объеме наносимого раствора, использованная во всех электрохимических экспериментах $C_{\text{ТС}} = 10^{-4} \text{ М}$. В то же время в остальном объеме геля на начальный момент времени задана нулевая концентрация ТС.

$$C_{\text{ТС}0} = 0.$$

Для ограничения переноса массы на нижней границе полуэллипсоида (гель у поверхности электрода) задано граничное условие *No Flux*.

Можно отметить, что согласно уравнению Рейндлса-Шевчика, время выхода тока на пиковые значения совпадает со временем насыщения поверхности электрода красителем, что в модели является временем выравнивания концентрации на поверхности рабочего электрода. Вследствие этого при расчете времени выхода тока на плато в качестве секущей точки был выбран центр поверхности рабочего электрода. Для оценки времени возникновения токов на электроде выбрана точка, удаленная от края капли на $0,01R$.

На модели проведены параметрические исследования поведения ТС в геле в зависимости как от коэффициента диффузии, так и от геометрии капли, в частности, для расчетных коэффициентов $D_{\text{зфр}}$ (в среде буферного раствора), $D_{\text{А-Са}}$ (в среде альгината кальция) и $D_{\text{АЖ-Са}}$ (в среде альгинат-желатинового геля), и для объемов равных 0,1, 0,5, 1 мкл. Расчеты проводились для временного интервала 50 минут с шагом 1 с.

В предложенном виде модель позволяет произвести расчеты распределения красителя в капле на поверхности рабочего электрода (рис. 3), провести оценку времени появления красителя на поверхности электрода и ее насыщения электроактивными молекулами.

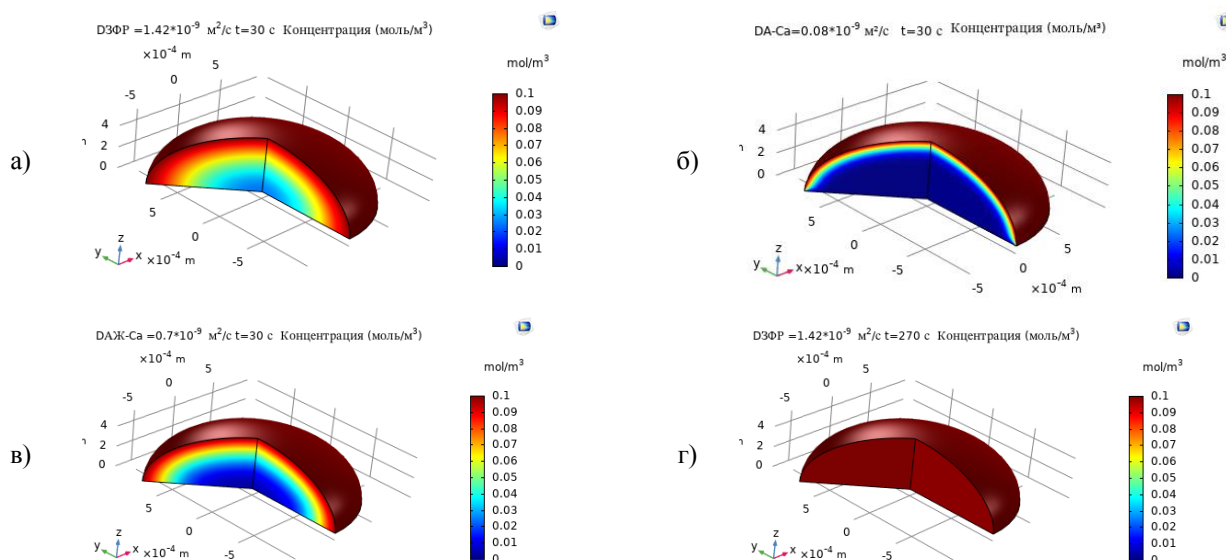


Рисунок 3. Распределение красителя в капле среды $V=1$ мкл для различных коэффициентов диффузии, соответствующих отсутствию геля (а), гидрогелю альгината кальция и альгинат-желатиновому гелю (в) через 30 с., а также после установления равновесия (г). Изображения получены с помощью решателя *COMSOL Multiphysics*

При расчёте времени насыщения электродной поверхности медиатором для различных объемов капли получены данные, приведенные в таблице 1. Для объемов 0,5 и 1 мкл., расчётные показатели времени насыщения заметно выше экспериментальных значений. По-видимому, для условий буферного раствора без гидрогелевой среды существенный вклад вносят конвекционные процессы.

Обращает на себя внимание расхождение расчетных показателей времени насыщения поверхности ТС для альгинатного геля с экспериментальными данными. При ЦВА именно альгинатный гель обеспечивал относительно быструю стабилизацию токов.

Для капли объемом 0,1 мкл наблюдаем быстрое установление равновесия во всех случаях, так, к моменту завершения первого цикла ЦВА, по всему объему капли концентрация ТС постоянна и равна $C_{TC}=10^{-4}$ М.

Были проведены расчеты концентрации ТС на поверхности рабочего электрода для условий разных коэффициентов диффузии. Такие расчеты показывают ориентировочное «время ответа» электрохимической системы (табл. 2).

Полученные данные показывают, что в пределах одной секунды на электроде может быть достигнута концентрация ТС, доступная для регистрации методом ЦВА, для всех исследованных гидрогелей. При этом для малого объема геля различия со средой буферного раствора незначительны, а нанесение большего объема гидрогеля (особенно с низким коэффициентом диффузии ТС) позволяет уже на начальных этапах эксперимента различить среды с разной проницаемостью.

Таблица 1 Ожидаемое время (с) насыщения поверхности рабочего электрода толуидиновым синим для различных сред и объемов капли гидрогеля. Данные получены с помощью решателя *COMSOL Multiphysics*

D (м²/с) \ V (мкл)	0,1	0,5	1
Буферный раствор ($1,42 \times 10^{-9}$)	4	99	270
Альгинат-желатиновый гель ($0,7 \times 10^{-9}$)	10	192	547
Альгинат кальция ($0,08 \times 10^{-9}$)	85	2975	>3600

Таблица 2 Концентрация толуидинового синего (мкмоль/л) при $t = 1$ с. в точке поверхности рабочего электрода, удаленной от края капли на $0,01R$, для различных сред и объемов капли гидрогеля. Данные получены с помощью решателя *COMSOL Multiphysics*

D (м²/с) \ V (мкл)	0,1	0,5	1
Буферный раствор ($1,42 \times 10^{-9}$)	100	92	87
Альгинат-желатиновый гель ($0,7 \times 10^{-9}$)	99	86	81
Альгинат кальция ($0,08 \times 10^{-9}$)	96	48	44

Таким образом, при решении относительно простой диффузионной задачи, удалось получить удовлетворительное соответствие данных экспериментальным показателям. В существующем виде модель позволяет предсказать скорость поступления красителя к электроду для разных типов гидрогелей, оценить время формирования отклика системы (при условии диффузионного контроля электрохимического процесса), влияния геометрии гелевой капли, концентрации электроактивного вещества. При этом можно сформулировать направления совершенствования модели:

- необходимо ввести в модель описание адсорбции электроактивного вещества компонентами гидрогеля. Например, катионные красители (ТС) взаимодействуют с полианионными гелеобразователями (альгинатом), что вносит существенный вклад в формирование результирующего сигнала и может служить фактором, объясняющим результаты расхождения экспериментальных данных и результатов моделирования для системы «альгинат-ТС»;
- для воспроизведения условий сдвига окислительно-восстановительного равновесия требуется введение параметра «соотношение окисленной и восстановленной формы медиатора» как в объеме раствора, так и на поверхности электрода;
- для имитации гистофизиологических процессов необходима возможность внесения в гидрогель «неоднородностей», определяющих локальные изменения окислительно-восстановительных и диффузионных свойств гидрогеля, отражающие активность клеток.

Список литературы / References:

1. Giobbe G.G., Crowley C., Luni C., Campinoti S., Khedr M., Kretzschmar K., De Santis M.M., Zambaiti E., Michielin F., Meran L., Hu Q., van Son G., Urbani L., Manfredi A., Giomo M., Eaton S., Cacchiarelli D., Li V., Clevers H., Bonfanti P., De Coppi P. Extracellular matrix hydrogel derived from decellularized tissues enables endodermal organoid culture. *Nature communications*, 2019, vol. 10, № 1, p. 5658. doi: 10.1038/s41467-019-13605-4
2. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
3. Fonseca K.B., Bidarra S.J., Oliveira M.J., Granja P.L., Barrias C.C. Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomater.*, 2011, vol. 7, no. 4, pp. 1674-1682.
4. Tsivadze A.Y., Batishchev O.V., Andreev V.N., Petrikov S.S., Goroncharovskaya I.V., Evseev A.K., Shabanov A.K., Goldin M.M. Voltammetric analysis in blood serum in patients with severe combined trauma. *Doklady Physical Chemistry*, 2019, vol. 486, no. 1. pp. 67-69.
5. Андреев В.Н., Евсеев А.К., Гараева Г.Р., Гольдин М.М. Сопоставление редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови. *Молекулярная медицина*, 2013, № 4, С. 37-40. [Andreev V.N., Evseev A.K., Garaeva G.R., Goldin M.M. Blood serum redox potential and antioxidant activity comparison. *Molekulyarnaya medicina*, 2013, no. 4, pp. 3740. (In Russ.)]
6. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuzikov A.V., Agafonova L.E., Archakov A.I. Electrochemical methods in biomedical studies. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2015, vol. 9, no. 3, pp. 228-243.
7. Черенков И.А. Раевских К.С., Сергеев В.Г., Кривилев М.Д. Моделирование протеазной активности с использованием электрохимического интерфейса. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 2, с. 422-426. [Cherenkov I.A., Raevskich K.S., Sergeev V.G. Krivilyov M. D. Modeling protease activity using the electrochemical interface. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 422-426. (In Russ.)]
8. Черенков И.А., Березина Л.С., Кривилев М.Д., Сергеев В.Г. Диффузия толуидинового синего в альгинат-желатиновом гидрогеле при воздействии пепсина. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 3, с. 481-485. [Cherenkov I.A., Berezina L.S., Krivilyov M. D., Sergeyev V.G. Diffusion of toluidine blue in alginate-gelatine hydrogel under the influence of pepsin. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2020, vol. 5, no. 3, pp. 481-485. (In Russ.)]
9. Rawson F.J., Downard A.J., Baronian K.H. Electrochemical detection of intracellular and cell membrane redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, p. 5216.
10. Серов В.В., Шехтер А.Б. *Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология)*. М.: Медицина, 1981, 312 с. [Sero V.V., Shechter A.B. *Connective tissue (functional morphology and general pathology)*. M.: Medicine, 1981, 312 p. (In Russ.)]
11. Kumar S.A., Chen S.L., Chen S.M. Amperometric sensor for detection of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide using a poly (pyronin B) film modified electrode. *Electroanalysis*, 2009, vol. 21, no. 12, pp. 1379-1386.
12. Huang J., Zeng Q., Bai S., Wang L. Application of Coal in Electrochemical Sensing. *Anal. Chem.*, 2017, vol. 89, no. 16, pp. 8358-8365.
13. Goudie M.J., Ghuman A.P., Collins S.B., Pidaparti R.M., Handa H. Investigation of diffusion characteristics through microfluidic channels for passive drug delivery applications. *J. Drug Deliv.*, 2016. doi: 10.1155/2016/7913616
14. *Электроаналитические методы*, ред. Шольц Ф. М.: Бином «Лаборатория знаний», 2010, 326 с. [Electroanalytical methods, ed. Scholz F., M: Binom "Laboratoriya znaniy", 2010, 326 p. (In Russ.)]

**TOLUIDINE BLUE DYE DIFFUSION IN HYDROGEL MEDIA: ELECTROCHEMICAL EXPERIMENTS
DATA AND TASKS FOR NUMERICAL SIMULATION****Emelyanova A.Yu., Ignat'eva M.M., Cherenkov I.A., Krivilyov M.D.**

Udmurt State University

Universitetskaya str., 1, Izhevsk, 426034, Russia; e-mail: ivch75@udsu.ru

Abstract. This work summarizes the electrochemical experiments data in the study of toluidine blue dye diffusion in hydrogel media based on biocompatible gelling agents (such as gelatin and alginate) and their combinations. Diffusion coefficient calculations based on electrochemical experiments findings are shown. Experimental data is used for diffusion simulation study in a model describing connection of gel drop geometry and diffusion coefficient to the response generation time and electrode surface saturation with electroactive molecules. Diffusion model restrictions for describing experimental data are shown. Further model development directions are formulated.

Key words: *toluidine blue, cyclic voltammetry, alginate, gelatin, hydrogels, COMSOL Multiphysics.*

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ КОМПОЗИТА НАНОВОЛОКНА ОКСИДА АЛЮМИНИЯ – НАНОАЛМАЗЫ ПРИ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ Fe^{2+} И Cu^{2+}
**Ронжин Н.О.¹, Посохина Е.Д.¹, Михлина Е.В.², Симунин М.М.³, Рыжков И.И.^{2,3},
Бондарь В.С.¹**

¹ Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: roniol@mail.ru

² Институт вычислительного моделирования ФИЦ КНЦ СО РАН

ул. Академгородок, 50/44, г. Красноярск, 660036, РФ

³ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Разработана методика получения на основе нановолокон оксида алюминия и наноалмазов детонационного синтеза сенсорного композита в виде твердых дисков толщиной 0,5 мм и диаметром 40 мм. Подобраны условия термической обработки дисков композита для придания им структурной стабильности в водных растворах. Обнаружен эффект осветления композита при обработке температурами выше 500 °С – темно-серый цвет материала меняется на белый. Обнаруженный эффект связан с удалением неалмазного углерода с поверхности наноалмазов, инкорпорированных в матрицу нановолокон оксида алюминия, при термической обработке композита температурами более 500 °С. В пользу этого свидетельствуют результаты синхронного термического анализа композитных материалов – термогравиметрического (ТГА) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). В модельных экспериментах продемонстрирована применимость имеющего белый цвет композита для визуальной качественной оценки наличия фенола в водных пробах. Инкубацией образцов композита в растворах сульфата железа и сульфата меди проведена функционализация материала этими ионами металлов. Установлено, что каталитическая эффективность функционализированных ионами Cu^{2+} и Fe^{2+} композитов при тестировании фенола значительно возрастает, по сравнению с исходным композитом – в 2,6 и 3,2 раза, соответственно.

Ключевые слова: наноалмазы, нановолокна оксида алюминия, композит, сенсор, ионы металлов, функционализация, фенол.

Одной из актуальных задач в области мониторинга окружающей среды является разработка эффективных и простых в использовании инструментов обнаружения вредных и токсичных веществ. В частности, для решения этой задачи интерес представляют сенсоры, основанные на колориметрическом принципе и позволяющие проводить качественную и количественную оценку веществ по изменению цвета анализируемой пробы [1-3]. Такие сенсоры удобны и просты в применении: образующийся продукт реакции виден визуально и указывает на присутствие аналита. Ранее мы установили, что наноалмазы детонационного синтеза за счет поверхностных микропримесей ионов железа и меди катализируют в присутствии перекиси водорода реакцию соокисления фенола и 4-аминоантипирина, образуя цветной продукт [4,5]. Это позволило на основе наноалмазов как сенсорного элемента и матрицы из нановолокон оксида алюминия создать композит, позволяющий детектировать фенол в водной среде [6]. Цель данной работы состояла в получении из нановолокон оксида алюминия и детонационных наноалмазов сенсорного композита, позволяющего визуально оценивать наличие фенола в образцах воды, и изучении возможности повышения каталитической активности и диагностической эффективности композита за счет его дополнительной функционализации ионами железа и меди.

В работе использовали модифицированные наноалмазы с высокой коллоидной стабильностью в водных суспензиях и средним размером кластеров 70 нм, которые получали из коммерческих наноалмазов взрывного синтеза (ООО «Реал-Дзержинск, Россия) оригинальным способом [7]. Матрицей для фиксации наноалмазов являлись нановолокна Al_2O_3 диаметром 10–15 нм и длиной до нескольких сантиметров (ANF Technology, Эстония) [8].

Изготовление нанокомпозита проводили согласно схеме, представленной на рисунке 1. Суспензию нановолокон Al_2O_3 готовили в деионизованной воде изложенным ранее способом [6]. К навеске материала добавляли деионизованную воду и диспергировали нановолокна перемешиванием суспензии на магнитной мешалке в течение 30 мин. После этого суспензию обрабатывали ультразвуком (Sonics & Materials VC-505, 22 кГц, США) в течение 15 мин для придания нановолокнам большей коллоидной устойчивости. В результате ультразвуковой обработки исходная длина нановолокон уменьшалась до нескольких мкм. Приготовленную суспензию нановолокон и гидрозоль наночастиц смешивали при весовом соотношении компонентов 5:1 и инкубировали полученную смесь в течение 15 мин при 32 °С при постоянном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. После этого проводили вакуумную фильтрацию проинкубированной смеси через фторопластовый фильтр (диаметр пор 0,6 мкм), на поверхности которого из полученного композита

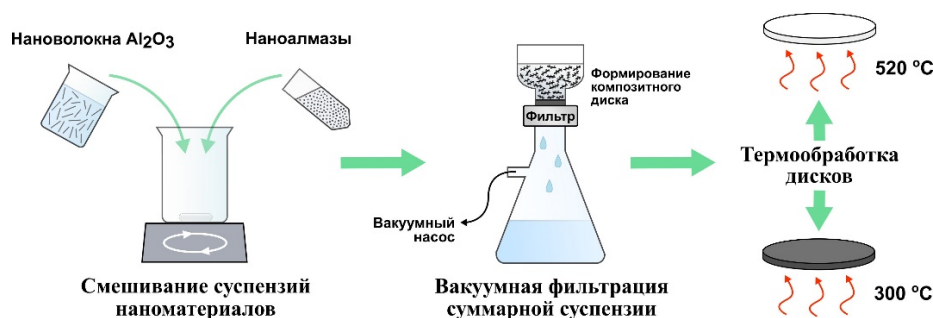


Рисунок 1. Схема получения композита из нановолокон Al_2O_3 и наноалмазов

формировался круглый диск диаметром 40 мм [6]. Для сравнительных исследований в качестве контроля использовали диски, полученные аналогичным образом из нановолокон Al_2O_3 . Для придания дискам структурной стабильности в водных растворах проводили их термообработку (вакуумная электропечь Спарк-Дон Микротерм 95, Россия) в интервале температур 200–600 °C. Образцы композита функционализировали с помощью адсорбции на их поверхность ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} , инкубируя образцы в течение часа при 22 °C в водных растворах 25 mM FeSO_4 и CuSO_4 и после этого трижды отмывая раствором 120 mM NaCl .

Функциональную активность композита оценивали с помощью реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-аминоантипирин – пероксид водорода) [9]. Количество образовавшегося в реакции цветного продукта, концентрация которого пропорциональна концентрации фенола в пробе, определяли спектральным методом (спектрофотометр UV-1800, Shimadzu, Япония) по поглощению при длине волны 506 нм.

Синхронный термический анализ проводили на приборе STA 449 Jupiter (NETZSCH, Германия), сочетающем одновременное измерение изменения массы (термогравиметрический анализ – ТГА) и тепловых потоков (дифференциальная сканирующая калориметрия – ДСК). Образцы (наноалмазы, нановолокна Al_2O_3 и композит на их основе) нагревали в соответствии с температурной программой со скоростью 10 К/мин от 40 до 1000 °C в динамической воздушной атмосфере с расходом 30 мл/мин.

В работе было установлено, что образцы композита приобретают структурную стабильность в водных растворах после их термообработки 300 °C и выше. При обработке композита температурами выше 500 °C был обнаружен эффект осветления материала – темно-серый цвет менялся на белый (рис. 2). Вероятнее всего, наблюдаемый феномен объясняется удалением неалмазного углерода с поверхности наноалмазов при термической обработке композита температурами более 500 °C. В пользу этого свидетельствуют результаты синхронного термического анализа образцов композита, которые приведены на рисунке 3. Начиная с 430 °C наблюдается резкий прирост выделения CO_2 , связанный с распадом поверхностных химических групп наноалмазов [10], а также со сгоранием неалмазного (аморфного) углерода на поверхности наночастиц [11]. При этом максимум высвобождения CO_2 приходится на 590 °C, а регистрируемый максимальный выброс тепла при 560 °C сопровождается потерей массы образца на 18% (рис. 3). Стоит отметить, что синхронный термический анализ контрольной матрицы из нановолокон Al_2O_3 не выявил потери массы образца или каких-либо заметных тепловых процессов в исследуемом диапазоне температур.

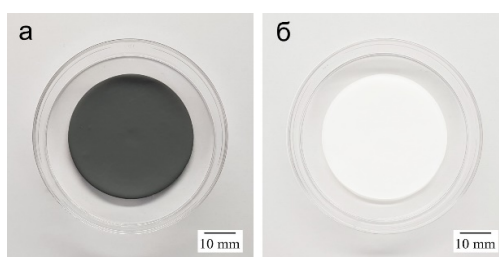


Рисунок 2. Внешний вид композитного диска после термообработки при 300 °C (а) и 520 °C (б)

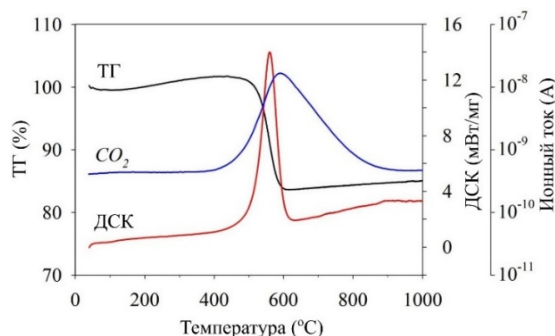


Рисунок 3. Синхронный термический анализ образца композита



Рисунок 4. Динамика образования цветного продукта реакции окислительного азосочетания при использовании композита для визуального качественного обнаружения фенола в образце воды

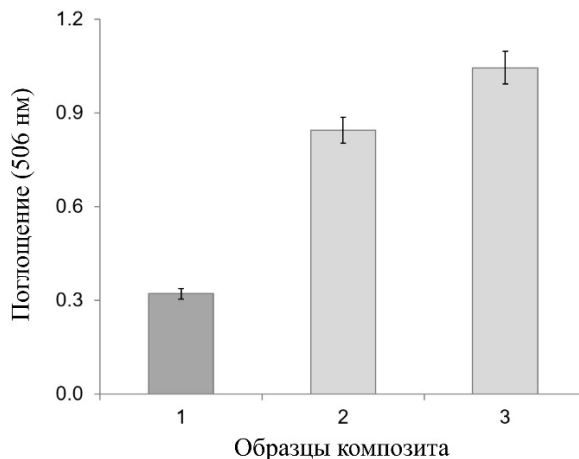


Рисунок 5. Образование продукта реакции, катализируемой разными образцами композита: 1 – исходный композит; 2 и 3 – композит, функционализированный ионами Cu^{2+} и Fe^{2+} , соответственно

При сравнительной оценке функциональной активности термически обработанных образцов композита было установлено, что после воздействия температурами, близкими к области максимального выхода тепла ($560\text{ }^{\circ}\text{C}$), композит утрачивает свою каталитическую функцию в реакции азосочетания. Исходя из этого, для получения каталитически активного и имеющего белый цвет композита нами был определен температурный диапазон его термообработки от 500 до $520\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В модельных экспериментах была продемонстрирована применимость композита белого цвета для визуальной качественной оценки наличия фенола в водных образцах. На рисунке 4 представлена динамика образования цветного продукта после добавления на поверхность композитного диска ($d = 6,5\text{ мм}$) необходимых компонентов реакции (4-аминоантипирин и пероксид водорода) и аликвоты воды, содержащей фенол. Образующаяся окраска позволяет быстро визуально оценить присутствие фенола в пробе, что делает такой композит применимым в качестве сигнального индикатора для мониторинга загрязнения водной среды фенолом. После этого может быть проведена количественная оценка фенола в тестируемой пробе воды спектральным методом.

В экспериментах показано, что инкубация образцов композита в водных растворах CuSO_4 и FeSO_4 сопровождается адсорбцией на них ионов указанных металлов и это увеличивает каталитическую активность материала в реакции азосочетания. Установлено, что эффективность функционализированных ионами Cu^{2+} и Fe^{2+} композитов при тестировании фенола значительно (в 2,6 и 3,2 раза, соответственно) возрастает, по сравнению с исходными образцами композита (рис. 5).

Таким образом, в представленной работе из нановолокон оксида алюминия и детонационных наноалмазов получен сенсорный композит, позволяющий визуально оценивать наличие фенола в водной среде. С помощью термообработки композита при $520\text{ }^{\circ}\text{C}$ получен композит белого цвета, обладающий каталитической активностью в реакции окислительного азосочетания. Результаты синхронного термического анализа (ТГА/ДСК) указывают на то, что эффект осветления композита происходит вследствие удаления неалмазного углерода с поверхности наноалмазов, инкорпорированных в матрицу нановолокон оксида алюминия. В экспериментах показано, что ионы Fe^{2+} и Cu^{2+} адсорбируются на поверхность композита из водных растворов. Установлено, что функционализация ионами меди и железа существенно повышает каталитическую эффективность композита при тестировании фенола в образцах воды, по сравнению с эффективностью исходного композита.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ 18–29–19078 мк.

Список литературы / References:

1. Ondigo D.A., Tshentu Z.R., Torto N. Electrospun nanofiber based colorimetric probe for rapid detection of Fe^{2+} in water. *Analytica Chimica Acta*, 2013, vol. 804. doi: 10.1016/j.aca.2013.09.051.
2. Sarika R., Shankaran D.R. Colorimetric detection of picric acid using rhodamine dye loaded nanofiber membrane. *Sensor Letters*, 2016, vol. 14. doi: 10.1166/sl.2016.3708.

3. Geltmeyer J., Vancoillie G., Steyaert I., Breyne B., Cousins G., Lava K., Hoogenboom R., De Buysser K., De Clerck K. Dye modification of nanofibrous silicon oxide membranes for colorimetric HCl and NH₃ sensing. *Advanced Functional Materials*, 2016, vol. 26. doi: 10.1002/adfm.201602351.
4. Ronzhin N.O., Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S. Catalytic activity of nanodiamonds in azocoupling reaction. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2014, vol. 5. doi: 10.4236/jbmb.2014.53020.
5. Ronzhin N., Puzyr A., Bondar V. Detonation nanodiamonds as a new tool for phenol detection in aqueous medium. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2018, vol. 18. doi: 10.1166/jnn.2018.15382.
6. Ronzhin N.O., Posokhina E.D., Mikhlin E.V., Simunin M.M., Nemtsev I.V., Ryzhkov I.I., Bondar V.S. Production of a composite based on alumina nanofibers and detonation nanodiamonds for creating phenol indication systems. *Doklady Chemistry*, 2019, vol. 489. doi: 10.1134/S001250081911003X.
7. Puzyr A.P., Bondar V.S. *Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability*. RU Patent № 2252192. 2005, Bull, no. 14.
8. Features of Nafen alumina nanofibers. URL: <http://www.anftechnology.com/nafen/>
9. Eremin A.N., Semashko T.V., Mikhailova R.V. Cooxidation of phenol and 4-aminoantipyrin catalyzed by polymers and copolymers of horseradish root peroxidase and *Penicillium funiculosum* 46.1 glucose oxidase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42. doi: 10.1134/S0003683806040119.
10. Koshcheev A.P. Thermodesorption mass spectrometry in the light of solution of the problem of certification and unification of the surface properties of detonation nano-diamonds. *Russian Journal of General Chemistry*, 2009, vol. 79. DOI: 10.1134/S1070363209090357.
11. Bradac C., Osswald S. Effect of structure and composition of nanodiamond powders on thermal stability and oxidation kinetics. *Carbon*, 2018, vol. 132. doi: 10.1016/j.carbon.2018.02.102

CATALYTIC EFFECT OF ALUMINA NANOFIBERS - NANODIAMONDS COMPOSITE AFTER FUNCTIONALIZATION BY Fe²⁺ AND Cu²⁺

Ronzhin N.O.¹, Posokhina E.D.¹, Mikhlin E.V.², Simunin M.M.³, Ryzhkov I.I.^{2,3}, Bondar V.S.¹

¹ Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: roniol@mail.ru

² Institute of Computational Modeling FRC KSC SB RAS

Akademgorodok str., 50/44, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³ Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

Abstract. A method of fabrication of a sensor composite based on alumina nanofibers and detonation synthesized nanodiamonds in the form of firm disks 0.5 mm thick and 40 mm in diameter has been developed. The conditions for thermal treatment of composite disks to impart them structural stability in aqueous solutions were selected. The effect of bleaching the composite was found when processing with temperatures above 500 °C - the dark gray color of the material changes to white. The observed effect is associated with the removal of non-diamond carbon from the surface of nanodiamonds incorporated in the alumina nanofibers matrix during thermal treatment of the composite at temperatures above 500 °C. This is confirmed by the results of simultaneous thermal analysis of composite materials – thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Model experiments have demonstrated the applicability of the white composite for a visual qualitative assessment of the presence of phenol in water samples. By incubating composite samples in iron sulfate and copper sulfate solutions the materials were functionalized with these metal ions. It was found that the catalytic efficiency of the composites functionalized with Cu²⁺ and Fe²⁺ ions during phenol testing significantly increases in comparison with the initial composite by a factor of 2.6 and 3.2, respectively.

Key words: nanodiamonds, alumina nanofibers, composite, sensor, metal ions, functionalization, phenol.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛОВ

Кравченко Е.М., Кучина Е.С., Лаптева Е.А., Одарюк И.Д.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283001, ДНР; e-mail: elena_grazhina@mail.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. В работе изучена возможность применения стабильных радикалов для определения содержания фенолов в реакционной смеси с помощью окислительно-восстановительного титриметрического анализа. Разработана процедура получения ABTS^{•+}-радикала в реакции лакказного окисления ABTS с последующим выделением катион-радикала гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-10. С помощью различных подходов определен коэффициент экстинкции для ABTS^{•+}-радикала, который составил $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. В качестве реагента для стандартизации раствора ABTS^{•+}-радикала и [•]DPRH предложена аскорбиновая кислота. Показана применимость окислительно-восстановительного титрования с использованием катион-радикала ABTS и [•]DPRH для регистрации кинетики расщепления многоатомного фенола в процессе его окисления в присутствии лакказы *Trametes versicolor*.

Ключевые слова: стабильные радикалы, лакказа, фенолы, аскорбиновая кислота, окисление, спектрофотометрия, окислительно-восстановительное титрование.

В последние годы интерес исследователей привлекают ферменты лигнолитического комплекса дереворазрушающих грибов, в основном лакказы и пероксидазы [1], а также пероксидазы растений [2], так как высокая стабильность и активность, доступность сырья для извлечения делают их перспективными объектами технологических процессов. Сложность изучения процессов с участием лакказ или пероксидаз обусловлена возможностью инициации ферментом радикального окисления без дальнейшего его катализа, то есть, может включать элементарные стадии, протекающие за пределами активного центра фермента [3]. Поэтому для разработки технологических схем с участием этих оксидоредуктаз, прогнозирования протекания побочных реакций необходимо знать принципиальный механизм катализа этих процессов.

Распространенным методом исследования механизма окисления фенолов является спектрофотометрия. Для орто-, пара-дигидроксibenзолов и некоторых их производных достоверно установлено, что первичными относительно стабильными продуктами окисления являются соответствующие бензохиноны, и полосы поглощения продуктов и субстратов четко различимы. Однако в большинстве случаев при окислении фенолов наблюдается сложный спектр реакционной смеси, который не представляется возможным использовать для получения достоверных кинетических кривых. Указанные затруднения приводят к необходимости поиска дополнительных подходов для получения кинетических данных и исследования механизма.

В работе предложен способ изучения кинетики убыли многоатомного фенола в процессе ферментативного окисления с помощью метода селективного окислительно-восстановительного титрования проб реакционной смеси катион-радикалом 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (ABTS^{•+}) и дифенилпикрил-гидразилом ([•]DPRH). Эти вещества имеют интенсивную окраску, ABTS^{•+} – сине-зеленую ($\lambda_{max} = 414$ нм), [•]DPRH – фиолетовую ($\lambda_{max} = 513$ нм) и традиционно используются для определения антирадикальной активности. ABTS^{•+} применяется при изучении процессов в водных средах, а [•]DPRH – в органических, например, в этаноле [4, 5]. Эти радикалы осуществляют одноэлектронное окисление фенолов, переходя в соответствующие восстановленные формы – ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)) и DPPH (дифенилпикрилгидразин), растворы которых становятся бесцветными и светло-желтыми соответственно.

Отрыв подвижного H-атома или электрона от гидроксильной группы фенола (QH₂) приводит к образованию феноксильного радикала (QH[•]) согласно уравнениям (1), (2) [6, 7]:



Дальнейшее превращение феноксильного радикала зависит от структуры исходного фенола. Возможно окисление семихинонных радикалов до хинонов, их диспропорционирование до соответствующих хинонов и исходных фенолов. Феноксильные радикалы также могут рекомбинировать [8]. Образование хинонов происходит следующим образом:



В случае фенолов, не образующих хинонов или имеющих заместители, стабилизирующие феноксильный радикал (например, ионол), возможно образование сложных олигомерных продуктов, в том числе продуктов конъюгации с ABTS^{•+} или [•]DPRH [9, 10].

Взаимодействие стабильных радикалов с большинством фенолов в условиях эксперимента протекает с высокой скоростью, что позволяет использовать окислительно-восстановительный титриметрический анализ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферментативное окисление фенолов исследовали в присутствии лакказы макромизета *Trametes versicolor* фирмы SIGMA. Фермент, ABTS (содержание основного вещества $\geq 98\%$) и *DPPH того же производителя дополнительно не очищали. Аскорбиновую кислоту, флороглюцин, 2,3-дигидроксibenзойную кислоту очищали перекристаллизацией из спирта или водно-спиртовых растворов. Гидрохинон очищали сублимацией. Чистоту реагентов устанавливали по температурам плавления и спектрофотометрически. Буферные растворы готовили из реагентов надлежащей чистоты по стандартным методикам [11] на бидистиллированной воде.

ABTS^{•+}-радикал получали ферментативным окислением ABTS с помощью лакказы из *Trametes versicolor* и выделяли методом гель-проникающей хроматографии. В цитратный буфер с pH 3,0 вводили раствор ABTS (концентрация в смеси 5,0 мМ) и фермент (концентрация в смеси 100 мг/л). Окислителем выступал молекулярный кислород. Закрытую пробирку помещали в термостат при 308 К, выдерживали смесь в течение 2 часов при периодическом перемешивании. После этого реакционную смесь вносили в колонку с сефадексом G-10 (l = 20 см, d = 1,0 см), уравновешенную 50 мМ цитратным буфером pH 3,0. Смесь элюировали бидистиллированной водой. Буфер и бидистиллированную воду для элюирования дегазировали с помощью вакуумирования.

Полученный раствор ABTS^{•+}-радикала, свободный от фермента, стандартизовали титрованием аскорбиновой кислотой, а его концентрацию непосредственно перед работой проверяли спектрофотометрически. Растворы ABTS^{•+} и *DPPH стабильны при хранении при 4°C не менее недели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как чистота коммерческого препарата *DPPH находится в пределах 90-95%, а катион-радикал ABTS образуется с высоким, но достоверно неизвестным выходом, при определении точных концентраций их растворов ориентироваться только на величину навесок было недостаточно. В качестве титрантов для стандартизации ABTS^{•+}-радикала были испытаны несколько восстановителей. Определение точки перехода при окислительно-восстановительном титровании проводили со спектрофотометрическим и визуальным контролем. Как видно из таблицы 1, значения коэффициентов экстинкции, полученные при использовании спектрофотометрического и визуального контроля, совпадают.

Согласно [12], коэффициент экстинкции ABTS^{•+}-радикала, рассчитанный по количеству прореагировавшего ABTS при условии, что выход при окислении его ионами Ce⁴⁺ составляет 100%, равен $3,6 \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Полученное в данной работе значение коэффициента экстинкции для ABTS^{•+} в реакции лакказного окисления составило $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Такое же значение получаем, применяя окислительно-восстановительное титрование катион-радикала аскорбиновой кислотой (табл. 1). При использовании персульфата калия в качестве окислителя ABTS значение коэффициента экстинкции составило $(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Применение в качестве восстанавливающих агентов для ABTS^{•+} тролокса, гексацианоферрата калия, тиосульфата натрия, йодида калия и β-меркаптоэтанола дает более высокие значения коэффициента экстинкции (табл. 1). Таким образом, в дальнейшей работе использовали $\epsilon(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 3,3 \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹.

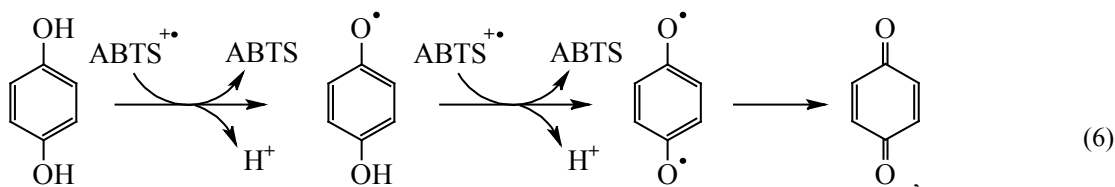
В отдельных экспериментах установлено, что при обесцвечивании ABTS^{•+}-радикал восстанавливается до ABTS, следовательно, процесс является одноэлектронным. Сопреженный процесс окисления гидрохинона до п-бензохинона сопровождается переносом двух электронов согласно реакции (6). Возможен также вариант диспропорционирования феноксильных радикалов по реакции (7). При таких вариантах окисления гидрохинона фактор эквивалентности будет в пределе равным двум.

Таблица 1. Значения коэффициентов экстинкции для водного раствора катион-радикала ABTS

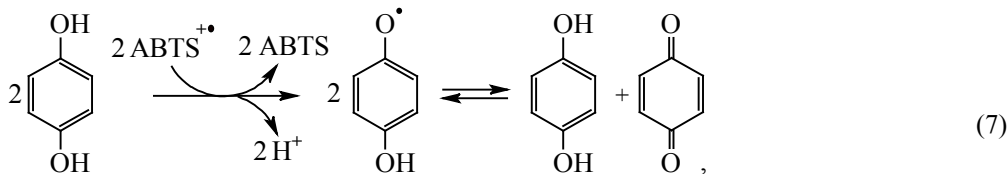
восстановитель ABTS ^{•+} -радикала	<i>f</i>	$\epsilon \cdot 10^{-4}$, л·(моль·см) ⁻¹	примечание
AscH ₂	2	$3,4 \pm 0,2$	
AscH ₂		$3,3 \pm 0,2$	СФ*
тролокс		$6,4 \pm 0,3$	СФ
K ₄ [Fe(CN) ₆]	1	$4,3 \pm 0,3$	
K ₄ [Fe(CN) ₆]		$4,3 \pm 0,3$	СФ
Na ₂ S ₂ O ₃		$3,9 \pm 0,2$	
Na ₂ S ₂ O ₃		$4,2 \pm 0,1$	СФ
KJ + Na ₂ S ₂ O ₃ + крахмал		$5,4 \pm 0,2$	
β-меркаптоэтанол		$4,4 \pm 0,2$	

СФ – титрование велось со спектрофотометрическим контролем точки перехода;

f – фактор эквивалентности, который использовали для расчетов, исходя из предполагаемой схемы реакции.

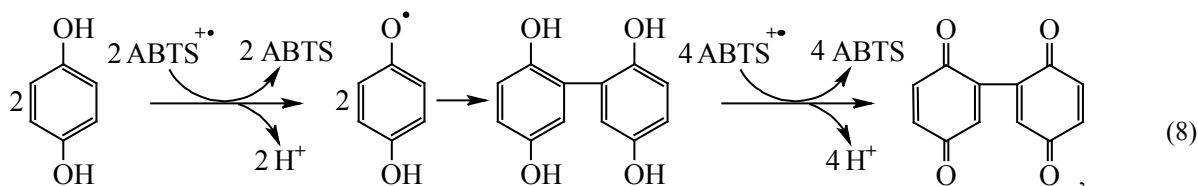


$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:2, f = 2.$$

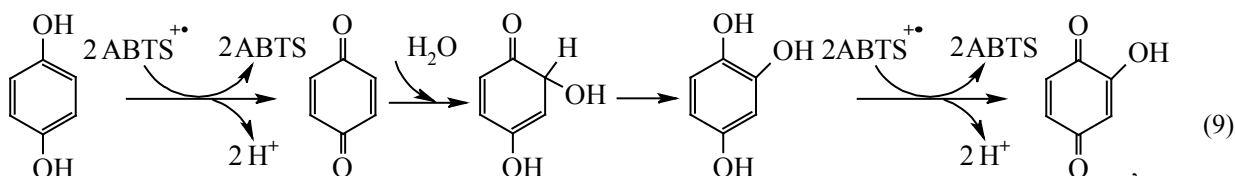


$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:2, f = 2.$$

Однако для бензохинонов и феноксильных радикалов, образующихся при окислении соответствующих фенолов, могут реализовываться дополнительные пути превращений, в которых молярные соотношения будут иными. Рассмотрим на примере гидрохинона. Взаимодействие двух феноксильных радикалов может приводить не только к диспропорционированию по реакции (7), но и к образованию новой С-С связи между ароматическими кольцами. Такой димерный конъюгат имеет четыре гидроксильные группы, которые могут быть окислены $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -радикалом по реакции (8). Кроме того, возможно нуклеофильное присоединение воды к хинону, в результате чего образуются новые гидроксильные группы, которые тоже могут восстанавливать $\text{ABTS}^{\bullet+}$, например, по реакции (9). В этом случае молярное соотношение в пределе будет равно четырем, а если предположить окисление гидроксильной группы хинона, то больше четырех.



$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:3, f = 3.$$



$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:4, f = 4.$$

Таким образом, в реакции окисления многоатомных фенолов $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -радикалом в зависимости от механизма фактор эквивалентности (f) может варьировать в относительно широких пределах: от примерно двух, при отсутствии побочных реакций, до трех и более – при их наличии. Данный параметр напрямую с количеством гидроксильных групп не связан.

В качестве модельных соединений для проверки применимости методики использовали двухатомные фенолы – гидрохинон и 2,3-дигидроксibenзойную кислоту, так как кинетические кривые их расходования и накопления продуктов регистрируются с помощью УФ- и видимой спектрофотометрии. Молярные соотношения (фактор эквивалентности), в которых $\text{ABTS}^{\bullet+}$ взаимодействует с гидрохиноном, 2,3-дигидроксibenзойной кислотой и флороглюцином, равны $(2,0 \pm 0,1)$, $(4,5 \pm 0,2)$, $(2,8 \pm 0,3)$ соответственно. По-видимому, процесс окисления катион-радикалом 2,3-дигидроксibenзойной кислоты, флороглюцина является более сложным, чем описано реакциями (3), (4). Кроме этого, не исключены процессы рекомбинации феноксильных радикалов с $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Несмотря на то, что полученные значения молярных соотношений не являются целыми и не позволяют однозначно судить о механизме окисления 2,3-дигидроксibenзойной кислоты и флороглюцина $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -радикалом, их можно использовать при расчете неизвестной концентрации титруемого фенола.

Кинетику лаказного окисления молекулярным кислородом гидрохинона и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты исследовали спектрофотометрически непосредственно в термостатируемой кювете с перемешиванием, и методом отбора проб в термостатируемом реакторе с барботацией с последующим установлением концентрации субстрата окислительно-восстановительным титрованием. Отбор проб реакционной смеси производили, разбавляя их в 4-8 раз фосфатным буферным раствором (pH 7), при комнатной температуре,

Таблица 2. Начальные скорости лакказного окисления гидрохинона и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты

Субстрат	$V_{0,CF}$, мкМ/с	$V_{0,ABTS^{+}}$, мкМ/с
гидрохинон	$2,1 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$
2,3-дигидроксibenзойная кислота	$0,57 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,04$

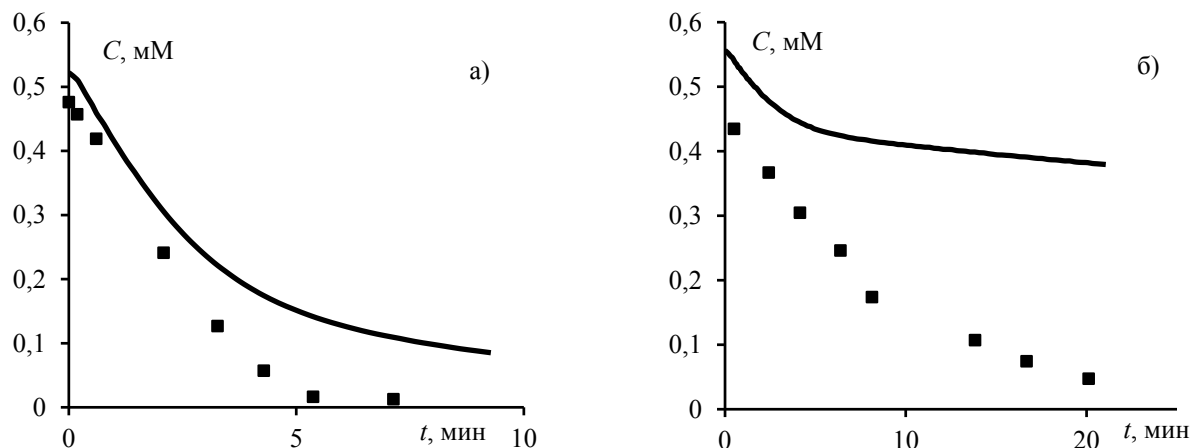


Рисунок 1. Кинетические кривые расходования гидрохинона (а) и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты (б) в процессе лакказного окисления, полученные спектрофотометрическим методом (сплошные кривые) и титрованием непрореагировавшего субстрата катион-радикалом ABTS (обозначено точками). $[E]_0 = 20$ мг/л, 0,1 М цитратный буфер pH 4,6, T 308 К. $[GX]_0 = 0,5$ мМ, $[2,3\text{-диОН}]_0 = 0,6$ мМ

обеспечивая торможение лакказного окисления путем разбавления и изменения pH. Ингибирование лакказы необходимо, так как она катализирует превращение и субстрата, кинетика окисления которого изучается, и продукта восстановления ABTS⁺-радикала – ABTS. Концентрацию гидрохинона и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты вычисляли из титриметрических данных с использованием факторов эквивалентности, определенных ранее.

Несмотря на то, что определенные разными способами значения начальных скоростей реакции расходования двух использованных субстратов лакказы при их окислении совпадают в пределах погрешности эксперимента (табл. 2), кинетические кривые не накладываются (рис. 1).

Кинетическая кривая расходования гидрохинона, регистрируемая с помощью окислительно-восстановительного титрования, расположена немного ниже кривой, получаемой спектрофотометрией. То есть, имеется небольшой вклад накапливающегося *пара*-бензохинона в области максимума полосы поглощения гидрохинона ($\lambda_{max} = 289$ нм). Расхождение кинетических кривых расходования 2,3-дигидроксibenзойной кислоты, полученных спектрофотометрическим и титриметрическим методами, значительно. Таким образом, применение ABTS⁺-радикала для установления концентраций многоатомного фенола в реакционной смеси окислительно-восстановительным титрованием в водной среде позволяет достоверно определить только начальные скорости расходования субстратов, когда спектрофотометрический метод для решения этой задачи не подходит. Это обуславливает необходимость поиска других агентов для проведения окислительно-восстановительного титрования при определении концентрации фенолов в реакционной смеси.

В качестве такого агента можно использовать DPPH, так как он имеет ряд преимуществ: является коммерческим препаратом и его предварительное получение не требуется; титрование осуществляется в этаноле, в котором число побочных реакций резко снижено по отношению к водной среде и происходит полное ингибирование фермента. С помощью аскорбиновой кислоты было определено с высокой точностью значение коэффициента экстинкции для DPPH, которое составило $(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Вычисленное значение f для гидрохинона составило $2,1 \pm 0,2$, что указывает на реализацию реакций (2), (4), (5) при проведении окислительно-восстановительного титрования с использованием DPPH.

Предложенная методика определения концентрации субстрата при лакказном окислении фенолов путем окислительно-восстановительного титрования может быть полезна в случаях, когда затруднено спектрофотометрическое наблюдение. Методика проста в исполнении и состоит из двух этапов – определение фактора эквивалентности путем титрования раствором стабильного радикала нескольких известных концентраций исследуемого фенола и исследование ферментативной кинетики. Однако требует необходимости использования метода отбора проб, что удлиняет время проведения эксперимента и ограничивает число точек для получения кинетической кривой.

Список литературы / References:

1. Куликова Н.А. и др. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2011, т. 47, с. 619-634. [Kulikova N.A. et al. The use of basidiomycetes in technologies for processing and utilization of technogenic waste: fundamental and applied aspects (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, pp. 619-634. (In Russ.)]
2. Veda P Pandey et al. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases [Text]. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 1-16. doi: 10.4172/2161-1009.1000308
3. Diana M. Mate, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 2017, vol. 10, no. 6, pp. 1457-1467. doi: 10.1111/1751-7915.12422
4. Santos-Sanchez N.F., Salas-Coronado R., Villanueva-Cañongo C., Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *IntechOpen*, 2019. doi: 10.5772/intechopen.85270
5. Roberta Re et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26, pp. 1231-1237.
6. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Пахомов П.М. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений. *Химико-фармацевтический журнал*, 2009, т. 43, № 6, с. 27-31. [Volkov V.A., Dorofeeva N.A., Pakhomov P.M. Kinetic method for the analysis of antiradical activity of plant extracts. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2009, vol. 43, no. 6, pp. 27-31. (In Russ.)] doi: 10.30906/0023-1134-2009-43-6-27-31
7. Osman A.M., Wong K.K.Y., Fernyhough A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006, vol. 346, no. 1, pp. 321-329. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.118
8. Shendrik A.N., Odaryuk I.D., Kanibolotska L.V. et al. Radical formation during phenol oxidation in aqueous media [Text]. *Int. J. Chem. Kinet.*, 2012, vol. 44, no. 6, pp. 414-422. doi: 10.1002/kin.20592
9. Gramss G. Reappraising a Controversy: Formation and Role of the Azodication (ABTS²⁺) in the Laccase-ABTS Catalyzed Breakdown of Lignin. *Fermentation*, 2017, vol. 3, no. 27, pp. 1-18. doi: 10.3390/fermentation3020027
10. Osman A.M. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) with (+)-catechin: evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH· and the oxidized form of the polyphenol. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2011, vol. 412, pp. 473-478. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.123
11. Досон Р. и др. *Справочник биохимика*: Пер. с англ. М.: Мир, 1991, 544 с. [Dawson R. et al. *Biochemist's Handbook*: Per. from English M.: Mir, 1991, 544 p. (In Russ.)]
12. Branchi B., Galli C., Gentili P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, vol. 3, pp. 2604-2614. doi: 10.1039/B504199F

THE STABLE RADICALS FOR STUDY THE ENZYME OXIDATION OF PHENOLS**Kravchenko E.M., Kuchina E.S., Lapteva E.A., Odaryuk I.D.**

Donetsk National University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283001, DPR; e-mail: elena_grazhina@mail.ru

Abstract. It was studied the possibility of using stable radicals to determine the content of phenols in the reaction mixture with redox titrimetric analysis. The procedure for obtaining an ABTS^{•+}-radical in the laccase oxidation of ABTS has been developed. The subsequent isolation of the radical cation by gel chromatography on a column with Sephadex G-10 was applied. The extinction coefficient for the ABTS^{•+}-radical was determined using various approaches and it was equaled $(3.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$. Ascorbic acid has been proposed as a reagent for the solution of ABTS^{•+}-radical and [•]DPPH standardization. Redox titration with ABTS^{•+} and [•]DPPH might be used for recording the kinetics of consumption of polyphenol during its oxidation in the presence of the *Trametes versicolor* laccase.

Key words: stable radicals, laccase, phenols, ascorbic acid, oxidation, spectrophotometry, redox titration.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПОЛИМОРФ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА, ИНДУЦИРУЕМЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С ИОНАМИ СОЛЕЙ, В ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДАХ ТИПА ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТЬ

Рожков С.П.

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 185910, РФ; e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Аннотация. Рассматриваются фазовые переходы типа жидкость-жидкость (L-L) в водно-солевых дисперсиях глобулярных белков в нативных состояниях (N^* , N) в интервале температур между тепловой (D^*) и холодной (D) денатурацией. Предполагается, что белковые интермедиаты (I , I^*), возникающие в результате неравновесной (де)сорбции ионов в процессе переходов $D \leftrightarrow N$ и $D^* \leftrightarrow N^*$, участвуют в фазовом переходе L-L с образованием кластеров и фибрилл в основной фазе белков N и N^* . Таким образом они компенсируют свой избыточный химический потенциал ($ChPot$), обусловленный несбалансированным распределением адсорбированных ионов соли в структуре белка по сравнению с N -белком. Температурная модель поведения $ChPots$ ($\Delta\mu_i$) различных состояний белка: низкотемпературного $i = D, N, I$ и высокотемпературного $i = D^*, N^*, I^*$, переходы между ними, а также температурная зависимость $ChPot$ растворителя ($\Delta\mu_1$) представлены в форме фазовых диаграмм. На этой основе обсуждаются взаимосвязь между значениями $\Delta\mu_1$ и температурами L-L-переходов (верхней и нижней критическими температурами растворения), а также причины неидеального поведения осмотического давления в водно-солевых белковых дисперсиях.

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , кофеин, водный раствор, агрегация.

Вопросы равновесия и фазовых переходов (ФП) первого рода между нативным (N) и денатурированным (D) состояниями белка остаются предметом интенсивных исследований в связи с проблемами самоорганизации белка [1]. В то же время ФП типа жидкость-жидкость (L-L) в дисперсиях глобулярных белков, которые обычно наблюдаются в диапазоне стабилизации нативной формы белка, также привлекают большое внимание. Они связаны с образованием белковых кластеров (микрофаз) в определенных температурных диапазонах, близких к ФП первого рода как со стороны низких ($D \leftrightarrow N$) переходы так и высоких ($D^* \leftrightarrow N^*$ переходы) температур. Роль кластерной организации в биосистемах имеет громадное значение. Она сопряжена с явлениями многоступенчатой кристаллизации и агрегации белков [2,3], определяет гетерофазную организацию безмембранных органелл в цитоплазме и нуклеоплазме [4,5], участвует в регуляции осмотического гомеостаза и мгновенных адаптационных реакциях на уровне макромолекул [6,7], связана с развитием конденсационных заболеваний [8,9], технологиями пищевой индустрии [10]. Вместе с тем возможная взаимосвязь явлений белкового фолдинга и L-L переходов в дисперсиях белков исследована явно недостаточно.

Одной из нерешенных проблем является соотношение кластерной организации дисперсии глобулярного белка в области L-L переходов и конформационного состояния молекул в кластере [11,12]. Обычно неизменными участниками L-L переходов в цитоплазме [13-16] являются белки с внутренне неупорядоченной структурой. Вследствие этого представляется весьма вероятным, что пути и механизмы тепловых $D^* \leftrightarrow N^*$ и холодных $D \leftrightarrow N$ переходов могут предопределять существование L-L переходов в дисперсиях глобулярных белков [17]. ФП типа L-L с критической точкой (при критическом составе и температуре) изучены к настоящему времени на относительно простых белковых модельных системах вода - глобулярный белок [11,12] и вода-белок-соль [18]. Экспериментально исследованы зависимости температуры критических точек L-L переходов от концентрации белков, различных солей [19] или других осмолитов, находящихся в дисперсии [20]. Для системы вода-белок-соль было получено условие для критического состава, которому должна соответствовать критическая температура [18]:

$$\frac{m_2}{m_3} = \frac{2 + 2 \left[1 + v^2 z^{-2} (2 + \Delta)^2 \right]^{1/2}}{v(2 + \Delta)}. \quad (1)$$

Здесь m_2/m_3 – отношение молярных концентраций белка и соли, соответственно, z – заряд белка, v – количество ионов электролита, сорбируемых белком, Δ – функция коэффициента активности соли. При этом m_2/m_3 характеризует критический состав системы, при котором происходит критический фазовый переход между фазой, представленной молекулярным раствором белка, и кластерной организацией раствора белка.

Плотные кластеры содержат около тысячи молекул белка и возникают в области температур L-L переходов под действием сил коллоидного взаимодействия: короткодействующего потенциала притяжения и дальнедействующего потенциала отталкивания. Кластеры-олигомеры размером 2-10 молекул имеют динамическую природу и постоянно возникают в растворах белков. Их число пропорционально концентрации белка. Кластеры третьего типа имеют мезоскопические размеры в сотни нанометров [11]. Изучение механизма образования таких кластеров находится лишь в начальной стадии [21] и может быть связано с существованием закритического состояния белковых растворов [22].

По имеющимся данным растворимость части глобулярных белков (сывороточный альбумин [23], серповидноклеточный гемоглобин [24], α -эластин [25]) снижается с повышением температуры, а их растворы имеют нижнюю критическую температуру растворимости (НКТР). Другая группа белков (лизоцим, кристаллины [26], иммуноглобулины [27]) лучше растворяются при повышении температуры и их растворы имеют верхнюю критическую температуру растворимости (ВКТР). Часто в дисперсиях белков наблюдается кристаллический полиморфизм, который связывают с наличием кластеров. Например, лизоцим имеет шесть кристаллических модификаций, причем некоторые из них отличаются количеством молекул воды на аминокислоту [28]. При этом обнаружено влияние связывания и гидратации ионов на кристаллическую решетку [29]. Известно, что белки могут иметь несколько десятков центров связывания различных анионов и катионов с разным'affинитетом [30-32]. В свою очередь, способность ионов к связыванию и их гидратация сильно зависят от температуры. Это влияет на их расположение в лиотропном ряду и селективность связывания [33-35]. Поскольку растворимость различных полиморф является функцией температуры, значений pH и концентрации солей [36], то иногда она следует температурному тренду от нормального к ретроградному, или наоборот [37]. Существуют экспериментальные данные [38] и теоретические представления [17,39,40], согласно которым один и тот же белок способен образовать дисперсию как с ВКТР, так и с НКТР в зависимости от его микроокружения, определяющегося составом и значениями pH раствора (заряд белка), концентрацией и типом электролита, осмолитов и др. В своем рассмотрении мы исходим из потенциальной возможности существования ВКТР и НКТР в дисперсии одного и того же белка, хотя и разного состава, что находит свое отражение в предлагаемых фазовых диаграммах.

Считается, что наличие в белках участков с внутренне неупорядоченной структурой способствует образованию интермедиатов [33]. При этом потенциал связывания белков с ионами поливалентных металлов является важным фактором индуцированных металлом конформационных изменений белка, приводящих к появлению частично свернутых интермедиатов. Даже низкие концентрации некоторых металлов могут непосредственно вызывать образование фибрилл. В свою очередь, наличие специфических центров связывания ионов и температурные зависимости их эффективности определяются аминокислотной последовательностью [41]. Варьируя концентрации различных солей или pH растворов глобулярного белка, можно менять зарядовое состояние белка и влиять на его внутреннюю неупорядоченность. Таким образом, возникает возможность регулировать число и состояние интермедиатов и влиять на расположение L-L переходов на фазовой диаграмме. Поэтому в качестве термодинамической основы L-L переходов мы будем рассматривать наличие ряда интермедиатов I и I* белка, $D \leftrightarrow N$ и $D^* \leftrightarrow N^*$ переход у которых в силу ряда причин сдвинут в сторону более высоких либо более низких температур по сравнению с основным пулом белка.

Когда основная масса белка переходит в N конформацию в процессе $D \leftrightarrow N$ фазового превращения, фракции интермедиатов I остаются в промежуточной конформации между D и N. Если N-белки и I-белки будут иметь разный удельный объем, обусловленный наличием разного количества "пустот" в их структуре, химический потенциал молекул меньшего объема I будет больше, чем более крупных N. В таких случаях нарушается равновесие, которое может быть скомпенсировано выделением молекул с большим потенциалом в отдельную фазу (своего рода эффект изотермической перегонки). В качестве новой фазы могут возникать микроскопические белковые кластеры, содержащие интермедиаты. Капиллярное давление в таких кластерах может способствовать выравниванию химических потенциалов молекул в фазе интермедиатов по отношению к молекулам в основной фазе и установлению их метастабильного равновесия. Если по мере удаления от температуры $D \leftrightarrow N$ переходов структурно-динамические различия между интермедиатами и молекулами в основном состоянии будут уменьшаться, то возникнут условия для критического фазового перехода и формирования термодинамически устойчивой по отношению к процессам диффузии однофазной системы, в которой N состояние молекул будет максимально стабильным.

Таким образом, основной задачей работы является разработка феноменологического подхода, который позволил бы представить на одной фазовой диаграмме холододовые $N \leftrightarrow D$ и тепловые $N^* \leftrightarrow D^*$ равновесные фазовые переходы первого рода. Кроме того, рассматривается их продолжение в область L-L переходов как метастабильных равновесий между фазой молекул белка, находящихся в основной конформации (N или N*), и фазой интермедиатов (I или I*) белка, находящихся в составе кластеров. При этом низкотемпературные и высокотемпературные состояния D и D*; N и N*; I и I* хотя и близки структурно, но термодинамически различаются. Эти метастабильные равновесия как со стороны низких, так и высоких температур будут заканчиваться в критических точках при определенной температуре и соответствующем составе (НКТР и ВКТР) водно-солевой белковой дисперсии образованием устойчивой макроскопически однофазной системы.

Для решения задачи мы рассматриваем гипотетическую фазовую диаграмму температурных изменений химических потенциалов различных состояний белка μ^i , где $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$. Для того, чтобы установить взаимосвязь состояний молекул белков с состоянием системы вода-белок-соль, в качестве интегрального параметра мы используем химический потенциал растворителя $\Delta\mu_1$ и его температурные изменения, которые зависят от состояний белка. Этот параметр также отражает поведение осмотического давления дисперсии и с его помощью может быть учтен вклад в эффективное осмотическое давление различных конформационных состояний молекул.

МОДЕЛЬ

Известно, что с повышением температуры при постоянном давлении химический потенциал вещества μ понижается, так как $(\partial\mu/\partial T)_p = -S$, а энтропия S положительна [42]. При этом, чем ниже потенциал, тем более стабильна система. Используем это для представления поведения химических потенциалов различных состояний белка μ^i , где $i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$ - соответствующие состояния белка. На рисунке 1 представлена такая качественная диаграмма, на которой N и N^* -состояния белка наиболее стабильны (μ^N и μ^{N^*} меньше) в диапазоне температур между T_1 (фазовый переход $N \leftrightarrow D$) и T_6 (фазовый переход $N^* \leftrightarrow D^*$), а D и D^* состояния наименее стабильны (μ^D и μ^{D^*} больше) в этом диапазоне. В сторону более стабильного состояния изменяется и концентрация белков и содержание D^* и D формы становится ничтожным. Потенциалы интермедиатов белка I и I^* при этом принимают промежуточные значения, равно как и их концентрации. При температурах T_1 и T_6 температурные зависимости потенциалов имеют место излом, но их равенство обеспечивает равновесие всех состояний белка.

Можно предположить, что при дальнейшем повышении температуры химические потенциалы различных состояний белков могут изменяться нелинейно, так что в интервале T_2 - T_5 различие между потенциалами N - I и N^* - I^* состояний наиболее значительно (рисунок 1), а состояние – неравновесно. Это и определяет возможность ФП типа L-L, при котором молекулы с большим потенциалом группируются в кластер. Однако, начиная с температуры T_5 , которая близка к температуре критического фазового перехода, значения μ^N и μ^I могут выравниваться и причины для L-L перехода исчезают, поскольку все молекулы становятся энергетически и структурно неразличимы. Аналогичные рассуждения справедливы для конформеров N^* и I^* в диапазоне температур ниже тепловой денатурации ($T < T_6$, рисунок 1). Здесь неразличимость N^* и I^* наступает при $T < T_4$. Если в температурном промежутке между T_3 и T_4 переход между конформерами белка происходит в точках, образующих горизонтальную линию с общей касательной, то это соответствует непрерывному фазовому переходу [42]. При этом интермедиат I может переходить в стабильный конформер N^* , а интермедиат I^* - в стабильный конформер N .

Этот вывод согласуется с экспериментальными данными. Так, в диапазоне температур 12-20 °C сывороточный альбумин в растворе представлен единственным нативным конформером А, в то время как в диапазоне температур 22-50 °C белок представлен двумя нативными конформерами А и В, причем доля конформера В растет с температурой [43]. При 58 °C и выше происходит спонтанное превращение А в В. Для растворов ряда ферментов также было показано [44], что имеют место два нативных конформера белка с разными температурами их стабилизации. Была выдвинута гипотеза, что такое конформационное устройство характерно для всех ферментов. При этом высокотемпературный конформер может находиться в состоянии расплавленной глобулы. С помощью методики Ферстеровского переноса энергии (smFRET) было показано [45], что наряду с N -состоянием уже при комнатных температурах, практически сразу после $N \leftrightarrow D$ перехода появляется большая доля молекул со структурой, близкой к высокотемпературному D -состоянию.

Если рассматривать систему вода-белок-соль в целом, при каждой температуре для нее справедливо уравнение Гиббса-Дюгема:

$$d\mu_1 = -(n_N/n_1)d\mu^N - (n_I/n_1)d\mu^I - (n_D/n_1)d\mu^D. \quad (2)$$

Здесь μ_1 – химический потенциал водно-солевого растворителя. При этом последним слагаемым из-за малости n_D можно пренебречь. Отношения n_N/n_1 и n_I/n_1 характеризуют число молей воды, связанной с макромолекулами в одном состоянии и не связанной в другом. Поэтому $n_I/n_1 \approx (1 - n_N/n_1)$. Выберем в качестве стандартного состояние денатурированного белка μ^D . Тогда (2) примет вид:

$$d\Delta\mu_1 \approx -(n_N/n_1)d(\mu^N - \mu^D) - (n_I/n_1)d(\mu^I - \mu^D). \quad (3)$$

С учетом того, что $d\mu^i = (\partial\mu^i/\partial T)dT = -S^i$, ур. 3 примет вид:

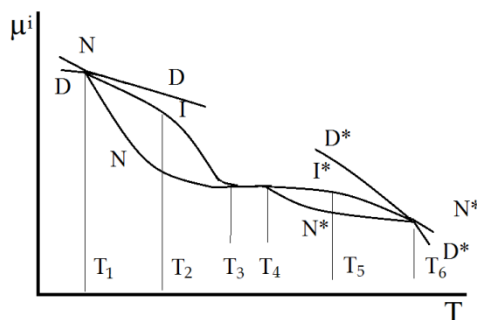


Рисунок 1. Гипотетическое температурные зависимости химических потенциалов μ^i различных конформеров белка ($i = D, D^*, N, N^*, I, I^*$) в интервале от T_1 (фазовый переход $N \leftrightarrow D$) до T_6 (фазовый переход $N^* \leftrightarrow D^*$); T_2 и T_5 – температуры образования кластеров; T_3 и T_4 – критические фазовые переходы между фазами нативного белка и фазами интермедиатов с верхней и нижней критическими температурами растворения, соответственно. T_3 - T_4 – закритическая макроскопически однофазная область

$$\Delta\mu_1 \approx (n_N / n_1) (S^N - S^I) \Delta T - (1/n_1) (S^D - S^I) \Delta T. \quad (4)$$

Аналогичное уравнение справедливо и для S^{N*} , S^{I*} , S^{D*} . Таким образом, температурное поведение химического потенциала воды будет определяться разностью энтропий различных состояний белка при соответствующей температуре, или углом наклона кривых μ^i (рисунок 1). С учетом того, как это представлено на данном рисунке, в диапазоне температур ($T_1 - T_2$): $S^N > S^I > S^D$. В диапазоне температур ($T_2 - T_3$): $S^N < S^I$ и $S^N \approx S^D$. В интервале ($T_3 - T_4$) $S^N = S^I = 0$. В интервале ($T_4 - T_5$) $S^{N*} > S^{I*}$ и $S^{N*} \approx S^{D*}$. В интервале ($T_5 - T_6$) $S^{N*} < S^{I*} < S^{D*}$. С учетом этого ур. 4 позволяет предсказать существенно нелинейное поведение $\Delta\mu_1$ между T_1 и T_6 . Так, в диапазоне низких температур $\Delta\mu_1$ сначала растет и достигает максимума при T_2 , а затем убывает (полувогнута 1). Соответственно, в диапазоне высоких температур $\Delta\mu_1$ сначала убывает при понижении температуры от T_5 до T_6 , а затем возрастает (полувогнута 2). В области температур $T_3 - T_4$ эти две "полувогнуты" сходятся.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что водно- белковые системы способны к реентрантным (возвратным) фазовым переходам при изменении температуры (холодовая D и тепловая D* денатурация) $D \leftrightarrow N \leftrightarrow D^*$, концентрации поливалентного электролита [46,47] и гидростатического давления [48]. Физико-химические системы с реентрантными переходами обычно описываются эллиптической диаграммой Тамманна [49]. Ранее такая диаграмма была адаптирована для анализа $D \leftrightarrow N$ переходов белковых систем в модели двух состояний в координатах давление P - температура T [50]. Результат интегрирования уравнения $d\Delta G = -\Delta S dT + \Delta V dP$ от референтной точки с координатами T_0 , P_0 до T, P дает кривую второго порядка [51]. Условие равновесия $\Delta G = 0$ определяет границу фазового равновесия $D \leftrightarrow N$, которая располагается на периметре скошенного эллипса.

По аналогии с этим для систем при постоянном давлении, но с переменным количеством вещества (например, вследствие эффектов предпочтительной гидратации), с учетом изменения химического потенциала растворителя $\Delta\mu_1$, уравнение для дифференциала свободной энергии будет иметь вид [52]:

$$d\Delta G = -\Delta S dT - \Delta n_1 d\mu_1, \quad (5)$$

где Δn_1 – коэффициент предпочтительного связывания. Интегрирование (5) также дает полином второго порядка относительно переменных T, $\Delta\mu_1$ и в условиях равновесия $\Delta G = 0$ представляет собой эллипс в координатах T- T_0 , $\mu_1 - \mu_0 = \Delta\mu_1$ [52].

Как известно, $\Delta\mu_1 = (\mu_1 - \mu_0)$ определяет сродство между компонентами раствора: $\Delta\mu_1 = RT \ln a_1$. При этом $\Delta\mu_1 = -V_1 \Pi$. Осмотическое давление Π раствора белка:

$$\Pi \approx RT c_2 (1/M_2 + B_2 c_2), \quad (6)$$

где c_2 , M_2 , B_2 – концентрация белка, молекулярная масса и второй вириальный коэффициент, зависит от механизмов взаимодействия между компонентами раствора и взаимодействия белков с ионами электролита [53], что определяется величиной и знаком коэффициента B_2 . Таким образом, с формальной точки зрения фазовые диаграммы в координатах изменения гидростатического и осмотического давления от температуры должны быть схожими [54].

На рисунке 2 представлена схематическая фазовая диаграмма в координатах $\Pi - T$ ($\Pi = -\Delta\mu_1/V_1$) в форме, близкой к эллиптической. Сначала Π в области холодной денатурации белка растет с температурой до точки ФП 1го рода (T_1), связанной с появлением нативного состояния. С приближением к этой точке $(\partial\Delta\mu_1/\partial T) \rightarrow \infty$, поскольку в точке перехода функция $\Delta H = T\Delta S = -T((\partial\Delta\mu_1/\partial T) \neq 0)$ терпит разрыв. То же и для области высоких температур. На рисунке 2 температуры T_1 и T_6 также соответствуют $N \leftrightarrow D$ и $N^* \leftrightarrow D^*$ фазовым переходам. Если

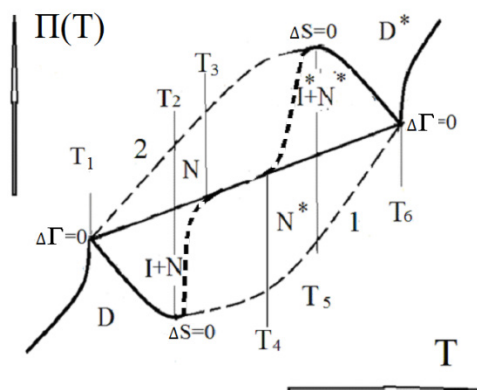


Рисунок 2. Гипотетическая фазовая диаграмма дисперсии глобулярного белка в координатах осмотическое давление Π – температура T. Крайние точки "эллипса" соединены "нейтральными" линиями $\Delta S = S^D - S^N = 0$ и $\Delta V = V^D - V^N = 0$. D и D* - денатурированные состояния, N и N* - нативные состояния. I и I* – интермедиаты белка. I+N, I*+N* – метастабильные состояния, возникающие в результате фазовых переходов жидкость-жидкость. Знак (*) означает, что тепловые и холодные формы белка могут быть неидентичными

бы N, D и I молекулы имели одинаковый молярный объем, их осмотическое давление изменялось бы вдоль "нейтральной" линии $\Delta V = V^D - V^N = 0 = V^I - V^N$. Однако обычно $V^N > V^D$ [55]. Это неравенство может сохраняться и для интермедиатов белка, для которых фазовый переход $N \leftrightarrow D$ не закончился. Поскольку их химический потенциал повышен, они находятся в нестабильном состоянии при температурах выше фазового перехода. Однако с образованием кластера, в котором капиллярное давление уравнивает избыточный химический потенциал, они могут переходить в метастабильное состояние. Появление плотных кластеров белка аналогично тому, что в системе доминирует потенциал притяжения.

Таким образом, эллиптическая форма диаграммы предполагает существование в интервале $T_1 - T_6$ фракций белка с молекулами разного объема (D, D*, N, N*, I, I*). Две «полуволны», представленные на рисунке 2 жирными линиями, обусловлены нелинейным поведением $\Delta\mu_1$ (ур. 3) и вписываются в эллипс. При этом в точках экстремумов осмотического давления $\partial(\Delta\mu_1)/\partial T = -(S^D - S^N) = 0$, что соответствует положению «нейтральной» линии $\Delta S = S^D - S^N = 0$. При температуре T_3 исчезают условия для фазового разделения, поскольку N-состояние молекул белка и состояние интермедиатов белка I становятся энергетически и объемно неразличимы. Это критический переход, который является предельным случаем ФП I-go рода. Ему также соответствует условие существования "нейтральных" линий $\Delta S = S^I - S^N = 0$ и $\Delta V = V^I - V^N = 0$.

Фазовый переход $D^* \leftrightarrow N^*$ в области высоких температур также сопровождается образованием интермедиатов, однако в силу особенностей гидратации и взаимодействия с ионами солей создаются условия для формирования агрегатов линейных и/или криволинейных фибрилл как кластеров новой фазы. Так, было показано, что сывороточный альбумин [56] и лизоцим [57] при уменьшении pH и в присутствии солей при комнатных и повышенных температурах способны образовывать фибриллы, кинетические условия для формирования которых и их структура существенно зависят от микроокружения. Для таких анизотропных вытянутых образований суммарный потенциал взаимодействия может становиться потенциалом отталкивания, и подобные микрофазы должны быть менее плотными, чем основная фаза. При температуре T_4 исчезают условия для фазового разделения, поскольку N*-состояние молекул белка и состояние интермедиатов белка становятся энергетически и объемно неразличимы. Это критический переход как предельный случай ФП I-go рода. Этому соответствует $\Delta S = S^{N^*} - S^{I^*} = 0$ и $\Delta V = V^{N^*} - V^{I^*} = 0$.

Замыкают эллипс пунктирные линии 1 и 2. Они могут соответствовать вкладу в изменение Π олигомеров белка (1), возникающих при дестабилизации плотных кластеров, либо криволинейных фибрилл (2), возникающих при дестабилизации ансамблей линейных фибрилл.

Известно, что осмотическое давление ведет себя существенно неидеально в зависимости от потенциала притяжения между молекулами, молекулами и водой, а также взаимодействия белков с ионами солей [58-60]. При этом оно должно уменьшаться, следуя соответствующей траектории на фазовой диаграмме в области нижней петли на рисунке 2 в интервале $T_1 - T_2$, в связи с образованием плотных кластеров. С ростом концентраций солей знак 2 вириального коэффициента становится отрицательным, и это сопряжено с образованием кластеров. При этом наблюдаются малые значения осмотического давления и давления набухания (если образуется белковый гель [61]). В кластерах белка в условиях повышенной плотности молекул могут идти как процессы зародышеобразования, так и образования олигомеров белка. В диапазоне нейтральных значений pH около 20% белка могут находиться в составе олигомеров [62]. Эти олигомеры частично сохраняются по завершении L-L фазового перехода и дают свой вклад в осмотическое давление (пунктир (1) между T_2 и T_6 на рисунке 2). По мере роста температуры олигомеры могут дестабилизироваться и давление возрастать.

В диапазоне высоких температур механизм взаимодействия изменяется. Наиболее вероятно, что ионы солей по-разному взаимодействуют с молекулами белка при низких и высоких температурах. Установлено, что при пониженных температурах на белке адсорбируются предпочтительно анионы (особенно для 1:1 электролита), даже несмотря на отрицательный заряд белка [60]. В этом видится аналогия с повышением pH раствора [62]. При больших температурах сродство катионов с белком может увеличиваться (особенно поливалентных), что обусловлено особенностями гидратации и энтропийными эффектами. В этом видится аналогия с понижением pH раствора [62]. При этом возможна перезарядка поверхности с (-) на (+), которая при сильной адсорбции катионов может приводить к электростатическому отталкиванию молекул и реэнтрантному фазовому переходу [23,46]. Эксперименты по осмотическому давлению показывают, что денатурация белка приводит к разным типам его динамического поведения и взаимодействия при пониженных и повышенных pH [63]. В первом случае усиливается сегментальная подвижность белка, способствующая образованию филаментов, а во втором случае меньшая подвижность способствует образованию интермедиатов белка и олигомеризации. Если в области высоких температур между T_6 и T_5 возникают кластеры, содержащие вытянутые белковые фибриллы как результат L-L фазового перехода, то в этом случае вириальный коэффициент может принимать большие положительные значения [53] (петля между T_6 и T_4 на рисунке 2). По мере уменьшения температуры ниже НКТР остаются небольшие криволинейные фибриллы (пунктирная линия 2 на рисунке 2), которые разрушаются при дальнейшем уменьшении температуры. Вблизи области холодной денатурации остаются мономеры [64], которые вносят свой вклад в осмотическое давление.

Таким образом, в диапазоне нативных состояний белка между T_1 и T_6 общее осмотическое давление и его отклонение от идеальности будет определяться вкладом от всех возможных конформационных состояний молекул белка, включающих кластеры интермедиатов, олигомеры, различные фибриллы и агрегаты. На рисунке 2 этот возможный суммарный вклад может быть представлен совокупностью линий, ограниченной условным эллипсом.

Диаграмма на рисунке 2 допускает существование реэнтрантных фазовых переходов при изменении концентрации и типа соли в результате их влияния на смещение температур T_2 и T_5 и изменения наклона линии $\Delta S = S^D - S^I = 0$. Сначала рост концентрации соли (ионной силы) ведет к уменьшению температурного диапазона между T_2 и T_5 , но дальнейший рост приводит к его расширению. При постоянной же температуре улучшение качества растворителя переводит систему из области геля [64] с малым давлением набухания (вне эллипса), через дисперсию белка (внутри эллипса), в область геля с большим давлением набухания (вне эллипса).

На основе рисунка 2 можно предложить расширенную фазовую диаграмму дисперсии белка в координатах температура - состав (рисунок 3). При этом состав определяется отношением молярных концентраций белка и соли m_2/m_3 согласно уравнению (1). Диаграмма учитывает наличие двух L-L ФП [38], возможное существование двух А и В конформационных состояний нативного белка в диапазоне температур нативного состояния [43] (при этом одно из них может быть интермедиатом в соответствующем температурном интервале), наличие большой фракции белковых олигомеров [62] и упорядоченных агрегатов амилоидоподобных фибрилл [57]. На рисунке 3 пунктирными линиями представлены кривые растворимости олигомеров белка и криволинейных фибрилл. Те и другие могут существовать в промежутке между ВКТР и НКТР как возможный результат дестабилизации белковых кластеров и линейных фибрилл, возникающих при L-L фазовых переходах. На положение ВКТР и НКТР на температурной шкале существенное влияние оказывают соли и/или водорастворимые полимеры [38]. На основе существующих данных можно предположить, что с ростом концентрации солей [19] и полимеров НКТР и ВКТР сначала сближаются по температуре, затем, в зависимости от ионной силы, начинают расходиться, создавая условия для реэнтрантных (возвратных) фазовых переходов [23]. Таким образом, реализация гипотетической ФД (рисунок 3) предполагает наличие изменяющегося состава дисперсии по концентрации как белка, так и других осомолитов, в то время как при постоянном составе то или иное конформационное и фазовое изменение может и не наблюдаться в заданном диапазоне температур.

В области промежуточных температур линии растворимости конформеров А и В могут пересекаться, что отражает тот факт, что при повышении температуры химический потенциал конформера В становится меньше, чем у конформера А, который все больше превращается в В форму. При пониженных температурах – наоборот, химический потенциал А конформера становится ниже, и он преобладает в растворе белка. Слева от этих линий конформеры образуют истинный раствор, тогда как справа от них находится область состояний, в которой наблюдается образование соответствующих конденсационных состояний в растворе белка. Так, в области повышенных температур справа от кривой А могут возникать фибриллы белка путем одноступенчатой конденсации, в то время как на линии бинадали в этой области олигомеры белка и В-конформеры белка образуют конденсационные структуры в результате ФП L-L, в которых также возможно образование как фибрилл из олигомеров (двухступенчатое фибриллообразование), так и аморфных агрегатов-сферулитов [65]. В результате дестабилизации конденсационных образований, возникающих при ФП L-L в этой области температур, справа от линии бинадали возможно образование метастабильного состояния, представленного криволинейными фибриллами. Такие структуры были обнаружены в растворах лизоцима [57]. Их растворимость понижается с понижением температуры (кривая 2 на рисунке 3), в то время как растворимость олигомеров повышается (кривая 1) при понижении температуры.

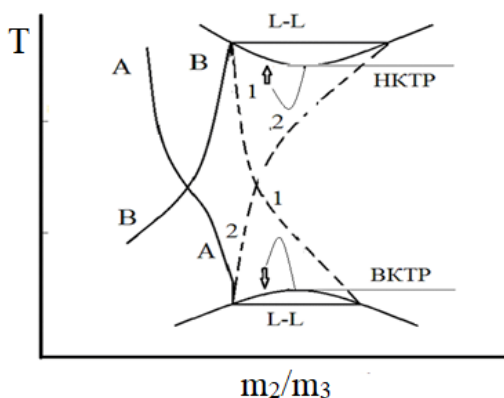


Рисунок 3. Гипотетическая фазовая диаграмма глобулярного белка в водно-солевых растворах в координатах температура – состав m_2/m_3 , где m_2 и m_3 – молярные концентрации белка и соли, соответственно. А и В – возможные конформеры нативного белка [43]. При этом состояния как А, так и В-конформер могут быть близки к расплавленной глобуле в соответствующем температурном интервале. Переходы жидкость-жидкость в области бинадалей (горизонтальные линии) соответствуют системам с нижней и верхней критическими температурами растворения (НКТР и ВКТР). Пунктирные кривые -линии растворимости олигомеров белка (1) и криволинейных фибрилл (2) в закритической области между НКТР и ВКТР. Кривые со стрелками показывают возможные изменения температур критических точек с ростом концентрации солей m_3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фазовая диаграмма эллиптического типа в координатах давление-температура $\{P, T\}$ давно и успешно используется для выяснения термодинамических особенностей кооперативных переходов в белковых молекулах. Диаграмма такого типа распространяется и на координаты осмотического давления от температуры $\{P, T\}$ при постоянном внешнем давлении. Анализ поведения химических потенциалов нативного и денатурированного состояния молекул белка, а также их интермедиатов, показал, что диаграмма $\{P, T\}$ способна отражать не только ФП первого рода $N \leftrightarrow D$, но и ФП типа $L-L$, а также критические ФП с НКТР и ВКТР, происходящие при соответствующих температуре и водно-солевом составе. Эта диаграмма позволяет учесть наличие в дисперсии белка олигомеров, аморфных и фибриллярных агрегатов, гелеобразных состояний, которые формируют существенно неидеальное поведение осмотического давления в диапазоне температур между холодной и тепловой денатурацией. Кроме того, диаграмма учитывает наличие в дисперсии белка реэнтрантных фазовых переходов, зависящих от температуры, концентрации солей и/или других осмолитов. Все это открывает возможности для анализа и прогнозирования конформационных, структурных и возвратных фазовых переходов на основе одной и той же координатной плоскости.

Список литературы / References:

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка*. М.: Университет, 2002, 376 с. [Finkelstein A.V., Ptitsyn A.V. *Protein Physics*, Boston e.a.: Academic Press, 1st ed., 2002, 354 p. (In Russ.)]
2. Sleutel M., van Driessche A.E.S. Role of clusters in nonclassical nucleation and growth of protein crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2014, vol. 111, no. 5, pp. E546-E553. doi: 10.1073/pnas.1309320111
3. Golub N., Meremyanin A., Markossian K., Eronina T., Chebotareva N., Asryan R., Mironets V., Kurganov B. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation. *FEBS Lett.*, 2007, vol. 581, no. 22, pp. 4223-4227. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.066
4. Shin Y., Brangwynne C.P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 2017, vol. 357, no. 6357, p. eaaf4382. doi: 10.1126/science.aaf4382
5. Yewdall N.A., Mason A.T., van Hest J.C.M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells. *Interface Focus*, 2018, vol. 8, no. 5, p. 20180023. doi: 10.1098/rsfs.2018.0023
6. Rozhkov S.P. Three-component system water-biopolymer-ions as a model of molecular mechanisms of osmotic homeostasis. *Biophysics*, 2001, vol. 46, no. 1, pp. 51-57.
7. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Phase states of water-protein(polypeptide)-salt system and reaction to external environment factors. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 43-48. doi: 10.1134/S0006350914010175
8. Fandrich M., Schmidt M., Grigorieff N. Recent progress in understanding Alzheimer's b-amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.*, 2011, vol. 36, no. 6, pp. 338-345. doi: 10.1016/j.tibs.2011.02.002
9. Sivalingam V., Prasanna N.L., Sharma N., Prasad A., Patel B.K. Wild-type hen egg white lysozyme aggregation in vitro can form self-seeding amyloid conformational variants. *Biophys. Chem.*, 2016, vol. 219, pp. 28-37. doi: 10.1016/j.bpc.2016.09.009
10. Nicolai T., Durand D. Controlled food protein aggregation for new functionality. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 249-256. doi: 10.1016/j.cocis.2013.03.001
11. Vekilov P.G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *J. Phys: Condens. Matter*, 2012, vol. 24, no. 19, p. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101
12. Dumetz A.C., Chockla A.M., Kaler E.W., Lenhoff A.M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophys. J.*, 2008, vol. 94, no. 2, pp. 570-583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152
13. Uversky V.N. Under-Folded Proteins: Conformational Ensembles and Their Roles in Protein Folding, Function, and Pathogenesis. *Biopolymers*, 2013, vol. 99, no. 11, pp. 870-887. DOI: 10.1002/bip.22298
14. El-Baba T.J., Kim D., Rogers D.B., Khan F.A., Hedes D.A., Russell D.H., Clemmer D.E. Long lived intermediates in a cooperative two-state folding transitions. *J. Phys. Chem. B*, 2016, vol. 120, no. 47, pp. 12040-12046. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b08932
15. Feig M., Sugita Y. Reaching new levels of realism in modeling biological macromolecules in cellular environments. *J. Mol. Graph. Model.*, 2013, vol. 45, pp. 144-156. doi: 10.1016/j.jmgm.2013.08.017
16. Hyman A.A., Weber C.A., Julicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2014, vol. 30, pp. 39-58. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325
17. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 539-546. doi: 10.1134/S0006350917040182
18. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Thermodynamic study of protein phases formation and clustering in model water-protein-salt solutions. *Biophysic. Chem.*, 2010, vol. 151, pp. 22-28. doi: 10.1016/j.bpc.2010.04.007
19. Grigsby J.J., Blanch H.W., Prausnitz J.M. Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH. *Biophys. Chem.*, 2001, vol. 91, pp. 231. doi: 10.1016/s0301-4622(01)00173-9
20. Galkin O., Vekilov P.G. Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, vol. 97, no. 12, pp. 6277-6281. doi: 10.1073/pnas.110000497

21. Vekilov P.G., Vorontsova M.A. Nucleation precursors in protein crystallization. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 2014, vol. 70, no. 3, pp. 271-282. doi: 10.1107/S2053230X14002386
22. Rozhkov S.P., Goryunov A.S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions. *J. Supercrit. Fluid.*, 2014, vol. 95, pp. 68-74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028
23. Matsarskaia O., Braun M.K., Roosen-Runge F., Wolf M., Zhang F., Roth R., Schreiber F. Cation-Induced Hydration Effects Cause Lower Critical Solution Temperature Behavior in Protein Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 2016, vol. 120, no. 31, pp. 7731-7736. doi: 10.1021/acs.jpcc.6b04506
24. Han J., Herzfeld J. Interpretation of the osmotic behavior of sickle cell hemoglobin solutions: different interactions among monomers and polymers. *Biopolymers*, 1998, vol. 45, no. 4, pp. 299-306. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)45:4<299::AID-BIP4>3.0.CO;2-G
25. Kaibara K., Watanabe T., Miyakawa K. Characterization of critical processes in liquid- liquid phase separation of the elastomeric protein- water system: microscopic observations and light scattering measurements. *Biopolymers*, 2000, vol. 53, no. 5, pp. 369-379. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(20000415)53:5<369::AID-BIP2>3.0.CO;2-5
26. Lomakin A., Asherie N., Benedek G.B. Aeolotropic interactions of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, no. 17, pp. 9465-9458. doi: 10.1073/pnas.96.17.9465
27. Luo H., Leeb N., Wang X., Li Y., Schmelzer A., Hunter A.K., Pabst T., Wang W.K. Liquid-liquid phase separation causes high turbidity and pressure during low pH elution process in Protein A chromatography. *J. Chromatogr., A*, 2017, vol. 1488, p. 57-67. doi: 10.1016/j.chroma.2017.01.067
28. Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I., Rashkovich L.N. Atomic Force Microscopy Study of Lysozyme Crystallization. *Crystallography Reports*, 2002, vol. 47, suppl. 1, pp. S149-S158.
29. Gillespie C.M., Asthagiri D., Lenhoff A.M. Polymorphic protein crystal growth: influence of hydration and ions in glucose isomerase. *Cryst. Growth Des.*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 46-57. doi: 10.1021/cg401063b
30. Von Hippel P.H., Schleich T. The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: Timasheff, S.N., Fasman, G.D., Eds. *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, N.Y.: Marcel-Dekker, 1969, pp. 417-574.
31. Record T.M., Anderson C.F., Lohman T.M. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening and ion effects on water activity. *Quart. Rev. Biophys.*, 1978, vol. 11, no. 2, pp. 103-178. doi: 10.1017/s003358350000202x
32. Collins K.D. Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization *Biophys. Chem.*, 2006, vol. 119, no. 3, pp. 271-281. doi: 10.1016/j.bpc.2005.08.010
33. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human synuclein. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 47, pp. 44284-44296. doi: 10.1074/jbc.M105343200
34. Senske M., Constantinescu-Aruxandei D., Havenith M., Herrmann C., Weingartner H., Ebbinghaus S. The temperature dependence of the Hofmeister series: thermodynamic fingerprints of cosolute-protein interactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, vol. 18, no. 43, pp. 29698-29708. doi: 10.1039/c6cp05080h
35. Dudev T., Lim C. Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, no. 1, pp. 538-556. doi: 10.1021/cr4004665
36. Aldabaibeh N., Jones M.J., Myerson A.S., Ulrich J. The solubility of orthorhombic lysozyme crystals obtained at high pH. *Cryst. Growth Des.*, 2009, vol. 9, no. 7, pp. 3313-3317. doi: 10.1021/cg900113e
37. Veessler S., Ferte N., Costes M.-S., Czjzek M., Astier J-P. Temperature and pH effect on the polymorphism of aprotinin (BPTI) in sodium bromide solutions. *Cryst. Growth Des.*, 2004, vol. 4, no. 6, pp. 1137-1141. doi: 10.1021/cg0498195
38. Wang Y., Annunziata O. Comparison between protein-polyethylene glycol (PEG) interactions and the effect of PEG on protein-protein interactions using the liquid-liquid phase transition. *J. Phys. Chem. B.*, 2006, vol. 111, no. 5, pp. 1222-1230. doi: 10.1021/jp065608u
39. Cin ar H., Fetahaj Z., Cinar S., Vernon R.M., Chan H.S., Winter R.H.A. Temperature, hydrostatic pressure, and osmolyte effects on liquid-liquid phase separation in protein condensates: physical chemistry and biological implications. *Chem. Eur. J.*, 2019, vol. 25, pp. 13049-13069. doi: 10.1002/chem.201902210
40. Shiryayev A., Pagan D.L., Gunton J.D., Rhen D.S., Saxena A., Lookman T. Role of solvent for globular proteins in solution. *J. Chem. Phys.*, 2005, vol. 122, no. 23, p. 234911. doi: 10.1063/1.1931655
41. Ma L., Cui Q. Temperature dependence of salt-protein association is sequence specific. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 48, pp. 14466-14472. doi:10.1021/bi0613067
42. Atkins P.W. *Physical Chemistry*, Oxford, Melbourne, Tokyo: Oxford University Press, 1998, 997 p.
43. Bian L., Wu D., Hu W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 2014, vol. 28, no. 2, pp. 295-301. doi: 10.1002/bmc.3020
44. Hollowell H.N., Younvanich S.S., McNevin S.L., Britt B.M. Thermodynamic analysis of the low- to physiological-temperature nondenaturational conformational change of bovine carbonic anhydrase. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2007, vol. 40, no. 2, pp. 205-211. DOI: 10.5483/bmbrep.2007.40.2.205
45. Aznauryan M., Nettels D., Holla A., Hofmann H., Schuler B. Single-molecule spectroscopy of cold denaturation and the temperature-induced collapse of unfolded proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, vol. 135, no. 38, pp. 14040-14043. doi: 10.1021/ja407009w

46. Matsarskaia O., Roosen-Runge F., Lotze G., Moeller J., Mariani A., Zhang F., Schreiber F. Tuning phase transitions of aqueous protein solutions by multivalent cations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, vol. 20, no. 42, pp. 27214-27225. doi: 10.1039/c8cp05884a
47. Zhang F., Weggler S., Ziller M.J., Ianeselli L., Heck B.S., Hildebrandt A., Kohlbacher O., Skoda M.W.A., Jacobs R.M.J., Schreiber F. Universality of protein reentrant condensation in solution induced by multivalent metal ions. *Proteins*, 2010, vol. 78, no. 16, pp. 3450-3457. doi: 10.1002/prot.22852
48. Luong T.Q., Kapoor S., Winter R. Pressure - A gateway to fundamental insights into protein solvation, dynamics, and function. *ChemPhysChem*, 2015, vol. 16, no. 17, pp. 3555-3571. doi: 10.1002/cphc.201500669
49. Johari G.P. The Tammann phase boundary, exothermic disordering and the entropy contribution change on phase transformation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, vol. 3, pp. 2483-2487. doi: 10.1039/b100246p
50. Hawley S.A. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 1971, vol. 10, no. 13, pp. 2436-2442. doi: 10.1021/bi00789a002
51. Smeller L. Pressure temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1595, no. 1-2, pp. 11-29. doi: 10.1016/S0167-4838(01)00332-6
52. Scharnagl C., Reif M., Friedrich J. Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1749, no. 2, pp. 187-213. doi: 10.1016/j.bbapap
53. Edsall J.T. The size, shape and hydration of protein molecules. In: Neurath H., Bailey K., Eds. *The proteins*, vol. 1, part B. NY: Academic Press inc., 1953, pp. 549-726.
54. Kornblatt J.A., Kornblatt M.J. The effects of osmotic and hydrostatic pressures on macromolecular systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1595, no. 1-2, pp. 30-47. doi: 10.1016/s0167-4838(01)00333-8
55. Royer C., Winter R. Protein hydration and volumetric properties. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2011, vol. 16, no. 6, pp. 568-571. doi: 10.1016/j.cocis.2011.04.008
56. Juarez J., Lopez S.G., Cambon A., Taboada P., Mosquera V. Influence of electrostatic interactions on the fibrillation process of human serum albumin. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, no. 30, pp. 10521-10529. doi: 10.1021/jp902224d
57. Miti T., Mulaj M., Schmidt J.D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 326-335. doi: 10.1021/bm501521r
58. Rescic J., Vlachy V., Jamnik A., Glatter O. Osmotic pressure, small-angle X-ray, and dynamic light scattering studies of human serum albumin in aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, vol. 239, no. 1, pp. 49-57. doi: 10.1006/jcis.2001.7545
59. McBride D.W., Rodgers V.G.J. Interpretation of negative second virial coefficients from non-attractive protein solution osmotic pressure data: an alternate perspective. *Biophys. Chem.*, 2013, vol. 184, pp. 79-86. doi: 10.1016/j.bpc.2013.09.005
60. Medda L., Monduzzi M., Salis A. The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific. *Chem. Commun. (Camb)*, 2015, vol. 51, no. 30, pp. 6663-6666. doi: 10.1039/c5cc01538c.
61. Navarra G., Giacomazza D., Leone M., Librizzi F., Militello V., San Biagio P.L. Thermal aggregation and ion-induced cold-gelation of bovine serum albumin. *Eur. Biophys. J.*, 2009, vol. 38, no. 4, pp. 437-446. doi: 10.1007/s00249-008-0389-6
62. Fullerton G.D., Kanal K.M., Cameron I.L. Osmotically unresponsive water fraction on proteins: non-ideal osmotic pressure of bovine serum albumin as a function of pH and salt concentration. *Cell Biol. Int.*, 2006, vol. 30, no. 1, pp. 86-92. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.11.001
63. Arabi S.H., Aghelnejad B., Schwieger C., Meister A., Kerth A., Hinderberger D. Serum albumin hydrogels in broad pH and temperature ranges: characterization of their self-assembled structures and nanoscopic and macroscopic properties. *Biomater. Sci.*, 2018, vol. 6, no. 3, pp. 478-492. doi: 10.1039/c7bm00820a
64. Ikenoue T., Lee Y.-H., Kardos J., Saiki M., Yagi H., Kawata Y., Goto Y. Cold denaturation of α -synuclein amyloid fibrils. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2014, vol. 53, no. 30, pp. 7799-7804. doi: 10.1002/anie.201403815
65. Adachi M., So M., Sakurai K., Kardos J., Goto Y. Supersaturation-limited and unlimited phase transitions compete to produce the pathway complexity in amyloid fibrillation. *J. Biol. Chem.*, 2015, vol. 290, no. 29, pp. 18134-18145. doi: 10.1074/jbc.M115.648139

POSSIBLE ROLE OF GLOBULAR PROTEIN POLYMORPHS INDUCED BY INTERACTION WITH SALT IONS IN LIQUID-LIQUID TYPE PHASE TRANSITIONS

Rozhkov S.P.

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
Pushkinskaya str., 11, Petrozavodsk, 186910, Russia; e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Abstract. Liquid-liquid (L-L) type phase transitions in water-salt dispersions of native (N^* , N) globular proteins in the temperature range between thermal (D^*) and cold (D) denaturation have been considered. Protein intermediates (I , I^*) arising as a result of the ion non-equilibrium (de)sorption in the process of $D \leftrightarrow N$ and $D^* \leftrightarrow N^*$ transitions are assumed to be involved in the L-L phase transition forming clusters and fibrils in the main phase of N and N^* proteins. Thus, they compensate for their excess chemical potential (ChPot) caused by unbalanced distribution of adsorbed salt ions in protein structure as compared to N protein. A temperature model for the behavior of ChPots ($\Delta\mu^i$) of various states of the protein (low-temperature $i = D, N, I$ and high-temperature $i = D^*, N^*, I^*$, transitions between them), as well as the temperature dependence of the solvent ChPot ($\Delta\mu_1$) are presented in the form of phase diagrams. The relationship between the values of $\Delta\mu_1$ and the temperatures of L-L transitions (upper and lower critical solution temperatures) as well as the reasons for the nonideal behavior of osmotic pressure in water-salt protein dispersions are discussed on this basis.

Key words: *protein intermediates, clusters, liquid-liquid phase transitions, phase diagram, osmotic pressure.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *CANDIDA ALBICANS* МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Филиппова Е.М. Несвижский Ю.В. Титов С.А. Глухов А.И.

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

г. Москва, РФ; e-mail: liza.filippova97@yandex.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. *Candida* – дрожжеподобный гриб, который играет заметную роль в развитии оппортунистических инфекций у иммунокомпрометированных людей. Однако микробиологическая диагностика данного микроба, учитывая неуклонное расширение пула его лекарственно устойчивых штаммов, имеет определенные сложности. В этой связи целью настоящей работы явилась оценка возможности применения атомно-силовой микроскопии (АСМ) как средства микробиологической диагностики грибов рода *Candida*. В ходе исследования методом АСМ было проведено сканирование поверхности коллекционного штамма *Candida albicans* и сняты кривые взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством прибора. Сканирование и снятие кривых проводили в двух режимах работы микроскопа: контактном и полуконтактном, а также с использованием трех сенсоров, отличающихся константой упругости: «мягкий» (константа упругости 0,03 Н/м), «средний» (3,5 Н/м) и «жесткий» (5,5 Н/м). В результате исследования был подобран оптимальный по константе упругости кантилевер и режим атомно-силовой микроскопии клеточной поверхности *Candida albicans*.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, *Candida albicans*.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Во многих сообщениях от ВОЗ говорится о том, что за последние десятилетия сильно вырос процент микозов. В основном это связано растущим количеством иммунокомпрометированных лиц, например, людей с иммунодефицитом или получающих иммуносупрессоры после трансплантации, в следствии аутоиммунных заболеваний или для подавления воспаления, а также проходящих химиотерапию по поводу онкологического заболевания. Чаще всего причиной микозов являются дрожжеподобные грибы рода *Candida*, которые могут вызывать как поверхностные, так и системные процессы, отличающиеся высокой смертностью. Наиболее распространенным и хорошо изученным представителем данного рода грибов является *Candida albicans*.

По современным представлениям, в нормальных условиях основным «местом обитания» *Candida spp.* в организме человека является кишечник. При исследовании состава микрофлоры кишечника здоровых людей нескольких стран Европы присутствие грибов обнаружено в 20–80% [1], в кале — у 65–80%. Также *Candida spp.* выделяется из других биотопов - ротовой полости, урогенитального тракта [2]. Так, исследование взрослых здоровых добровольцев показало, что, например, *C. albicans* присутствует в орофарингеальной зоне у 17–75% лиц [3,4].

На сегодняшний день известно более 200 видов грибов рода *Candida*, идентификация которых затруднительна в связи с особенностями их биологии: они имеют как гаплоидный, так и диплоидный набор хромосом, изменчивую морфологию, высокую прочность клеточной стенки, обладают устойчивостью к действию иммунных факторов и пр. В последние десятилетия четко обозначилось неуклонное расширение пула штаммов с высокой резистентностью к антимикотическим препаратам, что осложняет лечебные мероприятия [5].

Сказанное определило актуальность проблемы выявления и лечения инфекций, вызванных дрожжеподобными грибами рода *Candida*, и поиска новых диагностических подходов, одним из которых может стать атомно-силовая микроскопия (АСМ). Суть методики - сканирование поверхности объекта чувствительным зондом, позволяющая получить его топографические характеристики. Этот инструмент прекрасно подходит изучения объектов биологии, в частности клеток, поскольку он обеспечивает более высокое, чем световой микроскоп, нанометровое разрешение [6].

В соответствии с вышесказанным целью настоящей работы явилось исследование физико-химических свойств поверхности *C. albicans* методом АСМ: сканирование поверхности гриба и снятие кривых взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством прибора.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовался штамм 30.2 *C. albicans* из коллекции ФБУН МНИИЭМ института им. Н.Г. Габричевского Роспотребнадзора. Штаммы хранились в замороженном состоянии при -70°C . Перед работой была проведена программная разморозка штамма, его восстановление и посев на плотную питательную среду Сабуро (агар). Чашки Петри хранились в стерильных условиях. Из культур микробов, выросших на Сабуро, готовили густую суспензию. Далее ее наносили на обезжиренные предметные стекла для приготовления 4 образцов, которые в последствии высушивались на открытом воздухе в стерильных условиях ламинарного бокса

и хранились до востребования. Качество приготовления микропрепаратов оценивали световой микроскопией в проходящем свете.

Для АСМ использовался микроскоп фирмы NT-MDT, модель Solver PRO. Работу вели в контактном и полуконтактном режимах. На каждом образце проводили исследование 8-11 точек, а также снимали кривые DFL(Height) при каждом подводе и отводе кантилевера. В работе сравнивали три вида кантилеверов с разными константами упругости: «мягкий» CSG 11 (константа упругости 0,03 Н/м), «средний» HA_FM/W2C (константа упругости 3,5 Н/м), «жесткий» NSG 11 (константа упругости 5,5 Н/м).

Для получения изображения сканировали участок объекта размером 5x5 nm. Для оценки качества изображения были введены два параметра - контрастность и качество изображения. Последнее оценивалось методом экспертной оценки по отсутствию визуальных дефектов: полос и пропусков отдельных областей изображения. Опираясь на качество и контрастность изображений принималось решение об эффективности режима работы прибора какой кантилевера.

Снятие кривых взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством прибора, т.е. зависимости отклонения кантилевера от высоты расположения или расстояния до объекта, проводили в режиме «подведения» и «отведения». Полученные кривые имели типовой вид (рис. 1). Определяли следующие точки, каждая из которых имеет две координаты по оси абсцисс и ординат. В режиме «подведение» (рис. 1a): «1» – начало действия притягивающих сил на кантилевер, «2» – смена действия сил на отталкивание, «3» – силы, возникающие при непосредственном контакте с поверхностью клетки. В режиме «отведение» (рис. 1b): «1» – минимальное действие сил адгезии, «2» – максимальное проявление сил адгезии, «3» – силы, возникающие при непосредственном контакте с поверхностью клетки.

Результаты исследования подвергали стандартной статистической обработке с помощью программы STATISTICA for Windows версия 6.0. В сравнительном анализе использовали непараметрические методы Манна-Уитни и «Хи-квадрат». Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$ [7]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы у нас получилось снять 52 изображения: 18 «мягким» кантилевером, 18 «средним» и 16 «жестким». Каждый кантилевер работал в двух режимах: контактном и полуконтактном. Соответственно половина изображений для каждого сенсора была снята одним режимом, оставшаяся часть – другим. На рисунках 2-4 представлены примеры полученных изображений для каждого режима и сенсора, а результаты экспертной оценки их качества – в таблице 1. Согласно проведенному сравнительному анализу (табл. 2) можно заключить, что для получения в АСМ изображений *S. albicans* в полуконтактном режиме лучше подходят «средний» и «жесткий» кантилеверы, а в контактном – «мягкий». При этом полуконтактный режим представляется более предпочтительным.

В каждой из 52 анализируемых точек был исследован механизм взаимодействия биоорганических структур клеточной стенки гриба со сканирующим устройством АСМ. При проведении данного исследования проявились ограничения, связанные с характером работы прибора: в полуконтактном режиме при приближении к изучаемому объекту кантилеверы проявляли высокочастотную вибрацию, не позволяющую фиксировать контрольные точки. Кроме того, «жесткий» кантилевер не выявлял данные точки и в контактном режиме. При этом контрольные точки хорошо выявлялись в 100% случаев «мягким» и «средним» кантилеверами в контактном режиме.

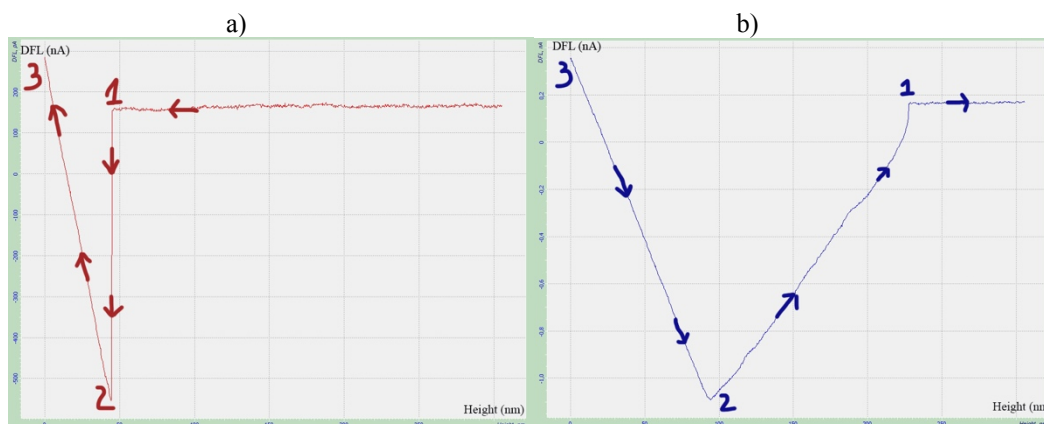


Рисунок 1. Примеры кривых DFL(Height) в режиме «подведение» (a) и «отведение» (b) кантилевера. По оси абсцисс показана высота (Height), измеряемая в нанометрах. По оси ординат – значение вертикального отклонения кантилевера (DFL), измеряемая в наноамперах

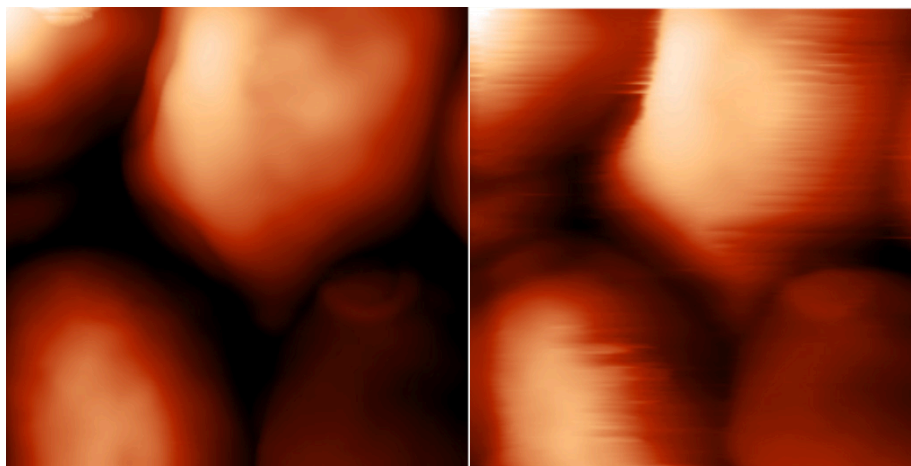


Рисунок 2. Изображение клетки *C. albicans* в полуконтактном (слева) и контактном (справа) режимах при работе «жестким» кантилевером. Изображение получено в программе Nova

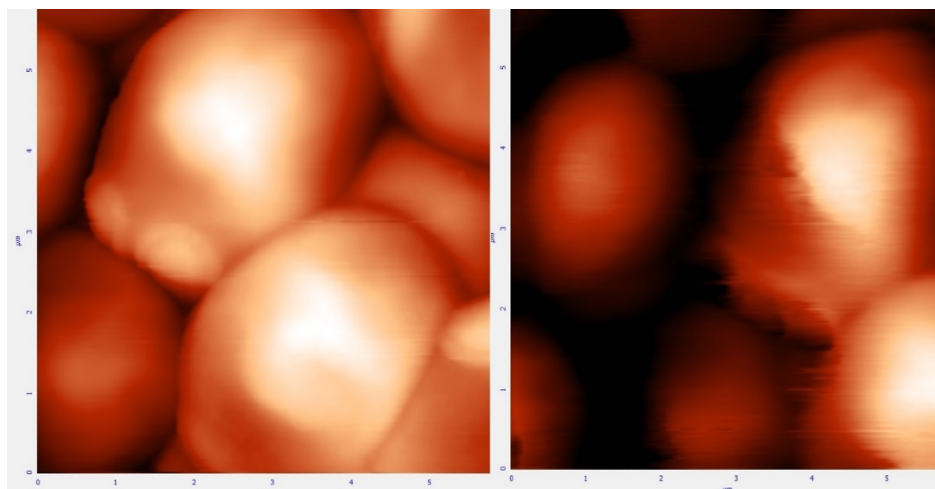


Рисунок 3. Изображение клетки *C. albicans* в полуконтактном (слева) и контактном (справа) режимах при работе «средним» кантилевером. Изображение получено в программе Nova

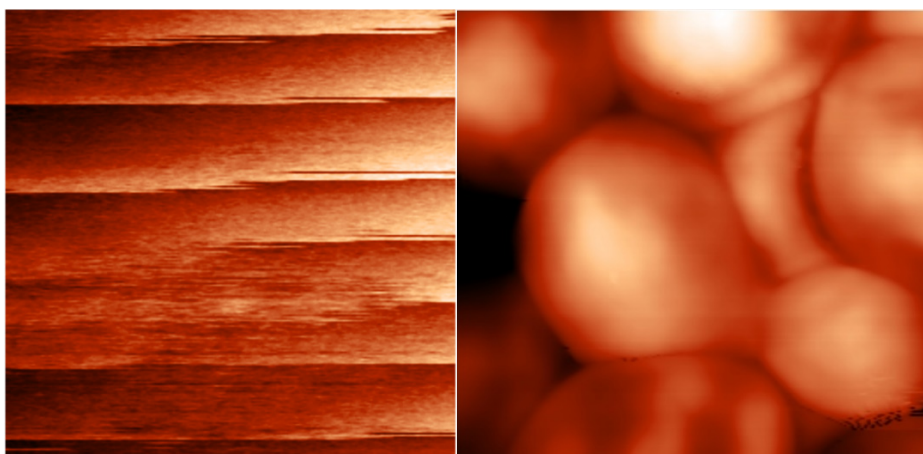


Рисунок 4. Изображение клетки *C. albicans* в полуконтактном (слева) и контактном (справа) режимах при работе «мягким» кантилевером. Изображение получено в программе Nova

Таблица 1. Результаты оценки качества изображений

Сенсор	Метод	Количество изображений	Контрастность		Отсутствие дефектов сканирования	
			n	%	n	%
«Мягкий»	Контактный	9	9	100,0	8	88,9
	Полуконтактный	9	0	0,0	0	0
«Средний»	Контактный	9	3	33,3	0	0
	Полуконтактный	9	9	100,0	8	88,9
«Жесткий»	Контактный	8	5	62,5	1	12,50
	Полуконтактный	8	6	75,0	5	62,50

Таблица 2. Сравнение эффективности сенсоров по параметрам оценки качества изображения при разных режимах сканирования

	Контактный режим		Полуконтактный режим	
	Контрастность	Отсутствие дефектов	Контрастность	Отсутствие дефектов
«Мягкий»/ «Средний»	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
«Мягкий»/ «Жесткий»	<0,05	<0,01	<0,01	>0,05
«Средний»/ «Жесткий»	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 3. Сравнительная эффективность кантилеверов в режиме «подведения»

Характеристика	Точка	Кантилевер		K	p
		«Мягкий»	«Средний»		
Height	«1»	208,55 +- 25,44	174,7125 +- 9,88	1,19	>0,05
	«2»	199,80625 +- 26,08	171,74375 +- 9,92	1,16	>0,05
	«3»	0	0	0	-
DFL	«1»	482,95625 +- 46,18	-144,4375 +- 28,32	-3,34	<0,05
	«2»	432,1875 +- 42,86	-195,5625 +- 26,12	-2,21	<0,05
	«3»	1496,1875 +- 80,45	- 1246,04375 +- 84,22	1,20	<0,05

В таблице 3 отражены результаты измерения значений координат (Height и DFL) точек исследуемых графиков в режиме «подведения» различными сенсорами. Среднее значение Height для «1» точки, измеренное мягким сенсором, несущественно отличается от значения, полученного «средним» сенсором ($p > 0,5$). Для «2» и «3» точек отличие также несущественно ($p > 0,5$). Для характеристики DFL значения всех трех точек, полученных «мягким» и «средним» сенсорами, оказались существенно отличными ($p < 0,05$).

Таблица 4 содержит аналогичную информацию для режима «отведения». Среднее значение для высоты в «1» точке, измеренное «мягким» сенсором, значительно отличается в 1,64 ($p < 0,05$) раза от данного значения, измеренного «средним» сенсором. Значение для «2» точки также существенно отличается в 1,86 раза ($p < 0,05$). Аналогичные значения для «3» точки существенно не отличаются ($p > 0,05$). Результаты для DFL получились следующие: «1» точка существенно отличается в -3,18 раза ($p < 0,05$), а «2» и «3» несущественно в 0,87 ($p > 0,05$) и 1,18 ($p > 0,05$), соответственно.

Таблица 4. Сравнительная эффективность кантилеверов в режиме «отведения».

Характеристика	Точка	Кантилевер		К	p
		«Мягкий»	«Средний»		
Height	«1»	371,7625 +- 32,92	226,76875 +- 9,93	1,64	<0,05
	«2»	367,0625 +- 33,74	197,90625 +- 10,51	1,86	<0,05
	«3»	0	0	0	-
DFL	«1»	488,875 +- 47,55	-153,6875 +- 31,45	-3,18	<0,05
	«2»	-234,75 +- 56,97	-271,1875 +- 28,75	0,87	>0,05
	«3»	1540,25 +- 82,81	1309,625 +- 86,03	1,18	>0,05

Таблица 5. Сравнение способности сенсоров детектировать отличия между точками

Характеристика	Режим	Сенсор	Сравниваемые точки		
			«1»/ «2»	«1»/ «3»	«2»/ «3»
Height	«Подведение»	«Мягкий»	-	<0,05	<0,05
		«Средний»	-	<0,05	<0,05
	«Отведение»	«Мягкий»	-	<0,05	<0,05
		«Средний»	<0,05	<0,05	<0,05
DFL	«Подведение»	«Мягкий»	-	<0,05	<0,05
		«Средний»	<0,05	<0,05	<0,05
	«Отведение»	«Мягкий»	<0,05	<0,05	<0,05
		«Средний»	<0,05	<0,05	<0,05

Для сравнения эффективности «мягкого» и «среднего» сенсора по фиксированию контрольных точек полученные результаты были сведены в таблице 5. Как можно видеть, «мягкий» сенсор чаще «допускал» ошибку при исследовании такого объекта, как *Candida albicans*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что АСМ успешно позволяет визуализировать такой микроскопический объект, как дрожжеподобные грибы рода *Candida*, и изучать интегральные физико-химические характеристики биоорганических структур ее клеточной стенки.

В настоящем исследовании, хотя и на ограниченном количестве образцов, испытание было проведено параллельно в контактном и полуконтактном режимах и несколькими кантилеверами при их отведении и подведении, что уже на этом этапе позволяет наметить оптимальный режим дальнейших исследований исследования физико-химических свойств данного объекта методом АСМ.

Наши результаты только частично сошлись с работами ученых, исследующих *C. albicans*. Полученные нами результаты согласуются с данными, полученными [8,9] при отработке режимов исследования *C. albicans*. В тоже время, они противоречат способу детектировать кривые зависимости силы от расстояния Sofiane El-Kirat-Chatel et al. [10]. Действительно *C. albicans* лучше подвергается визуализации в полуконтактном режиме при использовании сенсоров с низкой константой упругости. Однако, в нашей работе было показано, что «средний» кантилевер обладает большей чувствительностью, нежели «мягкий», которым обычно пользуются ученые для изучения физико-химических свойств клеточной стенки *C. albicans*, а «жесткий», в тоже время, малопригоден. Совершенно очевидно, что в такой ситуации для преодоления разногласий и выработки эффективных режимов атомно-силовой микроскопии *C. albicans* необходимо продолжить начатое нами исследование на большей выборке.

ВЫВОДЫ

1. *C. albicans* может успешно изучаться методом АСМ.
2. Для визуальной оценки в контактном режиме оказался эффективным «мягкий» кантилевер, а в полуконтактном – «средний».
3. «Средний» кантилевер обладает большей эффективностью при исследовании структур *C. albicans* по сравнению с «мягким», так как он оказался более результативным по отношению к характеристике Height при «отведении» и DFL при «отведении».
4. При АСМ *C. albicans* характеристика DFL обладает большей чувствительностью и эффективностью, по сравнению Height, так как хорошо дифференцируется при «отведении» и «подведении».

Список литературы / References:

1. Lopes-Colombo A., Guimaraes T., Camargo L.F.A., Richtmann R. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2013, vol. 17, iss. 3, pp. 283-312.
2. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Горшкова Г.И. Кандидозный сепсис. *Диагностика микозов*. [Arabian R.A., Klimko N.N., Gorshkova G.I. Candidal sepsis. *Diagnosis of mycoses*. (In Russ.)]
3. Gazzard B. Fungal infection of the gastrointestinal tract. *Principles and Practice of Clinical Mycology*, 1996, pp. 165-177.
4. Martha F. Mushi et al. High Oral Carriage of Non-*albicans* *Candida* spp. among HIV-infected individuals. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016, vol. 49, pp. 185-188.
5. Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Воропаева В.А., Лиханская Е.И., Несвижский Ю.В. Мутации в гене ERG11 *Candida albicans*, выделенных у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Проблемы медицинской микологии*, 2021, т. 23, № 2, с. 68. [Voropaev A.D., Ekaterinchev D.A., Voropaeva V.A., Likhanskaya E.I., Nesvizhsky Yu.V. Mutations in the ERG11 gene of *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients. *Problems of medical mycology*, 2021, vol. 23, no. 2, p. 68. (In Russ.)]
6. Webb H.K., Truong V.K. et al. Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy. Current research and methodologies. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, vol. 86, pp. 131-139.
7. Урбах В.Ю. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М.: 1975, 295 с. [Urbach V.Yu. *Statistical analysis in biological and medical research*. M.: 1975, 295 p. (In Russ.)]
8. Kasas S. et al., AFM contribution to unveil pro- and eukaryotic cell mechanical properties. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, vol. 73, pp. 177-187.
9. Khatiwada D., Lamichhane S.K., A Brief overview of AFM Force distance spectroscopy. *The Himalayan Physics*, 2011, vol. 2, no. 2, pp. 80-83.
10. Sofiane El-Kirat-Chatel et al. Nanoscale analysis of caspofungin-induced cell surface remodelling in *Candida albicans*. *Nanoscale*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 1105-1115.

APPLYING ATOMIC FORCE MICROSCOPY FOR WORK WITH THE CELL SURFACE OF CANDIDA ALBICANS**Filippova E.M., Nesvizhskiy U.V., Titov S.A., Glukhov A.I.**

Sechenov University (MSMU)

Trubeckaya 8, Moscow, Russia; e-mail: elizaveta.filippova97@yandex.ru

Abstract. *Candida albicans* is a yeast-like fungus that lives on people's mucous membranes and skin and does not cause infections. However, it plays a role in the development of opportunistic infections in immunocompromised people. In this work, we would like to evaluate the possibility of studying the cell wall of *C. albicans* by atomic force microscopy, as well as compare the operating modes of the microscope and choose the most optimal one for working with the fungus. Atomic force microscopy is a powerful tool for evaluating surfaces, including the cell walls of biological objects. The microscope is capable of operating in different modes, but in this work we compared two of them: contact and semi-contact. These methods are the most popular for evaluating the surfaces of biological objects. Comparison of the modes was carried out on the *C. albicans* strain. The surface of the strain was scanned by atomic force microscopy, and the curves of the dependence of the sensor deviation from the distance to the object were recorded. Scanning and recording of curves were carried out in two modes of operation of the microscope: contact and semi-contact, as well as three sensors: soft, medium and hard. As a result of the study, the optimal sensor and mode for atomic-force microscopy were selected.

Key words: Atomic-force microscope, *Candida Albicans*.

NEW DIRECTIONS IN BIOPHYSICS OF AQUATIC ECOSYSTEMS

Degermendzhi A.G.¹, Degermendzhi N.N.²¹ Institute of Biophysics Siberian Branch of RAS,*Akademgorodok str., 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: ibp@ibp.ru*² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky,*Partizana Zheleznyaka str., 1, Krasnoyarsk. 660022, Russia; e-mail: nn1947@yandex.ru*

Received: 13.07.2021

Abstract. The paper presents new experimental and theoretical results of the study of the mechanisms of stability and controllability of communities of hydrobionts (microorganisms) in open aquatic ecosystems. The basis is the search and study of physicochemical mechanisms of action of density growth-controlling factors (DGCF) and the laws of sustainable coexistence of natural populations. Experimental and theoretical results were achieved: 1) elements of the mathematical theory of similarity of aquatic ecosystems are developed on the basis of joint environmental-hydrophysical equations of dynamics of their state in a dimensionless form; 2) the connection (theorem) of the maximum number of coexisting species (n) and the number of DGCF (m) is proved: $n < m$; 3) through the change of the input DGCF rules for the formation of a community structure with a predetermined species composition and methods for searching DGCF are proposed; 4) the fundamental phenomenon of autostabilization of the DGCF is revealed: independence of background levels of the DGCF from their input flows. The general environmental significance of the results is discussed in terms of the fundamental improvement of the predictive "strength" of mathematical models of aquatic ecosystems.

Key words: *ecosystem similarity, autostabilization, quantization theorem, coexistence principle, ecosystem models.*

1. INTRODUCTION.

It can be argued that biophysical ecology (i.e., the science concerned with studying the subject matter of ecology from the physical–mathematical point of view) is developing rather slowly. The rate of development of this science, which is highly important for developing scientifically based management of ecosystems and the biosphere, is limited by the following factors: (1) the absence of systematic experimental approaches (of the type used in physics) connected with the impossibility to make experiments with the ecological object which is unique (e.g., unique is the biosphere itself, a certain lake, river ecosystem, etc.); (2) the rare procedures for the verification of ecosystem mathematical models using field and/or experimental data; (3) the variety of interactions within ecosystems in terms of energy, matter, and control even for small-species communities; and (4) the absence of strict methods for the transfer of laboratory-scale experimental data to full scale. We shall discuss some solutions to the situation.

We shall consider water resources as an example. The rapidly increasing consumption of water will soon make the lack of freshwater a factor that will limit the development of civilization as severely as diminishing energy resources will do. As a rule, the interests of water users are conflicting. However, almost all of them pollute water environments, seriously interfering with ecosystems and making harmful alterations to them. Aquatic ecology must be able both to predict the environmental consequences of the activities of water users and also to satisfy their needs in the best possible way. The biophysics of ecosystems has three major branches with their own physical–mathematical methods: namely, (a) monitoring the integrated parameters of ecosystems, (b) the kinetic experimental approach, and (c) mathematical modeling, which is based on the first two branches. In its methodology, the biophysics of ecosystems currently tends towards reductionism, maybe because it has been used successfully in physical sciences. Investigations address the spatio-temporal distribution and dynamics of various ecological structures of aquatic ecosystems (species, age, sex, functional structure, and trophic structure) and the hydrochemical conditions of a water body. More specifically, the biophysics of ecosystems deals with:

- biochemical and population mechanisms: self-regulation of growth in aquatic communities, substrate consumption, material cycling, inter-specific relationships in the community;
- contribution of density and limiting factors to the stability of aquatic communities;
- physical principles underlying the theory of the search for limiting factors;
- laws of the stable coexistence of interacting populations;
- principles and theory of material cycling in aquatic communities;
- experiments, mechanisms, and the theory of migration behavior of aquatic organisms (plankton);
- scale-up of ecosystems;
- construction of ecosystems with tailored properties;
- ecosystems with closed material loops as models of biosphere-like systems.

The purpose of ecosystem biophysics is to reach such a level of knowledge about the elementary physical–biochemical mechanisms responsible for the functioning of aquatic ecosystems that would be sufficient to make valid prognoses of their natural and human-induced dynamics and to control their state.

A very important part of ecosystem biophysics is theoretical prediction of the development of aquatic ecosystems, including water quality. An instrument of prognosis (i.e., the theory and models of aquatic ecosystems) must be regarded

as equal to the methods of biological monitoring [1], including remote control, and physicochemical analysis of the state of a water body. Until recently, modeling of aquatic ecosystems has been only (and rather weakly) related to data of the classical monitoring of water bodies. The existing procedure of model identification and verification (actually fitting to field data) does not allow an extrapolation of constructed models to other water bodies, because it disguises and mixes up the errors of measurements of ecosystem inputs and the lack of knowledge of mechanisms responsible for the functioning of ecosystems. The most serious drawback of the existing method of modeling aquatic ecosystems (compared with physics) is that modeling is unrelated to experimental investigations. Thus, we cannot gain any essentially new knowledge about the mechanisms of interactions of biological components, so the heuristic significance of investigations is limited. Experimental investigations are laboratory and/or semi-field investigations of both the kinetic characteristics of aquatic organisms and the behavior of a community in special experiments. Experimental methods in biophysical ecology must, like physical ones, provide insight into the internal structure of communities and interactions between populations. The deepest insight into the structure of an ecosystem, its parts and their functioning is gained when experimental and field data are coordinated and the logical consistency of this coordination can be verified by mathematical models of various hierarchical levels. Although biologists are sometimes skeptical about the achievements of mathematical modeling, this may be the only means to strictly verify ecological hypotheses, particularly in the case of events with multi-directional processes running simultaneously, and the universal method to check the ecological efficiency of different scenarios of controlling the state of a water body [2].

Contemporary knowledge of the structure of river, lake, and reservoir ecosystems and the practical positive control of the state of water bodies suggest more questions than answers. The answers are less profound than ecological problems. The reason is that aquatic ecology as a science encounters some objective difficulties related to the following sections (Sections 1.1–1.3).

1.1 Experiment in ecology.

In contrast to physics, ecology is poor in experimental approaches; we do not refer to methods of field observations but rather to experimental approaches similar to physical ones (i.e., a discriminating experiment with a whole ecosystem responding to a sole experimentally calibrated impact).

1.2 Complexity of ecosystems.

The rapid accumulation of ecological knowledge is naturally impeded by specific features of aquatic ecosystems. An ecosystem consists of numerous variously interrelated components, which are responsible for its counter-intuitive behavior (i.e., the behavior is opposite to what we can predict based on our limited knowledge, which seems to us quite complete). In ecology, this behavior has particularly grave consequences, as the human impact on aquatic ecosystems increases and there is rather limited time for thorough studies to counterbalance counter-intuitiveness. In this respect, physics has been in a better position for quite a long time. Counter-intuitive behavior can also be caused by changes in interactions between populations (due to adaptation, microevolution) that the ecology researcher is not aware of.

1.3 Non-trophic regulation of ecosystems.

In the general case, we adhere to classical concepts and assume that, to make a valid prognosis, it is sufficient to know only the trophic–energy structure of an aquatic ecosystem and to have basic knowledge of the species. However, an ecosystem comprises organized fluxes of energy, matter, and control. Processes of control may be even more important for a valid prognosis than material flows. Moreover, the effective specific mechanisms of regulation that have been selected in the course of long-term evolution and that include various (e.g., chemical) special signal systems can influence all species, from bacteria to humans. Thus, when we consider the impact of pollutants, we should study not only the processes of their decomposition and biochemical transformation but also their damaging effects on regulatory interactions and their interference with regulation, including communications.

2. FUNDAMENTALS OF WATER ECOSYSTEM: SIMILARITY THEORY.

If we address the problem of experimenting with real aquatic ecosystems, leaving aside quite successful experiments with water treatment facilities, we can see that a well-developed methodology is still lacking. There is an approach based on the construction of various sizes of experimental micro-ecosystems; there are systems of continuous cultivation of microorganisms, and finally there are test-tank or aquarium-type laboratory systems. However, all these systems are deficient in principles, methodology, and methods of extrapolating the results of laboratory and semi-laboratory experiments to natural ecosystems. A mathematical theory of scaling of aquatic ecosystems could provide a scientific basis for developing the principles of such extrapolation. Scaling theory has proved to be useful in hydrodynamics and aerodynamics.

Let us recall the theory of dimensionality and scaling [3,4]. The main result is contained in the “S-theorem” (short for “similarity theorem”). We suppose that physical value a depends on determining parameters and variables $a_1, \dots, a_k, a_{k+1}, \dots, a_n$:

$$a = f(a_1, \dots, a_{k+1}, a_n). \quad (1)$$

If $a_1, \dots, a_k$ are independent variables then Equation (1) can be reduced to the relationship of dimensionless quantities:

$$S = F(1, \dots, 1, S_{k+1}, \dots, S_n),$$

where $S = a/a_1^h, \dots, a_k^q; S_j = a_j/(a_1^{p_1^j}, \dots, a_k^{p_k^j}); j = k + 1, \dots, n$, or compactly:

$$S = F(S_1, \dots, S_{n-k}). \quad (2)$$

It follows from (2) that S really depends—not on n parameters—but rather on $n - k$ parameters.

Let us apply the S-theorem to the simplest model of an aquatic microbial ecosystem based on the principle of a chemostat. Let a population of microorganisms of biomass $x(t)$ develop in the system at specific flow rate D (the ratio of volume flux to system volume) and consume some substrate of the background concentration $S(t)$ and the input concentration S_0 . An increase in biomass of 1 gram requires the consumption of y grams of substrate. The dependence of the specific growth rate (SGR) of biomass (g) is given as $g = \mu S/(K_S + S)$, where μ is the maximum SGR, and K_S is the half-saturation constant for the substrate. Then

$$\left. \begin{aligned} S &= \varphi(x(0), S(0), S_0, t, \mu, K_S, D, y) \\ x &= f(x(0), S(0), S_0, t, \mu, K_S, D, y), \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

where dimensionalities are as follows:

$$\begin{aligned} [x] &= [S] = [x(0)] = [S(0)] = [S_0] = [K_S] = \text{M/L}^3; \\ [t] &= T; [D] = [\mu] = T^{-1}; [y] = 1. \end{aligned}$$

As independent variables we take K_S and μ . Then, according to Equation (2), the dimensionless parameters are $F = x/K_S$, $W = S/K_S$, $\tau = t/\mu^{-1}$, $V = D/\mu$, etc. Equations (3) will be given as $W = \varphi(x(0)/K_S, S(0)/K_S, S_0/K_S, t\mu^{-1}, D/\mu, y)$ or $W = \varphi(\tau, V, y)$. Similarly, $F = f(\tau, V, y)$.

In contrast to an empirical search for Equation (2) type relationships, for this system there is a known mechanism, and thus dimensionless equations $W_\tau^* = (S_0/K_S - W)V - yWF/(1 + W)$ and $F_\tau^* = (W/(1 + W) - V)F$ can be written down. In the steady state $W = V/(1 - V)$. A graph of a theoretical dimensionless relationship between the residual concentration of limiting substrate $W (= S/K_S)$ and the dimensional quantity of flow rate $V (= D/\mu; D < \mu)$ together with respective experimental values is presented in Figure 1. All undimensioned points are adequate (i.e., belong to) one and the same curve $W = V/(1 - V)$. Even this very simple example shows that the condition of similarity between field (f) and laboratory (l) ecosystems (i.e., equality of all dimensionless similarity parameters, $\tau_f = \tau_l$; $V_f = V_l$, etc.) leads to the requirement of a certain relationship between population microbiological parameter (μ) and flow rate (D) as a hydrodynamic quantity: $D_f/\mu_f = D_l/\mu_l$. Hence, in laboratory experiments, populations growing at higher rates μ_l can be used, and thus higher flow rates D_l can be set. The dimensionless laboratory relationship between the background concentration of the limiting substrate and D/μ will be the same as the field concentration. Since $t_f\mu_f = t_l\mu_l$, laboratory time (t_l) of the identical laboratory and field dynamics of the components will be μ_l/μ_f times shorter than the field time.

Using the S-theorem, one can write down simultaneous ecological–hydrophysical equations for the dynamics of the state of an aquatic ecosystem in dimensionless form. Thus, new parameters of similarity can be added to well-known ones (i.e., Reynolds', Froude's, etc.), with ecological micro-parameters used along with hydrophysical ones. The future

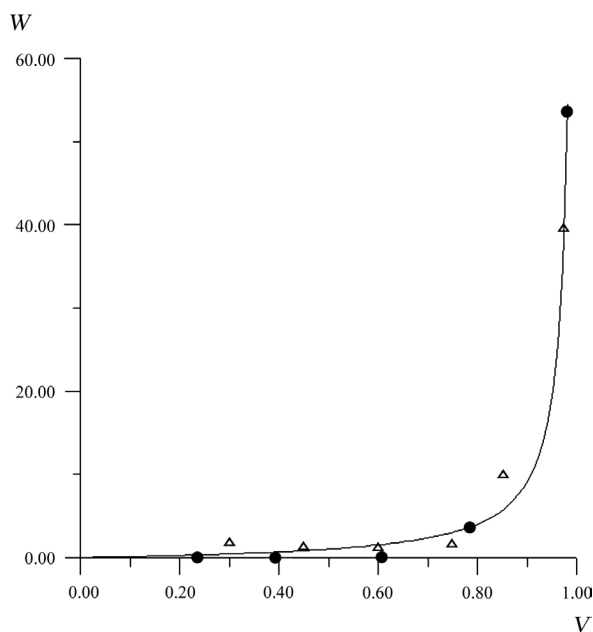


Figure 1. Dimensionless relationship between residual substrate concentration (W) and dimensionless flow rate (V). Experiments: *Saccharomyces carlsbergensis*, substrate, glucose [5]; Δ mixed culture of activated sludge, substrate, glucose [6]. Theory: — $W = V/(1 - V)$

scaling theory for aquatic ecosystems will contain a simultaneous mathematical description of the three main groups of processes: hydrodynamic, hydrochemical, and hydrobiological. The ultimate goal must be scaling of the maximally complete system of equations generally consisting of (1) a hydrodynamic unit, (2) a hydrophysical unit, and (3) an ecosystem unit. The objective of the hydrodynamic unit is to calculate the spatio-temporal dynamics of current velocity (depending on the morphometry of the water body floor, friction, slopes, water flow, and inflow). The objective of the hydrophysical unit is to calculate the dynamics of the following parameters: water temperature (depending on turbulence, heat balance with the atmosphere, and input of thermal effluents); the level of underwater irradiation (depending on the outer light flux, light absorption and reflection by microalgae and particles); sedimentation; turbidity; etc. The objective of the ecosystem unit is to calculate the dynamics of the concentrations of phytoplankton, zooplankton, bacteria, the main hydrochemical components, and pollutants in the water column, and the dynamics of bottom-water organisms (depending on biological interactions between populations, material cycling, industrial effluents, limiting factors, hydrophysical and hydrodynamic conditions, and sludge transport). The author is planning to create a computer system that will simulate these units, in dimensional and dimensionless forms, and inverse algorithms, which will reconstruct field dynamics from laboratory dynamics.

Having undimensioned macro-parameters of the system of the abovementioned groups of equations, we can make a universal undimensioned description of the dynamics of some ecosystems. Then, varying experimental dimensional microparameters, we may be able to find the values of undimensioned macro-parameters equal to real ones and conduct experiments with this small ecosystem. Conversely, experimental dynamics must be converted into real dynamics for a large ecosystem, which cannot be experimented on. Accurate similarity scaling can start a new direction in the experimental modeling of very many ecologically significant phenomena (material cycling in aquatic ecosystems, self-purification, stratification of biological components, migration of plankton, microalgal blooms) together with the modeling of hydrophysical parameters (currents, light and temperature fields, etc.). It would be good to use experimental facilities that hydraulic engineers have used for similarity scaling of hydrophysical characteristics only. For the sake of similarity, it will be necessary to equip these facilities with technical systems of light radiation for microalgal photosynthesis, to prepare model effluents, etc. The great advantage of this approach is that decision-makers would clearly see the environmental consequences of a given project even before it is practically implemented. First, it would be reasonable to construct simple homogeneous ecological flow-through systems and then gradually to move up to spatially heterogeneous ones. At the same time, it would be necessary to develop an ecological–hydrophysical scaling theory, later involving the scaling of hydrochemical processes. In the course of development, theoretically grounded bans may be placed on simultaneous scaling of ecological–hydrophysical processes that produce an opposite effect on scaling parameters, as happens in hydrodynamics in the case of wave resistance to movement ($Fr = v/\sqrt{lg}$) and in the case of viscose resistance ($Re = \rho vl/\mu$). The main concerns of the scaling theory for aquatic ecosystems are (a) the validity of systems of equations and (b) the theoretical limits of similarity scaling.

3. GROWTH ACCELERATION: A NEW INTEGRAL INDEX OF THE CUMULATIVE EFFECT OF ALL THE REGULATORS IN A MONOCULTURE.

As the question of the complexity of ecosystems (Section 1.2) is rather difficult, the question of the non-trophic regulation of ecosystems should be pursued simultaneously. To create a stock of valid models, taking into account the mechanisms of population regulation (see Section 1.3), it is necessary to amass experimental data on the kinetic parameters of aquatic organisms, with kinetics being defined broadly (growth rates, food spectra, types of limiting factors, death rates, nature and intensity of inter-population relationships, etc.). These kinetics must be used in models along with quantitative field observations of the dynamics of ecosystem components so as to verify and identify the structures of model ecosystems. That is why the modeler's work cannot be independent of the experimenter's and the naturalist's work. They have to design experiments together.

Experimental methods must play a special part in the development of mathematical models of natural aquatic ecosystems, and specifically of microbial aquatic communities. The most important biochemical substances are those that are responsible for the sustainability of a microbial community. First of all, these are density-dependent growth control factors (DDGCFs; i.e., substances that are released or consumed by a population and that influence the growth of this or another population [7]). It is traditional to determine the relationship of the SGR to a specific DDGCF (e.g., a Monod-type relationship). However, the question of whether one such relationship is enough is not usually discussed (i.e., whether Liebig's bottleneck principle is valid here or the SGR depends on other DDGCFs, unknown to the researcher). In more general terms, this question can be formulated as follows. If we know the relationship of the SGR to some specific DDGCF, can we accurately quantify our knowledge of the density-dependent control of this species in a specific system? In other words, is there a way to determine the aggregate effect of all the DDGCFs on a specific population? In contrast to physics, where the types and number of forces and principles of their action are well-known, the situation in aquatic ecology is quite different. Any product of the ecosystem's metabolism (innumerable biochemical substances) can potentially be a factor controlling the stability of the community by positive or negative feedback. Even if we manage to make a complete list of all the biochemical products of metabolism, the main question remains open as to which of these substances can influence, say, the growth rate of a microbial population and how? Only these substances can be regarded as DDGCFs, which are essential for modeling.

The fundamental solution to this problem is based on an essentially physical idea. The idea is as follows. Take a separate microbial population, a monoculture, and assume that it is related to several biochemical DDGCFs by feedbacks. Microbiologists know that not only limiting substrates—but also metabolites—inhibiting or stimulating growth, can be

considered to be DDGCFs. Then, what is the overall measure of the feedback level in growth control; that is, what is the estimate of the total effect produced by all the DDGCFs on population growth? As the theory developed previously states [8], this is a change in the growth rate increase B (i.e., acceleration of growth). Or, in other words, it is the rate of change of SGR, g , in response to a pulse disturbance of population concentration ΔX , under an unchanged (at the moment of disturbance) chemical composition of the environment:

$$B = \left. \frac{\partial g}{\partial t} \right|_d - \left. \frac{\partial g}{\partial t} \right|_u \quad (4)$$

where d is the disturbed state; u is the undisturbed state (the control state); and $[B] = T^{-2}$ (i.e. the dimensionality of growth acceleration value (B) is inverse to negative quadratic time $T(T^{-2})$; there is a similar value with similar dimensionality in Newton's mechanics called "physical object acceleration").

In the general case, for a monoculture whose SGR is determined by several (n) DDGCFs, the formula for calculation of the theoretical specific values of $B(B_{Th})$ is given as:

$$B_{Th} = \sum_{i=1}^n (\partial g / \partial A_i) a_i \quad (5)$$

where $g(A_1, A_2, \dots, A_n)$ is the SGR of the monoculture as a function of all DDGCFs; and a_i is the coefficient of transformation of the i -th DDGCF.

Thus, all the n DDGCFs make a plus or minus contribution ($a_i \partial g / \partial A_i$) to the total theoretical value of B_{Th} . On the other hand, the same value can be found experimentally, B_E , from a change in the growth rate increase of a disturbed population and an undisturbed one, based on the above definition of feedback and Equation (4). It is assumed that growth rate increase as a response to the disturbance by biomass concentration occurs without any delay, due to the density activity of microorganisms (Figure 2). The value of $B_E - B_{Th} \equiv \Delta B$ determines the total control by unknown DDGCFs.

The proportion of total unknown DDGCFs in the total control (B_E) (i.e., $\Delta B / B_E$) can be determined, too. This is a very important value, showing the magnitude of the total control efficiency contributed by the yet unknown DDGCFs. If this value amounts to several dozen percent, a search for other DDGCFs should be continued. Strict equality of the positive feedback component to the negative one, so that $\Delta B = 0$, seems unlikely. As long as this variant has not been found in reality, we will not take it into account. In principle, the proposed method can be realized experimentally [8]. Based on this, we can estimate the contribution of specific regulators to the integral value of feedback and the natural (seasonal) values of feedback for natural populations of aquatic microorganisms in their natural habitats. Put in simpler terms, the experimental value of the natural negative feedback shows the degree to which the growth of a population of microorganisms is limited by natural substrates in a given place at a given time. A similar value obtained as a coefficient of interactions between populations shows the degree of competition or other types of relations.

Thus, in modeling the internal structure of a microbial community, the freedom of the model should be restricted by the requirement that the calculation should be in agreement with both classical kinetic parameters (production, generation time, the first-time derivatives of biomass) and new ones, values of natural feedbacks, and interaction coefficients (the second derivatives). A limitation "from above" is the requirement that the model should correspond to field monitoring data (e.g., biomass of species, or concentration of chemical substances such as zero derivatives).

4. CONCLUSION: THE FUTURE MONITORING OF AQUATIC ECOSYSTEMS.

We have proposed approaches to the study of ecosystems under natural and human-imposed conditions. These

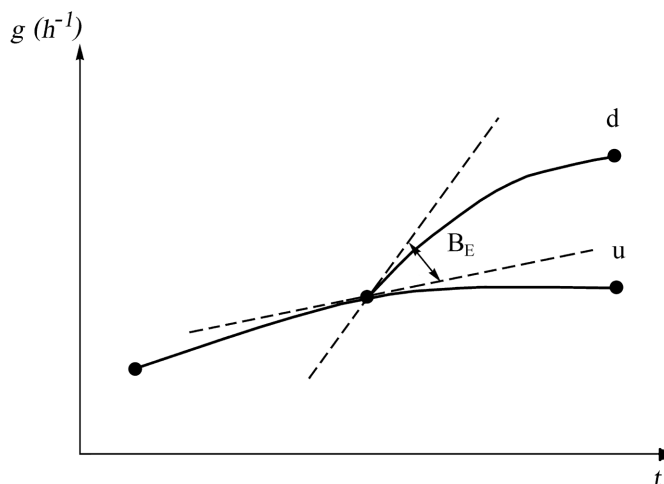


Figure 2. Approach to estimating the experimental level of feedback B_E

include (1) studying the fundamentals of the ecosystem similarity theory based on the principle of scaling however complex a system of equations may be necessary and getting a new set of dimensionless macroparameters and working out experimental approaches including the method of transfer of laboratory data to field data, (2) a new experimental–theoretical approach using the growth acceleration index to estimate the integral degree of knowledge of growth regulators, (3) the idea of working out a new language to describe the state and dynamics of ecosystems with the help of specially selected bioassay indicators, and (4) based on the simple schemes of fermentation reactions, an idea is being developed about the possible dependence of a series of selective population parameters, which is important for modeling the microevolutional process. The proposed new trends of biophysical ecology will increase the physical strictness of the method.

Acknowledgements. This project “Development of scenarios for control the recreational potential of the Abakan Canal of the Yenisei River in Krasnoyarsk based on monitoring its ecological state and mathematical modeling” was funded by Krasnoyarsk Regional Fund of Science.

References:

1. Kratasyuk V.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.H., Egorova O.I., Abakumova V.V., Gribovskaya I.V., and Kalacheva G.S. Problems and prospects of bioluminescent assay in ecological monitoring. *Siberian Ecological Journal*, 1996, vol. 5, pp. 397-403.
2. Gubanov V.G., Degermendzhy A.G., Bayanova Yu.N., Bolsunovsky A.Ya., Gladyshev M.I., Gribovskaya I.V., Zinenko G.H., Halacheva G.S., Stepen A.A., Temerova T.A., Ustyugova T.T., Khromechek E.B., and Shitova L.Yu. Prognostic modeling of ecosystem dynamics and water quality based on kinetic characteristics. *Siberian Ecological Journal*, 1996, vol. 5, pp. 453-472.
3. Barenblatt G.I. *Similarity, Scaling, Intermediate Asymptotic*. Gidrometeoizdat, Leningrad, 1982, 255 p.
4. Sedov L.I. *Methods of Similarity and Dimensionality in Mechanics*. Nauka, Moscow, 1972, 440 p.
5. Toda H. Invertase biosynthesis by *Saccharomyces carlsbergensis* in batch and continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 1976, vol. 18, no. 8, pp. 1103-1115.
6. Chiu S.Y., Fan L.T., Hao I.C., and Erickson L.E. Kinetic behavior of mixed populations of activated sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 1972, vol. 14, no. 2, pp. 179-199.
7. Odum E.P. *Fundamentals of Ecology*, Third Edition. W.B.Saunders, Philadelphia, 1971, 574 p.
8. Degermendzhy A.G., Adamovich V.V., and Adamovich V.A. A new experimental approach to the search for chemical density factors in the regulation of monoculture growth. *Journal of General Microbiology*, 1993, vol. 131, pp. 2027-2031.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА НА ОРГАНИЧЕСКИХ ПОЧВЕННЫХ ЭКСТРАКТАХ БЕРЕГОВ КРАСНОЯРСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Дегерменджи Н.Н.

Красноярский государственный медицинский университет
ул. Партизана Железняка, 1, г. Красноярск, 660022, РФ; e-mail: nn1947@yandex.ru
Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. Экологическое прогнозирование динамики микроорганизмов и качества воды в Красноярском водохранилище основано на знании зависимости удельной скорости роста (УСР) от лимитирующих субстратов. Объектом исследования является влияние почвенного экстракта материала береговых обрушений – перманганатной окисляемости – ХПК (химическое потребление кислорода) на рост автохтонного бактериопланктона Красноярского водохранилища. Определяется максимальная УСР и константа Михаэлиса-Ментена. Данные параметры использовались в экомодели Красноярского водохранилища для оценки эффективности самоочищения.

Ключевые слова: почвенный экстракт, бактериопланктон, кинетика роста, прогноз.

ВВЕДЕНИЕ

Красноярское водохранилище представляет собой глубокий слабопроточный водоем с преимущественно сезонно-контролируемым протоком. В разнообразном использовании водохранилища преобладает гидроэнергетика. Площадь водного зеркала составляет 2000 кв. км., объем – 73.3 куб. км., длина – около 390 км, средняя ширина – 5-6 км, наибольшая ширина – 15 км, средняя глубина – 27 м, максимальная глубина – 105 м. Среднегодовой расход у напорного трубопровода плотины – 80-90 куб. км/год. Одной из отличительных характеристик водохранилища является значительная переменность уровня водной поверхности – от 234 до 225 м, т.е. диапазон составляет 18 м. Возраст водохранилища – около 50 лет. Гидробиология водохранилища характеризуется интенсивным “цветением” сине-зеленых водорослей, достигающим до 1,4-3,3 г/куб. м сухого веса. (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Melosira granulata* (0,34 г/куб. м) и *Fragilaria crotonensis* (0,31 г/куб. м)).

Микроорганизмы играют основную роль в круговороте углерода, азота, фосфора и серы, а также в минерализации и самоочищении, как в естественных, так и в искусственных аквасистемах [1]. Полное описание микробиологического блока водных экосистем должно основываться не только на стехиометрии элементного цикла, но также на кинетических характеристиках процессов и их зависимости от условий среды во время эксперимента. Введение экспериментальных кинетических характеристик в математические прогнозные модели представляет собой новый прогрессивный путь и должно способствовать повышению адекватности теории при прогнозировании состояния экосистемы. Основные трудности возникают при выборе субстрата для экспериментов по кинетическим характеристикам. Общепринятое применение добавок органических веществ, таких как углеводороды, органические кислоты, пептон и т.д. – всего лишь модели природных компонентов субстратов. Анализ источников некоторых органических веществ в Красноярском водохранилище показал, что основным компонентом является процесс деструкции прибрежной зоны. Количество отложений при деструкции прибрежной полосы при прогнозе на десятилетний период составляет около 40% общего баланса, однако с завершением строительства Саянского моря (вверх по течению) оно поднимется до 73%. Разрушение лесных почв, чернозема способствует поступлению гумуса и других органических соединений в Красноярское водохранилище. Все это приводит к необходимости исследования УСР бактериопланктона (Б) на почвенных экстрактах материалов разрушения береговой полосы и его поглощение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Почвенный экстракт культуральной среды для культивирования Б приготавливался из почв различных горизонтов, разрушающихся в районе водной станции Сыдинского залива. Микробиологические взятия образцов с целью культивации было проведено на той же водной станции в стерильных условиях на глубине 20 см от поверхности с одновременной фильтрацией фито- и зоопланктона.

Почвенные экстракты приготавливались по методу Фишера [2]: 1кг почвы плюс 1 литр 0,1% водного раствора Na_2CO_3 , естественная экстракция в течение 24 часов со встряхиванием, центрифугированием и стерилизацией автоклавированием. Химическая потребность в кислороде (ХПК) чистого желтого почвенного экстракта составляла 140 мг ХПК/л. Изменение начальной концентрации органического вещества во время экспериментов по выращиванию Б осуществлялось перемешиванием различных пропорций экспериментального объема Б и объема экстракта: в контроле (с) – 200 мл экспериментального и 0 мл экстракта, 1 – 20 и 180; 2 – 60 и 140; 3 – 100 и 100; 4 – 140 и 60; 5 – 180 и 20. Колбы помещались в термостат при температуре 20°С. Общая численность Б определялась прямым счетом на ядерных фильтрах под люминесцентным микроскопом; в конце эксперимента измерялась остаточная концентрация ХПК в супернатанте в каждой колбе.

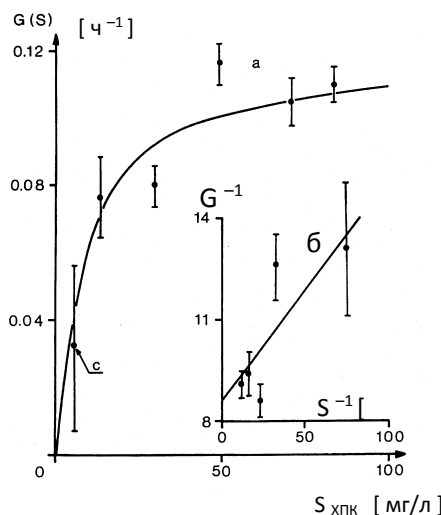


Рисунок 1. График зависимости УСР (G) бактериопланктона от ХПК концентрации почвенных экстрактов ($S_{\text{хпк}}$) из материалов обрушений берегов Красноярского водохранилища: а – прямые координаты; б – обратные координаты; с – опыт, не использовавшийся при расчетах μ_{max} и K_s

РЕЗУЛЬТАТЫ ПО КИНЕТИКЕ РОСТА

Из динамики величины X ($[X]=\text{кл/мл}$) Б во время экспериментов (с, 1-5) рассчитывалась УСР: $G(S_{\text{хпк}}) = \ln(X_2/X_1)/(t_2-t_1)$, где $S_{\text{хпк}}$ – средняя концентрация ХПК в течение экспериментального периода t_1, t_2 . По этим данным (рис. 1) была рассчитана максимальная УСР ($\mu_{\text{max}} = 0.117 \pm 0.019$ 1/час), константа Михаэлиса-Ментена ($K_s = 7.85 \pm 6.6$ мг ХПК/л), а также коэффициент поглощения органики почвенного экстракта Б: $y = 11.74 \pm 1.17$ г ХПК/г биомассы.

МОДЕЛЬНЫЙ ПРОГНОЗ: ДИНАМИКА БАКТЕРИЙ

Расчет динамики Б проводился по имитационной модели экосистемы. Модель имеет следующие основные блоки: гидрологический блок (осуществляющий гравитационное и ветровое течения), блок морфометрии водоема, гидрохимический блок, экологический блок. Чтобы адаптировать модель к новому водоему необходимо указать карту глубин, распределение поверхностных камер, соответствующие входные временные ряды и соответствующие гидрометеорологические условия (ветер, радиацию и т.п.). Экологический блок содержит следующие компоненты: диатомовые и сине-зеленые водоросли, Б, зоопланктон, простейшие, химические компоненты. Зависимость УСР от Б представлена на рисунке 1.

Расчет динамики Б совместно с представлением натуральных полевых данных (по заливу Сыда Красноярского водохранилища) проводился для вариантов экосистем различной степени сложности (обозначенных на рис. 2 цифрами 1-8):

1. только гидрологическая модель, биологические процессы «заморожены»;
2. Б ограничено ХПК, остальные компоненты отсутствуют;
3. присутствуют следующие компоненты: диатомовые и сине-зеленые водоросли, бактерии, простейшие, органическое вещество, фосфор, азот, при отсутствии зоопланктона и круговорота;

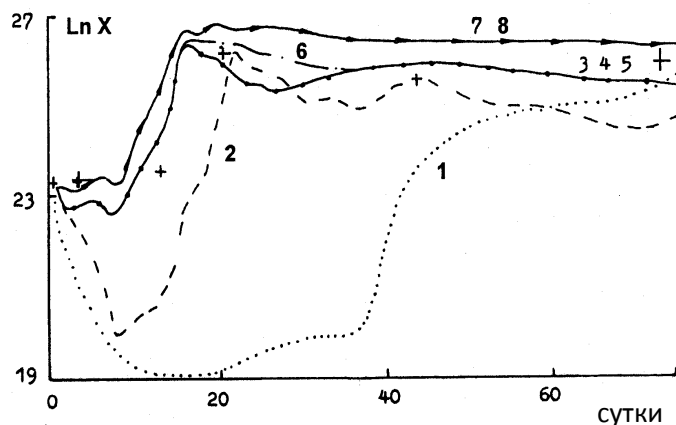


Рисунок 2. Расчетная динамика бактерий (+ – данные наблюдений)

4. то же, что и вариант 3, но с круговоротом;
5. то же что и вариант 3, за исключением повышения G_{diatom} и зоопланктона;
6. то же что и вариант 5, но с круговоротом;
7. то же что и вариант 6, за исключением еще большего повышения G_{diatom} ;
8. то же что и вариант 3, но с включением каннибализма зоопланктона, и круговоротом, G_{diatom} несколько ниже.

Динамика Б связана с изменениями введения ограничивающей рост органики в «камеру». При снижении притока органики Б отмирает и плотность Б снижается. Важным следствием этого является то, что приток аллохтонной органики как таковой не может адекватно объяснить наблюдаемую динамику Б и становится необходимым допустить образование дополнительного аллохтонного вещества в водной экосистеме. Это заставило перейти к более сложным моделям экосистем.

МОДЕЛЬНЫЙ ПРОГНОЗ: ДИНАМИКА САМООЧИЩЕНИЯ

Еще одним применением кинетических характеристик является прогноз самоочищения. В качестве нового параметра введем экономическую оценку ущерба, наносимого сбросами предприятий в совокупности с температурными перепадами на Енисее после строительства Красноярской гидроэлектростанции. Летняя температура на участке от Дивногорска до Красноярска упала с 18–20 °С до 10–12 °С [3], в то время как зимняя температура воды поднялась на один-два градуса выше точки замерзания. Такие изменения должны оказывать влияние на экосистему. Ниже описываемый подход не имеет целью дать портрет системы, а всего лишь продемонстрировать использование биофизических показателей в экологических и экономических моделях.

Для получения эколого-экономической оценки ущерба допустим, что существует только одно загрязняющее вещество (например, общая концентрация S органического вещества), поглощаемого Б. Самоочищение представляет собой снижение S вниз по течению. При допущении высокой турбулентности в вертикальных и боковых измерениях, что вполне вероятно для Енисея, очищение зависит только от расстояния вдоль реки, r , и от времени t . Уравнение динамики экосистемы, объединенное с уравнениями движения Сан-Венана (1) для нестационарного потока жидкости имеют вид:

$$\begin{cases} I_0 - \frac{\partial h}{\partial r} = \frac{v^2}{c^2 R} + \frac{1}{g} \frac{\partial v}{\partial t} + \frac{v}{g} \frac{\partial v}{\partial r}, & \frac{\partial w}{\partial t} + \frac{\partial Q}{\partial r} = q \\ \frac{\partial s}{\partial t} + v \frac{\partial s}{\partial r} = -G(s)X, & \frac{\partial X}{\partial t} + v \frac{\partial X}{\partial r} = -G(s) \frac{1}{y} X \end{cases} \quad (1)$$

$$I \equiv i_0 - \partial h / \partial r$$

с типичными граничными и начальными условиями [4,5]. Здесь t – время; r – координата, рассчитанная вдоль потока; Q – расход воды; i_0 – уклон дна; h – уровень воды; I – уклон водной поверхности в виде разности между уклоном дна и глубиной (h), изменяющейся по потоку; $v(r,t)$ – средняя скорость на участке r ; g – ускорение тяжести; R – гидравлический радиус; $c=c(R)$ – коэффициент Шези (Shezy factor); q – приток на единицу водного потока; $w(h,t)$ – «живое» сечение; $X(r,t)$ – биомасса Б; $G(s)$ – УСР Б как функция S ; $S(r,t)$ – концентрация загрязняющего вещества, т.е. растворенного органического вещества (РОВ); $1/y$ – коэффициент урожайности.

Для простоты рассмотрим стационарную задачу для системы (1). Решение такой системы относительно $s(r)$ (при линейной УСР: $G(s) = \mu_{\text{max}}/K_s \cdot S \equiv k \cdot S$) имеет вид:

$$s(r) = (X_0/y + s_0) s_0 / (X_0/y \cdot \exp[k(X_0/y + s_0)r/v] + s_0), \quad (2)$$

где $s_0 = s(0)$, $X_0 = X(0)$, т.е. для $r=0$.

В случае, когда УСР Б описывается уравнением Моно ($G(s) = \mu_{\text{max}} s / (K_s + s)$) аналитическое выражение для $s(r)$ преобразуется к трансцендентному виду:

$$s_0((X_0/y + s_0) - s(r))^a / s(r) = (X_0/y)^a \exp[k(X_0/y + s_0)r/v], \quad (3)$$

где $a \equiv 1 + (X_0/y + s_0)/K_s$.

Проанализируем следующую ситуацию: каким образом s_0 – начальная концентрация загрязняющего вещества в месте “предыдущего” выброса влияет на фоновую концентрацию этого вещества на участке до “следующего” выброса? Можно показать (см. формулу (3)), что при очень высоких и очень малых концентрациях s_0 величины $s(r)$ будут небольшими. Следовательно, существует такая критическая величина $s_0 = s_0^{\text{crit}}$, после которой концентрация $s(r)$ снижается, т.е. может возникнуть “парадоксальная ситуация” когда при повышении загрязненности где-то вверху по течению концентрация загрязнения на некотором расстоянии вниз по течению снижается. При большой начальной биомассе X_0 имеем аналитическую оценку: $s_0^{\text{crit}} > v/(rk)$. Учет насыщения в зависимости УСР (3) может вызвать появление еще одной критической концентрации s_0 , после которой фоновая концентрация вновь начнет подниматься (рис. 3).

Допустим, что на расстоянии r' был произведен сброс того же загрязняющего вещества с очистных сооружений со скоростью Q_d и концентрацией $S_i(r')$. Обозначив концентрацию РОВ на расстоянии $r' - \varepsilon_1$ ($\varepsilon_1 \approx 0$) вверх по течению от места сброса как $S_{up}(r')$ и вниз по течению ($r' + \varepsilon_1$), как $S_{dw}(r')$, получаем (при условии полного перемешивания)

$$S_{dw}(r') = Q/(Q_d+Q) S_{up}(r') + Q_d/(Q_d+Q) S_i(r') \text{ или} \\ (1+\beta) S_{dw}(r') = S_{up}(r') + \beta S_i(r'), \quad (4)$$

где $\beta \equiv Q_d/Q$ – коэффициент перемешивания. При неполном перемешивании Q можно заменить на соответствующий поток.

Величина S_i , может быть связана с концентрацией загрязняющего вещества на входе очистного сооружения (Р) отношением $\alpha P/(\alpha+m) = S_i$. Стоимость (m) резко повышается с повышением степени очистки. Наивысшая возможная концентрация $S_{dw}(r')$ не должна превышать максимально допустимую концентрацию – ПДК. Следовательно, S_i также имеет верхний предел $S_i \leq (1+\beta) \text{ПДК} / \beta + S_{up}/\beta$. Это условие, ограничение $S_i(P)$ и выражение (4), приводят к искомой формуле стоимости очистки (m) с допущением на предысторию самоочищения в реке

$$m = \{ \alpha [\beta(P-\text{ПДК}) + (S_{up}(r') - \text{ПДК})] \} / \{ \beta \text{ПДК} - (S_{up}(r') - \text{ПДК}) \}. \quad (5)$$

В зависимости от требуемой точности оценки (m) концентрацию S_{up} в (5) можно рассматривать в виде (2) или (3). Оценка m сама по себе не определяет ущерба; скорее стоимость сохранения природы (очистки), но изменения этой величины могут обеспечить знание ущерба или прибыли при изменении условий. При объединении с (2) выражение (5) обеспечивает стоимость очистки как функцию параметров экосистемы, таких как максимальная УСР, урожайность и т.д. Если эти важнейшие характеристики соотношены с влиянием факторов окружающей среды, B_i , таких как температура, токсиканты и т.д. составляющие ущерба можно определить для любого фактора.

а) Общий ущерб – составляющие ущерба. Найдено, что стоимость очистки (m) является функцией внешних факторов (B_i), или $m=m(B_i, \dots, B_n)$. Соответственно, общий ущерб (или прибыль) Δm при небольших отклонениях B_i от начальных величин B_i оценивается выражением:

$$\Delta m = \sum_{i=1}^n (\partial m / \partial B_i) * \Delta B_i.$$

Величина $\partial m / \partial B_i$ определяет ущерб или экономию приписываемые “единичному” изменению влияния B_i , а $\Delta m_i = (\partial m / \partial B_i) * \Delta B_i$ представляет собой составляющую ущерба в случае изменения коэффициента на ΔB_i .

Проведем оценку ущерба, вызванную изменением, скажем, температуры, Т. Применим $S_{up}(r)$ в виде уравнения (2) или при строгих ограничениях. Легко доказать, что

$$m = (Q_1 \exp(dr) + l_1) / (Q_2 \exp(dr) + l_2),$$

где явный вид параметров не приводится для экономии места $d=kX_0 v^{-1}/y$. Пусть $d=d(T)$. В диапазоне исследованных температур было экспериментально обнаружено, что $(\partial k / \partial T) > 0$. Другими словами, приводится увеличивающаяся часть УСР как функция температуры. Тогда,

$$\Delta m_T \equiv (\partial m / \partial T) \Delta T = \lambda (\partial k / \partial T) \Delta T \quad (\lambda < 0) \quad (6)$$

Последнее выражение показывает, что с падением температуры Δm_T положительно. Следовательно, снижение температуры приводит к ущербу, который можно оценить в строгих количественных терминах по формуле (6).

б) Какова стоимость очистки? На этот необычный, но важный вопрос можно ответить очень четко. В гипотетическом случае отсутствия самоочистки ($k = 0$) стоимость очистки составляет

$$m_0 = \alpha (\beta P - S_{up}^{crit} + s_0) / (S_{up}^{crit} - s_0), \text{ где } S_{up}^{crit} \equiv (1+\beta) \text{ПДК}.$$

С допущением природного механизма очистки ($k \neq 0$) она составляет

$$m_k = \alpha [\beta P - S_{up}^{crit} + S_{up}(r)] / [S_{up}^{crit} - S_{up}(r)].$$

При равенстве всех прочих условий стоимость дается разностью ($m_0 - m_k$). В действительности, это - оценка финансовой “помощи” очистному сооружению, обеспечиваемой водной экосистемой. Тогда, $E = (m_0 - m_k) / m_0$ представляет собой экономию, приписываемую данной “помощи”. Преимущество данной оценки заключается в независимости от параметра α – стоимости самоочистки – которая является неизвестной.

Для конкретизации оценки ущерба воспользуемся экспериментальными результатами, полученными на Красноярском водохранилище. В экспериментах с природной смешанной культурой Б исследовалась реакция УСР на различные концентрации почвенных экстрактов из материалов почвы при размывании берегов (рис. 1), что позволило лучше понять влияние природных веществ на рост бактериальных культур и на самоочищение.

Концентрация органического вещества, ограничивающего рост, определялась по химическому потреблению кислорода (ХПК). В этих экспериментах получена УСР агрегированного бактериопланктона как функция уровня ХПК $G(S)$ (рис. 1).

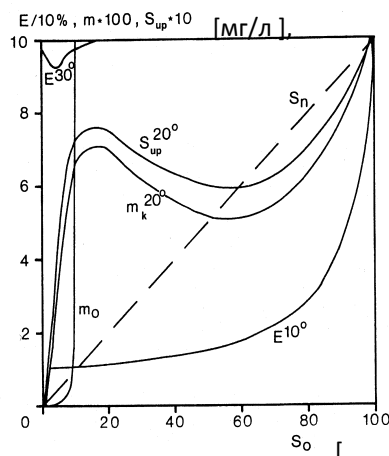


Рисунок 3. Самоочищение (E), стоимость очистки (m) и концентрация загрязняющего вещества РОВ (S_{up}) как функция концентрации «выше» по течению (S_0); цифры сверху – температуры воды; S_n – концентрация без самоочистки ($k=0$)

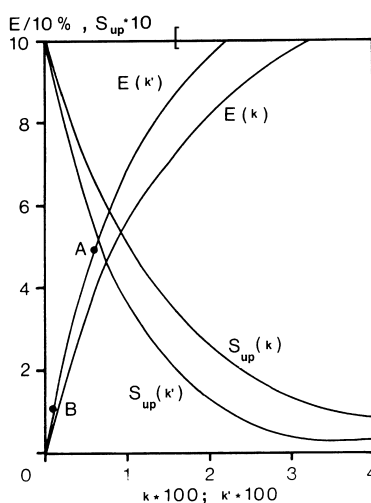


Рисунок 4. E и S_{up} ($r=40$) как функция константы Михаэлиса (E(k) и $S_{up}(k)$; $k = \mu_{max}/k_s$; $\mu_{max} = 0,36$) выраженные в k. E(k') и $S_{up}(k')$ являются зависимостями от максимальной УСР, которая меняется с температурой: А – при $T = 20^\circ\text{C}$; В – при $T = 10^\circ\text{C}$

Нами принято, что та же зависимость сохраняется вниз по течению ниже Красноярского водохранилища ($S_{хпк}$) и выражена как $S_{sgr} = S_{хпк} * 1,7$ [6]:

$$G(S) = k'(T)S/(13,75+S); k'(T) = 0,34 \exp\{-(T-32)/11,3\}^2.$$

Расчетные величины E, S_{up} и m для некоторых модельных параметров ($P = 1,000$; $\beta = 0,01$; $\alpha = 1$; $x_0 = 0,33$; ПДК= 10), экспериментальных данных ($G(S)$ и $y = 0,0501$.) и натурных значений ($r = 40$ км; $v = 4$ км/час) показаны на рисунке 3. $S_{up}(r)$ использовалась в виде уравнения (3). На рисунке 4 показаны экономическая выгода самоочистки. E и фоновый уровень РОВ, $S_{up}(ХПК)$ вниз по течению как функция константы Михаэлиса и максимальной УСР (при окончательном анализе – функция T). В модельном примере снижение средней летней температуры на 10°C привело к 40%-ному снижению экономии (точки А и В на рис. 4).

При данной оценке экономических последствий экологических изменений экосистема рассматривается в свете экономической целесообразности. Объединение с другими экспертными критериями может привести к комплексному принятию решений по водопользованию. Преимуществом предлагаемого подхода является четкость всех легко определяемых параметров. Данный подход может быть итеративно использован для полного описания экономической эффективности экосистемы для всей реки.

ВЫВОДЫ

Установлено, что зависимость УСР общего количества Б (неидентифицированная смешанная культура) от уровня ХПК экстракта описывается уравнением Махаэлиса-Ментена как и для чистых культур. Математические расчеты динамики общей численности Б позволяют сделать следующие выводы: 1) новый метод модельного насыщения кинетическими экспериментальными данными дает возможность рассчитать динамику Б существенно более адекватную; 2) более детальное описание экосистемы повышает адекватность прогноза; 3) анализ гидрологических расчетов показывает, что в среднем за сезон и за исключением периодов цветения результаты моделирования качественно, а для некоторых камер и составляющих и количественно приближаются

к наблюдаемым; 4) предложен нетрадиционный метод оценки экономичности самоочистки речной экосистемы. Это, в частности, справедливо для камер, на которые оказывает большое влияние реки, втекающие в них и создающие условия непрерывного протока. В настоящей статье мы рассмотрели нетрадиционный подход к моделированию качества воды и динамики Б, основанный на цепочке теоретических и экспериментальных исследовательских этапов: синтез экосистемной модели, включающий кинетические характеристики --> проверка модели на основе существующих данных --> расчеты прогнозных и общих смет экологических последствий проекта. Данный экспериментальный метод получения кинетической информации совместно с моделированием может найти применение в различных сферах водопользования на водохранилищах.

Благодарности: Работа «Разработка сценариев управления рекреационным потенциалом Абаканской протоки р. Енисей в г. Красноярске на основе мониторинга ее экологического состояния и математического моделирования» проведена при поддержке Красноярского краевого фонда науки.

Список литературы / References:

1. Карп Н.Г., Уиттон Б.А. *Биология цианобактерий*. Унив. Беркли Пресс, Беркли, 1982, 688 с. [Carr N.G., Whitton B.A. *Biology of cyanobacteria*. Univ. Berkeley Press, Berkeley, 1982, 688 p. (In Russ.)]
2. Теппер Е.З., Шилинкова Б.К., Переверзева Г.Л. *Микробиологический практикум*. Агропромиздат, Москва, 1987, 239 с. [Tepper E.Z., Shilinkova B.K., Pereverzeva G.L. *Microbiological workshop*. Agropromizdat, Moscow, 1987, 239 p. (In Russ.)]
3. Гительзон И.И., Абросов Н.С., Гладышев М.И., Дегерменджи А.Г., Сидько Ф.Я., Шевырнов А.П., Голд В.М., Голд С.З. *Енисей: проблемы крупнейшей реки Сибири*, с. 471-485. В: Дегенс, Е. Т. и Р. Херрера (ред.), Круговорот углерода и минеральных веществ в крупнейших реках мира. Сондербд. N58, SCOPE/UNEP, Гамбург, 1985.
4. Антонцев С.А., Меирманов А.М. *Математические модели совместного движения поверхностных и грунтовых вод*, Изд-во НГУ, Новосибирск, 1979. [Antontsev S.A., Meirmanov A.M. *Mathematical models of joint motion of surface and ground waters*, Novosibirsk, 1979. (In Russ.)]
5. Дегерменджи А.Г., Печуркин Н.С., Шкиденко А.Н. *Автостабилизация факторов роста в биологических системах*, Изд-во Наука, Новосибирск, 1979, 141 с. [Degermendzhi A.G., Pechurkin N.S., Shkidenko A.N. *Autostabilization of growth factors in biological systems*, Nauka, Novosibirsk, 1979, 141 p. (In Russ.)]
6. Алёкин О.А. *Основы гидрохимии*. Л.: Гидрометеиздат, С.-Петербург, 1970, 444 с. [Alekin O.A. *Fundamentals of Hydrochemistry*. L.: Gidrometeizdat, 1970, 443 p. (In Russ.)]

MATHEMATICAL SIMULATION OF BACTERIOPLANKTON DYNAMICS ON ORGANIC SOIL EXTRACTS OF KRASNOYARSK RESERVOIR

Degermendzhi N.N.

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky
Partizana Zheleznyaka str., 1, Krasnoyarsk. 660022, Russia; e-mail: nn1947@yandex.ru

Abstract. Ecological forecasting of microorganisms dynamics and water quality in the Krasnoyarsk reservoir is based on knowledge of the dependence of specific growth rate (SGR) on limiting substrates. The object of the study is the influence of the soil extract of the material of coastal collapses – permanganate oxidability – COC (chemical oxygen consumption) on the growth of autochthonous bacterioplankton of the Krasnoyarsk reservoir. The maximum SGR and Michaelis-Menten constant are determined. These parameters were used in the eco-model of the Krasnoyarsk reservoir to assess the efficiency of self-cleaning.

Key words: soil extract, bacterioplankton, growth kinetics, prognosis.

ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫЙ ПЕРОКСИД ВОДОРОДА: ПОЛУЧЕНИЕ, РОСТРЕГУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА

Апашева Л.М.¹, Будник М.И.¹, Лобанов А.В.¹, Овчаренко Е.Н.¹, Розанцев М.В.², Турбин В.В.², Сергеев А.И.¹, Стребков Д.С.³

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 1, г. Москва, РФ; e-mail: apasheva@rambler.ru

² НПО «Экопероксид водорода»

21 км Варшавского ш, 1. Ленинский район, поселение Булатниковское, Московская обл., РФ;
e-mail: info@ecoperoksid.ru

³ Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ
1-й Институтский проезд, 5, г. Москва, РФ; e-mail: nauka-ds@mail.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. Пероксид водорода уникальное низкомолекулярное соединение во многом определяет физиологические и биохимические процессы живой природы. В природе пероксид существует и его можно определить в чистых природных водах. Появляется все больше сообщений об использовании пероксида в практике сельского хозяйства и медицины. Разработана природоподобная технология и создана установка для получения экологически чистого водного раствора пероксида водорода (экопероксид) без стабилизаторов. Способ аналогичен действию разряда молнии. Исследована его рострегулирующая активность на трех видах растений в стрессовых условиях культивирования: 1. Минимальное увлажнение воздушной среды 2. Минимальное увлажнение грунта в замкнутом объеме. Показано, что раствор экопероксида стимулирует рост и развитие растений при определенной концентрации пероксида водорода в растворе, а именно $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, растворы экопероксида с большей концентрацией пероксида водорода блокируют рост и развитие растений. Показано методом ПМР изменение структуры внутриклеточной воды при действии пероксида водорода. Экопероксид способствует более связанному состоянию протонов воды в клетках растений, увеличению количества воды, связанной с клеточными структурами. Экопероксид способствует выживанию растений в стрессовых условиях, повышает физиологический статус растения, что определяется в значительной мере увеличением количества связанной внутриклеточной воды.

Ключевые слова: пероксид водорода, природоподобные технологии, экопероксид, биологическая активность, стресс.

Пероксид водорода уникальное низкомолекулярное соединение во многом определяет физиологические и биохимические процессы живой природы.

Его значимость в биоорганических процессах дает основание отнести пероксид к веществам, играющим важную роль в поддержании жизни на Земле. В природе пероксид существует и его можно определить в чистых природных водах, в составе дождевой воды и снега. В Московской области описано наличие пероксида с концентрацией его в дождевой воде до 1 мг/л [1].

Начиная с 19 века появляются сообщения о результатах изучения пероксида и его атомарного кислорода, о включении пероксида в медицинскую практику [2].

Известно, что процесс фотосинтеза играет основополагающую роль в жизнедеятельности растений, а эффективность фотосинтеза в значительной мере зависит от пероксида водорода [3].

Ранее нами была показана значимость пероксида в качестве антистрессового регулятора роста при выращивании растений в стрессовых ситуациях дефицита влаги, пониженных температур, засоленности грунтов (RU 2264070, RU 2423813, RU 2445759).

Все большее внимание к изучению свойств пероксида водорода, к изучению механизма его действия способствует и поиск новых методов получения пероксида. Существует несколько способов его получения путем контактного и бесконтактного воздействия на воду. Промышленный пероксид высококонцентрированный водный раствор, который стабилизируют различными добавкам, часто токсичными, для замедления его разложения. Наличие стабилизаторов затрудняет использование коммерческого пероксида в практике с/х.

Мы получали пероксид водорода бесконтактным высокоэнергетическим способом воздействия на воду стримерами высоковольтного электрического разряда, аналогом молниевых разрядов, с помощью созданной установки [4]. А именно, в реакторе над поверхностью воды устанавливали электрод из электропроводящего материала, соединяли электрод с высоковольтным выводом трансформатора, подавали на электрод электрическую энергию от трансформатора, создавали стримеры электрического разряда между электродом, воздушной средой и поверхностью воды с образованием в воде пероксида водорода.

Количество пероксида, получаемого в растворе определяли методом иодометрии [5]. Описанным способом возможно получение раствора с концентрацией в растворе пероксида до $1 \cdot 10^{-3}$ М. Получаемый без добавок наночастиц водный раствор экологически чистого пероксида (далее ЭПВ) с концентрацией пероксида $1 \cdot 10^{-3}$ М можно считать экологически чистым раствором.

Цель работы определить влияние ЭПВ на развитие растений, оценить его рострегулирующую активность. В работе использовали ЭПВ с концентрацией в нем пероксида $3,5 \cdot 10^{-4}$ М, $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, $3,5 \cdot 10^{-6}$ М. Исследование вели двумя способами подраживания растений в экстремальных условиях.

1. Условия минимального увлажнения воздушной среды методом дозированного опрыскивания.
2. Условия минимального однократного увлажнения грунта при изоляции растения от внешней среды.

Тест-объектами были следующие растения;

Кукуруза сорт Песня

Огурец сорт Конкурент

Редис сорт Жара

Вариант № 1

Использование ЭПВ для увлажнения воздушной среды.

Установка для орошения воздушной среды состоит из двух блоков: контрольный блок, где орошение осуществляется дистиллированной водой, опытный блок, где орошение осуществляется растворами ЭПВ с разными концентрациями пероксида, а именно $3,5 \cdot 10^{-4}$ М, $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, $3,5 \cdot 10^{-6}$ М. Режим работы установки: орошение воздушной среды в течение 25 сек, которое автоматически включается каждые 20 мин, работа в течение 6 часов в сутки на свету, затем автоматически осуществляется отключение освещения и увлажнения на 18 часов.

Семена раскладывали на сетчатый поддон, что обеспечивало свободный сток увлажнителя для его повторного использования. Описанные условия культивирования имитируют возможные условия работы в теплице, что позволяет прогнозировать использование растворов ЭПВ в практике растениеводства.

Анализ полученных результатов показал, что стимуляция прорастания и роста проростков отмечены при использовании ЭПВ с концентрацией пероксида $3,5 \cdot 10^{-5}$ М. Эта концентрация пероксида близка к значениям его в природных водах. Наиболее выраженный эффект стимуляции развития опытных растений отмечен при обработке семян огурца, когда получено превышение контрольных значений на 220%. Для семян редиса – 160% превышение контрольных значений, незначительный эффект стимуляции отмечен при работе с семенами кукурузы – всего 110%. Использование растворов ЭПВ с концентрацией пероксида $3,5 \cdot 10^{-4}$ М замедляло прорастание семян и блокировало рост проростков. При орошении раствором ЭПВ с концентрацией пероксида, $3,5 \cdot 10^{-6}$ М не зафиксировано отличия от контроля ни в одном из вариантов.

На рисунке 1 представлены проросшие семена огурца: слева – контроль, справа – опыт. На рисунке 2 представлены проросшие семена редиса: слева – контроль, справа – опыт.

Полученные данные с использованием ЭПВ с различными концентрациями пероксида водорода в его растворах для орошения воздушной среды при культивировании трех видов растений в малых объемах и в ограниченный временной период свидетельствуют, что ЭПВ можно отнести к регуляторам роста растений при использовании его растворов в определенной концентрации для получения либо блокирования, либо стимулирования развития растений с учетом определенного вида растения. Это соответствует определению «регулятор роста растений», когда действие препарата эффективно при учете видовой и сортовой специфичности в определенной концентрации действующего начала.



Рисунок 1. Семена огурца сорт Конкурент через 3 суток после орошаемого проращивания с концентрацией пероксида водорода $3,5 \cdot 10^{-5}$ М



Рисунок 2. Семена редиса сорт Жара через 3 суток после орошаемого проращивания с концентрацией пероксида водорода $3,5 \cdot 10^{-5}$ М

Вариант № 2

Семена огурца сорт Конкурент изначально проращивали в дистиллированной воде. Живые наклюнувшиеся семена помещали в пластиковые прозрачные сосуды из ПЭТ-пластика на грунт - промытый песок. Песок однократно изначально увлажняли в контроле дистиллированной водой, в опыте растворами ЭПВ одинаковым объемом увлажнителя. Сосуды герметично закрывали и выставляли в люминостат с ритмом освещения свет: темнота = 12:12 час. Длительность эксперимента 35 суток.

Наблюдение за развитием растений вели дистанционно. Для учета и анализа эффекта действия ЭПВ пробы отбирали из аналогичных дублирующих сосудов. При однократном увлажнении песка растворами ЭПВ с концентрацией в нем пероксида $3,5 \cdot 10^{-4}$ М отмечено угнетение, а затем и блокирование роста проростков и их гибель к 6-м суткам опыта. При использовании раствора ЭПВ с концентрацией пероксида $3,5 \cdot 10^{-6}$ М отличие от контроля по тесту развития проростков не отмечено. В варианте, где проростки росли на песке, однократно увлажненным раствором ЭПВ с концентрацией пероксида $3,5 \cdot 10^{-5}$ М, отмечено опережение роста и развития проростков в опыте по сравнению с контрольными значениями. Наблюдали опережение по времени появления семядольного листа, увеличение высоты надземной части проростков, начальные сроки роста в замкнутом объеме до 10 суток. Далее наблюдали постепенную потерю тургора, угнетение роста, а к 35-м суткам опыта в контроле не было живых растений, в опыте выжило 25% растений.

Объяснением повышенной устойчивости, антистрессового действия ЭПВ на растения могут быть наблюдаемые в опытных вариантах структурные изменения внутриклеточной воды в проростках огурца. Проведены эксперименты с использованием метода протонной спин-спиновой релаксации ПМР [6,7]. Процессы спин-спиновой релаксации описываются временем релаксации T_2 . Для фракции свободной воды время релаксации – 2 сек, для воды, связанной с клеточными структурами – десятки мсек.

Для опытов отбирали проростки огурца, подрощенные в контроле на воде, в опыте на растворе ЭПВ. В опытных образцах определено увеличение вклада в кривую поперечной намагниченности быстрой компоненты T_2 . Это соответствует более связанному состоянию протонов воды, вклад связанной воды в опыте достигает 20–40%, в контроле – это 11–14% от общего количества протонов воды в клетках. Получено, что растворы ЭПВ с определенной концентрацией пероксида, а именно $3,5 \cdot 10^{-5}$ М при контакте с растением влияют на изменения структуры внутриклеточной воды, увеличивают количество воды, связанной с клеточными структурами.

Таким образом, экопероксид, получаемый по предложенной нами природоподобной технологии, можно отнести к классу веществ – регуляторов роста растений. Использование экопероксида для культивирования растений в созданных стрессовых условиях минимального увлажнения либо воздушной среды, либо грунта, повышает устойчивость растений к стрессу. Оптимальным раствором экопероксида в качестве антистрессового препарата в изученных условиях является его раствор с концентрацией пероксида водорода, близкой к концентрации его в водах грозового дождя, а именно $3,5 \cdot 10^{-5}$ М.

Получаемый ЭПВ способствует выживанию растений в стрессовых условиях, повышая физиологический статус растения, что определяется в значительной мере увеличением количества связанной внутриклеточной воды.

Список литературы / References:

1. Позин М.Е. *Перекись водорода и перекисные соединения*. Л. М.: ГХИ, 1951. [Pozin M.E. *Hydrogen peroxide and peroxide compounds*. L. M.: GKH, 1951. (In Russ.)]
2. Дуглас У. *Целительные свойства пероксида водорода*. СПб-Питер, 2004, 180 с. [Douglas W. *Healing properties of hydrogen peroxide*. SPB-Peter, 2004, 180 p. (In Russ.)]
3. Комиссаров Г.Г. *Фотосинтез: физикохимический подход*. М.: Едиториал УРСС, 2003, 223 с. [Komissarov G.G. *Photosynthesis: a physicochemical approach*. M.: Editorial URSS, 2003, 223 p. (In Russ.)]
4. Стребков Д.С., Будник М.И., Апашева Л.М., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н., Вигдорчиков О.В., Турбин В.В. *Способ и устройство получения экологически чистого раствора пероксида водорода из воды* Международная заявка на изобретение № PCT/RU2020/000364 [Strebkov D.S., Budnik M.I., Apasheva L.M., Lobanov A.V., Ovcharenko E.N., Vigdorichikov O.V., Turbin V.V. *Method and device for producing an environmentally friendly solution of hydrogen peroxide from water*. International application for invention No. PCT / RU2020 / 000364 (In Russ.)]
5. Лобанов А.В., Рубцова Н.А., Веденеева Н.И., Комиссаров Г.Г. Фотокаталитическая активность хлорофилла в образовании пероксида водорода в воде. *Докл РАН*, 2008, том 421, № 6, с. 773-776. [Lobanov A.V., Rubtsova N.A., Vedeneeva N.I., Komissarov G.G. Photocatalytic activity of chlorophyll in the formation of hydrogen peroxide in water. *Dokl. RAS*, 2008, vol. 421, no. 6, pp. 773-776. (In Russ.)]
6. Апашева Л.М., Комиссаров Г.Г. *Способ защиты растений от засухи*. Патент РФ 423813, 2011. [Apasheva L.M., Komissarov G.G. *Method of protecting plants from drought*. RF Patent 423813, 2011. (In Russ.)]
7. Апашева Л.М., Лобанов А.В., Комиссаров Г.Г. *Изменение структуры внутриклеточной воды*. V съезд биофизиков России, 2015, т. 2. [Apasheva L.M., Lobanov A.V., Komissarov G.G. *Changes in the structure of intracellular water of the*. V Congress biophysicists of Russia, 2015, vol. 2. (In Russ.)]

ENVIRONMENTALLY FRIENDLY HYDROGEN PEROXIDE: PRODUCTION, GROWTH-REGULATING PROPERTIES**Apasheva L.M.¹, Budnik M.I.¹, Lobanov A.V.¹, Ovcharenko E.N.¹, Rozancev M.V.², Turbin V.V.², Sergeev A.I.¹, Strebkov D.S.³**

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences
4 Kosygina Street, Build. 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: apasheva@rambler.ru

² Scientific and production Association "Eco hydrogen peroxide"
21 km of Varshavskoye highway, 1, Bulatnikovskoye rural settlement, Moscow region, 142718, Russia;
e-mail: info@ecoperoksid.ru

³ Federal Scientific Agroengineering Center VIM
1st Institutsky proezd, 5, Moscow, 109428, Russia; e-mail: nauka-ds@mail.ru

Abstract. Hydrogen peroxide, a unique low molecular weight compound, largely determines the physiological and biochemical processes of living nature. Peroxide exists in nature and can be determined in pure natural waters. There are more and more reports on the use of peroxide in the practice of agriculture and medicine. A nature-like technology has been developed and an installation has been created for producing an environmentally friendly aqueous solution of hydrogen peroxide (eco-peroxide) without stabilizers. The method is similar to the action of a lightning discharge. Its growth-regulating activity was studied on three plant species under stressful cultivation conditions: 1. Minimum humidification of the air 2. Minimum soil moisture in a confined space. It has been shown that a solution of ecoperoxide stimulates the growth and development of plants at a certain concentration of hydrogen peroxide in the solution, namely $3.5 \cdot 10^{-5}$ M, solutions of ecoperoxide with a higher concentration of hydrogen peroxide block the growth and development of plants. The PMR method demonstrated changes in the structure of intracellular water under the action of hydrogen peroxide. Ecoperoxide promotes a more bound state of water protons in plant cells, an increase in the amount of water associated with cellular structures. Ecoperoxide promotes the survival of plants under stress conditions, increases the physiological status of the plant, which is largely determined by an increase in the amount of bound intracellular water.

Key words: *hydrogen peroxide, nature-like technologies, eco-peroxide, biological activity, stress.*