

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 6, № 3
2021**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 6, № 3
2021**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 6, No. 3, 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, № 3, 2021

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

Г.С. Охрименко, Е.Д. Каримова

Решение обратной задачи ЭЭГ и интегральная оценка мощности в задаче анализа ритмов покоя 371

М.А. Суслов

Техника исследования скорости роста растительных клеток под воздействием внешнего повышенного давления 377

Л.М. Апашева, А.С. Дмитриев, А.В. Лобанов, И.А. Михайлова, Н.А. Рубцова, В.В. Савранский

Суспензия графена в качестве регулятора роста растений 381

Н.С. Горячев, П.О. Иванов

Физические причины чередования хиральности в иерархической организации биологических структур 385

Ю.С. Петронюк, Е.А. Храмцова, Н.Н. Трофимова, О.М. Андрюхина,**А.А. Рябцева, Т.С. Гурьева, О.А. Дадашева, В.М. Левин, П.П. Зак**Анализ динамики развития структур глаза японского перепела (*Coturnix Coturnix Japonica Dom.*) ультразвуковыми высокочастотными методами 389**В.А. Панчелюга, М.С. Панчелюга**

О возможной внешней обусловленности спектра околочасовых периодов 393

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

В.А. Капцов, В.Н. Дейнего, Д.В. КозырицкийСелективная поведенческая реакция *Trichoplax* (Placozoa) на RGB – световые стимулы 400**П.А. Жулидин, П.Д. Филин, И.Л. Пластун**

Молекулярное моделирование процесса синтеза наночастиц сульфида цинка в присутствии молекул флагеллина 409

А.О. Луценко, Д.К. Шпигун, А.Э. Сидорова

Методика оценки хиральности суперспиральных структур белков 413

Д.К. Шпигун, А.О. Луценко, А.Э. Сидорова

Методика оценки хиральности спиральных структур белков 418

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

Влияние сильно связанных молекул воды на фотовозбуждение красителя тионина в растворе: квантовохимический анализ 424

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**М.Д. Садовничук, А.С. Скоробогатова**

Оценка элементного статуса периферической крови женщин в зависимости от возраста .. 434

Д.И. Телегина, С.В. Васильева

Сероводород выступает медиатором NO-сигнальной активности, тем самым стимулируя дисперсию биопленок..... 439

И.В. Ивлиева (Перетокина), А.А. Мещерякова, Л.М. Бабков, В.В. Сорокин

ИК спектры и структура хромопиридинкарбонитрильных систем.....447

А.Б. Бурлаков, С.А. Титов, Л.А. Зыкова

Высокочастотная сонография сердечно сосудистой системы в раннем развитии низших позвоночных.....454

Е.А. Храмцова, О.Р. Куликова, Д.И. Ушмаров, К.Г. Антипова,**К.И. Луканина, С.Е. Гуменюк, В.М. Левин, Т.Е. Григорьев**Оценка скорости деградации каркасных губок на основе хитозана *in situ* по данным акустической микроскопии 460**А.А. Евтина, М.А. Булдаков, В.О. Нехорошев, Н.В. Ландль,****Н.В. Чердынцева, Ю.Д. Королев**

Влияние низкотемпературных плазменных струй на пролиферацию опухолевых клеток 464

Д.С. Финашкин, Л.М. Бабков

Структура и колебательные спектры изомеров дигидроксibenзойной кислоты. Теория, эксперимент.....472

Д.И. Грачёв, К.Б. Шумаев, В.А. Медведева, А.С. Фефлер, О.В. Космачевская,**Э.К. Рууге**

Взаимодействие различных нитрозильных комплексов гемоглобина с активными формами кислорода и азота 477

Т.П. Кулагина, А.Б. Гапеев, А.В. Ариповский, Е.С. Жукова, Т.Г. Щербатюк

Жирнокислотный состав и активность антиоксидантных ферментов в тканях крыс при опухолевом росте в условиях воздействия озона 482

Е.Д. Каримова, Н.С. Катермин, С.Е. Буркитбаев

Анализ сенсомоторного мю-ритма пациентов с эпилепсией методом независимых компонент 487

К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов, Э.И. Насыбуллина,**А.К. Мартусевич, Э.К. Рууге**

Влияние различных доноров оксида азота на неферментативное гликирование биомолекул 494

М.П. Самцов, Д.С. Тарасов, Е.В. Малюшкова, И.И. Хлудеев, А.П. Луговский,**И.В. Семак**

Анализ свойств комплексов полиметиновых красителей с белками сыворотки крови методом гель-электрофореза 499

И.А. Лавриненко, Д.А. Семёнов, Д.А. Лагуткин, А.Ю. Зайцева,**Е.А. Генералов, О.В. Матвеева, Е.Е. Егоров, Ю.Д. Нечипуренко**

Ацидоз и эффект Вериги-Бора при развитии COVID-19 505

**А.Г. Погорелов, Л.Г. Ипатова, А.И. Панайт, М.А. Погорелова, А.А. Гулин,
В.Н. Погорелова**

Спектрометрия растительных полисахаридов в растворе электрохимически активированной воды 511

**F.M. Gonzalez, A. Moreno, T.A.M. Cervantes, J. Italo, M.A. Hernandez-Apam,
R. Lima**

Significance test to a data matrix of nanoreservoirs of tannins extracted from tenuiflora mimosa (tepezcohuite) encapsulated in tio2 anoreservoirs..... 516

Ю.Д. Нечипуренко, Х.Л. Касерес

Гипотеза контаминации мембран при эпилепсии..... 520

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

А.Т. Кулиева

Влияние электромагнитного поля дециметрового диапазона на концентрацию общего белка и гемоглобина в крови у крыс облученных в пренатальном периоде 525

М.Т. Аббасова

Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения дециметрового диапазона на активность церулоплазмينا и на перекисное окисление липидов в сыворотке крови у крыс.....529

CONTENTS

Volume 6, No. 3, 2021

GENERAL BIOPHYSICS

G.S. Okhrimenko, E.D. Karimova

Solving the inverse EEG problem and integral power estimation in the resting rhythm analysis problem 371

M.A. Suslov

The technique of the plant cells growth rate study under impact of elevated external pressure..... 377

L.M. Apasheva, A.C. Dmitriev, A.V. Lobanov, I.A. Mikhailova, N.A. Rubtsova, V.V. Savransky

Graphene suspension as a plant growth regulator 381

N.S. Goryachev, P.O. Ivanov

Physical reasons for the alternation of chirality in the hierarchical organization of biological structures..... 385

Y.S. Petronyuk, E.A. Khrantsova, N.N. Trofimova, O.M. Andriukhina, A.A. Ryabtseva, T.S. Gurieva, O.A. Dadasheva, V.M. Levin, P.P. Zak

Analyzing the dynamics of the Japanese quail eye structures development by scanning acoustic microscopy technique..... 389

V.A. Panchelyuga, M.S. Panchelyuga

On possible external nature of circadian periods spectra..... 393

MODELLING IN BIOPHYSICS

V.A. Kaptsov, V.N. Deynego, D.V. Kozyritsky

Selective behavioral response of Trichoplax (Placozoa) on RGB-light stimuli 400

P.A. Zhulidin, P.D. Filin, I.L. Plastun

Molecular dynamics simulation of metal sulfides processing in presence of flagellin..... 409

A.O. Lutsenko, D.K. Shpigun, A.E. Sidorova

Method for chirality assessment of superhelical protein structures..... 413

D.K. Shpigun, A.O. Lutsenko, A.E. Sidorova

Method for determining the chirality of protein helical structures 418

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

Influence of strongly bonded water molecules on photoexcitation of thionine dye in solution: quantum chemical analysis 424

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY**M.D. Sadovnichuk, A.S. Skarabahatava**

Assessment of the elemental status of peripheral blood of women depending on age 434

D.I. Telegina, S.V. Vasilieva

Hydrogen sulfide mediates no-signaling activity, thereby stimulating biofilm dispersion 439

I.V. Ivlieva (Peretokina), A.A. Mecheryakova, L.M. Babkov, V.V. Sorokin

IR spectra and structure of chromenopyridine carbonitrile systems 447

A.B. Burlakov, S.A. Titov, L.A. Zykova

High frequency sonography of the cardiovascular system in the early development of the lower vertebrates.....454

E.A. Khramtsova, O.R. Kulikova, D.I. Ushmarov, K.G. Antipova, K.I. Lukanina, S.E. Gumenyuk, V.M. Levin, T.E. Grigoriev

Evaluation of the degradation rate for chitosan spongy scaffolds in situ by mean of acoustic microscopy 460

A.A. Evtina, M.A. Buldakov, V.O. Nekhoroshev, N.V. Landl, N.V. Cherdyntseva, Y.D. Korolev

Effect of low-temperature plasma jets on tumor cell proliferation..... 464

D.S. Finashkin, L.M. Babkov

Structure and vibrational spectra of dihydroxybenzoic acid isomers. Theory, experiment.....472

D.I. Grachev, K.B. Shumaev, V.A. Medvedeva, A.S. Fefler, O.V. Kosmachevskaya, E.K. Ruuge

Interaction of various nitrosyl complexes of hemoglobin with reactive oxygen and nitrogen species 477

T.P. Kulagina, A.B. Gapeyev, A.V. Aripovsky, E.S. Zhukova, T.G. Shcherbatyuk

Fatty acid composition and activity of antioxidant enzymes in rat tissues during tumor growth under ozone exposure 482

E.D. Karimova, N.S. Katermin, S.E. Burkitbaev

Analysis of sensorimotor mu rhythm epilepsy using ICA 487

K.B. Shumaev, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, E.I. Nasybullina, A.K. Martusevich, E.K. Ruuge

Influence of various nitric oxide donors on non-enzymatic glycation of biomolecules 494

M.P. Samtsov, D.S. Tarasov, E.V. Maliushkova, I.I. Khludayev, A.A. Lugovski, I.V. Semak

Analysis of the properties of polymethine dyes complexes with blood serum proteins by gel electrophoresis 499

I.A. Lavrinenko, D.A. Semyonov, D.A. Lagutkin, A.Y. Zaitceva, E.A. Generalov, O.V. Matveeva, Y.E. Yegorov, Y.D. Nechipurenko

Acidosis and Bohr effect in COVID-19 progression..... 505

A.G. Pogorelov, L.G. Ipatova, A.I. Panait, M.A. Pogorelova, A.A. Gulina, V.N. Pogorelova

Spectrometry of plant polysaccharides in electrochemically activated water 511

F.M. Gonzalez, A. Moreno, T.A.M. Cervantes, J. Italo, M.A. Hernandez-Apam, R. Lima

Significance test to a data matrix of nanoreservoirs of tannins extracted from tenuiflora mimosa (tepezcohuite) encapsulated in tio2 anoreservoirs..... 516

Yu.D. Nechipurenko, J.L. Hernandez Caceres

Membrane contamination hypothesis for epileptic activity..... 520

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

A.T. Kulieva

Influence of the electromagnetic field of the decimeter range on the concentration of total protein and hemoglobin in blood of rat offspring irradiated in the prenatal period 525

M.T. Abbasova

Effect of low-intensity electromagnetic radiation of the decimeter range on the activity of ceruloplasmin and lipid peroxidation in blood serum in rats 529

РЕШЕНИЕ ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ ЭЭГ И ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА МОЩНОСТИ В ЗАДАЧЕ АНАЛИЗА РИТМОВ ПОКОЯ

Охрименко Г.С.¹, Каримова Е.Д.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: galina-oxp@mail.ru

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

ул. Бутлерова, 5а, г. Москва, 117485, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Современное общество уделяет много времени потреблению различного рода медиаматериала, что не может не влиять на функциональное состояние головного мозга. Психологи и нейрофизиологи отмечают важность и необходимость нахождения в состоянии спокойного бодрствования – расслабленное физическое и умственное состояние, в котором человек не сосредоточен ни на чём конкретном. В данной работе рассматриваются изменения интенсивности и локализации ритмов спокойного бодрствования электроэнцефалограммы (тета, альфа и бета) после восприятия информационно-развлекательного видеоконтента и пассивного созерцания природы. С каждым из 16 испытуемых проводилось два эксперимента в разные дни (просмотр развлекательного видеоматериала и видеоряда природы). До и после сессий была произведена запись ЭЭГ в состоянии покоя при открытых и закрытых глазах. Решение обратной задачи ЭЭГ и поиск распределённых источников активности ритмов были реализованы с помощью метода standard low resolution tomography (sLORETA), определение спектральной мощности ритмов ЭЭГ до и после восприятия выполнялся методом быстрого преобразования Фурье. После активного восприятия информационного наполненного контента, интенсивность генераторов альфа-ритма повышалась, а после пассивного созерцания природы – снижалась. Наблюдалась разнонаправленная динамика в двух сессиях в бета-1 и бета-2 диапазонах частот. Распределение и динамика тета-ритма не отличались после активной и пассивной сессии. Проведение статического анализа мощностных характеристик позволило получить следующие результаты: наблюдалось повышение спектральной мощности альфа-ритма после активной сессии с открытыми и закрытыми глазами, а также повышение мощности бета-1-ритма после активной сессии в пробе с открытыми глазами.

Ключевые слова: ЭЭГ, ритмы покоя, медиа, функциональное состояние.

ВВЕДЕНИЕ

XXI век – век цифровизации, а также стремительного развития технологий, которые безусловно имеют огромное влияние на жизнь современного человека, и, как следствие, способствуют появлению привычки постоянного потребления различного медиаконтента. Значительную часть времени нынешнее общество проводит за просмотром блогов, подкастов, передач и различных шоу. Кроме того, последние несколько лет стали популярны площадки, производящие короткие видеоролики (TikTok, Instagram)

Часть информации, полученной с помощью подобных ресурсов, может быть действительно полезна, интересна и необходима для саморазвития человека, например, просмотр научно-популярных видеороликов. Но зачастую использование интернет-ресурсов – это способ заполнить «паузы» в жизни человека (ожидание в очереди, поездки на общественном транспорте, перерывы на работе или учёбе). Подобный досуг в этом случае воспринимается как простой и лёгкий способ переключиться и отдохнуть. При этом происходит не целевой поиск интересующего содержания, а «сёрфинг» в сети, то есть просмотр и прослушивание предлагаемого алгоритмом сайта контента [1].

Восприятие – достаточно сложный и ресурсозатратный процесс когнитивной деятельности. Поэтому такое активное потребление медиапродуктов не может не сказаться на функциональном состоянии головного мозга.

Если рассматривать функциональное состояние как результат взаимодействия модулирующих систем мозга и высших отделов коры больших полушарий, который определяет текущий режим деятельности человека [2], то длительная афферентная зрительная или слуховая стимуляция перед основной трудовой деятельностью человека или во время пауз с одной стороны может способствовать поддержанию достаточно высокого уровня активации коры, но с другой – приводить к напряжению и перегрузке анализаторов, истощению нервной системы.

Психологи и нейрофизиологи отмечают важность состояния спокойного бодрствования и пребывания в нём [3-5] – в этот момент активно работают сети покоя (Resting State Network). Кроме того, предполагается, что нарушения работы сети покоя могут играть роль в таких болезнях и расстройствах, как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, шизофрения и др. [6-8]. В связи с этим крайне важно исследовать влияние длительного просмотра медиаконтента на функциональное состояние головного мозга в состоянии покоя.

В данной работе моделируются две различных ситуации для каждого испытуемого: просмотр развлекательного медиаматериала в одном случае и просмотр видеоролика с изображением природы без информационной нагрузки в другом. Подобная экспериментальная парадигма позволила сравнить влияние двух

видов деятельности (просмотр видео и созерцание природы) на функциональное состояние мозга, а также сделать вывод об изменении интенсивности и локализации ритмов покоя после каждого из воздействий.

МЕТОДИКА

Экспериментальная парадигма. В данном исследовании принимали участие 16 человек (9 женщин, 7 мужчин) в возрасте: 21-25 лет. С каждым участником проводили два эксперимента в разные дни. В одном из экспериментов исследовали активное восприятие медиаконтента: испытуемому были предложены научно-популярные видеоролики на различные тематики. Участники могли выбрать интересующий их видеоряд, а также сменить видеоролик на другой при просмотре. В другом эксперименте было исследовано пассивное восприятие – некоторая модель спокойного отдыха без какой-либо умственной нагрузки, аналог созерцания природы или наблюдения за окружающим миром из окна. Для этого были предложены несколько видеорядов без информационного контента: изображение и звуки природы. Длительность видеороликов в обоих случаях составляла 30 мин. В состоянии спокойного бодрствования до и после просмотра с открытыми и закрытыми глазами проводилась запись ЭЭГ. Для анализа использовалось 128 записей.

Оборудование. Регистрацию ЭЭГ проводили 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), расположенными по системе “10-20”, монополярно относительно объединенных ушных электродов A1 и A2. Для всех отведений задавали частоту опроса 256 Гц, полосу пропускания 0.5–70 Гц, импеданс менее 30 кОм.

Метод независимых компонент (Independent components analysis - ICA), использованный в программе Eeglab, применялся для выделения артефактов и удаления сигналов, относящихся к артефактам, из общей записи ЭЭГ.

Обратная задача ЭЭГ и поиск источников активности. При анализе записей ЭЭГ была решена обратная задача ЭЭГ и определена локализация источников активности ритмов покоя (тета-, альфа-, бета1-, бета2- ритмов) в приближении распределенных источников с помощью метода LORETA [9-11]. Для того чтобы сделать вывод об изменении интенсивности источников после просмотра видеороликов для каждого ритма покоя в случае открытых и закрытых глаз необходимо было произвести повоксельное вычитание интенсивности после просмотра и до просмотра видеоролика, затем усреднить данную разницу по всем испытуемым.

Спектральный анализ. Для проведения интегральной оценки мощности по всем каналам до и после просмотра видеоролика использовался спектральный анализ, в результате которого были получены значения амплитуд спектральной мощности в полосах частот тета- (4–8 Гц), альфа- (8–13 Гц), бета1- (13–24 Гц), и бета2- (24–35 Гц) ритмов по каждому из 17 отведений. После чего значения были усреднены по всем отведениям.

Т-критерий Уилкоксона. На основе значений мощности до и после просмотра видеоролика, полученных из спектрального анализа, проводился статистический анализ с помощью MS Excel (расчет Т-критерия Уилкоксона), необходимый для нахождения достоверных различий в каждой сессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Изображения, представленные ниже, являются результатом решения обратной задачи ЭЭГ с использованием стандартной модели черепа и структур мозга. На рисунках 1-4 продемонстрированы 3D модели распределения интенсивности, являющиеся разностью реконструированных распределённых источников после и до просмотра контента и усредненные по всем испытуемым. Распределение источников колебаний рассмотрено в полосах частот, соответствующих ритмам покоя: тета (4–8 Гц), альфа (8–13 Гц) и бета1 (13–24 Гц), и бета2 (24–35 Гц). Учитывая, что данные изображения демонстрируют изменение интенсивности распределенных источников по каждому ритму после просмотра видеоролика, можно сделать вывод об увеличении или уменьшении интенсивности после такого воздействия. Тогда положительное значение интенсивности характеризует увеличение интенсивности, а отрицательное значение, соответственно, уменьшение интенсивности источников ритмов.

1) Глаза закрыты, тета-ритм:

После активной сессии у испытуемых наблюдалось повышение интенсивности источников тета-ритма в височных областях и в районе центральной борозды. После пассивной сессии в височных областях также наблюдалось повышение интенсивности источников тета-ритма, но с меньшим значением, чем после активной сессии (рис. 1а).

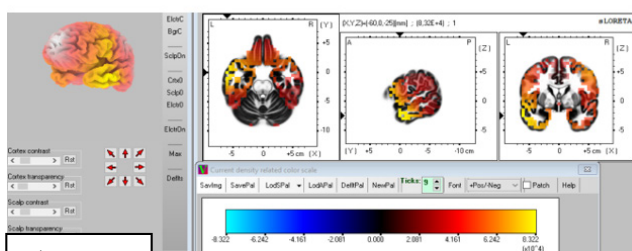
2) Глаза открыты, тета-ритм:

Как после активной, так и после пассивной сессии интенсивность источников тета-ритма уменьшилась диффузно по всему объему (рис. 1б).

3) Глаза закрыты, альфа-ритм:

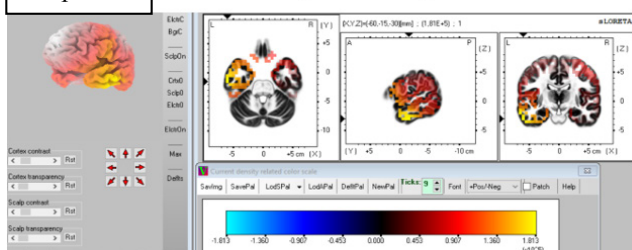
После активной сессии у испытуемых наблюдалось повышение интенсивности источников альфа-ритма в затылочных и задневисочных областях слева. А после пассивной сессии наблюдалось незначительное повышение интенсивности в затылочных областях и выраженное снижение интенсивности источников альфа-ритма в лобных и височных областях (рис. 2а).

Активная проба, тета-ритм

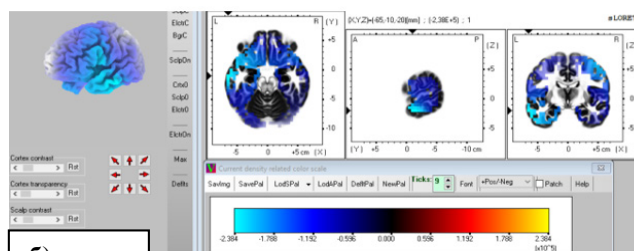


а) глаза закрыты

Пассивная проба, тета-ритм



Активная проба, тета-ритм



б) глаза открыты

Пассивная проба, тета-ритм

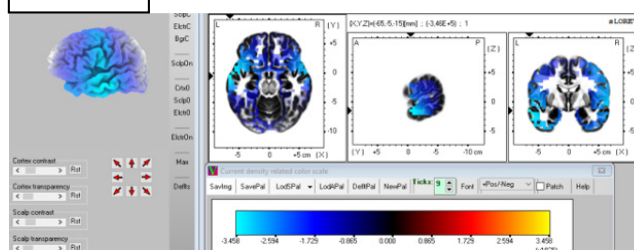
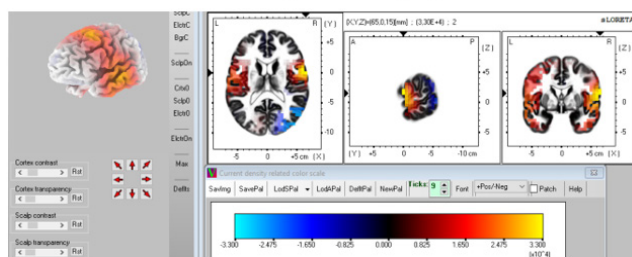


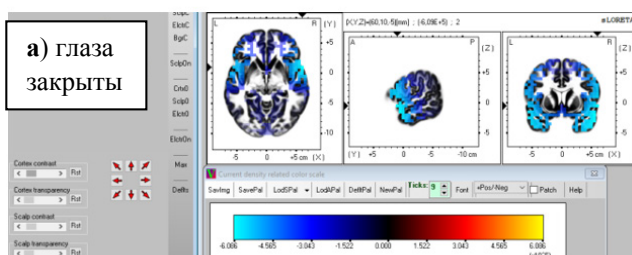
Рисунок 1. Распределение источников активности головного мозга **тета-ритма** для активной и пассивной сессии (а) при закрытых глазах и (б) при открытых глазах

Активная проба, альфа-ритм

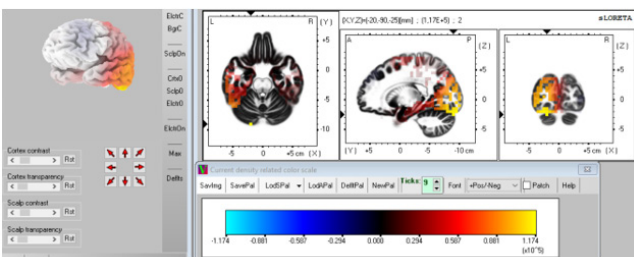


а) глаза закрыты

Пассивная проба, альфа-ритм



Активная проба, альфа-ритм



б) глаза открыты

Пассивная проба, альфа-ритм

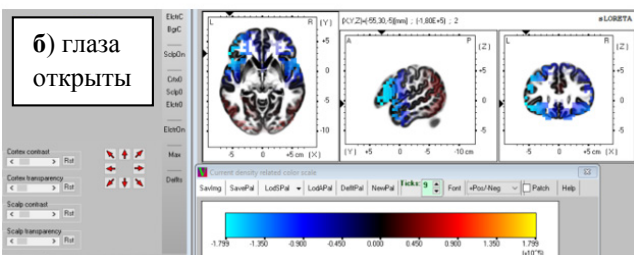


Рисунок 2. Распределение источников активности головного мозга **альфа-ритма** для активной и пассивной сессии (а) при закрытых глазах и (б) при открытых глазах

4) Глаза открыты, альфа-ритм:

После активной сессии интенсивность источника альфа-ритма увеличилась в височной области и области центральной борозды. После пассивной сессии интенсивность, наоборот, уменьшилась в тех же локусах (рис. 2б).

5) Глаза закрыты, бета1-ритм:

После активной сессии наблюдалось увеличение интенсивности источников бета1- ритма диффузно по всему объему. После пассивной сессии интенсивность в правой лобной доли также увеличивалась, а в левой височной доле, наоборот, незначительно уменьшалась (рис. 3а).

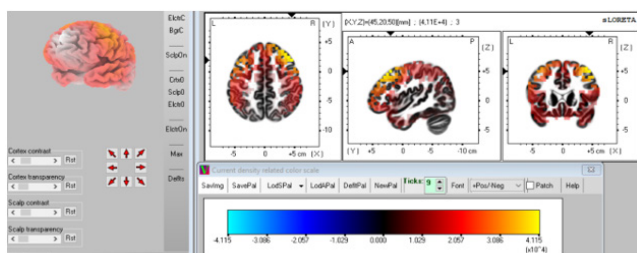
6) Глаза открыты, бета1 – ритм:

После активной сессии интенсивность бета1-ритма увеличилась в лобных и височных областях. В отличие от этого, после пассивной сессии интенсивность источников уменьшилась в тех же локусах (рис. 3б).

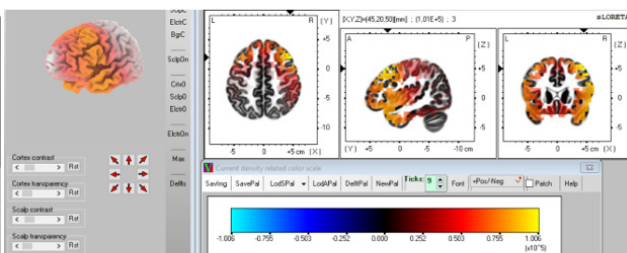
7) Глаза закрыты, бета2 – ритм:

После активной сессии наблюдалось как повышение, так и снижение интенсивности источников бета2-ритма. Интенсивность увеличилась в правом полушарии, а в левой височной и фронтальной области интенсивность уменьшилась. После пассивной сессии интенсивность диффузно увеличилась по всему объему (рис. 4а).

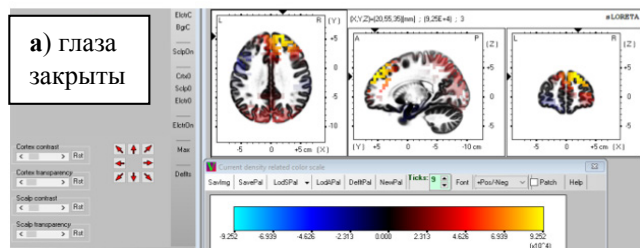
Активная проба, бета1-ритм



Активна проба, бета1-ритм



Пассивная проба, бета1-ритм



Пассивная проба, бета1-ритм

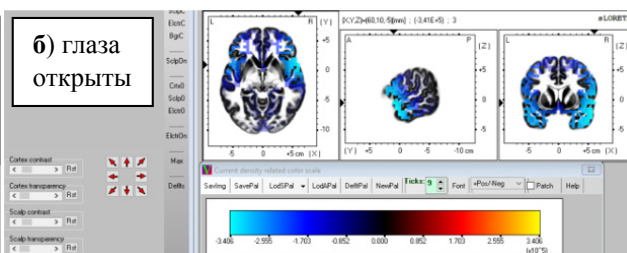
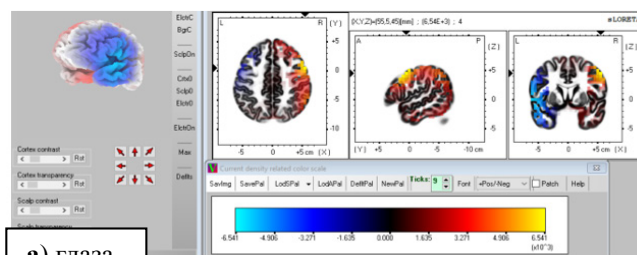
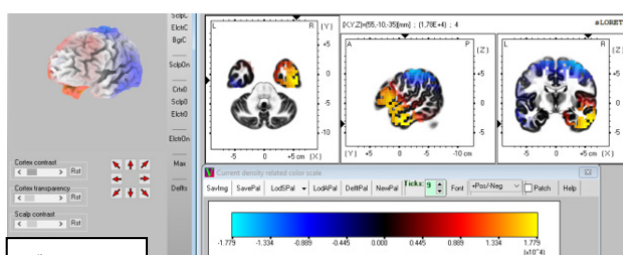


Рисунок 3. Распределение источников активности головного мозга бета1-ритма для активной и пассивной сессии (а) при закрытых глазах и (б) при открытых глазах

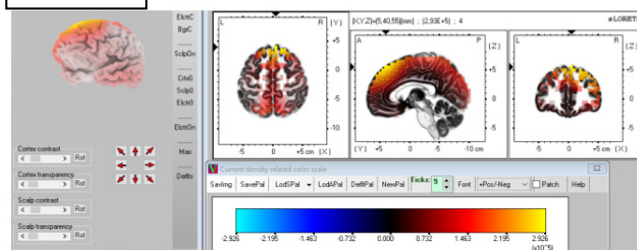
Активная проба, бета2-ритм



Активная проба, бета2-ритм



Пассивная проба, бета2-ритм



Пассивная проба, бета2-ритм

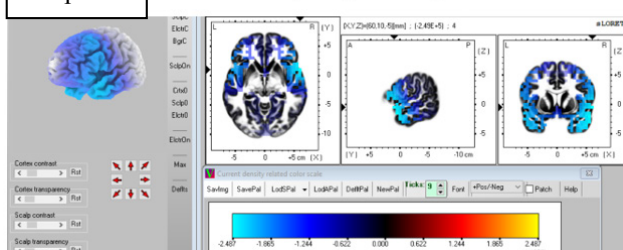


Рисунок 4. Распределение источников активности головного мозга бета2-ритма для активной и пассивной сессии (а) при закрытых глазах и (б) при открытых глазах

8) Глаза открыты, бета2 – ритм:

После активной сессии наблюдалось увеличение интенсивности источников бета2 – ритма в правой височной области, а также уменьшение интенсивности в затылочной области. После пассивной сессии наблюдалось уменьшение интенсивности в лобных и височных областях (рис. 4б).

Интегральная таблица изменений интенсивности источников представлена в таблице 1.

Таблица 1. Интегральное представление результатов: наиболее значимые изменения интенсивности распределённых источников ЭЭГ ритмов после активной и пассивной сессии в пробах с закрытыми и открытыми глазами

Состояние	Сессия	тета-ритм	альфа-ритм	бета1-ритм	бета2-ритм
Глаза закрыты	активная сессия	↑ виски, центральная борозда	↑ затылочные обл. (слева)	↑ диффузно по всему объёму	↑ правое полушарие, ↓ лев. височная и фронт. обл.
	пассивная сессия	↑ виски	↓ лобные, височные обл.	↑ правая лобная доля, ↓ лев. височные обл.	↑ диффузно по всему объёму
Глаза открыты	активная сессия	↓ диффузно по всему объёму	↑ виски, центральная борозда	↑ лобные, височные обл.	↑ правая височная обл., ↓ затылочная обл.
	пассивная сессия	↓ диффузно по всему объёму	↑ виски, центральная борозда	↓ лобные, височные обл.	↓ лобные, височные обл.

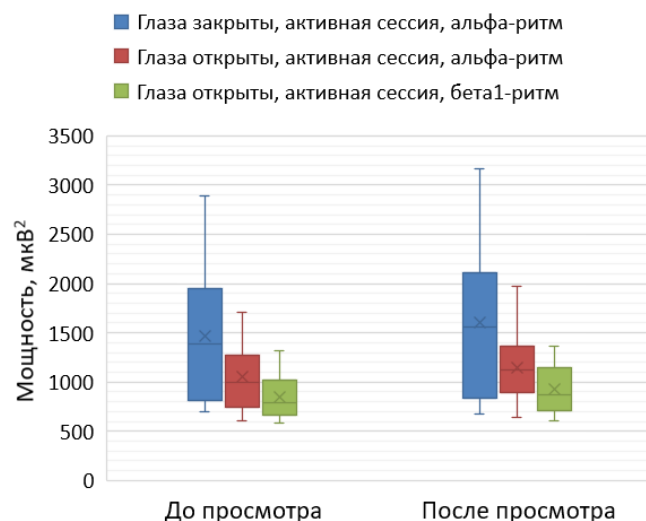


Рисунок 5. Спектральная мощность ритмов в состоянии покоя до и после просмотра видеороликов

1. Наиболее значимые различия в разных сессиях наблюдаются в диапазоне альфа-ритма: после активного восприятия информационного наполненного контента, интенсивность генераторов альфа-ритма повышалась, а после пассивного созерцания природы – снижалась.
2. Разнонаправленная динамика в двух сессиях наблюдалась также в бета1 и бета2 диапазонах частот в пробе с открытыми глазами – в активной сессии повышалась интенсивность источников в лобных и височных областях, а после пассивной сессии – снижалась в тех же локусах.
3. Распределение и динамика источников тета-ритма не отличались после активной и пассивной сессии.

Статистический анализ спектральной мощности ритмов до и после сессий (Т-критерий Уилкоксона) выявил достоверные отличия в частотном диапазоне альфа-ритма при открытых и закрытых глазах и в бета1-диапазоне при открытых глазах (рис. 5): спектральная мощность данных ритмов достоверно повышалась именно после активного просмотра медиаконтента.

Таким образом, резюмируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы:

- Повышение мощности альфа-ритмов в сочетании с повышением бета ритмов после **активной сессии** может свидетельствовать о повышенном внимании, когнитивной деятельности, процессах запоминания, а также о необходимости физиологического отдыха и переключения в режим спокойного бодрствования.
- Состояние после **пассивной сессии** характеризуется снижением активности альфа-генераторов, повышением активности источников тета- и бета-ритмов при закрытых глазах и понижением их активности при открытых глазах. Достоверных изменений мощности спектральных ритмов после пассивной сессии не было выявлено. Данные результаты могут свидетельствовать о снижении уровня бодрствования испытуемых, и нуждаются в дальнейших подтверждениях на более объемной выборке и последующей интерпретации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что даже 30 минутная сессия просмотра различных научно-популярных и развлекательных коротких видео влияет на показатели состояния спокойного бодрствования, что говорит об изменении функционирования сетей покоя. Повышение интенсивности альфа- и бета- генераторов свидетельствует о двух параллельных процессах – переходе в режим покоя, но и одновременно с этим перевозбуждении коры головного мозга, такое состояние обычно возникает при тревожных расстройствах. Замещение периодов спокойного бодрствования активным потреблением информации может привести к снижению времени работы сетей покоя, и соответственно, перевозбуждению, проблемам с памятью и вниманием.

Список литературы / References:

1. Белозерова Ю.М. Опыт применения медиатехнологий, виртуальной и дополненной реальности в формировании профессиональных компетенций сотрудников организаций сферы услуг. *Цифровое общество как культурно-исторический контекст развития человека: сборник научных статей*. Под общ. ред. Р.В. Ершовой. Коломна: Государственный социально-гуманитарный университет, 2020, с. 41-43. [Belozerova Yu.M. Experience in the use of media technologies, virtual and augmented reality in the formation of professional competencies of employees of service organizations. *Digital society as a cultural and historical context of human development: a collection of scientific articles*. Under the general ed. of R.V. Ershova. Kolomna: State Social and Humanitarian University, 2020, pp. 41-43. (In Russ.)]
2. Марютина Т.М., Ермолаев О.Ю. *Введение в психофизиологию: учебное пособие по курсу: "Общая и возрастная психофизиология"*. М.: Московский психолого-социальный институт. Флинта, 1997, 240 с. [Maryutina T.M., Ermolaev O.Yu. *Introduction to psychophysiology: a textbook for the course: "General and age-related psychophysiology"*. М.: Moscow Psychological and Social Institute. Flinta, 1997, 240 p. (In Russ.)]

3. Greicius M.D., Krasnow B., Reiss A.L., Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, vol. 100, no. 1, pp. 253-258. doi: 10.1073/pnas.0135058100
4. Gusnard D.A., Raichle M.E., Raichle M.E. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 2001, vol. 2, no. 10, pp. 685-694. doi:10.1038/35094500
5. Mason M.F., Norton M.I., Van Horn J.D., Wegner D.M., Grafton S.T., Macrae C.N. Wandering minds: the default network and stimulus-independent thought. *Science*, 2007, vol. 315, no. 5810, pp. 393-395. doi: 10.1126/science.1131295
6. Greicius M.D., Srivastava G., Reiss A.L., Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, vol. 101, no. 13, pp. 4637-4642. doi: 10.1073/pnas.0308627101
7. Lowe M.J., Beall E.B., Sakaie K.E., Koenig K.A., Stone L., Marrie R.A., Phillips M.D. Resting state sensorimotor functional connectivity in multiple sclerosis inversely correlates with transcallosal motor pathway transverse diffusivity. *Human brain mapping*, 2007, vol. 29, no. 7, pp. 818-827. doi: 10.1002/hbm.20576
8. Bluhm R.L., Miller J., Lanius R.A., Osuch E.A., Boksman K., Neufeld R.W., Theberge J., Schaefer B., Williamson P. Spontaneous low-frequency fluctuations in the BOLD signal in schizophrenic patients: anomalies in the default network. *Schizophrenia bulletin*, 2007, vol. 33, no. 4, pp. 1004-1012. doi: 10.1093/schbul/sbm052
9. Pascual-Marqui R.D. Standardized low-resolution brain electromagnetic tomography (sLORETA): technical details. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 2002, vol. 24, Suppl D, pp. 5-12.
10. Fuchs M., Kastner J., Wagner M., Hawes S., Ebersole J.S. A standardized boundary element method volume conductor model. *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 2002, vol. 113, no. 5, pp. 702-12. doi: 10.1016/s1388-2457(02)00030-5
11. Jurcak V., Tsuzuki D., Dan I. 10/20, 10/10, and 10/5 systems revisited: Their validity as relative head-surface-based positioning systems. *Neuroimage*, 2007, vol. 34, no. 4, pp. 1600-1611. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.09.024

SOLVING THE INVERSE EEG PROBLEM AND INTEGRAL POWER ESTIMATION IN THE RESTING RHYTHM ANALYSIS PROBLEME

Okhrimenko G.S.¹, Karimova E.D.²

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory str., 1, Moscow, 119234, Russia; e-mail: galina-oxp@mail.ru

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the RAS

5a Butlerova str., Moscow, 117485 Russia

Abstract. Modern society devotes a lot of time to the consumption of various kinds of media materials, which cannot but affect the functional state of the brain. Psychologists and neurophysiologists outline the significance and necessity of being in a state of calm wakefulness which is a relaxed physical and mental state when a person is not focused on anything specific. This paper examines the changes in the intensity and localization of the rhythms of calm wakefulness of the electroencephalogram (theta, alpha and beta) after the perception of informative and entertainment video content and passive contemplation of nature. Two experiments were carried out on each of the 16 participants on different days (viewing entertainment video material and a video series of nature). The EEG was recorded at rest with the participants' open and closed eyes before and after the sessions. The solution to the inverse EEG problem and the search for distributed activity sources were implemented using the standard low resolution tomography (sLORETA) method; the determination of the EEG spectral power before and after perception was performed by the Fast Fourier Transform method. After active perception of information-filled content, the intensity of alpha-rhythm generators increased, and after passive contemplation of nature it, conversely, decreased. Multidirectional dynamics was observed in two sessions in the beta-1 and beta-2 frequency ranges. The distribution and dynamics of the theta rhythm did not differ after the active and passive sessions. The statistical analysis of the power characteristics enabled us to obtain the following results: an increase in the spectral power of the alpha rhythm was observed after an active session with the participants' open and closed eyes, as well as an increase in the power of the beta1 rhythm was noted after an active session in the sample with their open eyes.

Key words: EEG, rest rhythms, media, functional state.

ТЕХНИКА ИССЛЕДОВАНИЯ СКОРОСТИ РОСТА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВНЕШНЕГО ПОВЫШЕННОГО ДАВЛЕНИЯ

Суслов М.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе представлен технический и методический подход для исследования скорости роста растительных клеток под воздействием внешнего гидростатического давления, как одного из важных термодинамических параметров роста. Данный подход включает использование оригинальной камеры давления, адаптированной под оптический микроскоп и газовую систему для подачи и сброса давления. В работе приведена подробная конструкция и чертёж разработанной камеры, а также схема проведения эксперимента с её использованием, включая описание дополнительных технических и программных средств. Использование данной камеры позволяет исследовать изменение размеров и скорость роста растительных клеток в динамике непосредственно при изменении внешнего давления в диапазоне от 0,1 до 1 МПа. Представлены некоторые результаты исследования воздействия повышенного гидростатического давления на рост растительных клеток, полученные с использованием данного технического и методического подхода. В частности, на примере корней проростков кукурузы показано, что повышение внешнего давления до 0,3 МПа вызывает ускорение роста растяжением в клетках эпидермиса корня. Оценены перспективы дальнейшего использования разработанной системы применительно к исследованиям ростовых процессов в растительных тканях.

Ключевые слова: камера давления, растительные клетки, рост растяжением.

Рост растений – это сложный физиологический процесс, который часто является чувствительным индикатором воздействия окружающей среды [1]. Влияние абиотических факторов на ростовые процессы в растениях, таких как температура, влажность, освещение и т.д. привлекает внимание многих исследователей и является важным направлением биологических исследований [2-5], а изучение ростовых процессов в динамике и непосредственно под воздействием внешних факторов представляет особый интерес. Рост растяжением является отличительной особенностью растительных клеток. В результате роста растяжением длина клеток может увеличиваться в десятки и в сотни раз, что обеспечивает высокие темпы роста растений. При этом важную роль в данном процессе играет фактор давления [6]. В первую очередь это тургорное давление (гидростатическое давление внутри клеток), которое является механическим стимулом растяжения клеточной стенки и, соответственно, увеличения длины клеток [7]. Величина тургорного давления в клетках растений может достигать нескольких атмосфер. Предполагается, что кроме тургорного давления важным параметром в процессе роста клеток растяжением является внеклеточное давление в растительных тканях (апопластное давление), которое обычно отличается от атмосферного давления и может изменяться в пределах суток [8-10]. Результаты математического моделирования роста клеток в тканях растений показывают, что изменения внеклеточного давления могут модулировать скорость роста клеток растяжением. В частности, согласно модели, резкое увеличение внеклеточного давления должно приводить к увеличению скорости роста клеток в зоне растяжения [8]. Экспериментальное подтверждение роли фактора давления в ходе роста клеток растяжением, очевидно, предполагает воздействие на исследуемый образец внешнего давления различной величины в пределах физиологических значений. Для реализации данной задачи в лабораторных условиях была разработана и изготовлена камера давления, позволяющая проводить непрерывное измерение скорости роста клеток в тканях растений непосредственно при воздействии внешним давлением до 1 МПа. На рисунке 1 представлен чертёж поперечного сечения камеры.

Камера имеет цилиндрическую форму с диаметром основания 80 мм и высотой 35 мм. Корпус камеры изготовлен из алюминиевого сплава (Al-Cu-Mg). В нижнем и в верхнем основании камеры на резиновые прокладки (2) устанавливаются съёмные, прозрачные, кварцевые стёкла марки КУ-1. Диаметр стёкол 65 мм, толщина нижнего стекла (1) составляет 6 мм, толщина верхнего стекла (5), через которое осуществляется наблюдение за образцом, составляет 2 мм. Таким образом, камера имеет прозрачное дно и верх. Для герметизации камеры стекла снизу и сверху прижимаются с помощью винтов к основному корпусу камеры алюминиевыми дисками (3) с круглыми центральными отверстиями диаметром 50 мм для нижнего диска и 30 мм для верхнего. Данная конструкция позволяет измерять скорость роста отдельных клеток в тканях с помощью оптического микроскопа. Стоит отметить, что вышеуказанная толщина стёкол обеспечивает оптимальное значение требуемой величины давления и приближения к объективу микроскопа. В боковой части алюминиевого корпуса выполнено отверстие диаметром 1,5 мм с тонкой иглой для медленной подачи и сброса давления. Через штуцер (4) камера подсоединяется с помощью пневмомагистрали к газовой системе, состоящей из баллонов с воздухом, манометров, редукторов и электроклапанов для подачи и сброса давления.

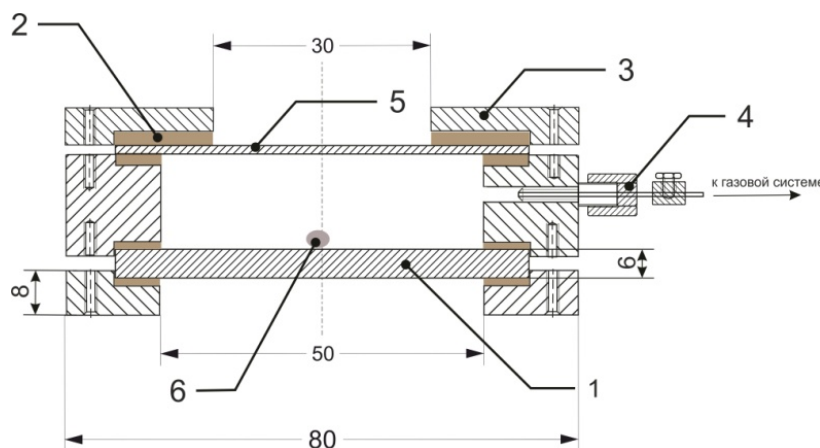


Рисунок 1. Поперечное сечение камеры давления: 1 – кварцевое прозрачное стекло марки КУ-1, 2 – резиновые уплотнительные прокладки, 3 – диск из алюминиевого сплава (Al-Cu-Mg), 4 – штуцер с встроенной иглой для подачи и сброса давления, 5 – верхнее, тонкое кварцевое стекло марки КУ-1, 6 – исследуемый растительный образец

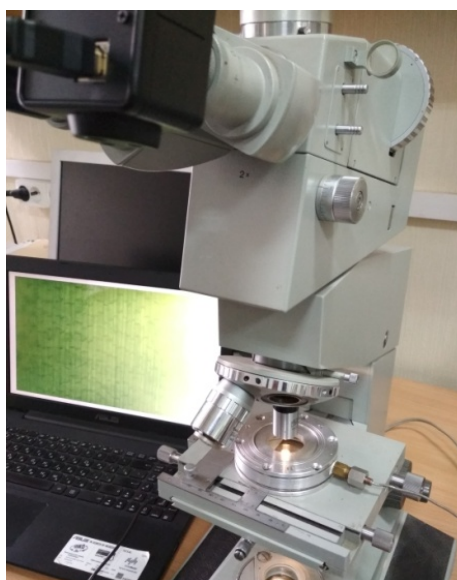


Рисунок 2. Фотография камеры давления, установленной под объектив оптического микроскопа, оснащённого цифровой видеокамерой

Ход эксперимента по воздействию внешнего избыточного давления на скорость роста растительных клеток осуществляется следующим образом: исследуемый образец, в частности сегмент корня растений, содержащий зону растяжения, укладывается на прозрачное дно камеры и частично накрывается слоем фильтровальной бумаги для фиксации. Далее, камера закрывается прозрачным верхним стеклом, которое через резиновую прокладку герметично зажимается алюминиевым диском с помощью винтов. После помещения образца камера устанавливается под объектив оптического микроскопа, оснащённого цифровой видеокамерой (рис. 2) и подсоединяется к газовой системе для подачи и сброса давления.

Через определённые временные интервалы происходит фотографирование клеток эпидермиса корня при нормальном давлении (контроль), а затем при повышении внешнего давления в диапазоне от 0,1 до 1 МПа. Полученные изображения клеток обрабатываются с помощью программного обеспечения MacBiophotonics ImageJ. Для вычисления скорости роста на первом полученном изображении выбирается некоторое количество хорошо просматриваемых клеток и вычисляются их исходные размеры. Далее производится сравнение со следующими изображениями, сделанными при одном и том же разрешении, и определяется изменение размеров исходно выбранных клеток в ходе роста растяжением (рис. 3).

Инструменты программы MacBiophotonics ImageJ позволяют производить вычисление размеров клеток как вручную (по проставленным меткам, соответствующим границам клеток), так и автоматически путём вычитания изображений.

На рисунке 4 показано изменение длины и ширины клеток эпидермиса корня из зоны растяжения 7-ми дневных проростков растений кукурузы в контроле (при нормальном атмосферном давлении) и после 5-ти часов воздействия внешним давлением величиной 0,3 МПа. Как видно из рисунка повышение внешнего давления вызывает заметное увеличение длины клеток по сравнению с контролем, что свидетельствует об ускорении роста

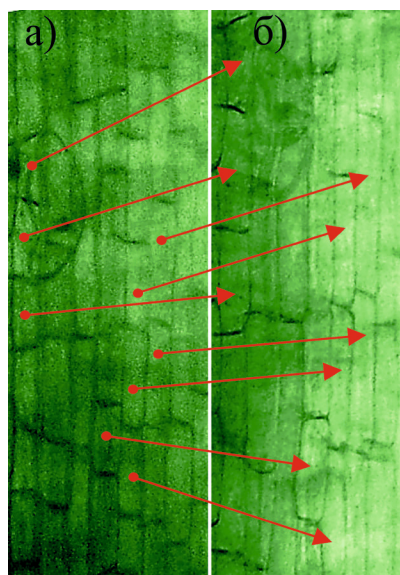


Рисунок 3. Фотографии клеток эпидермиса корня кукурузы из зоны растяжения: а) – контроль (до повышения давления), б) – те же клетки через 5 часов после повышения давления до 0,3 МПа

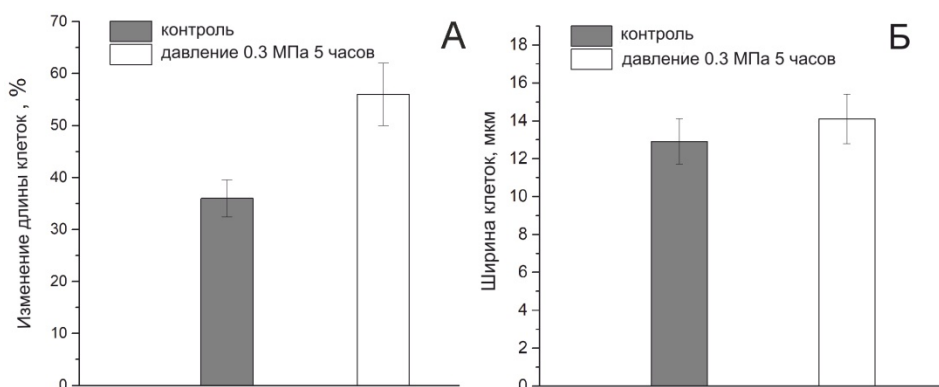


Рисунок 4. Изменение длины клеток (в процентах по отношению к начальному значению) и ширины клеток эпидермиса корня кукурузы из зоны растяжения через 5 часов роста при нормальном атмосферном давлении (контроль) и при повышенном давлении 0,3 МПа

клеток растяжением. Стоит отметить, что данный эффект ускорения роста наблюдается практически сразу после повышения давления (данные не приведены). При этом, воздействие давлением на клетки, прошедшие стадию роста растяжением, не вызывает увеличения прироста длины (данные не приведены). Предположительно, причиной данного эффекта может быть компенсация внешним давлением внеклеточного (апопластного) давления в тканях корня, сброшенного в результате отсечения сегмента корня.

Таким образом, приведённый в данной работе оригинальный технический и методический подход позволяет исследовать ростовые процессы в растительных тканях при изменении внешнего давления, как одного из важных термодинамических параметров роста и развития растений. Представленную в работе камеру давления можно использовать для исследования роста не только отдельных клеток в тканях, но и целых небольших проростков растений. По сравнению с другими способами измерения скорости роста с использованием механических и инфракрасных датчиков смещения [11], метод, описанный в настоящей работе, обеспечивает бесконтактное измерение и позволяет одновременно исследовать рост клеток в нескольких растительных образцах одновременно. В перспективе предполагается оснастить камеру системой термостабилизации и использовать её для исследования скорости роста растительных клеток при одновременном изменении внешнего давления и температуры.

Исследование проведено в рамках работы по гос. заданию для ФИЦ Казанского научного центра РАН.

Список литературы / References:

1. Braidwood L., Breuer C., Sugimot K. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, 2014, vol. 201, pp. 388-402.
2. Nagel K. A., Schurr U., Walter A. Dynamics of root growth stimulation in *nicotiana tabacum* in increasing light intensity. *Plant Cell Environ.*, 2006, vol. 29, no. 10, pp. 1936-1945.
3. Wraith J.M., Wright K.W. Soil water and root growth. *Hort Science*, 1998, vol. 33, pp. 951-959.

4. Madhu M., Hatfield J.L. Dynamics of Plant Root Growth under Increased Atmospheric Carbon Dioxide. *Agronomy Journal*, 2013, vol. 105, pp. 657-669.
5. Judd L.A., Jackson B.E., Fonteno W.C. Advancements in Root Growth Measurement Technologies and Observation Capabilities for Container-Grown Plants. *Plants*, 2015, vol. 4, pp. 369-392.
6. Christmann A., Grill E., Huang J. Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current opinion in Plant Biology*, 2013, vol. 16, pp. 293-300.
7. Kroeger J.H., Zerzour R., Geitmann A. Regulator or driving force? *The role of turgor pressure in oscillatory plant cell growth PLoS one*, 2011, vol. 6, no. 4, e18549.
8. Ortega J. Plant cell growth in tissue. *Plant physiology*, 2010, vol. 154, pp. 1244-1253.
9. Pessoa J., Calbo A. Apoplasm hydrostatic pressure on growth of cylindrical cells. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2004, vol. 16, no. 1, pp. 17-24.
10. Wieggers B.S., Cheer A.Y., Silk W.K. Modeling the hydraulics of root growth in three dimensions with phloem water sources. *Plant Physiology*, 2009, vol. 150, pp. 2092-2103.
11. Galbraith D.W.; Bohnert H.J.; Bourque D.P. *Methods in cell biology*, Academic Press Inc, San Diego, 1995, part A, vol. 49, 573 p.

THE TECHNIQUE OF THE PLANT CELLS GROWTH RATE STUDY UNDER IMPACT OF ELEVATED EXTERNAL PRESSURE

Suslov M.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences
Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru

Abstract. The work presents a technical and methodological approach for studying the growth rate of plant cells under influence of external hydrostatic pressure, as one of the important thermodynamic growth parameters. This approach involves the using of original pressure chamber adapted to optical microscope and gas system for supplying and releasing pressure. The paper contains the detailed design and drawing of the chamber, as well as the scheme of experiment conducting with chamber using, including a description of additional hardware and software. The use of this chamber makes it possible to investigate the changes in the size and growth rate of plant cells in dynamics directly with the change in external pressure in the range from 0,1 to 1 MPa. The main results of the external hydrostatic pressure impact study, obtained using this technical and methodological approach, are presented. In particular, on example of the roots of corn seedlings, it was shown that increasing of external pressure up to 0,3 MPa causes acceleration of elongation growth in the cells of the root epidermis. Prospects for the further using of the developed system as applied to studies of growth processes in plant tissues are presented.

Key words: pressure chamber, plant cells, elongation growth.

СУСПЕНЗИЯ ГРАФЕНА В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ

Апашева Л.М.¹, Дмитриев А.С.³, Лобанов А.В.¹, Михайлова И.А.³, Рубцова Н.А.¹,
Савранский В.В.²

¹ ФИЦ химической физики им Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, РФ

² ФИЦ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

ул. Вавилова, 38, г. Москва, РФ

³ Национальный исследовательский университет «МЭИ»

ул. Красноказарменная, 14, г. Москва, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Изучалось стимулирующее действие малых доз графена (0,2 мг/л, 2 мг/л и 20 мг/л) на растения двух видов: кукурузы и огурца – в отношении которых ранее проводились исследования стимуляции более высокими дозами и угнетение еще более высокими дозами углеродных наноматериалов. Применяемый в нашем исследовании графен получен оригинальным суперкавитационным способом и охарактеризован стандартными методами: электронной микроскопией и методом комбинационного рассеяния света. Спектры комбинационного рассеяния света свидетельствовали о наличии нанопластин толщиной от 1 до 5 атомных слоев углерода. Максимальное стимулирующее действие графена проявилось при концентрации графена в водной суспензии 20 мг/л. При концентрации 0,2 мг/л стимулирующее действие не обнаружено.

Ключевые слова: графен, суперкавитация, *Zea Mays*, *Cucumis*.

Способы получения графена совершенствуются с целью достижения снижения цены производства, простоты процесса, выхода и однородности продукта. Известны способы расслоения графена механические, химические, химического осаждения из паровой фазы, эпитаксиальный метод, смыв с поверхности, и т.д. [1] При химическом расслоении между слоями графита внедряют крупные ионы щелочных металлов, синтез графена проводится из окиси графита, который расслаивают в растворе до окиси графена и затем восстанавливают до графена.

Первые графен был получен (и охарактеризован) в виде небольших чешуек размером нескольких микрон путем механического расслоения графита с помощью скотча. После отслоения графита на ленте остается многослойный графен. При повторном и дальнейшем отслаивании многослойный графен раскалывается на несколько чешуек истинного монослойного графена. Возможно механическое расслоение графита с использованием кантилевера атомного силового микроскопа; метод позволяет изготавливать «графен - графит» до 30 слоев.

Настоящий бум развития технологий, основанных на выдающихся свойствах углеродных наночастиц ставит вопросы о воздействии их на живые организмы [2] и возможности ремедиации загрязненных почв при помощи растений. Поскольку такие исследования на разных видах и при различных концентрациях дают противоположные результаты (стимуляция и угнетение), интересно сопоставить действие частиц графена, полученных нашим способом с этими известными работами: будут ли отличаться концентрации контрастного действия на тех же видах растений при воздействии частиц, полученных нашим способом, до каких пределов минимальных концентраций стоит проводить ремедиацию почв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали нанопластины графена, полученные суперкавитационным способом. Получение нанопластин графена производили в кавитационной камере путем расщепления графитовых частиц размером 1 мм вдоль кристаллографических плоскостей за счет эффектов сдвиговых напряжений в высоко деионизированной воде с последующим ультразвуковым воздействием на образующиеся графеновые пластины для дополнительного уменьшения числа атомных углеродных слоев. Проведенная электронная микроскопия показала широкий спектр размеров наночастиц графена в пределах от единиц нанометров до десятков микрометров.

В наших работах использована суспензия нанопластин графена в деионизированной воде, которую фильтровали стальной сеткой с ячейками 2,5 мкм.

Электронный элементный состав не обнаружил наличия в пределах одного процента посторонних элементов, кроме углерода. На электроннограмме элементного состава (рис.1) применяемого в наших опытах графена видны кроме основной углеродной линии также кислородная линия и справа от нее слабый фон.

Спектры комбинационного рассеяния света свидетельствовали о наличии нанопластин толщиной от 1 до 5 атомных слоев углерода.

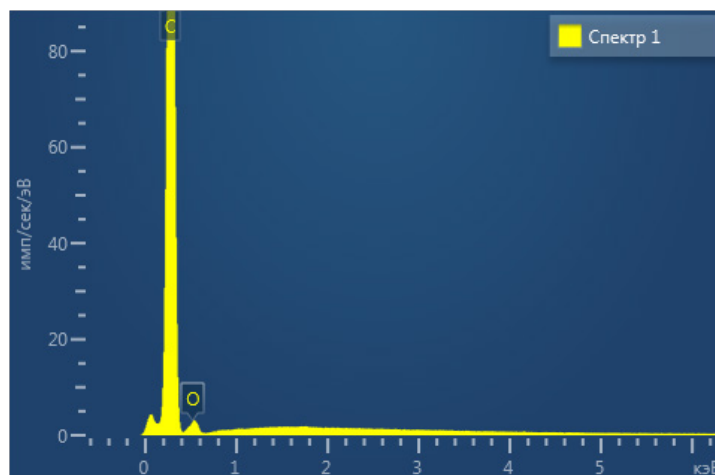


Рисунок 1. Электроннограмма графена

Для изучения способности суспензии графена воздействовать на растения отобраны семена огурца сорт Конкурент и кукурузы сорт Песня. Семена этих растений отличаются разным типом прорастания: у огурца – с выносом семядоли на поверхность грунта, у кукурузы – подземный тип прорастания. Для более четкого выявления рострегулирующей активности суспензии графена выбраны семена пониженной всхожести в результате длительного хранения (контрольная всхожесть для семян огурца – 29%, для семян кукурузы – 21%). Семена проращивали в термостате при температуре +20° С на увлажненных фильтрах. Мы применяли исходную суспензию в различных разведениях. В этом случае концентрация – единственный параметр, который мы изменяем и по которому сопоставляем с данными, полученными при изучении воздействия на растения различных видов графена.

В контроле фильтры увлажняли водой, в опыте О₁ использовали исходную суспензию графена 20 мг/л; в О₁₀ разведение суспензии в 10 раз, в О₁₀₀ разведение в 100 раз. На третьи сутки вели учет количества проросших семян. Далее растения доращивали в фитотроне с контролируемым освещением для наблюдения за последующим развитием проростков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наибольший эффект стимуляции прорастания отмечен при использовании исходной суспензии графена без разведения. Количество проросших семян огурца и кукурузы превышало контрольные значения в О₁ для кукурузы 41%, для огурца 29 %. При значении концентрации графена 2 мг/л отмечено превышение контрольных значений на 25 % и 19% соответственно (таблица 1). При концентрации графена 0,2 мг/л отличия от контроля не обнаружено.

Дальнейшее выдерживание пророщенных семян в течение 6 часов в фитотроне показало различия в развитии у опытных по сравнению с контрольными растениями. На рисунке 1 приведены фото этих проростков, на которых видно, что у кукурузы гипокотили, в случае проращивания в среде с графеном при концентрации 20 мг/л, визуально толще и длиннее на 18±5% по сравнению с более извилистыми и тонкими гипокотелями, выращенными на воде. Как у огурца, так и у кукурузы, зеленение проростков в опыте происходит активнее, то есть и дальнейшее развитие проростков стимулируется графеновой суспензией с данной концентрацией графена.

Таким образом, суспензия графена, полученная описанным способом, может быть отнесена к регуляторам роста растений.

Действие углеродных наноматериалов на растения огурца.

Известно, что оксид графена на серебряных частицах AgGO [3] при концентрациях 0,8 мг/мл (80 мг/л) подавлял рост проростков огурца. В других опытах рост корней огурца при воздействии углеродных однослойных нанотрубок наблюдался при их кратковременном воздействии в течение 24 и 48 часов в концентрациях 104, 315 и 1750 мг/л [4]. При этом однодневное воздействие было более эффективным, чем

Таблица 1. Процент всхожести семян растений, пророщенных на воде и на суспензиях графена

Концентрация графена	20 мг/л	2мг/л	0,2мг/л	0
Zea Mays	62±4%	46±5%	22±6%	21±6%
Cucumis	58±3%	48±4%	28±6%	29±5%

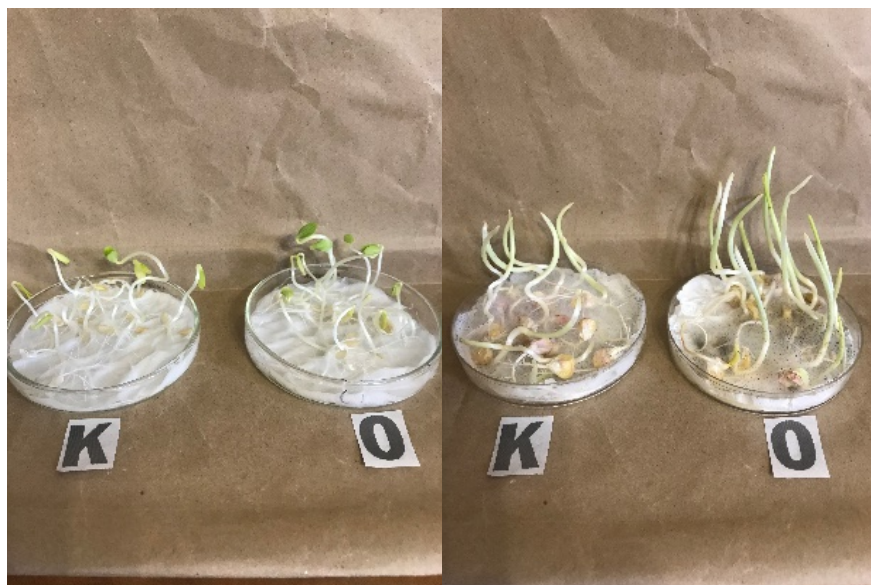


Рисунок 2. Огурцы (слева) и кукуруза, пророщенные в контроле (К) на воде, в опыте (О) на суспензии графена 20 мг/л

двухдневное. Показано, что нанотрубки не проникали внутрь, а остались на поверхности корня. Однако, у других видов – в случае растений риса, например, было показано, что углеродные наноматериалы проникают внутрь проростков [5]. При оптической микроскопии наблюдали у пророщенных в присутствии углеродных наночастиц черные агрегаты С 70 в семенах и корнях, но реже в стеблях и листьях.

Действие углеродных наноматериалов на растения кукурузы.

Повышение эффективности прорастания семян кукурузы под действием сульфидированного графена при концентрации 50 мг/л (0,05мг/мл) показано в работе [6]. Обработка корней проростков кукурузы сульфидированным графеном в концентрации 20, 25, 33, 50 мг/л, приводила к их разрастанию с максимумом эффекта при 50 мг/л, а концентрация 100 мг вызывала ингибирование роста проростков [7]. Такое действие различных концентраций агента привело авторов упомянутого исследования, по аналогии с гормезисом, к гипотезе о механизме воздействия через образование АФК на поверхности углеродных наночастиц. Кроме того, было показано повышение концентрации супероксид аниона и пероксида водорода в обработанной графеном хвое лиственницы [8].

Наши результаты изучения действия суспензии графена в концентрации 20 мг/л на растения огурца и кукурузы детализируют и дополняют известные данные по воздействию на растения кукурузы и огурца основанных на графене материалов при действии растворов с низкой концентрацией. Теперь этот ряд выглядит так: 0 ~ 0,2 г/л - нет эффекта, 2 мг/л ~ 50мг/л - стимуляция прорастания и роста с увеличением эффекта при повышении концентрации графена, 80 мг/л для огурца и 100мг/л для кукурузы - подавление прорастания и ингибирование роста растений. Дальнейшие исследования, по мере накопления данных, покажут степень справедливости гипотезы о роли АФК в регуляции роста растений. Напрямую ли АФК стимулируют рост, являясь регулятором роста, либо путем изменения проницаемости мембран или просто оболочек семян, включают ли они общие механизмы реакции на стресс, изменяют ли они активность ферментов. На эти вопросы ответы должны быть получены при последующих экспериментах.

Список литературы/References:

1. Bhuyan M.S.A., Uddin M.N., Islam M.M., Bipasha F.A., Hossain S.S. Synthesis of graphene. *Int Nano Lett*, 2016, vol. 6, pp. 65-83. doi: 10.1007/s40089-015-0176-1
2. Wang Qinghai, Li Cui, Wang Yu, Que Xiaoe. Phytotoxicity of Graphene Family Nanomaterials and Its Mechanisms: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 2019, vol. 7, 292. doi: 10.3389/fchem.2019.00292
3. Kim M.-J., Kim W., Chung H. *Effects of silver-graphene oxide on seed germination and early growth of crop species*. doi: 10.7717/peerj.8387
4. Canas J.E., Long M., Nations S., Vadan R., Dai L., Luo M., Ambikapathi R., Lee E.H., Olszyk D. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, vol. 27, no. 9 pp. 1922-1931. doi: 10.1897/08-117.1

5. Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A., Rao A.M., Luo Z-H., Ke P.C. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 2009, vol. 5, no. 10, pp. 1128-1132. doi: 10.1002/smll.200801556
6. Chen Z., Zhao J., Song J., Han S., Du Y., Qiao Y., Liu Z., Qiao J., Li W., Li J., Wang H., Xing B., Pan Q. Influence of graphene on the multiple metabolic pathways of *Zea mays* roots based on transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 2021, vol. 16, no. 1, p. 0244856. doi: 10.1371/journal.pone.024485
7. Ren W., Chang H., Teng Y. Sulfonated graphene-induced hormesis is mediated through oxidative stress in the roots of maize seedlings. *The Science of the Total Environment*, 2016, vol. 572, pp. 926-934. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.214.
8. Song J., Cao K., Duan C., Luo N., Cui X. Effects of Graphene on *Larix olgensis* Seedlings and Soil Properties of Haplic Cambisols in Northeast China. *Forests*, 2020, vol. 11, p. 258. doi: 10.3390/f11030258

GRAPHENE SUSPENSION AS A PLANT GROWTH REGULATOR

Apasheva L.M.¹, Dmitriev A. C.³, Lobanov A.V.¹, Mikhailova I. A.³, Rubtsova N. A.¹, Savransky V.V.²

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences.

Kosygin st.4, Moscow, Russia

² Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences.

Vavilov st. 38, Moscow, Russia

³ National Research University Moscow Power Engineering Institute MPEI.

Krasnokazarmennaya st.14, Moscow, Russia

Abstract. A stimulating effect has been studied of low doses of graphene (0.2 mg/l, 2 mg/l and 20 mg/l) on two species – corn and cucumber plants. (Earlier, these species had already been studied regarding stimulation by higher doses, and suppression by even higher doses, of carbon nano-materials.) The graphene used was obtained by original supercavitation method and was characterized by electron microscopy and by the Raman scattering. The spectra of the Raman scattering indicated the presence of 1 to 5 carbon atomic layers thick nanoplates. In this investigation, the maximum stimulating effect of graphene was revealed at the graphene concentration of 20 mg/l in an aqueous suspension. At the concentration of 0.2 mg/l no stimulating effect has been detected.

Key words: *Graphene, Supercavitation, Zea Mays, Cūcumis.*

ФИЗИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ ЧЕРЕДОВАНИЯ ХИРАЛЬНОСТИ В ИЕРАРХИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Горячев Н.С., Иванов П.О.

Институт проблем химической физики РАН

пр. Ак. Семенова, 1, г. Черноголовка, Московская обл., 142432, Россия.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, г. Москва, 119991, Россия.; e-mail: gor_ns@icp.ac.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе рассматривается кривизна дважды скрученных спиралей с различными видами закрученности – правая спираль, скрученная в левую сторону и правая спираль, скрученная в правую сторону. На основе данных о пространственной структуре ДНК, скрученной вокруг гистонового остова, построена геометрическая модель дважды скрученной спирали. С помощью формул дифференциальной геометрии были рассчитаны величины кривизны вдоль линии спирали. Рассмотрены два варианта намотки правой спирали ДНК, в правую спираль и в левую спираль. Показано, что чередование хиральности в иерархической организации макромолекул, на примере ДНК, энергетически в полтора раза выгоднее, чем в случае сохранения хиральности.

Ключевые слова: хиральность, ДНК, кривизна.

В работах [1-3] была выявлена фундаментальная закономерность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белков и нуклеиновых кислот. Наиболее ярко это выражено в структурной организации ДНК. Молекулы дезоксирибозы, соединенные фосфодиэфирными связями, образуют полимерный остов ДНК и являются D-изомерами, тогда как включающие их нуклеотиды находятся преимущественно в левой. Правая двойная спираль ДНК образует левую спираль на гистоновом остове рисунок 1. Аналогичная ситуация со сменой хиральности существует для белковых структур. Левые аминокислоты образуют полипептидную цепь, которая образует правую – спираль; правые-спирали, перевиваясь, образуют левую суперспираль; на четвертом иерархическом уровне белок имеет тенденцию к правой укладке. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур L-D-L-D.



Рисунок 1. Пространственная структура дважды скрученной ДНК, намотанной на гистоны (гистоны не показаны, находятся в центре спирали). Данные взяты из PDB [4] 1AOI. Представлены 146 пар оснований, образующих левую двойную спираль ДНК, скрученные в правую спираль

Наблюдая эти закономерности, невольно возникает вопрос о причинах формирования этих структур. Почему левой(правой) спирали выгодно закручиваться в правую(левую) сторону.

Мы решили рассмотреть этот вопрос с точки зрения сопротивления на изгиб. Согласно закону Гука для изгиба [5]:

$$M = EI * K, \quad (1)$$

где M – момент изгиба, EI – жесткость балки или модуль Юнга, $K=1/r$ – кривизна, равная обратной величине радиуса кривизны.

На основе формулы (1) и используя кривизну в качестве меры внутреннего напряжения спирали (чем больше кривизна, тем больше внутреннее напряжение), мы решили сравнить, как измениться кривизна правой спирали в зависимости от того в какую сторону ее скручивать.

В начале рассмотрим простую правую спираль, которая параметрически выражается формулой:

$$\begin{aligned} x &= R \cos(wt) \\ y &= R \sin(wt) \\ z &= pt \end{aligned} \quad (2)$$

где R – радиус спирали, t – параметр спирали, изменение от 0 до 1 соответствует одному витку, p – шаг спирали вдоль оси z за один виток, w – частота спирали. Из дифференциальной геометрии известно, что кривизна кривой, заданной параметрически, выражается формулой[6]:

$$K = \sqrt{\frac{(\vec{r}' \times \vec{r}'')^2}{(\vec{r}'^2)^3}}, \quad (3)$$

где $\vec{r} \equiv \vec{r}(t) = x(t)\vec{i} + y(t)\vec{j} + z(t)\vec{k}$, $\vec{r}' = dx/dt\vec{i} + dy/dt\vec{j} + dz/dt\vec{k}$, $\vec{r}'' = d^2x/dt^2\vec{i} + d^2y/dt^2\vec{j} + d^2z/dt^2\vec{k}$. Для простой спирали (2) кривизна принимает значение:

$$K = \frac{w^2 R}{p^2 + w^2 R^2}, \quad (4)$$

Из этой формулы следует, что кривизна не зависит от параметра t , что говорит о постоянстве ее вдоль всей спирали. Теперь приведем (без вывода) уравнение спирали, свернутой вдоль большой спирали так, что большая спираль является осью малой спирали:

$$\begin{aligned} x &= R \cos(wt) + R_m \left[\cos(wt) * \cos(vt) - \frac{p}{\sqrt{p^2 + w^2 R^2}} \sin(wt) * \sin(vt) \right] \\ y &= R \sin(wt) + R_m \left[\sin(wt) * \cos(vt) + \frac{p}{\sqrt{p^2 + w^2 R^2}} \cos(wt) * \sin(vt) \right], \\ z &= pt - \frac{w R_m R}{\sqrt{p^2 + w^2 R^2}} \sin(vt) \end{aligned} \quad (5)$$

где t – параметр спирали, изменение от 0 до 1 соответствует одному витку большой спирали, R_m – радиус малой спирали, R – радиус большой спирали, p – шаг большой спирали вдоль оси z , w – частота большой спирали (число витков при изменении параметра t на единицу, равен 2π), v – частота малой спирали. Теперь, вычислив кривизну по формуле (3), можно узнать, как она меняется вдоль кривой (в отличие от одинарной спирали она не постоянна). Ввиду громоздкости формул вывод их мы не приводим.

Для оценки значений кривизны будем использовать параметры спирали, которая образована ДНК на гистонах. Так длина фрагмента ДНК, приходящегося на одну нуклеосому, варьирует и в среднем составляет 200 пар оснований. При этом непосредственно с нуклеосомой связаны 146 пары оснований, которые образуют 1,67 оборота [7]. Гистон представлен в виде октамера и имеет форму цилиндра диаметром 11 нм и высотой 5,5 нм. ДНК имеет диаметр 2 нм и делает один оборот на 10 пар оснований. Исходя из этих данных, были рассчитаны параметры спиралей, которые представлены в таблице 1

Таблица 1. Параметры правой спирали, скрученной в левую спираль и параметры правой спирали, скрученной в правую спираль. Значения подобраны в соответствии размерами ДНК в нм

	правая спираль, скрученная в левую спираль	правая спираль, скрученная в правую спираль
R	6,5	6,5
R_m	1,0	1,0
w	2π	2π
ν	$8,67 \cdot 2\pi$	$8,67 \cdot 2\pi$
ρ	-2,25	2,25

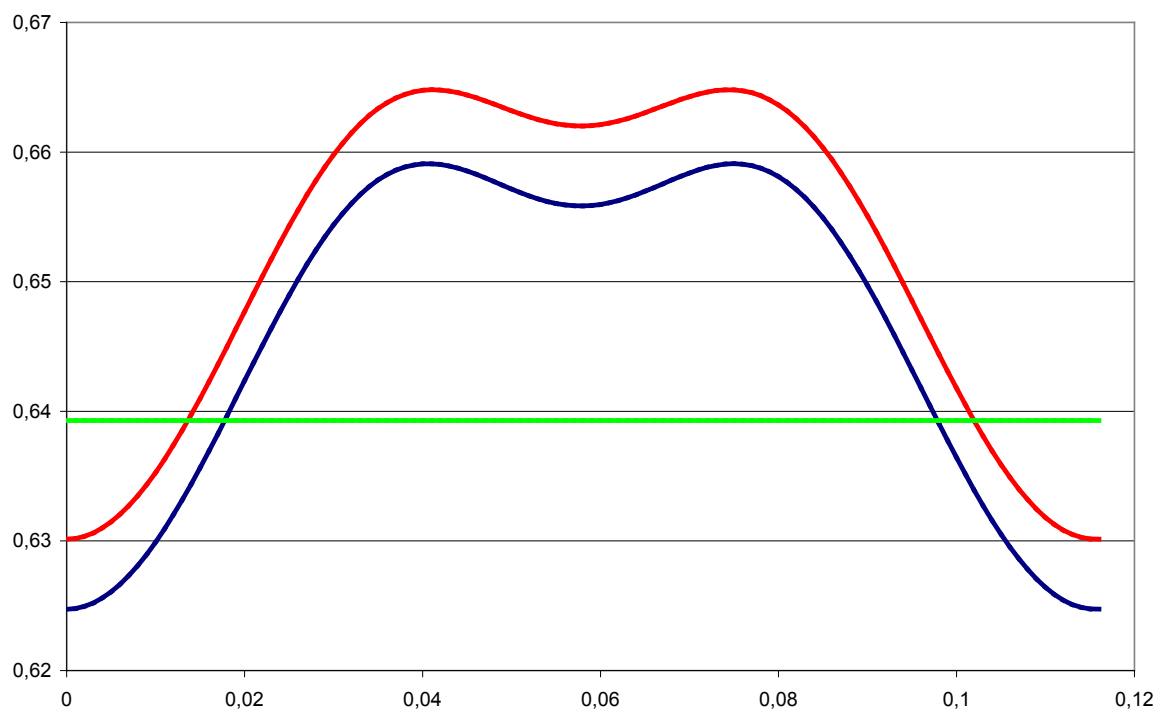


Рисунок 2. Зависимости кривизны дважды скрученных спиралей. Правая спираль, скрученная в левую (синий цвет), правая спираль, скрученная в правую (красный цвет), и прямая правая спираль с постоянной кривизной (зеленый цвет). По оси ординат отложена кривизна в nm^{-1}

В зависимости от знака величины шага большой спирали мы получим разное направление большой спирали, либо левую спираль (если шаг отрицательный), либо правую спираль (если шаг положительный). В результате мы получили зависимость кривизны от параметра t , которая имеет периодическую структуру и повторяется каждый виток малой спирали (рис. 2).

Как известно, энергия упругой деформации пропорциональна квадрату удлинения, а для изгиба – квадрату кривизны. Учитывая, что прямая спираль ДНК находится в равновесном положении, мы будем считать кривизну прямой правой спирали (равную 0,639) за равновесную величину кривизны. Суммируя квадрат разности рассчитанной кривизны и равновесной за один виток малой спирали, мы получим энергетическую меру сравнения для двух видов дважды скрученных спиралей. В окончательном результате у нас получилось 0,0246 для правой спирали, скрученной в левую спираль и 0,0383 для правой спирали, скрученной в правую спираль, что 1,56 раз больше. Исходя из этого, можно сделать вывод, что чередование вида спирали в иерархической организации макромолекул энергетически более выгодно.

Работа выполнена по теме Государственного задания, № АААА-А19-119112590105-7 государственной регистрации.

Список литературы / References:

1. Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Iakovenko L.V. От симметрий - к законам эволюции. I. хиральность как инструмент стратификации активных сред. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 1, p. 146. [Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Iakovenko L.V. From symmetries to the laws of evolution. I. chirality as a tool for stratification of active media. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 1, p. 146. (In Russ.)]

2. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 1, с. 159. [Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 1, p. 159. (In Russ.)]
3. Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Il'chenko S.A., Zhulyabina O.A., Yakovenko L.V. A periodic system of chiral structures in molecular biology. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 331.
4. <https://www.rcsb.org/>
5. Степин П.А. *Сопротивление материалов [Электронный ресурс]: учебник*. Санкт-Петербург: Лань, 2014, 320 с. <https://e.lanbook.com/book/3179>. [Stepin P.A. *Resistance of materials [Electronic resource]: textbook*. St. Petersburg: Lan, 2014, 320 p. (In Russ.)]
6. Погорелов А.В. *Дифференциальная геометрия*. М.: Наука, 1974, 176 с. [Pogorelov A.V. *Differential geometry*. Moscow: Nauka, 1974, 176 p. (In Russ.)]
7. Коряков Д.Е. Модификации гистонов и регуляция работы хроматина. *Генетика*, 2006, т. 42, № 9, с. 1170-1185. [Koryakov D.E. Modifications of histones and regulation of chromatin function. *Russian Journal of Genetics*, 2006, vol. 42, no. 9, pp. 970-984. (In Russ.)]

PHYSICAL REASONS FOR THE ALTERNATION OF CHIRALITY IN THE HIERARCHICAL ORGANIZATION OF BIOLOGICAL STRUCTURES

Goryachev N.S., Ivanov P.O

Institute of Problems of Chemical Physics RAS

Ac. Semenov avenue 1, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia

Lomonosov Moscow State University

GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: gor_ns@icp.ac.ru

Abstract. The paper considers the curvature of double-twisted spirals with different types of twist – the right spiral twisted to the left and the right spiral twisted to the right. Based on the spatial data on DNA structure twisted around the histone backbone, a geometric model of the double-stranded helix was constructed. Using differential geometry formulas, the curvature values along the spiral line were calculated. Two variants of winding the right DNA helix, into the right helix and into the left helix, are considered. It is shown that the alternation of chirality in the hierarchical organization of macromolecules, using DNA as an example, is energetically one and a half times more favorable than in the case of chirality preservation.

Key words: *chirality, DNA, curvature.*

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ РАЗВИТИЯ СТРУКТУР ГЛАЗА ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА (COTURNIX COTURNIX JAPONICA DOM.) УЛЬТРАЗВУКОВЫМИ ВЫСОКОЧАСТОТНЫМИ МЕТОДАМИ

Петронюк Ю.С.¹, Храмцова Е.А.¹, Трофимова Н.Н.¹, Андрюхина О.М.², Рябцева А.А.², Гурьева Т.С.³, Дадашева О.А.³, Левин В.М.¹, Зак П.П.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: jps7@mail.ru

² ГБУЗ МО МОНИКИ им. Владимирского
ул. Щепкина, 61/2, г. Москва, 129110, РФ

³ Институт медико-биологических проблем РАН
ш. Хорошевское, 76а, г. Москва, 123007, РФ

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. Одомашненная популяция Японского перепела *Coturnix japonica* является эффективной животной моделью возрастной офтальмологической направленности. В работе приведены результаты измерения размеров глаза цыплят перепела и его структурных элементов методами сканирующей акустической микроскопии (50-100 МГц). Показана динамика развития структур и их формирование в ранних стадиях постнатального развития. Измерения в условиях *in vitro* были выполнены на 10, 20 и 30-ти дневных цыплятах, а также на 65-ти дневных ювенильных птицах. Получены данные о возрастном формировании размеров и сферичности глазного яблока, роговицы, передней камеры, хрусталика, стекловидного тела. Результаты являются основой для дальнейших исследований по выявлению факторов провоцирования и профилактики ранней миопизации глаза.

Ключевые слова: онтогенез глаза, японский перепел, акустическая микроскопия.

Цыплята Японского перепела, наравне с цыплятами домашних кур, являются распространенной биомоделью различных форм офтальмопатологии, в том числе при моделировании детской миопии [1-5]. Основным преимуществом такой биомодели оказывается чрезвычайно мощная светорегулируемая циркадная мелатониновая система, что позволяет одновременно выполнять исследование процессов миопизации, изучать возможные светорегуляторные функции мелатонина в этих процессах и проводить эксперименты в максимально короткие сроки. Существует гипотеза, согласно которой миопический рост детского глаза по переднезадней оси стимулируется возбуждением красночувствительных и зеленочувствительных колбочек сетчатки, а возбуждение синечувствительных фоторецепторов тормозит этот рост [6,7]. Для экспериментальных исследований в этой области необходимой базой являются методики наблюдения за развитием живых структур с минимальным вмешательством в процессы их жизнедеятельности. Одним из методов прямого наблюдения является ультразвуковая визуализация, позволяющая работать неинвазивно в широком диапазоне рабочих частот и разрешающей способности. В данной работе динамика развития глаза японского перепела исследовалось *in situ* неинвазивным высокочастотным ультразвуковым методом акустической микроскопии в период с 10 по 65 сутки. Показана динамика изменения линейных размеров отдельных структур глаза: роговицы, хрусталика, передней и задней камеры глаза, а также проанализировано комплексное изменение всей оптической системы глаза при нормальном развитии.

Акустическая микроскопия традиционно используется для наблюдения структуры тканей и клеток в биологических [8], эмбриологических [9] и медицинских [10] исследованиях. Первоначально применение метода ограничивалось наблюдением микроструктуры поверхности биологических объектов; но с развитием импульсного режима появилась возможность отображения объемной структуры с микронным разрешением. Короткий зондирующий импульс, распространяясь внутри объекта исследования, отражается от границ элементов его внутренней структуры, регистрируется и визуализируется в виде эхограммы с последовательностью пиков от границ на соответствующей глубине. Механическое сканирование зондирующего ультразвукового пучка позволяет отображать структуру объекта послойно в виде поперечных сечений (В-сканы) и по глубине (С-сканы). Принципы метода описаны более подробно в [11].

В данной работе для исследования структуры и геометрии глаза перепела применялся импульсный акустический микроскоп, разработанный в ИБХФ РАН (СИАМ-2018, РФ). Использовался акустический объектив с рабочей частотой 50–100 МГц, малой угловой апертурой 22° и диаметром фокальной перетяжки 50 мкм. Перемещение акустической линзы осуществлялось прецизионными двигателями с шагом 25 мкм. Основными режимами визуализации было традиционное в медицинской практике А, В и В/D сканирование в виде сечений по глубине [5]. Режим динамической фокусировки - В/D-скан, использовался для обеспечения высокого уровня контрастности акустических изображений по всей глубине сечения. Эхо-импульсным методом измерялись продольные размеры структур глаза с погрешностью порядка ± 15 мкм. В качестве иммерсии использовался ультразвуковой гель низкой вязкости и бидистиллят. Исследования проводились при комнатной температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Время проведения одного эксперимента составляет около 10 минут.

Исследовались глаза японского перепела в возрасте 10, 20, 30 и 65 суток развития в норме. Для получения наиболее достоверной информации при сравнительном анализе ультразвуковых данных птенцы перепела взвешивались и калибровались по весу ± 10 г с точностью ± 1 г.

Исследования проводились *in vitro* со стороны роговицы при их естественном положении в глазных орбитах. Эхограмма сигналов (А-скан) вдоль оптической оси позволяла измерять размер глаза в целом, толщину роговицы и склеры, хрусталика, передней камеры и стекловидного тела. Система сканирования позволила позиционировать акустическую линзу максимально точно по центру глазного яблока, а также измерять размеры глаза в двух перпендикулярных оси направлениях – диаметрах экватора. Измерения проводились для левого и правого глаза для выборки из пары цыплят для каждого возраста 10, 20, 30 и 65 суток.

Эксперимент проводился в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных и приказу Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики».

На рисунке 1а представлено акустическое изображение (В/D-скан) глаза цыпленка перепела возрастом 10 суток. На изображении видны структуры глаза – роговица, передняя камера, хрусталик, стекловидное тело. На рисунке 1б приведена эхограмма импульсов, отраженных от границ структурных элементов. Измерение времени задержки между импульсами с учетом данных о скорости звука позволяет получить расстояние между границами, а именно толщину структурных элементов.

$$d = 0,5 (v \cdot t),$$

где d – толщина измеряемого структурного элемента, v – скорость звука, t – время пробега между границами элемента.

В таблице 1 приведены усредненные литературные данные о скорости звука внутри тканей глаза. Ткани глаза являются сильно обводненными, и величина скорости звука в них приближается к значению, характерному для воды – 1500 м/с. В таблице указаны значения скорости звука для роговицы, хрусталика и склеры, поскольку эти ткани имеют более плотную структуру и, соответственно, эта величина в них несколько отличается от значения для воды. Приведенные данные (табл. 1) использовались для определения толщины структурных элементов глаза вдоль переднезадней оси глаза.

В таблице 2 приведены результаты ультразвуковых измерений – осевая длина, диаметр экватора, толщины роговицы, передней камеры, хрусталика, стекловидного тела. Коэффициент сферичности определялся из соотношения диаметра экватора глаза к осевой длине (переднезадняя ось).

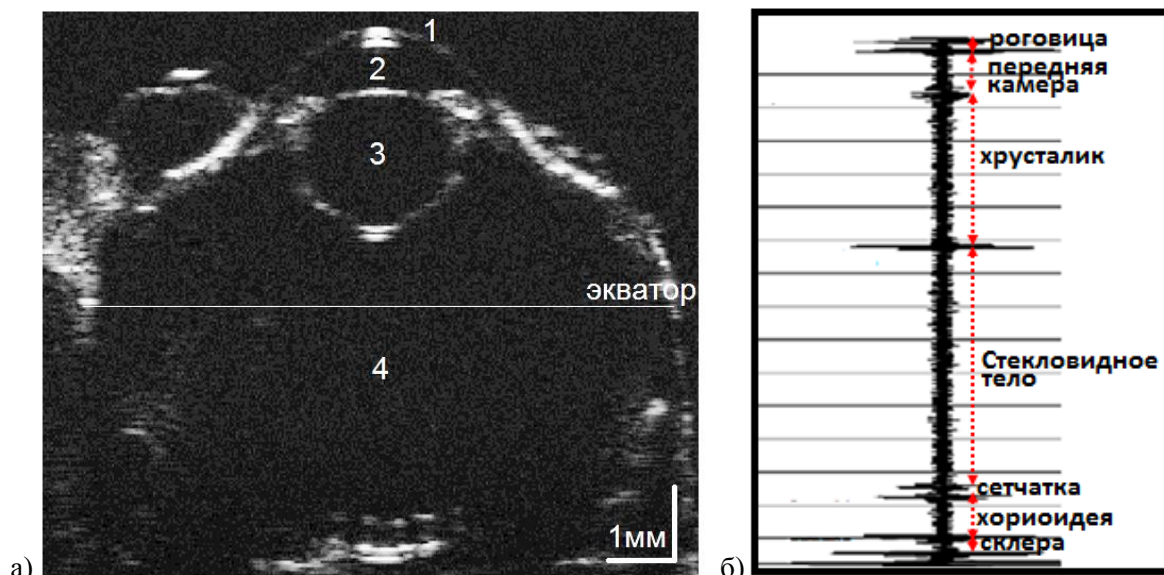


Рисунок 1. Акустическое изображения глаза перепела возрастом 10 дней. (а) – В/D-скан; (б) – эхограмма импульсов переднего отдела глаза. 1 – роговица, 2 – передняя камера глаза, 3 – хрусталик, 4 – стекловидное тело

Таблица 1 Скорости звука в частях глаза по данным из литературы, м/с

Значение	роговица	хрусталик	склера	Стекловидное тело	Вода
среднее	1562,5	1629	1639	1519,5	1500
минимальное	1550	1585	1622	1495	-
максимальное	1575	1673	1656	1544	-

Таблица 2. Результаты ультразвуковых морфометрических измерений глаза *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Приведено среднее значение в миллиметрах для выборки из пары цыплят (4 глаза) для каждого возраста. Величина СКО варьируется внутри погрешности измерения (± 15 мкм)

Возраст, сутки	Осевая длина L , мм	Диаметр экватора D , мм	Коэффициент сферичности L/D	Передняя камера, мм	Роговица, мм	Хрусталик, мм	Стекловидное тело, мм
10	5,85	8,24	0,71	0,60	0,135	1,85	3,05
20	6,45	8,72	0,74	0,58	0,135	2,01	3,55
30	7,20	9,86	0,73	0,61	0,158	2,05	3,97
65	8,15	10,1	0,81	0,85	0,141	2,72	4,37

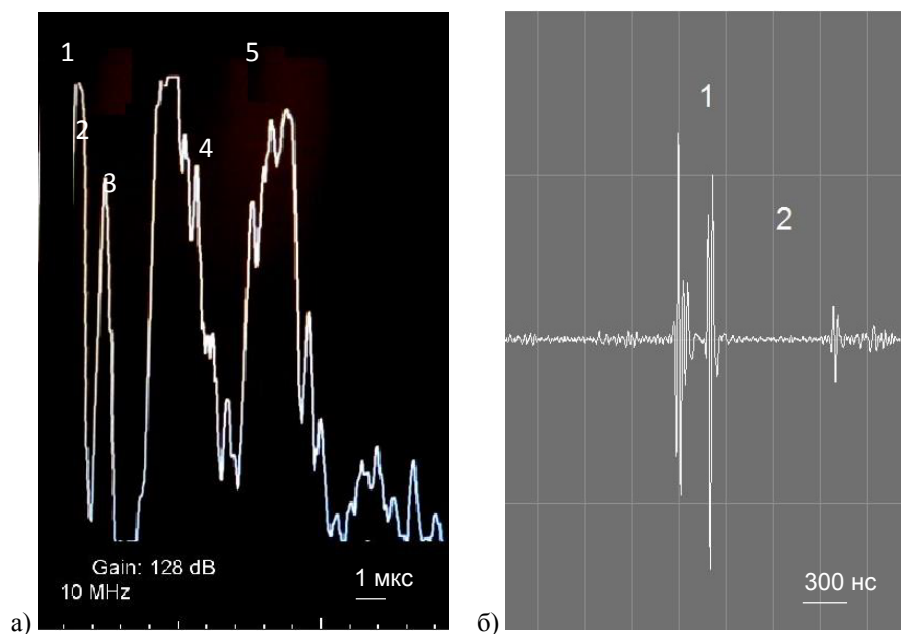


Рисунок 2. Эхограмма глаза Японского перепела при А-сканировании: а) офтальмологический ультразвуковой сканер HiScan OPTICON, (б) – ультразвуковой микроскоп SIAM (ИБХФ РАН), 1 – роговица, 2 – передняя камера, 3 – хрусталик, 4 – стекловидное тело, 5 – склера.

На рисунке 2 показаны эхограммы импульсов, полученных *in vivo* для глаза перепела возрастом 65 суток с использованием ультразвукового офтальмологического сканера HiScan OPTICON, 10 МГц (а) и акустического микроскопа SIAM, 50 МГц (б). На эхограммах видно, что измерения на частоте 10 МГц (HiScan) не позволяют исследовать тонкие структуры глаза, такие как склера и роговица, из-за высокой погрешности $\pm 0,3$ мм. Акустическая микроскопия использует более высокочастотные, сфокусированные и короткие зондирующие импульсы, что позволяет уверенно разделять эхосигналы от более тонких структур и получать данные о размерах структур глаза с точностью ± 15 мкм.

Проведенные измерения показывают, что при нормальном развитии в первой трети жизни глаза перепелов растут пропорционально (коэффициент сферичности) и линейно. Полученные данные о соотношении размеров основных оптических структур глаза перепела могут использоваться в качестве сравнительной шкалы при миопических рефракционных нарушениях. Предполагается дальнейшее исследование влияния спектрального состава освещения на формирование глаза в раннем постнатальном периоде в рамках задач по моделированию детской миопии.

Экспериментальная часть работ выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание).

Список литературы/References:

1. Зак П.П. и др. Экспериментальная модель для исследования механизмов возрастных и дегенеративных изменений в сетчатке глаза человека (японский перепел *C. japonica*). Доклады Академии наук, 2010, т. 434, № 2, с. 272-274. [Zach P.P. et al. Experimental model for studying the mechanisms of age-related and degenerative changes in the human retina (Japanese quail *C. japonica*). *Reports of the Academy of Sciences*, 2010, vol. 434, no. 2, pp. 272-274. (In Russ.)]
2. Wisely C. et al. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, vol. 61, pp. 72-97.

3. Sarfare S. et al. The effects of brief high intensity light on ocular growth in chicks developing myopia vary with time of day. *Exp Eye Res.*, 2020, vol. 195, art: 108039.
4. Sayed J. et al. The chick eye in vision research: An excellent model for the study of ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2017, vol. 61, pp. 72-97
5. Rucker F. Monochromatic and white light and the G regulation of eye growth. *Experimental Eye Research*, 2019, vol. 184, pp. 172-182.
6. Qian Y.S. et al. Incidence of myopia in high school students with and without red-green color vision deficiency. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, vol. 50, no. 4, pp. 1598-1605
7. Liu R. et al. The effects of monochromatic illumination on early eye development in rhesus monkeys. *Investig. Ophthalm. and Visual Science*, March, 2014, vol. 55, pp. 1901-1909.
8. Lemons R.A., Quate C.F. Acoustic microscopy: biomedical applications. *Science*, 1974, vol. 188, pp. 905-911.
9. Foster F.S., Zhang M.Y., Duckett A.S., Cucevic V., Pavlin C.J. In vivo imaging of embryoni development in the mouse eye by ultrasound biomicroscopy. *Investig. Ophthalm. and Visual Science*, 2003, vol. 44, pp. 2361-2366.
10. Sasaki H., Saijo Y., Tanaka M., Nitta S., Terasawa Y., Yambe T., Taguma Y. Acoustic properties of dialysed kidney by scanning acoustic microscopy. *Nephrol. Dial. Transplant*, 1997, vol. 12, pp. 2151-2154.
11. Zakutailov K.V. et al. *Inorganic Materials*, 2010, vol. 46, p. 1655.

ANALYZING THE DYNAMICS OF THE JAPANESE QUAIL EYE STRUCTURES DEVELOPMENT BY SCANNING ACOUSTIC MICROSCOPY TECHNIQUE

Petrynyuk Y.S.¹, Khramtsova E.A.¹, Trofimova N.N.¹, Andriukhina O.M.², Ryabtseva A.A.², Gurieva T.S.³, Dadasheva O.A.³, Levin V.M.¹, Zak P.P.¹

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences
Kosygin st., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: jps7@mail.ru

² Moscow Regional Research and Clinical Institute "MONIKI"
Shchepkin str. 61/2, Moscow, 129110, Russia

³ Research Center Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences
Khoroshevskoe Shosse, 76a, Moscow, 123007, Russia

Abstract. The domesticated population of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica dom.*) is an effective animal model of age-related ophthalmological orientation. The paper presents the results of the size measuring of quail chickens eye and its structural elements using scanning acoustic microscopy technique (50-100 MHz). The dynamics of the eye structures development and their formation in the early stages of postnatal development are shown. In vitro measurements were performed at 10, 20 and 30-day-old chickens, as well as on 65-day-old juvenile birds. Data on the age-related formation of the size and configuration of the eyeball, cornea, anterior chamber, lens, vitreous body were obtained. The results are the basis for further research to identify factors that provoke and prevent early myopization of the eye.

Key words: ontogeny of the eye, Japanese quail, acoustic microscopy.

О ВОЗМОЖНОЙ ВНЕШНЕЙ ОБУСЛОВЛЕННОСТИ СПЕКТРА ОКОЛОЧАСОВЫХ ПЕРИОДОВ

Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

ул. Институтская, 3, г. Пушкино, Московская обл., 142290, РФ; e-mail: victor.panchelyuga@gmail.com

Поступила в редакцию: 18.07.2021

Аннотация. В работе представлены результаты исследований периодов в диапазоне 10-300 мин во временных рядах флуктуаций процессов различной природы. Данные исследования позволили выявить спектр периодов, повторяющийся в исследованных временных рядах, в том числе, биологического происхождения. В настоящей работе рассматриваются дальнейшие исследования этого спектра, а также его совпадение с околочасовыми ритмами, которые, как было продемонстрировано в ходе более чем полувековой истории их исследований, присутствуют в динамике практически любых биологических систем. Такое совпадение, по нашему мнению, свидетельствует о наличии внешнего синхронизатора околочасовых ритмов.

Ключевые слова: околочасовые периоды, универсальный спектр периодов, флуктуации, синхронизация.

1. Введение. Околочасовые ритмы.

В настоящее время известен колебательный характер изменения многих параметров биологических объектов (морфологических, биохимических, физиологических) от субклеточного до популяционного уровня [1-3] с периодами от годовых до суточных (циркадных). Существуют аргументы в пользу как эндогенного («биологические часы»), так и экзогенного их происхождения.

Наряду с медленными колебаниями (циркадными, сезонными, годовыми), совпадающими с периодикой геофизических процессов и быстрыми – обнаруженными в разных биохимических реакциях, существует многочисленная литература об околочасовых ритмах (ОР) [4-9]. Эти колебания с периодами от десятков минут до нескольких часов были обнаружены в середине XX-века. ОР выявлены в динамике многих биологических систем: размерах клеточного ядра, интенсивности синтеза белка, активности ферментов, концентрации гормонов и АТФ, потребления кислорода, pH цитоплазмы, в органных и организменных ритмах дыхания, в сердечных сокращениях, в активности мозга, в поведенческих реакциях животных и человека и др. Они обнаружены у бактерий, дрожжей, некоторых других одноклеточных, моллюсков, у млекопитающих. Эти ритмы выявляются как *in vivo* так и *in vitro* [4-9].

Отмечается, что несмотря на интенсивные исследования, окончательно механизм возникновения ОР установить не удалось. Возможно, причина этого в том, что данный механизм обусловлен не только биологическими, но в первую очередь физическими свойствами биоструктур. Физическая природа ОР подтверждается следующими факторами: 1) независимостью ритмики ОР от температуры в интервале 18-37 градусов, в то время как биохимические реакции резко от нее зависят; 2) не найдет датчик времени или внутренний пейсмейкер ОР; 3) ОР не зависят ни от ядерного ни от АТФ-контроля; 4) ОР наблюдаются даже на тенях эритроцитов, а не только на полноценных клетках. Общность ОР в разных клетках и их органеллах подтверждает универсальность этого явления и его механизма, не связанного со спецификой биохимических процессов в каждом отдельном случае [4,5].

В обзоре [6] природа ОР связывается с одним из трех возможных механизмов: 1) периодические внешние воздействия; 2) генетическая обусловленность; 3) ОР, как имманентное свойство протоплазмы, не навязанное извне, генетически не запрограммированное и не требующее особой регуляции. Очень интересным является предположение [6] о фрактальной природе ОР.

Суммируя [4-9] можно заключить, что в большинстве работ авторы, в первую очередь, рассматривают ОР только как результат внутренних регуляторных процессов организма или межклеточных взаимодействий. В настоящей работе мы хотели бы представить аргументы в пользу внешней природы фактора, являющегося синхронизатором этих ритмов.

2. Универсальный спектр периодов во временных рядах флуктуаций процессов различной природы.

В работе [10] нами был впервые представлен локальный фрактальный анализ шумоподобных временных рядов методом всех сочетаний (МВС-метод). Данный метод является дальнейшим развитием метода минимальных покрытий (ММП) [11], который модифицирует традиционно используемый метод покрытий прямоугольниками, вводя требование минимальности покрытия, достигаемое в случае, когда величина покрывающего прямоугольника точно равняется величине размаха (разности между максимальным и минимальным значением) функции на отрезке временного ряда для которого вычисляется фрактальная размерность. Как показано в [11], выполнение данного требования обеспечивает более быстрый выход на асимптотический режим и дает возможность определения фрактальной размерности на основе значительно более коротких отрезков временных рядов. Более быстрый выход на асимптотический режим достигается благодаря

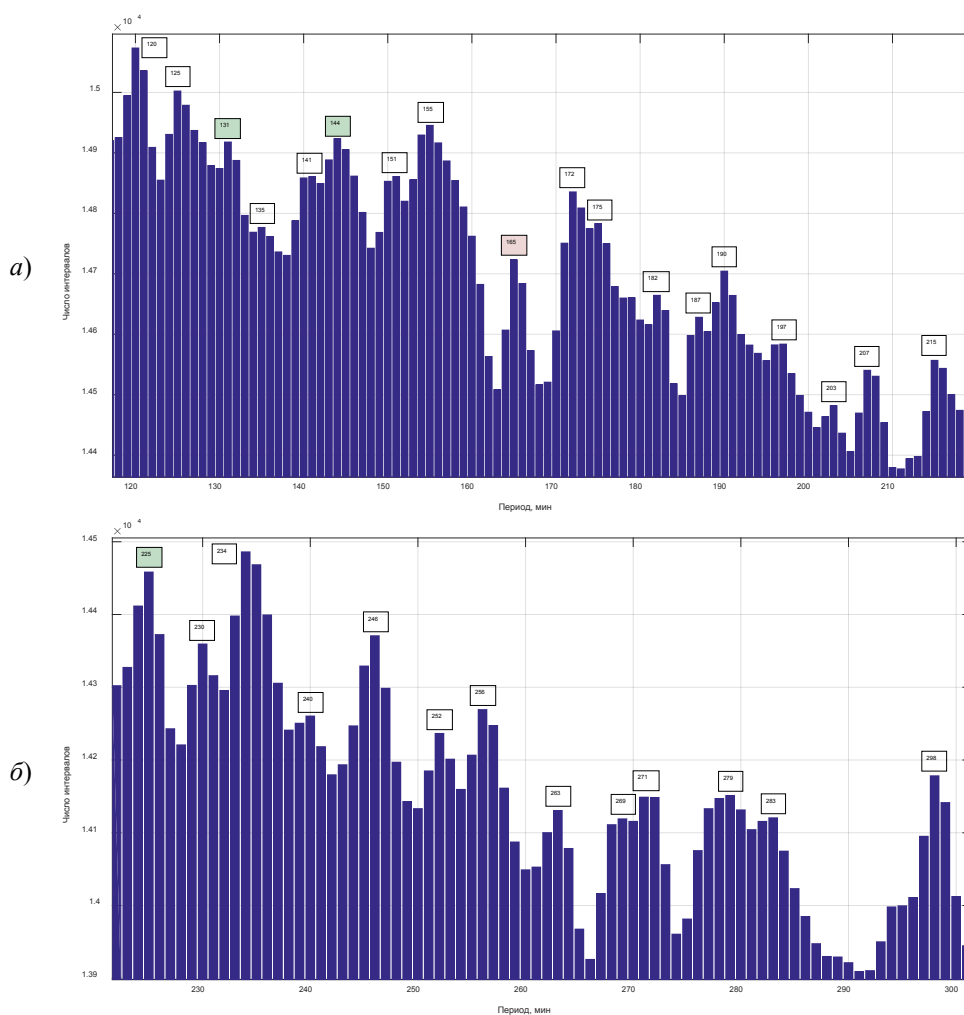


Рисунок 1. Суммарный спектр периодов в флуктуациях скорости альфа-распада для диапазона 120-220 мин, а) и 220-300 мин, б)

устранению ошибки, возникающей из-за того, что «высота» покрывающего прямоугольника, как правило, не совпадает с размахом анализируемого отрезка временного ряда. Использование минимальных покрытий полностью устраняет данную ошибку, имеющую чисто алгоритмическую природу. По образному выражению авторов ММП-метода, идея минимальных покрытий убирает масштаб по оси Y.

Т.о., МВС-метод [10] соединил в себе основные идеи ММП-метода с требованием инвариантности фрактальной размерности относительно линейных преобразований (сдвиги, растяжения, зеркальные отражения), а также относительно перестановок элементов отрезка временного ряда, на основе которого вычисляется фрактальная размерность. Последнее свойство является отличительной особенностью МВС-метода, придающей ему ряд уникальных свойств. Важнейшим из них является локальность - возможность вычисления фрактальной размерности для коротких (десятки точек) отрезков анализируемого временного ряда. При этом, в отличие от ММП-метода, для отрезка временного ряда длиной $N = 2^n$ МВС-метод позволяет проанализировать $N - 1$ масштабов, а не n , как в ММП-методе и других методах, обычно используемых для вычисления фрактальной размерности. Благодаря этому свойству величина N может быть значительно уменьшена, а точность определения фрактальной размерности существенно возрастает. Также хотелось бы особо отметить, что в случае использования МВС-метода, значение N не обязано быть кратным 2^n , а может быть любым.

Свойство инвариантности относительно перестановок элементов временного ряда достигается благодаря изменению концепции анализа фрактальной размерности: вместо процедуры разбиения временного ряда на фиксированные отрезки длины которых равняются анализируемому временному масштабу, используются все возможные сочетания из элементов анализируемого отрезка временного ряда, соответствующие анализируемому временному масштабу. Такой подход позволяет устранить ошибки вычисления фрактальной размерности, обусловленные наличием «выпадающих» элементов временного ряда, возникающих при «механическом» разбиении его на последовательные отрезки. Использование метода всех сочетаний устраняет этот недостаток и, если продолжить упомянутую выше аналогию, устраняет масштаб по оси X.

Одним из первых результатов использования МВС-метода для анализа шумоподобных временных рядов является исследование 329-суточного массива флуктуаций скорости α -распада обнаружившее устойчивый набор периодов в диапазоне 1–115 мин [12]. Также, в работе [12] было показано, что найденные периоды с хорошей

точностью совпадают с периодами собственных колебаний Земли. Это совпадение проявляется как для классических, так и для т.н. сейсмогравитационных или длинноволновых колебаний Земли [12].

Для указанного диапазона периодов была показана не только тесная связь найденного спектра со спектром собственных колебаний Земли, но также его универсальный характер: спектры периодов, найденные для флуктуационных процессов в системах различной природы всегда совпадали с соответствующей частью спектра, найденного для временных рядов флуктуаций скорости α -распада [12]. В силу универсального характера спектра, впервые найденного в [12], в дальнейшем он был назван «универсальным спектром периодов» (УСП).

Свойство универсальности, впервые отмеченное в [12], было подтверждено дальнейшими исследованиями. УСП был найден в флуктуациях температуры мелких млекопитающих и птиц [13] в т.ч., с различным уровнем метаболизма [14]. Также было показано наличие УСП во временных рядах флуктуаций хемилюминесценции планарий [15].

Результаты, рассмотренные выше, относятся к диапазону периодов 1–120 мин. В настоящей работе выполнен дальнейший МВС-анализ 329-суточного массива флуктуаций скорости альфа распада, использованного в [12], для исследования спектра периодов в диапазоне 120–300 мин. Используя методику, описанную в [10], был получен спектр, показанный на рис. 1. Для лучшей визуализации спектр разделен на две части и представлен в виде двух графиков. Значения периодов показаны в прямоугольных рамках над соответствующими пиками.

3. Спектр периодов в диапазоне 10–300 мин, наблюдаемый во временных рядах флуктуаций температуры мелких млекопитающих.

Результаты, представленные в п. 2, были получены с использованием МВС-анализа результатов 329-суточного массива 1-секундных измерений флуктуаций скорости альфа-распада. В случае временных рядов биологического происхождения, 1-секундное разрешение, зачастую, является избыточным, в силу медленности изменения измеряемых величин. Так, для рассмотренных ниже, временных рядов флуктуаций температуры, измерения чаще, чем один раз в минуту, практически, не имеет смысла. В то же время, применение МВС-анализа для 1-мин временных рядов приводит к тому, что минимальный анализируемый временной масштаб будет порядка одного часа и получаемые МВС-спектры, в этом случае, становятся несоизмеримыми со спектрами, описанными в п.2. Поэтому, для временных рядов флуктуаций, полученных при низком временном разрешении, необходим другой метод анализа. Метод, который дал хорошие результаты в выявлении УСП для 1-минутных временных рядов флуктуаций температуры, представлен ниже.

Данный метод предполагает, что измерения должны выполняться так, чтобы получить синхронные временные ряды измерений флуктуаций некоторого параметра. Ниже, для определенности, рассмотрим пример группы, состоящей из четырех крыс, у которых измеряли температуру тела с частотой 1 раз в минуту при помощи имплантированных внутрибрюшинно датчиков температуры ДТНЗ-28 («ЭМБИ РЕСЕРЧ», Новосибирск).

Пары измеренных временных рядов флуктуаций температуры, полученные от разных животных, разбивались на пересекающиеся отрезки длины которых изменялись от 10 мин до 300 мин с шагом 1 мин. Эти отрезки почленно суммировались для каждого значения длины – получали пары суммарных, синхронных отрезков для которых вычислялся коэффициент корреляции r . Т.о., для каждой пары временных рядов получали вектор r_{ij} значений коэффициентов корреляции для 290 значений длины отрезков (10...300мин).

Все возможные парные сочетания для четырех временных рядов даются матрицей R (1):

$$R = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{21} & r_{31} & r_{41} \\ r_{12} & r_{22} & r_{32} & r_{42} \\ r_{13} & r_{23} & r_{33} & r_{43} \\ r_{14} & r_{24} & r_{34} & r_{44} \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ r_{12} & 0 & 0 & 0 \\ r_{13} & r_{23} & 0 & 0 \\ r_{14} & r_{24} & r_{34} & 0 \end{pmatrix} \quad (1)$$

Т.к., диагональные элементы (корреляция отрезка с самим собой) ведут к тривиальному результату, а $r_{ij} = r_{ji}$, то рассмотрение имеет смысл только для верхней или нижней треугольных матриц. В (1), для определенности, выбрана нижняя треугольная матрица, как это показано в правой части выражения. Как следует из (1) для массива из 4-х временных рядов возможны шесть парных сочетаний, r_{ij} .

После того как были исследованы все возможные парные сочетания временных рядов (1) полученные шесть векторов r_{ij} почленно суммировались. Результат суммирования, для четырех анализируемых временных рядов, представлен на рисунке 2. Т.к., отдельные r_{ij} нормированы на единицу, а результат суммирования не нормирован, то рисунок 2 позволяет оценить степень совпадения «резонансных» значений периодов. Видно, что для некоторых периодов наблюдаются очень выраженные пики.

После этого суммарный спектр, показанный на рисунке 2, сглаживался два раза методом, скользящего среднего с использованием пуассоновского треугольного окна. Полученный результат приведен на рисунке 3. Спектр на рисунке 3 для большей наглядности разбит на две части, аналогично рисунку 1.

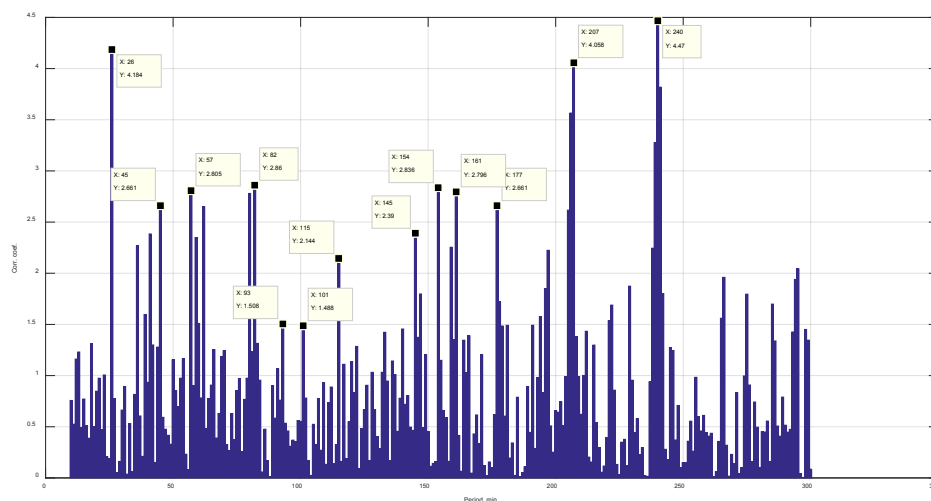


Рисунок 2. Суммарный спектр во временных рядах флуктуаций температуры у четырех крыс

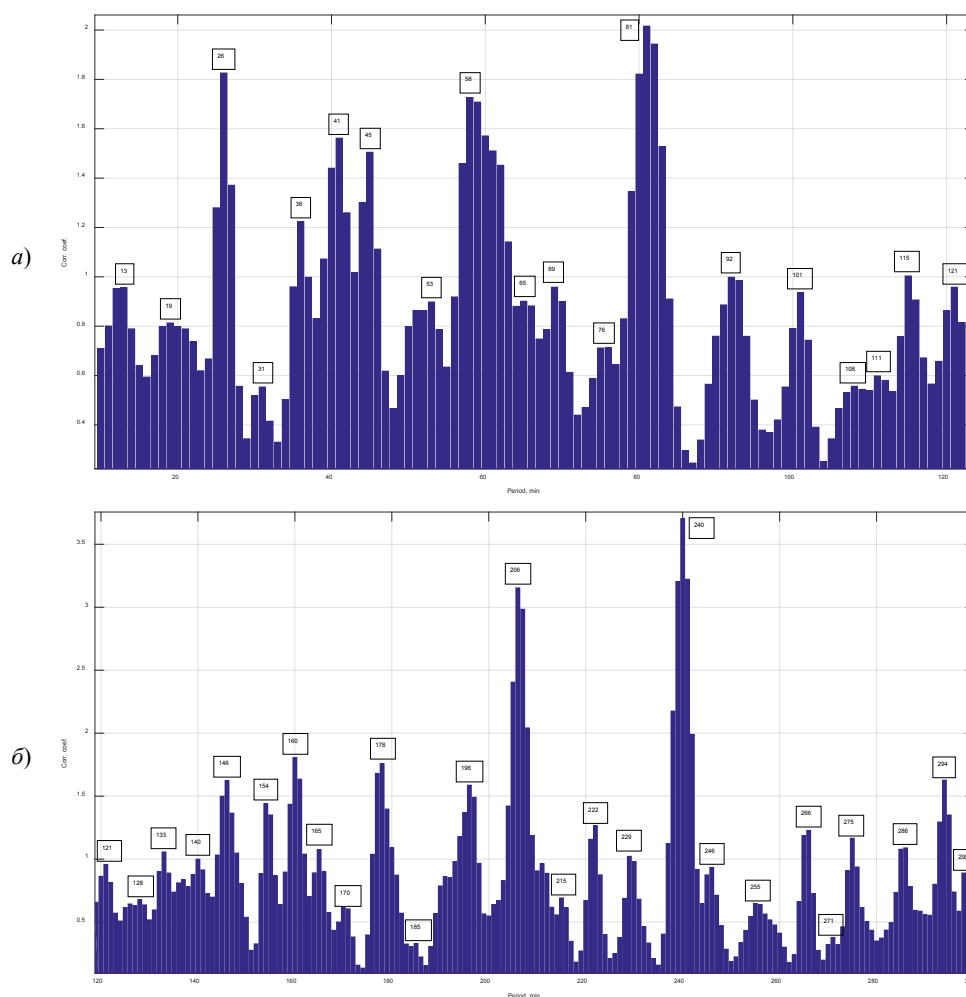


Рисунок 3. Части суммарный сглаженный спектр периодов для диапазона 10-120 мин, а) и 120-300 мин, б)

Как следует из рисунка 3, для некоторых значений периодов усреднения наблюдается повышенная корреляция между суммарными отрезками. Значения таких периодов, приведены над соответствующими пиками на рисунке 3. Результат, представленный на рисунок 3, в действительности, отражает тот факт, что для пар суммарных отрезков, длины которых совпадают с периодами УСП, коэффициент корреляции значительно выше.

Необходимо подчеркнуть, что спектры периодов, подобные приведенным на рисунке 3, при неизменности их частотной структуры, демонстрируют большую вариабельность амплитуд пиков. Поэтому, чтобы более четко выявить структуру спектра были затабулированы 1873 пика на спектрах, аналогичных показанному на рисунке 3, и построена гистограмма частоты встречаемости пиков в диапазоне 10-300 мин, которая показана на рисунке 4. Как следует из рисунка 4, некоторые пики встречаются на порядок чаще других.

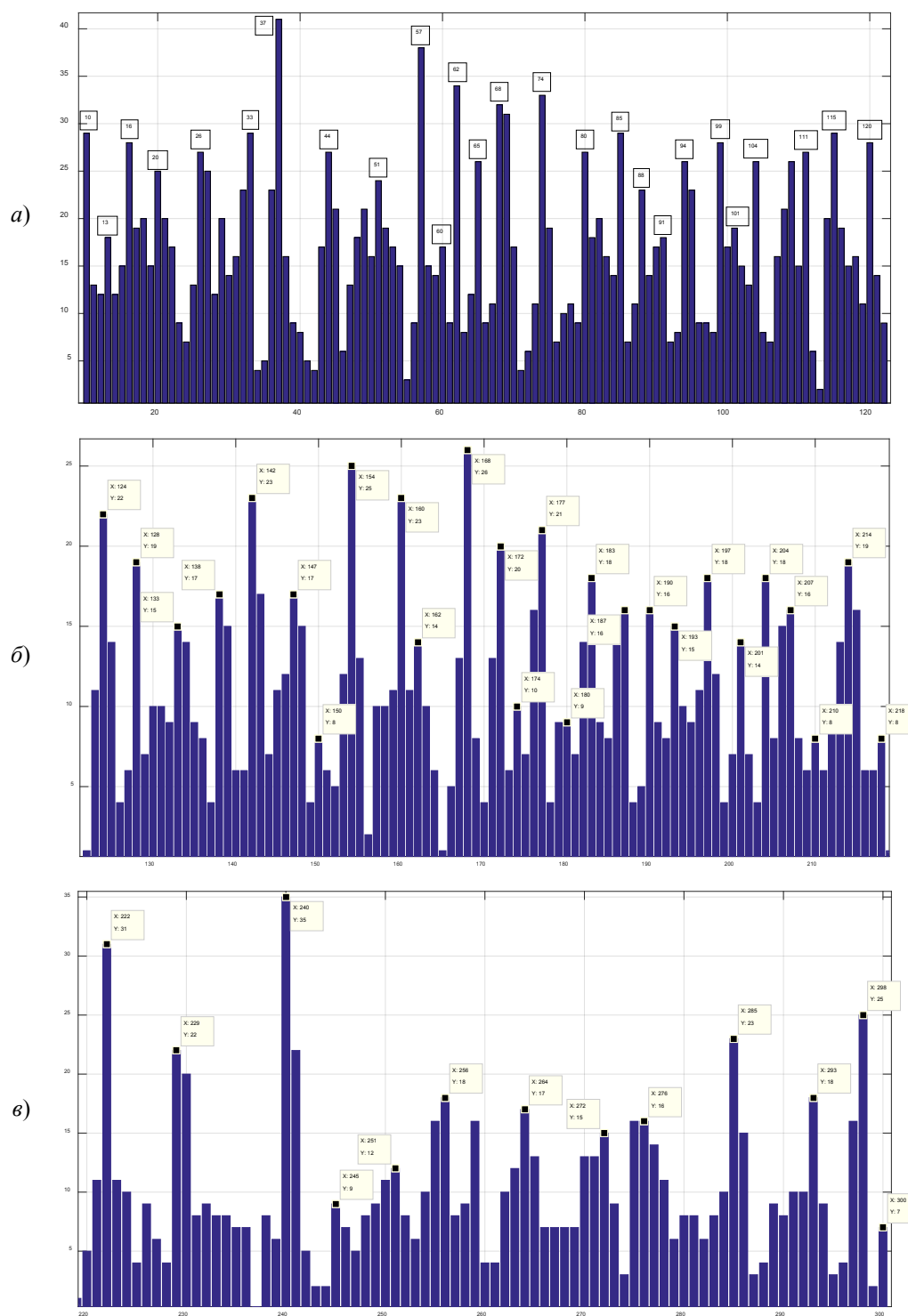


Рисунок 4. Частоты встречаемости пиков на суммарных спектрах периодов во временных рядах измерений флуктуаций температуры млекопитающих в диапазоне 10-120 мин, а) 120-220 мин, б) и 220-300 мин, в). Ось X – периоды, мин; Ось Y – число пиков, соответствующих данному периоду

Внимательное изучение распределения частоты встречаемости пиков, показанного на рисунке 4а), выявляет еще одну интересную закономерность: пики, присутствующие на данном распределении группируются в блоки (например, 26...33, 80...85, 88...91, 99...104, 115...120, и т.д.) «внутри» которых частота встречаемости пиков значительно выше, чем за пределами блока. Такая же блочная структура просматривается и на других распределениях, представленных на рисунке 4. На наш взгляд, наличие такой «блочной» структуры на рисунке 4, является следствием фрактальной структуры УСП. Очевидно, что дальнейшее изучение отмеченных фрактальных свойств, требует анализа, основанного, с одной стороны, на большем количестве экспериментальных временных рядов, а с другой, – на временных рядах, полученных с большим временным разрешением.

Таблица 1. Значения ОР- и УСП-периодов (мин)

ОР	УСП		ОР	УСП		ОР	УСП		ОР	УСП		ОР	УСП	
12	13	12	32	-	32	45	44	46	75	74	75.5	150	150	151
18	18	-	33	33	-	50	51	51	80	80	80	180	180	182
22	20	21.3	34	-	34.4	55	-	55.8	90	91	-	240	240	240
24	-	25	36	37	36.9	60	60	60.7	100	99	99.8			
27	26	27.5	40	-	41.3	66	65	65	105	104	106.3			
30	29	-	42	-	43	69	68	68.3	120	120	118			

Необходимо отметить, что подобная структура наблюдается также для спектра собственных колебаний Земли, который, как было отмечено выше, тесно связан с УСП. Так, например, период основной моды сфероидальных колебаний собственных колебаний Земли (табличное значение: 53.86 мин), в действительности, является мультиплетом (52.3, 53.06, 53.84, 54.68, 55.6 мин [16]), т.е., демонстрирует «блочную» структуру, аналогичную таковой на рисунке 4.

4. Заключение. Совпадение ОР с УСП

В работах [13-14] было показано совпадение УСП со спектрами периодов в флуктуациях температуры мелких млекопитающих и птиц, а также со спектром периодов в флуктуациях хемилюминесценции планарий [15] для диапазона периодов 10-120 мин. Рассмотрим такое совпадение для диапазона 120-300 мин, т.е. для спектров, приведенных на рисунке 1 и рисунках 3, 4.

Точность определения периодов на обоих спектрах равна ± 1 мин., следовательно, два периода «перекрываются», считаются совпадающими если разность их значений не превышает 2 мин. С учетом этого замечания на рисунке 1 «пустые», не закрашенные прямоугольники обозначают те периоды, которые совпадают с периодами на рисунке 4 в пределах указанной точности. Три периода (131, 144 и 225 мин) имеют величины, которые отличаются на три минуты. Эти периоды помечены прямоугольниками со светло-зеленым фоном. И один период (165 мин), присутствующий на рисунке 1, не выражен на рисунке 4. Он помечен прямоугольником со светло-красным фоном.

Учитывая, что каждый пик на рисунке 1 состоит из некоторого количества (3-6) линий, можно ожидать, что использование других рядов флуктуаций скорости альфа-распада может привести к совпадению пиков, отмеченных светло-зелеными прямоугольниками. Т.о., за исключением пика 165 мин, можно считать, что остальные 30 пиков спектра рисунка 1 с хорошей точностью совпадают со спектром рисунка 4 и, поэтому, мы можем утверждать, что совпадение УСП [12] со спектром периодов во временных рядах флуктуаций температуры мелких млекопитающих и птиц, отмеченное в [13,14] для диапазона периодов 10–120 мин, подтверждено также и для диапазона 120–300 мин.

В таблице 1 даны значения ОР, которые приведены в [8-9]. Справа от каждого значения ОР даны соответствующие величины УСП-периодов. Первое значение УСП-периода соответствует периодам, найденным в флуктуациях температуры мелких млекопитающих, рисунке 4, а второе – значению УСП периода, приведенного в [12] и на рисунке 1, для периодов, которые больше 120 мин. Как следует из таблицы 1, наблюдается практически полное соответствие ОР- и УСП-спектров в пределах, отмеченной выше точности ± 1 мин. Очевидно, что в силу отмеченного совпадения, флуктуации температуры млекопитающих, можно рассматривать как одно из интегральных проявлений ОР, наряду с процессами перечисленными в п. 1.

Такое совпадение периодов в спектрах, представленных в таблице 1, которые получены с использованием временных рядов флуктуаций в процессах кардинально различной природы: физических (альфа-распад) и биологических (флуктуации температуры млекопитающих, ОР) на наш взгляд, говорит о наличии внешнего синхронизатора этих ритмов. В пользу именно внешнего синхронизатора говорит также явление, впервые отмеченное в [14], и заключающееся в значительно более четкой выраженности УСП-спектра в флуктуациях температуры млекопитающих в случае пространственно-разнесенных измерений, когда 1) животные не контактируют между собой и 2) воздействующий на них внешний фон является различным. Т.е., в случае, когда устраняются вклады, связанные с «локальной синхронизацией».

Наличие такого внешнего синхронизатора вступает в кажущееся противоречие с «внутренними» механизмами ОР, которые, в некоторых случаях, детально исследованы [8,9]. Но, как известно, необходимым условием синхронизации является автоколебательный характер синхронизируемых систем [17]. Если генераторы ОР рассматривать, как автоколебательные системы, частоты которых близки к частотам УСП, то, как известно [17], такая система может быть синхронизована сколь угодно слабым внешним воздействием.

В этом случае возникает вопрос о том, как частоты «ОР-генераторов» оказались близкими к частотам УСП? Исходя из отмеченной выше связи УСП со спектром собственных колебаний Земли, которые так или иначе модулируют практически все процессы в литосфере (микрофлуктуации атмосферного давления, флуктуации электрического и магнитного полей и др. [16]) и которые, практически в неизменном виде, присутствовали в ходе всей биологической эволюции, задавая слабый, но очень стабильный частотный фон на котором происходило формирование ныне существующих биосистем. Очевидно, наличие такого фона должно вести к «эволюционному импринтингу» УСП-частот, что в конечном итоге и привело к отмеченному выше совпадению ОР- и УСП-периодов.

Список литературы / References:

1. Шноля С.Э. *Биологические часы*. М., Мир, 1964, 694 с. [Shnol S.E. *The biological clock*. M.: Mir, 1964, 694 p. (In Russ.)]
2. *Колебательные процессы в биологических и химических системах*. М.: Наука, 1967, т. 1. [Oscillatory processes in biological and chemical systems. M.: Nauka, 1967, vol. 1. (In Russ.)]
3. *Колебательные процессы в биологических и химических системах*. Пушино, 1971, т. 2. [Oscillatory processes in biological and chemical systems. Pushchino, 1971, vol. 2. (In Russ.)]
4. Эйдус Л.Х., Литинская Л.Л. *О природе клеточной ритмики*. Препринт. Институт биологической физики АН СССР, 1973, Пушино-на-Оке, 20 с. [Eidus L.Kh., Litinskaya L.L. *On the nature of cellular rhythm*. Preprint. Institute of Biological Physics of the Academy of Sciences of the USSR, 1973, Pushchino-on-Oka, 20 p. (In Russ.)]
5. Эйдус Л.Х., Литинская Л.Л. О биофизическом механизме околочасовой ритмики и ее роли в обмене веществ. *Биофизика*, 2006, т. 51, вып. 1, с. 108-115. [Eidus L.Kh., Litinskaya L.L. On the biophysical mechanism of circadian rhythm and its role in metabolism. *Biophysics*, 2006, vol. 51, iss. 1, pp. 108-115. (In Russ.)]
6. Бродский В.Я. О природе околочасовых (ультрадианных) внутриклеточных ритмов. Сходство с фракталами. *Известия АН, Сер. биологическая*, 1998, № 3, с. 316-329. [Brodsky V.Ya. On the nature of near-hourly (ultradian) intracellular rhythms. Similarity to fractals. *Izvestiya AN, Ser. biologicheskaya*, 1998, № 3, pp. 316-329. (In Russ.)]
7. Бродский В.Я. Околочасовые метаболические ритмы. *Биохимия*, 2014, т. 79, вып. 6, с. 619-632. [Brodsky V.Ya. Near-hour metabolic rhythms. *Biochemistry*, 2014, vol. 79, iss. 6, pp. 619-632. (In Russ.)]
8. Lloyd D., Rossi E.L. *Ultradian rhythms in life processes*. Springer-Verlag, 1992, 419 p.
9. Lloyd D., Rossi E.L. *Ultradian rhythms from molecules to mind*. Springer, 2008, 450 p.
10. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. Фрактальная размерность и гистограммный метод: методика и некоторые предварительные результаты анализа шумоподобных временных рядов. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 2, с. 377-384. [Panchelyuga V.A., Panchelyuga M.S. Fractal Dimension and Histogram Method: Algorithm and Some Preliminary Results of Noise-Like Time Series Analysis. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 283-289. (In Russ.)]
11. Dubovikov M.M., Starchenko N.V., Dubovikov M.S. *Physica A*, 2004, 339, pp. 591-608.
12. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. Локальный фрактальный анализ шумоподобных временных рядов методом всех сочетаний в диапазоне периодов 1-115 мин. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 2, с. 395-410. [Panchelyuga V.A., Panchelyuga M.S. Local Fractal Analysis of Noise-Like Time Series by the All-Permutations Method for 1-115 min Periods. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 317-330. (In Russ.)]
13. Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. Динамика температуры тела у мелких млекопитающих и птиц в 10-120-минутном диапазоне периодов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2020, т. 169, № 6, с. 706-711. [Diatroptov M.E., Panchelyuga V.A., Panchelyuga M.S. Body Temperature Dynamics in Small Mammals and Birds in 10-120-min Period Range. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2020, vol. 169, no. 6, pp. 765-770. (In Russ.)]
14. Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С., Суров А.В. Околочасовые ритмы температуры тела у млекопитающих и птиц с разным уровнем обмена веществ. *Доклады российской академии наук. Науки о жизни*, 2020, т. 494, № 1, с. 472-476. [Diatroptov M.E., Panchelyuga V.A., Panchelyuga M.S., A.V. Surov Circadian Rhythms of Body Temperature in Mammals and Birds with Different Metabolism Levels. *Doklady Biological Sciences*, 2020, vol. 494, no. 1, pp. 228-231. (In Russ.)]
15. Panchelyuga V.A., Tiras Kh.P., Novikov K.N., Panchelyuga M.S., Nefedova S.E., Seraya O.Yu. On universal nature of periods spectrum in time series of planaria chemiluminescence. *CEUR Workshop Proceedings*, vol. 2763, pp. 61-63.
16. *Сейсмогравитационные колебания Земли*. [Seismogravitational oscillations of the Earth. (In Russ.)]
17. Пиковский А., Розенблюм М., Куртс Ю. *Синхронизация*. М.: Техносфера, 2003, 508 с. [Pikovsky A., Rosenblum M., Curts Yu. *Synchronization*. M.: Technosphere, 2003, 508 p. (In Russ.)]

ON POSSIBLE EXTERNAL NATURE OF CIRCAHORALIAN PERIODS SPECTRA**Panchelyuga V.A., Panchelyuga M.S.**

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS

Institutskay 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: victor.panchelyuga@gmail.com

Abstract. The paper presents studies of periods in the range of 10-300 min in time series of fluctuations of processes of various nature. The research data made it possible to identify a spectrum of periods, repeating in the studied time series, including those of biological origin. The work discusses further studies of this spectrum, as well as its coincidence with circadian rhythms, which, as has been demonstrated in the course of more than half a century of their research, are present in the dynamics of almost any biological systems. Such a coincidence, in our opinion, indicates an external nature of circadian rhythms synchronizer.

Key words: circadian periods, universal spectrum of periods, fluctuations, synchronization.

СЕЛЕКТИВНАЯ ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ TRICHOPLAX (PLASOZOA) НА RGB – СВЕТОВЫЕ СТИМУЛЫ

Капцов В.А.¹, Дейнего В.Н.¹, Козырицкий Д.В.²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт гигиены транспорта Роспотребнадзора
Пакгаузное шоссе, 1, корп. 1, г. Москва, 125438, РФ; e-mail: kapcovva39@mail.ru

² Гимназия № 8 имени Н.Т. Хрусталева
ул. Хрусталева, 45, г. Севастополь, 299029, РФ; e-mail: d.kozyrsky@gmail.com

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. При гигиенических исследованиях актуальной задачей является поиск простых многоклеточных животных с социальным поведением для решения фундаментальных вопросов взаимодействия клеток с дестабилизирующими факторами внешней среды. К таким факторам относится световая среда, которая через спектральный состав света управляет биологическими часами живых организмов. Свет через систему ганглиозных клеток глаз и шишковидную железу с ее системой «серотонин-мелатонин» управляет «циркадными ритмами» человека. Шишковидная железа в своей структуре имеет пространственное распределение микрокристаллов CaCO_3 , клетки синтеза серотонина и мелатонина из триптофана, а также нейропептидную сеть. Поиск животного для исследования и моделирования процессов в шишковидной железе человека является актуальной гигиенической задачей. Таким модельным животным может стать Trichoplax (Placozoa), имеющий простейшую организацию среди известных организмов всего с шестью различными типами клеток, но с выдающимся социальным поведением. Проведен теоретический анализ спектрального состава света и степени его поляризации в морской среде обитания простейшего многоклеточного животного Trichoplax (Placozoa), а также особенностей его генно-клеточного строения. Исходя из законов гидрооптики и стратегии выживания («пища-жертва») определены координатные оси световой среды для Trichoplax: (световая вертикаль (395 нм) и две горизонтальные световые оси – отраженный горизонтальный свет от пищи (зеленый – 532 нм) и исходящий от арагонитового панциря хищника флуоресцентный свет (красный – 630 нм). На основании реакций животного на эти RGB световые стимулы высказана и подтверждена гипотеза о наличии RGB-таксиса у Trichoplax. Для управления Trichoplax выбраны монохромные световые сигналы красный – 630 нм, зеленый – 532 нм и синий – 395 нм.

Ключевые слова: световые стимулы, Trichoplax, кристаллические клетки, арагонит, шишковидная железа, кристаллы кальцита, фототаксис, триптофан, серотонин, нейропептидная сеть, циркадные ритмы.

Одним из ключевых факторов, влияющих на здоровье человека, является свет, который действует на шишковидную железу, ответственную за циркадные ритмы и синтез, серотонина и мелатонина из триптофана. Шишковидная железа состоит из клеток с кристаллами кальцита и нейропептидной сети, которая связана с нейронами мозга человека. Одной из актуальных проблем гигиены является поиск простых и недорогих в содержании биологических объектов для проведения исследований по влиянию света на биохимические процессы, протекающие в системе «кристаллы кальцита и нейропептидная сеть». Такие животные найдены – это Trichoplax, которые представляют собой новые модельные организмы с огромным потенциалом для многих областей биологических, биомедицинских и гигиенических исследований [1].

Многоклеточные животные Trichoplax в своей структуре содержат кристаллические клетки кальцита, нейропептидную сеть, нейромедиатор серотонин, в них обнаружен триптофан и каналы для мелатонина. Изучение данного животного представляет интерес не только для специалистов по гигиене света, но и труда, коммунальной, гигиене детей и подростков, гигиене питания, как простая биологическая модель для проведения экспериментов по изучению неблагоприятных влияний на живые клетки. Специалисты считают, что этот вид может стать научной суперзвездой, несущей ключи к истокам развития многоклеточных животных, мозга и рака.

Trichoplax (Placozoa) – это простейшее многоклеточное животное, появившееся 780 миллионов лет назад и дожившее до наших дней. Представляет собой «блинчик» размером менее 2 мм, толщиной 25 мкм, состоящий из трех слоев клеток и обитающий в теплых морях на глубине от 5 до 20 м [1]. С биологической точки зрения знания о его жизнестойкости, клеточном строении и межклеточном взаимодействии, а также коллективном поведении имеют большую ценность для познания эволюционных процессов развития животных и человека. Поиск светочувствительной системы у Trichoplax и открытие у него RGB-таксиса приоткрывает тайны выживания и эволюции цветного зрения у многоклеточных.

Основное условие эволюции – выживание в среде обитания, которая характеризуется спектром света, пищевыми ресурсами, множеством хищников, концентрацией веществ и газов (Ca, Na, Mg, Ru) в воде, уровнем кислотности pH, температурой. Эволюционный закон выживания определяет клеточное строение животного, функциональное взаимодействие между клетками и симбионтами, а также поведенческую реакцию животного на воздействия (изменения концентрации веществ, химические, световые), окружающей среды. Изменение концентрации Ca и Mg в воде влияет на животное Trichoplax: оно распадается на клетки при уменьшении

концентрации этих ионов или собирается из клеток вновь при возвращении концентрации веществ в норму. Выделяемые пищей вещества останавливают *Trichoplax* над ней с большой точностью. Животное *Trichoplax* выживает сотни миллионов лет в морской сине-зеленой световой среде. Это говорит о том, что сенсорная система *Trichoplax* и его строение отвечают закону необходимого разнообразия – для устойчивого существования биологической (в том числе кибернетической) системы необходимо, чтобы она обладала внутренним разнообразием, требуемым для блокирования любых внешних и внутренних возмущений [2].

Высокая жизнеспособность простейшего многоклеточного животного *Trichoplax* H2 при минимально необходимом внутреннем разнообразии определяется наличием: – клеток (шесть типов клеток при их общем количестве около 50000 штук); – симбиотов (бактерии *Grellia incantans* G. и Рутмания); – генов (геном *Trichoplax* включает 11,5 тысяч генов [3]); – сенсоров – кристаллических клеток (0,2% от общего количества клеток). Это минимальное разнообразие и привлекло внимание к простейшему животному *Trichoplax* исследователей из университетов многих стран, которые в основном изучают:

- генно-клеточное строение *Trichoplax*, типы клеток: вентральные эпителиальные; липофильные; железистые; волокнистые; дорсальные эпителиальные. Кристаллические клетки, содержащие кристалл арагонит, были открыты только в 2014 г. [4];
- процессы пищеварения, хемотаксиса и размножения *Trichoplax* [5];
- функционирование нейропептидной [6] системы и нейромедиаторов. Активно исследуется роль триптофана и серотонина в жизни *Trichoplax* [7];
- различные каналы (ионов кальция, натрия и сигнальных молекул NO).

В кристаллических клетках обнаружены натриевые потенциалы действия [8], определяющие биомеханику движения тела животного и его клеток [9, 10], система кристаллических клеток с кристаллами арагонита – как гравитационные сенсоры [11, 12]. В то же время мы не нашли работы, в которых бы рассматривались вопросы фототаксиса и тем более RGB-таксиса.

Проблема состоит в том, что сегодня отсутствует классификация сенсорных систем *Trichoplax*, а механизмы их действия малоизучены и полны противоречий. Авторами проанализированы работы международного коллектива исследователей *Trichoplax* различных континентов. Инициаторами работ по изучению биологии *Trichoplax* (в частности, электрической активности его кристаллических клеток, нейропептидной системы и сигнальных молекул NO) являются Л. Мороз (Флоридский университет) с соавторами, российский специалист по пластинчатым М. Никитин (МГУ им. Ломоносова), а также сотрудники Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Д. Романова и И. Смирнов [13-15]. Ранние исследования о *Trichoplax* изложены в книге Серавина Л.Н. и Гудкова А.В. [16]. Каролин Смит, нейробиолог из Национального института здоровья в Бетесде (США, штат Мэриленд) и Томас Риз обнаружили в протонервной системе *Trichoplax* клетки, которые содержат разновидность минерального кристалла. Этот кристалл всегда опускается на «дно» клетки, независимо от того, в каком положении находится животное: стоит он ровно, под наклоном или перевернут. Таким образом, *Trichoplax* использует эти клетки, чтобы «почувствовать», где находится верх, а где низ [17]. Каролин Смит указывает, что кристаллические клетки являются частью протонервной системы *Trichoplax*. Это важное положение для понимания роли митохондрий в кристаллической клетке и влияния системы этих клеток на поведенческие реакции *Trichoplax*. Новые знания о строении и поведении *Trichoplax* обсудят на Конференции «Origin of metazoans» (2021 г. Роскофф (Франция)). На ней с докладом «Типы клеток плакозоя – аналоги типов клеток других типов животных?» выступит специалист по кристаллическим клеткам (как гравитационным датчикам) Татьяна Майорова (NIH, Bethesda, США). Также считается, что *Trichoplax* движется по псевдослучайной траектории к пище и является необучаемым и неуправляемым животным [11]. Вопросам динамики движения клеток в теле *Trichoplax* уделяет большое внимание группа исследователей под руководством профессора Ману Пракаш (Университет Стэнфорд, США) [9,10]. В этих исследовательских центрах специалистами не рассматривались вопросы влияния водной световой среды на генно-клеточное формирование *Trichoplax* и его поведенческие реакции. Только в одной статье говорилось о том, что ночью в чашке Петри активность *Trichoplax* ограничена (они собираются в группу), а при свете они разбегаются [18]. Эффект «разбегания» группы *Trichoplax* под воздействием яркого искусственного светодиодного света (от подсветки предметного столика оптических микроскопов) наблюдали многие исследователи, но при этом каждый давал свою трактовку этому эффекту [7,20].

В природе жизнь животного *Trichoplax* тесно связана с солнечным светом, который меняет интенсивность и спектр, поярусно наполняя морские глубины красками цветов. Водный мир в сине-зеленом свете на глубине обитания *Trichoplax* от 5 до 20 м наполнен многообразием цветов, которое увеличивается за счет флуоресцентного света от кристаллов арагонита, гуанина и других органических соединений флоры и фауны. В этом многообразии цветов световых стимулов простейшее многоклеточное животное *Trichoplax* ориентируется уже 780 миллионов лет и успело накопить большой список генов опсинов (RDD38879.1, RDD36429.1). В морской воде эти многоклеточные по свету от флуоресценции и отраженному свету распознают врагов и источники пищи. При этом происходит межвидовая коммуникация [21] и ориентация животного в координатах «свет – цвет пищи – цвет врага». Для ориентации в этом хаосе цветов необходимо выбрать систему световых координат и команд для соответствующей поведенческой реакции (пища - стоп и можно есть, продолжить движение, опасность – изменить направление движения).

Световая среда обитания характеризуется уровнем освещенности, спектром света, степенью его поляризации. Для морских обитателей ключевой характеристикой света является поляризация, так как многие

обитатели морской стихии имеют в светочувствительной системе линзы из кристаллов кальцита (арагонита), который обладает двулучепреломлением. Это основа их поляризационного зрения, эффективность которого усиливается при наличии в глазах отражателей из кристалла гуанина. Также эти кристаллы на чешуе рыб обеспечивают их обладателям невидимость на углах атаки хищников [20], а флюоресценция этих кристаллов обеспечивает межвидовую коммуникацию [21,23].

Поляризованный свет сужает сектор обзора животного, но обеспечивает ему «квазипрямолинейное» движение к цели (источнику пищи). Для расширения сектора обзора необходимо иметь множество разнонаправленных фоточувствительных датчиков с арагонитом, как у хитона, или постоянно крутить телом, на котором находятся эти световые датчики. В поляризованном свете в мутной воде видно дальше и контрастней. Подводная поляризация света является максимальной, когда вы смотрите под углом 90° в сторону от основного направления распространения света, и минимальной при направлении взгляда, как по направлению распространения света, так и от него. Опускаясь глубже, независимо от положения солнца, самый яркий свет идет сверху вниз, поэтому поляризация минимальна, если смотреть прямо вверх и прямо вниз, и максимальна, если смотреть горизонтально [24]. Если смотреть снизу-вверх (от дна на поверхность моря), то в соответствии с законом полного отражения будет виден светлый круг, из которого истекает свет [25]. Этот свет является световой вертикалью и несет информацию для многоклеточного, где находится верх. Зелено-фиолетовый свет освещает зеленые водоросли (пища для *Trichoplax*), которые в отраженном (поляризованном) свете имеют ярко-зеленую окраску. У маленького *Trichoplax* есть враги, например, брюхоногие моллюски или стрекающие [26]. Панцирь всех моллюсков содержит карбонат кальция (CaCO_3), который может находиться в виде двух модификаций: - арагонита — характерен для более древних моллюсков; перламутровый слой всегда состоит только из арагонита; - кальцита — по-видимому, эта модификация более позднее приобретение моллюсков.

Кристаллы кальцита (арагонита) при облучении светом 395 нм светятся красным светом 630–650 нм. Этот горизонтально распространяющийся свет демаскирует хищника и многоклеточные *Trichoplax* покидают его территорию. Итак, для пространственной ориентации у многоклеточного *Trichoplax* есть три световые координаты. Это две горизонтальных координаты - направления на зеленый и красный свет и одно вертикальное направление - фиолетовый свет, идущий сверху вниз (гелиовертикаль). В лучах фиолетового света животное *Trichoplax* узнает, где находится пища или враг.

Исходя из особенностей клеточного строения (в частности, наличия кристаллических клеток с кристаллами арагонита) и перечня генов опсинов была высказана гипотеза о наличии RGB-таксиса у животного *Trichoplax*. Рассмотрим, насколько генно-клеточное строение *Trichoplax* способствует стратегии выживания и ориентации по световым координатам (фиолетового, зеленого и красного света). Фиолетово-зеленый свет интегрально воздействует на все клетки *Trichoplax*, при этом кристаллические клетки по своему строению выполняют роль светового сенсора по следующим характеристикам:

- большое количество этих клеток в теле одного животного (75 шт), подобно тому, как у моллюска хитона имеется множество арагонитовых глаз;

- размещение их в зоне края пластинки тела (10-20 мкм от края);
- наличие в них кристалла арагонита (как основы поляризационного зрения);
- тесная связь с другими клетками (с волокнистыми и липофильными) актиновыми нитями [11].

Систему кристаллических клеток хорошо видно в поляризованном свете на краях пластинчатого тела *Trichoplax* H2. У животного *Trichoplax* H4 под слоем верхних дорсальных клеток расположены ряды кристаллических клеток [8] содержащих линзовидные, ромбовидные кристаллы арагонита ~ 2 мкм в диаметре, чашевидное ядро, прилегающее к одной стороне клетки, и две центрально расположенные митохондрии, фланкирующие кристалл арагонита. Эти кристаллы арагонита обновляются, как у хитона. За их формирование в кристаллических клетках отвечает процесс биоминерализации [27]. Множество двулучепреломляющих кристаллов арагонита оказывает влияние на характер движения *Trichoplax*. Перед началом движения *Trichoplax* вращается и после нескольких оборотов движется в выбранном направлении. Такое сканирующее движение системой кристаллических клеток характерно для животного, у которого имеется поляризационное зрение, а также для систем, проводящих стохастическую оценку величины и направления светового сигнала.

При этом необходимо отметить, что кристалл арагонита при облучении светом 395 нм светится красным светом 630 нм, который благотворно влияет на фланкирующие его митохондрии. Красный свет стимулирует выработку митохондриями дополнительной порции АТФ [28] или кванта энергии [29], если она (митохондрия) находится в протонервной системе [17] и в клетке есть окись азота, которая подавляет выработку АТФ [31]. Этот факт очень интересен в свете открытия в кристаллических клетках *Trichoplax* потенциал-зависимых каналов действия [30].

О функционировании и строении кристаллических клеток в настоящее время известно мало, но исследования их строения продолжаются [11, 30]. Так в работе [11] показано следующее:

- эпителиальные клетки, контактировавшие с кристаллическими клетками, принадлежали эпителию по окружности животного и имели столбчатую форму с узким концом на поверхности. Более того, они отличались от других эпителиальных клеток тем, что содержали заметные пучки актиновых нитей по всему периметру [11];
- слой актина окружает кристаллические клетки [11]. Возможно, сокращение актиновых нитей вызывает формирование центров сжатия на верхней поверхности дорсальных клеток [9].

В работах [13,30] приведены результаты комбинированного анализа геномных, молекулярных и микрохимических исследований, демонстрирующие присутствие в кристаллических клетках *Trichoplax* функциональных ферментов синтеза монооксида азота (NOS) [13, 30].

Субстратом для NO-синтаз в синтезе оксида азота NO является L-аргинин [13], который является оптически активным. В зависимости от его концентрации меняется плоскость поляризации обыкновенного и необыкновенного лучей света, исходящих из кристалла арагонита. Окись азота может влиять на режим функционирования митохондрий [31], которые фланкируют кристалл арагонита. L-аргинин с металлоорганическими соединениями, может организовывать светочувствительные комплексы, такие как рутений-полипиридин [32] и другие металлы [33]. Они могут поглощаться из морской воды или из синие-зеленых водорослей и взаимодействовать с азотистыми соединениями цитоплазмы, в которых имеются дополнительные включения - светлые и темные пузырьки и аппарат Golgi [11, 30]. Известно, что с помощью везикулярного транспорта прошедшие через аппарат Golgi белки доставляются «по адресу» в зависимости от полученных ими в аппарате Golgi «меток». Везикулярный транспорт способствует формированию в кристаллической клетке кристалла арагонита [34], а наличие белков, гуанина и цитоплазмы создает предпосылки для формирования иридоцитов на поверхности чашевидного ядра.

Иридоциты — пигменты, в которых чередуются слои белковых пластин, кристаллов гуанина и цитоплазмы [19]. Из-за разных показателей преломления этих слоев пигменты интерферируют световые волны и могут отражать свет от ультрафиолетового до дальнего красного. Функции у пигментов иридоцитов самые разные: они могут предотвращать диффузию газов, защищать от перегрева, быть частью зрительной системы, помогать внутривидовой коммуникации или служить маскировкой. Отражающие свойства кристаллов гуанина зависят от их ориентации, которая может определяться параметрами внешнего магнитного поля [35-37]. Наличие в кристаллических клетках иридоцитов позволит расширить их функциональную роль.

Сегодня точные функции кристаллических клеток не классифицированы и учеными рассматриваются разные гипотезы их функционального назначения. В работах [11] экспериментально доказывается гипотеза, что кристаллические клетки являются статоцитами. Автор работы [11] считает: поскольку кристаллы кажутся достаточно тяжелыми, чтобы менять положение внутри кристаллической ячейки в ответ на гравитацию и разрушаются во время секционирования, мы предположили, что на самом деле это маленькие камни; - кристаллы CaCO_3 толщиной от 30 до 150 мкм встречаются в некоторых хитонах [38,39], хрупких морских звездах [40] и вымерших трилобитах [41], где они, как полагают, фокусируют свет, но кристаллы в *Trichoplax*, по-видимому, слишком малы, чтобы функционировать таким образом [11]. По данным работы [11], эксперименты проводились в затемненном помещении при постоянной цветовой температуре света, исходящего из прецизионного светового короба с регулируемой интенсивностью и контролем температуры (Northern Light Technologies, Inc., Канада). Стеклобанный контейнер с *Trichoplax* помещали на пластиковую чашку Петри, центрированную по уровню освещенности поверхности от светильника (светового короба) (освещенность 276 люкс). Известно, что светильники Northern Light Technologies, Inc., Канада применяются для светотерапии человека (при управлении циркадными ритмами) и построены на базе энергосберегающей лампы Northern Light Technologies с цветовой температурой 3500 К с подавлением УФ в спектре светильника. В спектре данного источника света преобладают красные и зеленые составляющие. Энергетически преобладает зеленый свет, фотоны которого имеют большую энергию, чем фотоны красного света [42]. По данным работы [11], при зелено-красном спектре света светильника Northern Light Technologies животные *Trichoplax* с разным содержанием кристаллических клеток вели себя по-разному на вертикальной стенке стеклянного контейнера. Возникает вопрос, что определило поведенческую реакцию *Trichoplax* в этом эксперименте - сила тяжести или спектральный состав света?

В рамках этого вопроса приобретает актуальность высказанная гипотеза о том, что у *Trichoplax* присутствует RGB-таксис. Для экспериментальной проверки гипотезы о наличии RGB-таксиса у *Trichoplax* под руководством руководителя проекта «*Trichoplax* для бионики» д.б.н. Кузнецова А.В. были проведены экспериментальные исследования на базе лаборатории биоразнообразия и функциональной геномики Мирового океана ФИЦ «ИнБЮМ им. А. О. Ковалевского РАН».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на лабораторных животных *Trichoplax* sp. H2. Культивирование животных в лабораторных условиях осуществлялось в закрытых чашках Петри, заполненных фильтрованной морской водой (соленость 35‰, pH 7,6–8,2) в холодильном шкафу (Серийный номер A279251217. Фирма Polair.) В условиях длительного культивирования у животных отсутствовали значительные морфологические изменения [43]. Исследования поведенческой реакции *Trichoplax* выполняли с использованием современных методов оптической микроскопии:

- оптический микроскоп Nikon Eclipse Ts2R-FI;
- оптические микроскопы: Nikon SMZ-1270, Stemi 305;
- оптический микроскоп «Леонардо 3.0» (специально разработанный под проект), позволяющий одновременно наблюдать поведение группы *Trichoplax* и каждого *Trichoplax* этой группы при низком уровне освещенности и стабильной температуре водной среды его обитания. В микроскопе были применены две веб-камеры – верхняя с матрицей 1,9 Мп и нижняя – 5 Мп). Микроскоп был оборудован манипулятором для подачи по оптоволокну световых стимулов. С двух камер изображение выводилось на экран ноутбука HP laptop Model14-

dk0028ur, на котором записывались и хранились видеофайлы. Фиксация поведенческой реакции животных осуществлялась с помощью цифровой камеры INFINITY.

Для описания реакции животного на световые стимулы мы использовали следующую терминологию:

- кинезис – это ненаправленное движение организма или клетки в ответ на стимул, поиск комфортного уровня освещенности.

- таксис – это движение или ориентация клетки, организма или части организма в ответ на внешний стимул и движение к стимулу или от него. Фототаксис- движение на свет или от света без анализа спектра.

- RGB-таксис – это селективная поведенческая реакция на световой стимул с разной длиной волны (разного цвета). RGB-таксис предполагает, что у животного имеется способность к анализу и принятию решения при регистрации световых стимулов с различной длиной волны.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований была применена технология черного ящика, которая заключалась в следующем: животных по стандартной методике помещали в чашку Петри, фиксировали их положения на видеокамеру, после чего с помощью оптоволокну подавались световые сигналы (532 нм, 630 нм, 395 нм) к местам нахождения животных и осуществлялась видеофиксация их поведения. Источники световых стимулов были выбраны исходя из спектра солнечного света, достигающего глубин обитания *Trichoplax*, поляризованных источников света в среде его обитания, строения кристаллических клеток и перечня генов опсинов. Обобщенные данные выбора приведены в таблице 1.

Для исключения влияния постороннего освещения на проводимый эксперимент был собран оптический микроскоп «Леонардо 3.0» с двумя веб-камерами, которые могут работать с минимальным уровнем освещенности, намного меньшим, чем указанный в работе [11]. Предметный столик микроскопа был обклеен светопоглощающей черной тканью. Данный микроскоп позволил открыть эффект RGB-таксиса у *Trichoplax*.

Фрагменты изменения формы тела *Trichoplax* при воздействии УФ 395нм представлены на рисунке 1.

Таблица 1. Обобщенные результаты выбора световых стимулов

Характеристика светового стимула	Глубина, на которой поглощается 99% света, (м)	Наличие генома опсина, соответствующего определенной длине волны света	Источники света в среде обитания	Источники света для моделирования
УФ 395нм	107	RDD38879.1 Violet-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2]	Солнечная гелиовертикаль	Профессиональный фонарь геолога
Зеленый	113	RDD36429.1 Green-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2]	Отраженный от водорослей свет	Лазер 532нм с оптоволоком
Красный	4	Вопрос открыт	Отраженный от арагонитового панциря хищника моллюска свет	Лазер 630нм-650нм
Синий	254	RDD38730.1 Blue-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2] RDD42761.1 Blue-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2] RDD39212.1 Blue-sensitive opsin [<i>Trichoplax</i> sp. H2]		Светодиодные источники света при 6500К
Оранжевый и Желтый	25 и 51	нет		Лампа накаливания

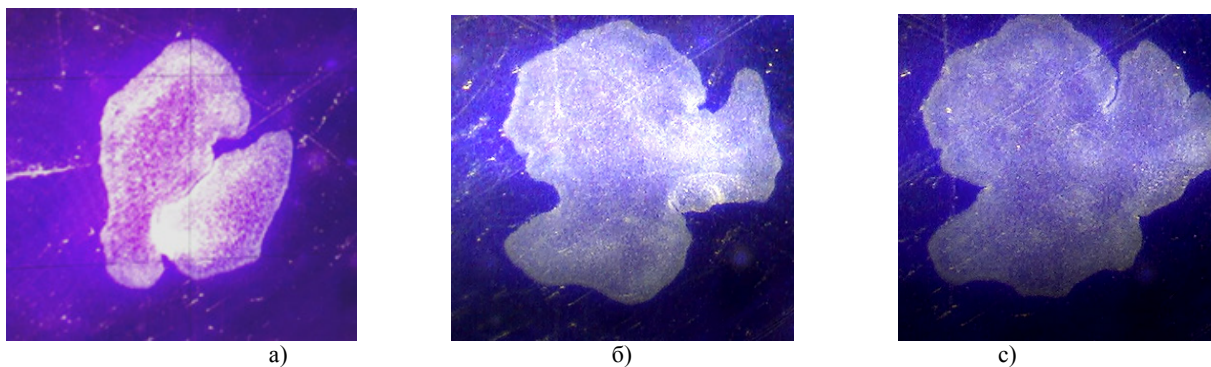


Рисунок 1. а) Форма тела Trichoplax при воздействии УФ 395нм. Trichoplax пытается раскрутить пластинку тела, свернутого в восьмерку; б) Форма пластинки Trichoplax при раскручивании восьмерки; в) Восстановленная форма пластинки Trichoplax после восстановления в УФ свете 395 нм (авторское фото, увеличение 60х)

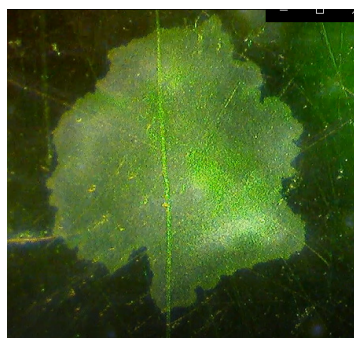


Рисунок 2. Форма края пластинки Trichoplax при воздействии зеленого света 532 нм с зубцами по линии края тела. Эффект «кленового листа» (авторское фото, увеличение 60х)

Под воздействием зеленого света 532 нм Trichoplax останавливается, края становятся изрезанными, фестончатыми (типа «кленового листа», рис. 2).

Обобщенные результаты первого опыта приведены в таблице 2.

По результатам серии опытов, проведенных при участии руководителя проекта «Trichoplax бионики» д.б.н. Кузнецова А.В., можно сделать следующие выводы:

Таблица 2. Обобщенные результаты испытаний на оптическом микроскопе Леонардо 3.0

Испытуемый Trichoplax хранился в стандартных условиях лаборатории, при пересадке в чашку Петри перекрутил тело по типу «восьмерки».			
№цикла	Длина волны светового стимула	Реакция испытуемого Trichoplax	Время воздействия, секунд
1цикл	532нм	Замер и сохранял перекрученную форму	58
	Led6500K	Форма восьмерки сохранилась	12
	395нм	Начал интенсивно двигаться раскручивая восьмерку	60
2цикл	532нм	Процесс раскручивания остановлен, замер и на краях пластинки появились зубцы –эффект	37
	395нм	Начался активный процесс раскручивания восьмерки до полного восстановления формы тела до стандартной	50
		Начал активно двигаться в сторону источника света	15
3цикл	532нм	Остановили активное движение, на краях пластинки появились зубцы	34
	395нм	Восстановилась активность движения, края пластинки округлились	82
4цикл	532нм	Активность спала до остановки, края пластинки заострились	60
	395нм	Края округлились, активность движения возросла	55
5цикл	532нм	Остановился, края пластинки заострились	33
	395нм	Началось активное движение, края пластинки округлились	100

1. При воздействии зеленого света (532 нм) останавливается движение Trichoplax, замирает движение клеток в его внутренней структуре.
2. Под воздействием ультрафиолетового света (395 нм) возникают вихревые движения внутренних клеток с последующим изменением формы Trichoplax и началом его движения в сторону источника ультрафиолетового света, который является преобладающим в световой среде на глубине обитания Trichoplax.
3. При воздействии красного света (650 нм) уменьшается скорость движения Trichoplax, происходит замирание движения внутренних клеток на время паузы, через некоторое время Trichoplax начинает движение от источника красного света. Данные результаты получены при комфортной для Trichoplax температуре водной среды.
4. Впервые с помощью световых сигналов проведено управление поведением Trichoplax и его клетками, а также доказано наличие у Trichoplax RGB-таксиса.
5. Представленный метод может использоваться в гигиенических исследованиях влияния внешних загрязнителей на окружающую среду, а также при воздействии света на шишковидную железу человека.

Список литературы/References:

1. Schierwater B., DeSalle R. Placozoa. *Current Biology*, 2018, vol. 28, no. 3, pp. 97-98.
2. Брылев В.А., Крючков В.Н., Залепухин В.В. *Теоретические аспекты биоразнообразия: Учебное пособие*. Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2003. [Brylev V.A., Kryuchkov V.N., Zalepukhin V.V. *Theoretical aspects of biodiversity: Tutorial*. Volgograd: VolGU Publishing House, 2003. (In Russ.)]
3. Srivastava M. et al. The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, pp. 955-960.
4. Smith C. et al. Novel Cell Types, Neurosecretory Cells and Body Plan of the Early-Diverging Metazoan, Trichoplax adhaerens 2014. *Curr Biol.*, 2014, vol. 24, no. 14, pp. 1565-1572. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.046
5. Smith C.L., Pivovarova N., Reese T.S. Coordinated Feeding Behavior in Trichoplax, an Animal without Synapses. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 9, e0136098. DOI: 10.1371/journal.pone.0136098
6. Moroz L.L. NeuroSystematics and Periodic System of Neurons: Model vs Reference Species at Single-Cell Resolution. *ACS Chemical Neuroscience*, 2018, vol. 9, pp. 1884-1903. doi:10.1021/acscchemneuro.8b00100
7. Никитин М. Нейротрансмиттеры и их функции у трихоплакса - животного без нервной системы. <https://www.youtube.com/watch?v=OwnA4oFro0w>. [Nikitin M. Neurotransmitters and their functions in Trichoplax - an animal without nervous systems. (In Russ.)]
8. Romanova D.Y., Smirnov I.V. et al. Sodium action potentials in placozoa: Insights into behavioral integration and evolution of nerveless animals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.08.020
9. Armona Sh., Storm Bullb M., Aranda-Diaz A., Manu Prakasha. C Ultrafast epithelial contractions provide insights into contraction speed limits and tissue integrity. *PNAS*, 2018, vol. 115, no. 44.
10. Ilton M. et al. The principles of cascading power limits in small, fast biological and engineered systems. *Science*, 2018, vol. 360, eaao1082.
11. Mayorova T.D. et al. Cells containing aragonite crystals mediate responses to gravity in Trichoplax adhaerens (Placozoa), an animal lacking neurons and synapses. *PLoS One* 13, 2018, e0190905. doi: 10.1371/journal.pone.0190905
12. Mayorova T.D. et al. A Gravity-Sensing Cell in Trichoplax adhaerens, an Early Branching Metazoan. 337.04. Conference: Society for Neuroscience 2016, in San Diego.
13. Moroz L.L., Romanova D.Y., Nikitin M.A., Dosung Sohn, Kohn Andrea B. The diversification and lineage-specific expansion of nitric oxide signaling in Placozoa: insights in the evolution of gaseous transmission Emilie Neveu, and Dirk Fasshauer Frederique Varoquaux Scientific reports, Nature Publishing Group (United Kingdom), 2020. doi: 10.13020-10
14. Nikitin M. Bioinformatic prediction of Trichoplax adhaerens regulatory peptides. *General and Comparative Endocrinology, Academic Press (United States)*, 2014. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.03.049
15. Романова Д.Ю. Разнообразие клеточных типов у гаплотипа H4 PLACOOZA SP. *Морской биологический журнал*, 2019, т. 4, № 1, pp. 81-90. [Romanova D.Yu. Diversity of cell types in the H4 PLACOOZA SP. *Nautical biological journal*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 81-90. (In Russ.)]
16. Серавин Л.Н., Гудков А.В. Trichoplax adhaerens (тип Placozoa) – одно из самых примитивных многоклеточных животных. Санкт-Петербург: ТЕССА, 2005, т. 69. [Seravin L.N., Gudkov A.V. Trichoplax adhaerens (type Placozoa) is one of the most primitive multicellular animals. St. Petersburg: TESSA, 2005, vol. 69. (In Russ.)]
17. Знакомьтесь: Трихоплакс, простейшее животное на Земле <https://scientificrussia.ru/articles/znakomtes-trihoplaks-prostejshee-zhivotnoe-na-zemle>. [Meet Trichoplax, the simplest animal on Earth (In Russ.)]
18. Heyland A., Croll R., Goodall S., Kranyak J., Wyeth R. Trichoplax adhaerens, an Enigmatic Basal Metazoan with Potential Trichoplax adhaerens, February. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2014, vol. 1128, pp. 45-61.
19. Журавлев Ю.Н., Карпенко А.А., Гузев М.А. К многообразию функций гуанинсодержащих структур в живых системах. *Вестник ДВО РАН*, 2021, № 2. [Zhuravlev Yu.N., Karpenko A.A., Guzev M.A. To the variety of functions of guanine-containing structures in living systems. *Bulletin FEB RAS*, 2021, no. 2. (In Russ.)] doi: 10.371102/0869-7698_2021_02_01
20. Mansi Srivastava. The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, pp. 955-960.

21. «Невидимая» рыба может осветить путь к лучшим оптическим устройствам <https://ru.livingorganicnews.com/invisible-fish-could-light-way-better-optical-devices> 775007. [Invisible Fish May Light the Way to Better Optics (In Russ.)]
22. Characterization of Light Reflection of Fish Guanine Crystals by Diamagnetic Micromanipulation.
23. Michiels N.K., Anthes N., Hart N.S., Herler J., Meixner A.J., Schleifenbaum F., Schulte G., Siebeck U.E., Sprenger D., Wucherer M.F. Red fluorescence in reef fish: A novel signalling mechanism? *BMC Ecology*, 2008, vol. 8, no. 16. doi: 10.1186/1472-6785-8-16
24. Johnsen S. The Optics of Life: A Biologist's Guide to Light in Nature "Оптика жизни: руководство биолога по свету в природе" <https://babylonzoo.blog/optics/index.html>
25. Очаковский Ю.Е., Копелевич О.В., Войтов В.И. Свет в море <https://coollib.com/b/279274/read>. [Ochakovsky Yu.E., Kopelevich O.V., Voitov V.I. Light in the sea (In Russ.)]
26. Eitel M., Osigus H.J., DeSalle R., Schierwater B. Global diversity of the Placozoa. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 4, e57131. DOI: 10.1371/journal.pone.0057131. PMID 23565136.
27. Wenjie Zhu, a Jiaping Lin, a Chunhua Caia, Yingqing Lua. Biomimetic mineralization of calcium carbonate mediated by a polypeptide-based copolymer.
28. Nicolette Nadene Houreld Shedding Light on a New Treatment for Diabetic Wound Healing: A Review on Phototherapy *ScientificWorldJournal*. 2014 doi: 10.1155/2014/398412.
29. Чачина Н.А., Кирток А.Н., Фролова М.С., Векшин Н.Л. Митохондрии – силовые электростанции нейронных сетей. *Нейроинформатика: Сборник статей. Ч. 1*, М., 2013, с. 219-229. [Chachina N.A., Kirtok A.N., Frolova M.C., Vekshin N.L. Mitochondria – power plants of neural networks. *Neuroinformatics Collection of articles. Part 1*, М., 2013, pp. 219-229. (In Russ.)]
30. Романова Д.Ю. Сравнительный анализ организации типов клеток и поведения у PLACOOZA. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2020, 26 с. [Romanova D.Yu. *Comparative analysis of the organization of cell types and behavior in PLACOOZA*. Abstract of dissertation for the degree of candidate biological sciences. 2020, 26 p. (In Russ.)]
31. Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova E.V. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. *Smolensk State Medical University*, Smolensk, Russia, 2016, vol. 14, no. 2, pp. 38-46.
32. Perez Y.R., Etchenique R. Optical manipulation of animal behavior using a ruthenium-based phototrigger. *Photochemical & Photobiological Sciences Issue*, 2019, vol. 1.
33. Юрре Т.А., Рудая Л.И., Климова Н.В., Шаманин В.В. Органические материалы для фотовольтаических и светоизлучающих устройств. *Физика и техника полупроводников*, 2003, т. 37, №. 7. [Yurre T.A., Rudaya L.I., Klimova N.V., Shamanin V.V. Organic materials for photovoltaic and light-emitting devices. *Physics and technology of semiconductors*, 2003, vol. 37, no. 7. (In Russ.)]
34. Crystallization Pathways in Biomineralization. *Annual Review of Materials Research*, 2011, vol. 41, pp. 21-40. doi: 10.1146/annurev-matsci-062910-095803
35. Mizukawa Y. Characterization of Light Reflection of Fish Guanine Crystals. *Diamagnetic Micromanipulation Doctoral Theses*, 2016, vol. 111.
36. Chikashige T., Iwasaka M. Magnetically-assembled micro/mesopixels exhibiting light intensity enhancement in the (012) planes of fish guanine crystals. *AIP Advances* 8, 2018, 056704. doi: 10.1063/1.5006135
37. Gur D., Palmer B.A., Weiner S., Addadi L. Light Manipulation by Guanine Crystals in Organisms: Biogenic Scatterers, Mirrors, Multilayer Reflectors and Photonic Crystals *Advanced functional materials*, 2017, vol. 27, iss. 6, 20171603514.
38. Speiser D.I., Eernisse D.J., Johnsen S. A chiton uses aragonite lenses to form images. *Curr Biol.*, 2011, vol. 21, pp. 665-670. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.033 PMID: 21497091.
39. Speiser D.I., DeMartini D.G., Oakley T.H. The shell-eyes of the chiton *Acanthopleura granulata* (Mollusca, Polyplacophora) use pheomelanin as a screening pigment. *J Nat Hist.*, 2014, vol. 48, pp. 2899-2911. doi: 10.1080/00222933.2014.959572
40. Aizenberg J., Tkachenko A., Weiner S., Addadi L., Hendler G. Calcitic microlenses as part of the photoreceptor system in brittlestars. *Nature*, 2001, vol. 412, pp. 819-822. doi: 10.1038/35090573 PMID: 11518966
41. Ga' I J., Horva'th G., Clarkson E.N.K., Haiman O. Image formation by bifocal lenses in a trilobite eye? *Vision Res.*, 2000, vol. 40, pp. 843-853. doi: 10.1016/S0042-6989(99)00216-3 PMID:10683460
42. Козлов Д.В. Физическая химия, лекции <https://studfile.net/preview/4482440/>. [Kozlov D.V. Physical chemistry, lectures (In Russ.)]
43. Разгадать тайны Черного моря: какие работы ведутся в лабораториях ИнБИОМа https://www.youtube.com/watch?v=MEbz9t4eVVA&feature=emb_logo. [Unravel the secrets of the Black Sea: what work is being done in the laboratories of in IBSS (In Russ.)]

SELECTIVE BEHAVIORAL RESPONSE OF TRICHOPLAX (PLACOZOA) ON RGB-LIGHT STIMULI

Kaptsov V.A.¹, Deynego V.N.¹, Kozyritsky D.V.²¹ All-Russian Research Institute of Transport Hygiene of Rospotrebnadzor
Pakgauznoe highway, 1, bldg. 1 Moscow, 125438, Russia, e-mail: kaptsovva39@mail.ru² Gymnasium № 8 named after N.T. Khrustalev
Khrustalev st., 45, Sevastopol, 299029, Russia, e-mail: d.kozyrytski@gmail.com

Abstract. When conducting hygienic research, an urgent task is to search for simple multicellular animals with social behavior to solve the fundamental issues of the interaction of cells with destabilizing environmental factors. Such factors include the light environment, which controls the biological clock of living organisms through the spectral composition of the light spectrum. Light through the system of ganglion cells of the eyes and the pineal gland with its "serotonin-melatonin" system controls the "circadian rhythms" of a person. The pineal gland in its structure has a spatial distribution of CaCO₃ microcrystals, serotonin and melatonin synthesis cells from tryptophan, as well as a neuropeptide network. The search for a model animal for the study and modeling of processes in the human pineal gland is an urgent hygienic task. Such a model animal can become a marine animal Trichoplax (Placozoa) has the simplest organization among all known animals with only six distinguishable cell types, but with outstanding social behavior. The theoretical analysis of the spectral composition of light and the degree of its polarization in the marine environment of the simplest multicellular animal Trichoplax (Placozoa), as well as the features of its gene-cell structure, is carried out. Based on the laws of hydrooptics and the survival strategy ("food-prey"), the coordinate axes of the light medium for Trichoplax are determined (the light vertical (395 nm) and two horizontal light axes – the reflected horizontal light from the food (green – 532 nm) and the fluorescent light coming from the aragonite shell of the predator mollusk (red – 630 nm). Based on the animal's reactions to these RGB light stimuli, a hypothesis is made about the presence of an RGB taxis in Trichoplax. The monochrome light signals red – 630 nm, green – 532 nm and blue – 395 nm are selected for Trichoplax control. Experimentally, within the framework of the work "Trichoplax for Bionics", the discovery of an RGB taxi in Trichoplax was confirmed. Trichoplax Movement control RGB -taxis – YouTube

Key words: light stimuli, Trichoplax, crystal cells, aragonite, pineal gland, calcite crystals, phototaxis, tryptophan, serotonin, neuropeptide network, circadian rhythms.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА ЦИНКА В ПРИСУТСТВИИ МОЛЕКУЛ ФЛАГЕЛЛИНА

Жулидин П.А., Филин П.Д., Пластун И.Л.

Саратовский государственный технический университет имени Ю.А. Гагарина

Политехническая ул., 77, г. Саратов, 410054, РФ; e-mail: zhulidin@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. Методами молекулярной динамики исследуются механизмы межмолекулярного взаимодействия, возникающего между ионами цинка и молекулами флагеллина в процессе бактериального синтеза наночастиц сульфида цинка с помощью бактерий *Bacillus subtilis* 168. Отличительной особенностью этого процесса является то, что единственным белком, участвующим в процессе синтеза и адсорбирующимся на поверхности частиц, является белок флагеллин. В результате анализа динамики молекулы флагеллина и образующихся в ходе взаимодействия водородных связей было обнаружено, что при температуре 300K в присутствии ионов цинка степень комплексообразования молекулы флагеллина существенно возрастает, что способствует образованию наночастиц сульфида металла.

Ключевые слова: ионы цинка, флагеллин, молекулярное моделирование, водородные связи, наноматериалы.

Наночастицы сульфида цинка являются одним из перспективных материалов в биофотонике, медицине и электронике. В частности, они используются как квантовые точки для диагностики и мониторинга *in vivo* различных биопроцессов, как составные части сенсоров и датчиков, а также для таргетной терапии различных заболеваний.

В представленной работе анализируются молекулярные механизмы образования наночастиц сульфида цинка методом бактериального синтеза при помощи бактерий *Bacillus subtilis* 168 [1]. Как правило, наночастицы сульфидов металлов получают химическими методами, однако эти методы высокзатратны и экологически опасны. Кроме того, химически синтезированные наночастицы менее биосовместимы, что существенно ограничивает их применение в биологических и медицинских системах. Особенностью бактериального синтеза наночастиц сульфидов металлов на основе именно этих бактерий является то, что единственным белком, участвующим в процессе синтеза и адсорбируемым на поверхности частиц, является флагеллин, присутствующий в жгутиках бактерий и обладающий уникальными характеристиками, обуславливающими его высокую подвижность, благодаря которой флагеллин может организовываться в полые цилиндрические структуры.

Методами молекулярной динамики было изучено поведение флагеллина в водных растворах солей, использующихся в процессе синтеза наночастиц сульфида цинка. В качестве исследуемых объектов была рассмотрена молекула флагеллина и ионы цинка и хлора поскольку основной солью рабочего раствора, используемого в ходе бактериального синтеза, является хлорид цинка [1]. Ранее нами было проведен анализ водородных связей аминокислот флагеллина и ионов серебра при образовании наночастиц сульфида серебра. Была выявлена существенная роль нестандартной аминокислоты метилизина в процессе водородного связывания и комплексообразования наночастиц сульфида серебра [2]. В случае сульфида цинка мы ожидаем, что влияние флагеллина также будет существенно.

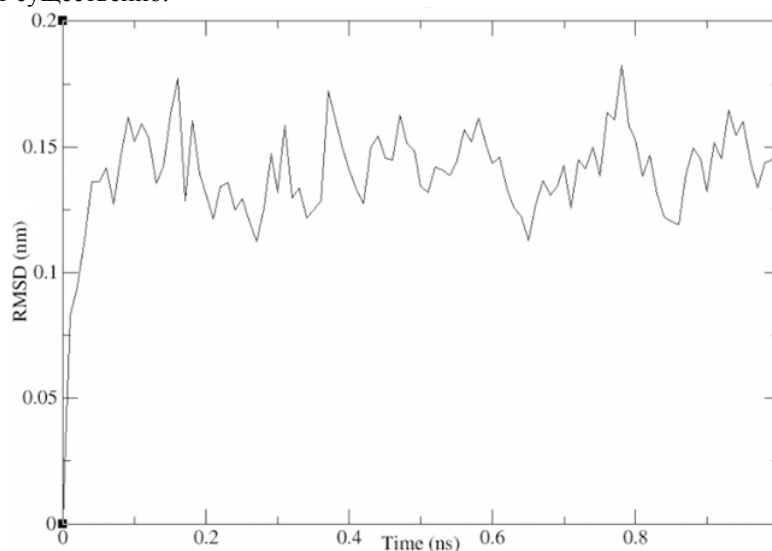


Рисунок 1. Среднеквадратичное отклонение атомов флагеллина в зависимости от времени

Молекулярное моделирование проводилось при помощи программного комплекса GROMACS [3] с использованием силовых полей AMBER99SB-ILDN [4] и трехточечного сольвата TIP3P. Аминокислотная последовательность флагеллина 6GOW (рис. 2а) взята из международной базы данных белков RCSB PDB [5]. На основе анализа среднего радиуса инерции и графика возникновения водородных связей между протеином и ионами цинка была изучена динамика молекул флагеллина.

В результате наших исследований была получена сольватированная электронейтральная система, состоящая из белка и ионов. Существует величина среднеквадратичного отклонения, которая характеризуется суммой расстояний между атомами из стандартного строения белковой структуры и новым рассчитанным состоянием. В случае молекулы флагеллина структура белка является устойчивой, так как среднеквадратичное отклонение находится в промежутке 1–1,5 Å на всем этапе моделирования (рис. 1).

Второй характеристикой, определяющей поведение белковой структуры, является радиус инерции, характеризующий меру компактности, посредством определения удалённости масс атомов от общего центра масс. В ходе расчётов было обнаружено, что в растворе, содержащем ионы хлора и цинка, средний радиус инерции постепенно уменьшался (на графике, рис. 2б, радиус инерции белка в присутствии ионов цинка обозначен чёрным цветом, без ионов цинка – красным).

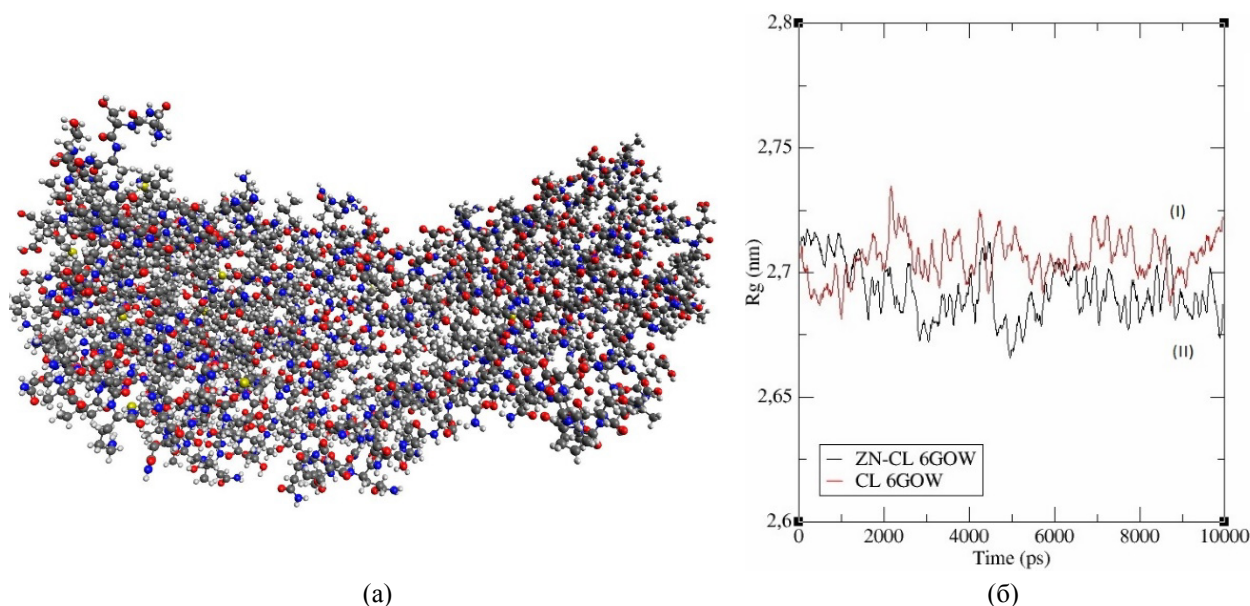


Рисунок 2. Рассчитанная молекулярная структура флагеллина (а) и радиус инерции флагеллина (б) в присутствии ионов хлора (б, (I)) и ионов хлора и цинка (б, (II))

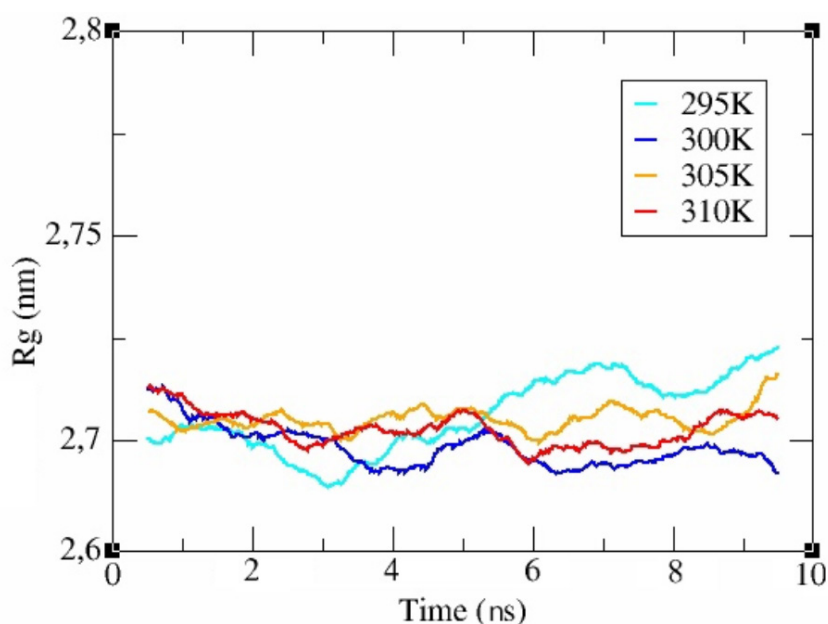


Рисунок 3. Зависимость радиуса инерции от температуры



Рисунок 4. Зависимость числа водородных связей от времени

Также была выявлена зависимость радиуса инерции белка в растворе ионов цинка (Zn) и хлора (Cl) от температуры (рис. 3). Флагеллин стремится занять более компактную структуру при $T = 300$ К. При температуре 305 К и выше тепловое движение молекул препятствует образованию устойчивых связей с ионами. Таким же образом при температуре 295 К и ниже биологическая активность белка падает. Это выражается в том, что графики данных функций лежат выше и имеют тенденцию к увеличению значений.

Кроме того, было отслежено количество возникающих в системе водородных связей, что показано на рисунке 4. Из рисунка видно, что с увеличением времени количество водородных связей растёт, что говорит о том, что происходит электростатическое взаимодействие между ионами цинка и аминокислотами флагеллина. Это показывает электростатическую природу механизма образования наночастиц сульфида цинка.

Таким образом, по результатам молекулярного моделирования можно сделать вывод, что в присутствии ионов цинка степень комплексообразования молекулы флагеллина существенно возрастает, что способствует образованию наночастиц металла, причём наиболее эффективно этот процесс происходит при 300 К (26,8 °C) – температуре, близкой к комнатной, когда все биологические процессы наиболее активны. Увеличение количества водородных связей при уменьшении радиуса инерции подтверждает электростатические механизмы комплексообразования в случае аминокислот флагеллина и ионов цинка.

Список литературы / References:

1. Журавлева О.А., Воейкова Т.А., Хаддаж М.Х. и др. Бактериальный синтез наночастиц сульфидов кадмия и цинка. Характеристика и перспектива их применения. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология*, 2018, № 36 (4), с. 191-198. [Zhuravleva O.A., Voeikova T.A., Khaddazh M.Kh. et al. Bacterial synthesis of cadmium and zinc sulfide nanoparticles. Characteristics and perspective of their application. *Molecular Genetics, Microbiology, Virology*, 2018, no. 36 (4), pp. 191-198. (In Russ.)]
2. Пластун И.Л., Захаров А.А., Наумов А.А., Жулидин П.А., Филин П.Д. Спектральные проявления молекулярных механизмов образования наночастиц сульфида серебра методом бактериального синтеза. *Оптика и спектроскопия*, 2021, т. 129, вып. 6, с. 717-726. [Plastun I.L., Zakharov A.A., Naumov A.A., Zhulidin P.A., Filin P.D. Spectral manifestations of molecular mechanisms of the formation of silver sulfide nanoparticles by bacterial synthesis. *Optics and Spectroscopy*, 2021, vol. 129, no. 6, pp. 717-726. (In Russ.)]
3. *Gromacs*. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.gromacs.org/About_Gromacs
4. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2010, vol. 78, iss. 8, pp. 1950-1958.
5. *RCSB Protein Data Bank*. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.rcsb.org/3d-view/6GOW>. doi 10.2210/pdb6GOW/pdb

MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF METAL SULFIDES PROCESSING IN PRESENCE OF FLAGELLIN

Zhulidin P.A., Filin P.D., Plastun I.L.

Yuri Gagarin State Technical University of Saratov

Politechnicheskay str., 77, Saratov, 410054, Russia; e-mail: zhulidin@mail.ru

Abstract. Molecular dynamics methods are used to study the molecular mechanisms of interaction between zinc ions and flagellin that occurs during the bacterial synthesis of zinc sulfide nanoparticles. The main characteristic of *Bacillus subtilis* 168 bacteria for production of zinc sulfide nanoparticles by biosynthesis is that the only one protein involved in the bacterial processing is flagellin. It was found that the temperature of 300 K increases the degree of complexation of the flagellin molecule significantly, which contributes to the formation of metal nanoparticles.

Key words: *zinc ions, flagellin, molecular modeling, hydrogen bonds, nanomaterials.*

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ СУПЕРСПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Луценко А.О., Шпигун Д.К., Сидорова А.Э.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: aleksluchrus@yandex.ru, denish.den@mail.ru, sky314bone@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. Настоящая работа представляет научное исследование, развивающее недавно разработанный на кафедре биофизики физического факультета МГУ метод оценки знака хиральности суперспиральных структур белков. Метод исходно разработан для суперспиралей типа «coiled-coil», как наиболее распространённых суперспиральных структур белков, однако применим и к другим типам суперспиралей. В основе метода лежит концепция, согласно которой, направление угла между осью суперспирали и осями составляющих спиралей позволяет определять знак хиральности всей структуры. Для проведения расчетов необходимо знать, какие аминокислотные остатки полипептидной цепи участвуют в образовании суперспирали, а также обладать информацией о взаимном пространственном расположении альфа-углеродов аминокислотных остатков спиралей, составляющих суперспираль. В работе исследованы, в основном, суперспирали типа «coiled-coil» как наиболее распространённый тип левых суперспиралей, а также правые суперспирали коллагена. Использование небольшого количества исходных данных и простота расчетов делают метод удобным в применении, а достоверность результатов настоящего исследования подтверждается проверкой, проведенной на структурах реальных белков. Данный метод можно рассматривать как шаг к определению не только знака хиральности суперспиральных белковых структур, но и степени их хиральности, и, следовательно, к распространению понятия хиральности на белковые глобулы.

Ключевые слова: белки, хиральность, спираль, суперспираль, coiled-coil.

Свойство хиральности является одним из ключевых природных инструментов самоорганизации и создания структурных иерархий в биологических системах, что подтверждается выявленной закономерностью чередования знака хиральности в иерархиях нуклеиновых кислот и белков [1]. Для белков эта закономерность заключается в том, что из левых аминокислот, представляющих собой первичную структуру белков, образуются вторичные структуры, представленные в основном правыми альфа-спиралями; которые, в свою очередь, имеют тенденцию к образованию левых суперспиралей типа «coiled-coil» [1,2]. Однако в настоящее время в научной литературе не отмечено наличие универсального метода определения знака хиральности таких структур.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ОБЪЕКТЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что правые альфа-спирали являются самыми распространенными из вторичных структур белка и энергетически самыми выгодными [3]. Их закрученность в правую сторону обусловлена взаимным расположением атомов радикалов аминокислот и атомов основной цепи [4]. Принципиальной для дальнейшего рассмотрения характеристикой является то, что в среднем на один виток альфа-спирали приходится около 3,6 аминокислотных остатков [3].

Образование несколькими альфа-спиралями нетривиальных конструкций заинтересовало исследователей после работ Полинга и Кори [5] и Крика [6,7]. Классическая структура типа «coiled-coil» представляет собой несколько длинных альфа-спиралей, перевитых между собой. Удерживаются суперспирали посредством гидрофобных межспиральных взаимодействий, а также ионных взаимодействий для суперспиралей, состоящих из трех и более спиралей [8]. Таким образом, для стабилизации суперспирали необходимо, чтобы составляющие альфа-спирали были приспособлены к этим взаимодействиям; т.е. только специфические альфа-спирали способны к образованию структур типа «coiled-coil». В частности, необходимо, чтобы гидрофобные остатки из разных альфа-спиралей располагались достаточно близко в пространстве, так же, как и полярные аминокислотные остатки, участвующие в ионных взаимодействиях.

Таким образом, для того, чтобы между двумя отдельными спиралями возникли взаимодействия, нужно, чтобы гидрофобные остатки находились друг напротив друга, и в природе это достигается тем, что структура каждой альфа-спирали несколько видоизменяется: вместо сравнительно произвольной последовательности аминокислотных остатков в цепи она становится определенной. В классической суперспирали типа «coiled-coil» аминокислотная последовательность спиралей делится на гептады — последовательности из семи аминокислотных остатков [9], где позиции остатков принято обозначать латинскими буквами *a, b, c, d, e, f, g*: в позициях *a* и *d*, как правило, находятся гидрофобные остатки, а в позициях *e* и *g* — полярные аминокислотные остатки, участвующие в ионных взаимодействиях [9]. Для того, чтобы остатки в позициях *a* и *d* двух различных спиралей находились напротив друг друга, каждая гептада распределяется по двум виткам, что

уменьшает среднее количество остатков на виток в α -спирали с 3,6 до 3,5. Такое перераспределение остатков относительно отдельной α -спирали достигается посредством левой закрутки всей суперспирали [10].

Следует отметить, что помимо гептадных «coiled-coil» существуют и другие, значительно более редкие их разновидности [10], в частности, суперспирали, в составляющих спиралях которых 11 остатков распределены на 3 витка, 15 остатков на 4 витка и пр. Распределение остатков по виткам в таких спиралях близко к такому для недеформированных альфа-спиралей, например, у спиралей с повтором в 11 аминокислотных остатков приходится 3,67 остатков на оборот. Направление закрутки такой суперспирали – вправо или влево – будет зависеть от того, как именно нарушена естественная последовательность альфа-спиралей: в сторону увеличения либо уменьшения плотности остатков на виток [10]. Повышенная концентрация остатков на виток приведет к правосторонней закрутке суперспирали, пониженная – к левосторонней.

За прошедшее со времени открытия структур типа «coiled-coil» время было произведено немало попыток их математического описания, начиная с основополагающих работ Ф. Крика [6,7], в которых он построил свою модель суперспиралей. Однако, хотя в них и приведено полноценное математическое описание «coiled-coil», показавшее, в частности, что направления закрутки суперспирали и отдельных спиралей различны, оно не могло дать возможности эффективно определять направление закрутки отдельных суперспиралей по координатам их атомов. В дальнейшем этот подход был использован во множестве разработок других авторов, например, в работах [11,12]. Но оба представленных описания не позволяли определить хиральность структуры; возможность того, что суперспираль будет правозакрученной, не учитывается в этих работах. В работе [13] используется принципиально другой подход. Авторы предлагают определять хиральность «поверхностной кривой», то есть линии, находящейся посередине между кривой, соединяющей гептадные остатки в позициях a , и кривой, соединяющей гептадные остатки в позициях d отдельных альфа-спиралей для классической суперспирали. При последующем расчете поверхностная кривая получилась левой, однако авторы отмечают, что из этого не следует, что суперспираль также является левой. Таким образом, данный подход также не дает объективной оценки знака хиральности суперспиральных структур.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗНАКА ХИРАЛЬНОСТИ СУПЕРСПИРАЛЕЙ

В настоящей работе представлен авторский способ оценки знака хиральности суперспиральных белковых структур на примере суперспиралей типа «coiled-coil». Для использования метода достаточно знания взаимного пространственного расположения альфа-углеродов цепи. В основе метода лежит определение направления закрутки каждой отдельной альфа-спирали относительно оси всей суперспирали, и в качестве критерия для определения этого направления был выбран угол между осью суперспирали и осями образующих ее спиралей. Ориентация этого угла относительно оси суперспирали (по часовой или против часовой стрелки) служит показателем для определения знака хиральности суперспирали. Для определения ориентации угла используется свойство векторного произведения образовывать правые тройки векторов.

В качестве примера рассмотрим белок 1A36 [14], состоящий из двух альфа-спиралей (рис. 1, *a*). На первом этапе строятся оси альфа-спиралей. Поскольку в альфа-спирали на один виток в среднем приходится 3,6 аминокислотных остатков, в качестве условного центра витка спирали взят геометрический центр 4 последовательных альфа-углеродов: для первого витка – точки C_1, C_2, C_3, C_4 , для второго витка – C_5, C_6, C_7, C_8 и т.д. Таким образом получают точки $A_1, A_2, \dots, A_m$, через которые проводится ось альфа-спирали (рис. 1, *b*). На следующем этапе строится «средняя спираль»: геометрический центр первых атомов каждой альфа-спирали ($C_{1,1}, C_{2,1}$) используется в качестве первой точки средней спирали, геометрический центр вторых атомов ($C_{1,2}, C_{2,2}$) – в качестве второй точки средней спирали и т.д. (рис. 1, *в*). Для средней спирали строится ось вышеизложенным способом, которая, согласно излагаемому методу, определяется в качестве оси суперспирали (рис. 1, *г*). Далее строится угол между направлением оси суперспирали (вектор v_s) и направлениями осей составляющих спиралей (векторы v_{c1}, v_{c2}). В общем случае как ось средней спирали, так и оси альфа-спиралей являются ломаными линиями в трехмерном пространстве, но для данного метода достаточно информации о взаимных направлениях осей только в узком поперечном сечении суперспирали (два полных витка альфа-спиралей), и на таком интервале оси можно рассматривать как прямые линии, что позволяет непосредственно строить для них векторы направления. Поскольку метод является качественным, а не количественным, и оценивает лишь знак, но не степень хиральности, такое приближение вполне уместно.

Общий геометрический анализ суперспиралей показывает, что для левой суперспирали составляющие спирали будут отклонены в правую сторону относительно оси суперспирали, и угол между векторами v_s и v_{ci} будет отсчитываться против часовой стрелки. Соответственно для правой суперспирали составляющие спирали будут отклонены в левую сторону, и угол будет отсчитываться по часовой стрелке. Таким образом, определение знака хиральности суперспирали сводится к определению направления угла между осью суперспирали и осью составляющей спирали.

Обозначим вектор от оси суперспирали к оси i -той спирали как v_{ki} , а векторное произведение векторов v_{ci} и $v_s - v_{pi}$. Если вектор v_{ci} отклонен от вектора v_s по часовой стрелке, и суперспираль является левой (рис. 2, *a, б*), то угол между векторами v_{ki} и v_{pi} будет тупым (рис. 2, *в, г*). Если же вектор v_{ci} отклонен от вектора v_s против часовой стрелки, и суперспираль является правой, то угол между векторами v_{ki} и v_{pi} будет острым.

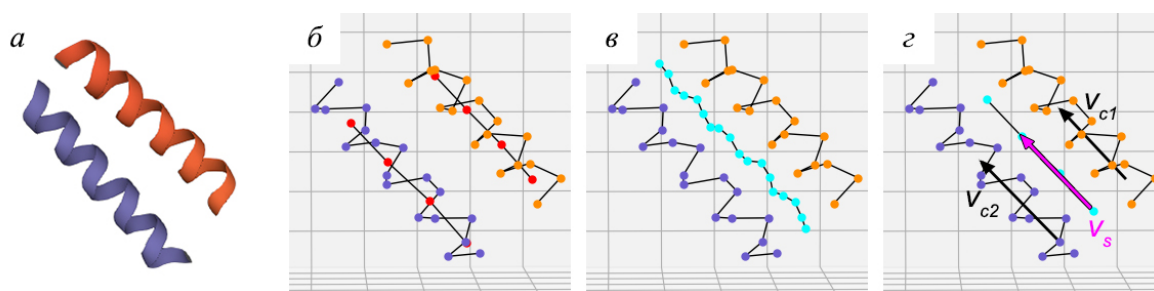


Рисунок 1. Схематическое изображение работы метода по определению знака хиральности структуры типа «coiled-coil» на примере белка 1A36 [14]: отображение 1A36 в базе данных PDB (а); оси спиралей (б), средняя спираль (в) и ось суперспирали (г)

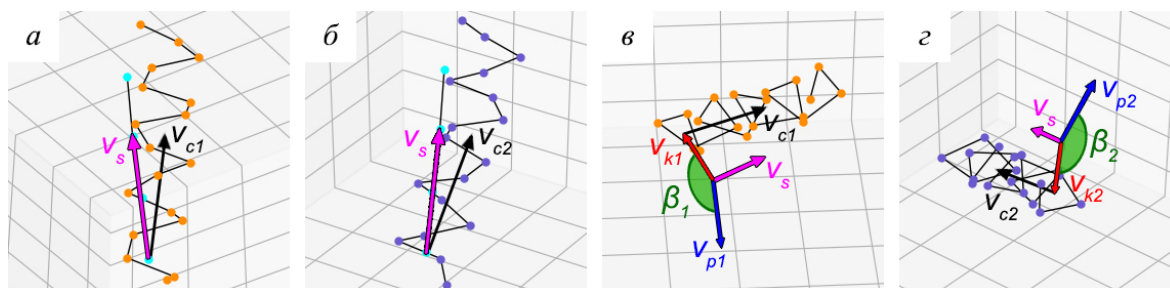


Рисунок 2. Определение знака хиральности структуры типа «coiled-coil» по углу между векторами

Величина угла между $\mathbf{v}_{ki}$ и $\mathbf{v}_{pi}$ определяется с помощью скалярного произведения, которое для тупых углов отрицательно, а для острых – положительно.

Окончательная оценка знака хиральности получается с помощью усреднения косинуса соответствующего угла для всех спиралей, образующих суперспираль:

$$\cos(\beta) = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \cos(\beta_i)$$

где β_i – угол между направлением оси i -той альфа-спирали и направлением оси суперспирали, т.е. между векторами $\mathbf{v}_{ki}$ и $\mathbf{v}_{pi}$, q – число спиралей, образующих суперспираль; β – некоторый эффективный угол, являющийся промежуточным по абсолютному значению углом между углами для отдельных спиралей. Если косинус угла β является положительной величиной, то суперспираль правая, если отрицательной – левая.

Необходимо отметить, что в файлах формата PDB напрямую не содержится информации ни о том, какие спирали участвуют в межспиральных взаимодействиях, ни, тем более, информации о том, какие конкретно аминокислотные остатки образуют суперспираль. Для получения этих сведений, являющихся, однозначно, принципиально необходимыми для построения вышеизложенной модели структуры, требуется пользоваться дополнительными источниками данных. В настоящей работе в этом качестве была использована база данных CC+ Database [15].

Для автоматизации определения знака хиральности написана компьютерная программа на языке Python. Для расчетов использовались координаты атомов из файлов PDB. Метод был опробован на 114 суперспиралях «coiled-coil» из восьми классов природных белков (гидролазы – 25 белков, оксидоредуктазы – 23 белка, вирусные – 22 белка, изомеразы – 16 белков, шапероны – 11 белков, структурные – 11 белков, транспорта электронов – 3 белка, экзцитоза/эндоцитоза – 3 белка), а также одна суперспираль из искусственного белка (1RN4). Все суперспирали природных белков метод определил как левые, а суперспираль из искусственного белка – как правую.

Для проверки корректности работы метода был также определен знак хиральности суперспиралей коллагена. Поскольку коллагеновые фибриллы являются правыми суперспиралями, косинус угла β для них должен быть положителен. Расчеты проводились для трех коллагеновых структур из PDB – 1BKV, 1CAG, 6HG7. Все три суперспирали получились правыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из ключевых вопросов молекулярной биофизики является определение механизмов образования и функционирования белков, в частности, определение свойств и особенностей отдельных характерных белковых элементов и выявление закономерностей в иерархиях белковых структур. Суперспирали типа «coiled-coil» являются значимым звеном в такой иерархической последовательности, и хиральность является их важным свойством.

Представлен принципиально новый метод оценки знака хиральности суперспиральных белковых структур. Метод использует координаты альфа-углеродов аминокислотных цепей белков в качестве исходных данных.

Метод основывается на оригинальном математическом описании суперспиралей и представляет собой алгоритм, использованный впоследствии в компьютерной программе, позволяющей оценивать знак хиральности суперспиралей. Метод отличается небольшим количеством необходимой информации и простотой вычислений, что является его существенным преимуществом при обработке больших массивов данных. Полученные результаты соответствуют данным, представленным в научной литературе, и полностью согласуются с концепцией хиральности белковых структур. Метод также демонстрирует высокую степень универсальности, позволяя обрабатывать суперспирали с различным количеством и различной структурой составляющих спиралей.

Хотя изложенный метод является вполне самостоятельным, следует отметить, что его разработку можно рассматривать как шаг к определению, помимо знака хиральности, степени хиральности суперспиральных белковых структур, что, в свою очередь, может привести к распространению понятия хиральности на иерархически вышестоящие категории – белковые глобулы, тем самым способствуя раскрытию общих принципов и закономерностей, а также механизмов фолдинга белков.

Список литературы / References:

1. Сидорова А.Э., Твердислов В.А. Самоорганизация в иерархии активных сред как движущая сила эволюции биосферы. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физ. Астрон.*, 2012, № 2, 65 с. [Sidorova A.E., Tverdislov V.A. Self-organization as the driving force for the evolution of the biosphere. *Moscow University Physics Bulletin*, 2012, vol. 67, no. 2, 213 p. (In Russ.)]
2. Brandrn C.-I., Tooze J. *Introduction to Protein Structure*. New York: Garland Publishing, 1999, 35 p.
3. Pauling L., Corey R.B., Branson H.R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *PNAS*, 1951, vol. 37, 205 p. doi: 10.1073/pnas.37.4.205
4. Branden C.-I., Tooze J. *Introduction to Protein Structure*. New York: Garland Publishing, 1999, 16 p.
5. Pauling L., Corey R.B. Compound Helical Configurations of Polypeptide Chains: Structure of Proteins of the α -Keratin Type. *Nature*, 1953, vol. 171, 59 p. DOI: 10.1038/171059a0
6. Crick F.H.S. The Fourier Transform of a Coiled-Coil. *Acta Cryst.*, 1953, vol. 6, 685 p. doi: 10.1107/S0365110X53001952
7. Crick F.H.S. The Packing of α -Helices: Simple Coiled-Coils. *Acta Cryst.*, 1953, vol. 6, 689 p. doi: 10.1107/S0365110X53001964
8. Yu Y.B. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, 1113 p. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00058-3
9. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами*. Москва: КДУ, 2012, 142 с. [Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. *Physics of protein: course of lectures with colored and stereoscopic illustrations and tasks*. Moscow: KDU, 2012, 142 p. (In Russ.)]
10. Lupas A.N., Gruber M. The structure of α -helical coiled coils. *Advances in Protein Chemistry*, 2005, vol. 70, 37 p. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70003-6
11. Fraser R.D.B., MacRae T.P. *Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*. London: Academic Press, 1973, 456-465 pp.
12. Phillips G.N. What Is the Pitch of the α -Helical Coiled Coil? *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 1992, vol. 14, 425 p. doi: 10.1002/prot.340140403
13. Neukirch S., Goriely A., Hausrath A.C. Chirality of Coiled Coils: Elasticity Matters. *Physical review letters*, 2007, vol. 100, 038105 p. doi: 10.1103/PhysRevLett.100.038105
14. RCSB PDB: Protein 1A36. URL: <https://www.rcsb.org/structure/1a36> (accessed: 12.07.2021).
15. CC+, a relational database of coiled-coil structures. URL: <http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccplus/search/> (accessed: 12.07.2021).

METHOD FOR CHIRALITY ASSESSMENT OF SUPERHELICAL PROTEIN STRUCTURES

Lutsenko A.O., Shpigun D.K., Sidorova A.E.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory St., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: aleksluchrus@yandex.ru, denish.den@mail.ru,
sky314bone@mail.ru

Abstract. This paper is an advancement of a method recently developed at the Department of Biophysics of the Faculty of Physics of Moscow State University for evaluating the chirality sign of superhelical protein structures. The method was originally developed for superhelices of "coiled-coil" type, as the most common superhelical protein structures, but it is applicable also to other types of superhelices. The method is based on the concept that states that the direction of the angle between the axis of the superhelix and the axes of the constituent helices allows to determine the sign of chirality of the entire structure. To perform calculations it is necessary to know which amino acid residues of the polypeptide chain are involved in the formation of the superhelix, as well as to have information about the mutual spatial arrangement of the alpha-carbons of the amino acids of the helices that make up the superhelix; this information can be obtained from the CC+ Database and the PDB file for a specific superhelix. The use of a small amount of initial data and the simplicity of calculations make the method convenient and fast to use, the reliability of the results of this study is confirmed by a validation carried out on the protein structures presented in the PDB database. This method can be considered as a step towards determining not only the sign of chirality of superhelical protein structures, but also the degree of their chirality, which, in its turn, can lead to the extension of the concept of chirality to hierarchically higher categories of objects – protein globules and supramolecular structures.

Key words: *proteins, chirality, helix, superhelix, coiled-coil.*

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ХИРАЛЬНОСТИ СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

Шпигун Д.К., Луценко А.О., Сидорова А.Э.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: denish.den@mail.ru, aleksluchrus@yandex.ru,
sky314bone@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. В данной работе рассмотрены различные подходы к количественной оценке молекулярной хиральности – одной из актуальных проблем биохимической физики. Предложен новый, относительно простой, метод оценки хиральности спиральных структур белковых молекул. Метод основан на нахождении опорных точек – атомов альфа-углерода в полипептидной цепи и последующем расчете смешанных произведений векторов, соединяющих эти точки. Специальное внимание уделено нормировке хиральности спиральных белковых структур. Проанализировано 983 белков из 12 классов, (данные базы PDB). Показано, что, наряду с энергетически более выгодными правыми α - и 3_{10} -спиралями, среди исследованных белков имеются элементы вторичной структуры в левой конформации. На основании разработанного метода получена карта хиральности спиральных структур исследованных белков. Данный метод можно рассматривать как шаг к распространению понятия хиральности на иерархически вышестоящие категории объектов – белковые глобулы и надмолекулярные структуры.

Ключевые слова: белки, хиральность, альфа-углерод, α -спираль, 3_{10} -спираль, карта хиральности.

ВВЕДЕНИЕ

Хиральность как важнейшее свойство молекулярно-биологических систем является предметом активных фундаментальных исследований как в нашей стране, так и за рубежом [1-3]. Большое внимание уделяется решению задач, связанных с разработкой критериев и методов оценки хиральности биомолекул, а также выявлению зависимости «структура – биологическая активность». В.А. Твердисловым с коллегами разработана концепция иерархического структурообразования в макромолекулярных системах, согласно которой для природных белков прослеживается закономерное чередование знака хиральности структурных уровней L-D-L-D, начиная с левой структуры из аминокислотных остатков до четвертичной надмолекулярной структуры [4]. Эта концепция полностью соответствует современному взгляду на механизм образования пространственной конформации белка как многостадийного процесса, одной из стадий которого является формирование элементов вторичной структуры, в том числе различных спиральных форм (α -спиралей, 3_{10} -спиралей и др.), для которых наиболее энергетически выгодной является D-конформация [5,6]. Левозакрученные спирали встречаются реже и преимущественно в полипептидных цепях, содержащих много остатков глицина [7]. Следует отметить, что долгое время о левых спиралях в белках вообще мало что было известно. Лишь в 2005 г. шведские исследователи, впервые проведя детальный анализ множества спиралей с точки зрения частоты их встречаемости, длины, аминокислотного состава и стабильности, выявили более трех десятков L-спиралей, обозначив их важную структурно-функциональную роль [8]. Позднее, китайские ученые, проанализировав множество белковых структур, идентифицировали 72 левых α -спиралей и 812 левых 3_{10} -спиралей [9] и показали, что объективное знание о хиральности спиральных конформаций элементов вторичной структуры представляется крайне важным.

Обзор основных методов определения хиральности молекулярных структур.

Плоский характер и фиксированная длина пептидных связей предопределяют практически единственную возможность для сворачивания пептидной цепи путем поворота плоскостей пептидных связей относительно их связей с α -углеродными атомами. Такое вращение было описано двугранными углами ϕ (поворот плоскости, предшествующий данному α -углеродному атому – поворот вокруг связей N–Ca) и ψ (поворот плоскости, следующий за данным α -углеродным атомом – поворот вокруг связей Ca – C). Эта пара двугранных углов считается ключевым параметром при геометрической оценке хиральности белков методом Рамачандрана, позволяющим увидеть преобладающую конформацию элементов вторичной структуры биомолекул [10] и получившим широкое распространение. Однако оказалось, что возможно существование конформаций полипептидной цепи и вне разрешенных областей карты Рамачандрана, которая дает лишь частичную картину конформационного богатства белка.

Давно известно, что молекулярной хиральности может быть придан количественный смысл через специально параметризованные функции. Однако хиральность молекулярных структур как таковую очень сложно определить количественно. К настоящему времени предложено несколько подходов к решению этой проблемы.

В качестве первой меры хиральности была предложена так называемая функция хиральности, определяемая в соответствии с расстояниями от центра масс до плоскостей симметрии правильного тетраэдра или тригональной бипирамиды [12,13]. Согласно первым работам в области химии, посвященным оценке знака хиральности, любая мера хиральности геометрического объекта является псевдоскалярной (инвариантной при

правильных вращениях, но изменяющей знак при неправильных вращениях), и, в общем случае, молекула характеризуется бесконечным набором хиральных параметров [11]. В качестве основных методов оценки хиральности в области химии можно привести следующие: метод топологических индексов ветвления для алканов (в зависимости от определенных физических свойств молекул) [14] и метод двоичного кода для описания молекулярной формы и хиральности бензоидов, зависящий от направления обхода (зеркальные молекулы в виде 2D-графа обладают одинаковыми по модулю, но противоположными по знаку значениями «взвешенной атомной суммы» – меры хиральности) [14-16]. Методы оценки хиральности по Хаусдорффу основаны на совмещении исходной симметрии объекта с зеркальным образом в метрическом пространстве и расчете меры хиральности как минимального расстояния, разделяющего хиральный и ахиральный объекты [17]. Однако данные методы не позволяли однозначно определять знак хиральности.

Согласно М. Петижану [18], мера хиральности в трехмерном евклидовом пространстве должна удовлетворять следующим требованиям: иметь неограниченное количество точек в рассматриваемом пространстве, определяться для пространства любой размерности, не зависеть от способа зеркального отображения и являться непрерывной характеристикой. Д. Авнис с соавторами, рассматривая симметрию и ее комплементарную особенность – хиральность как непрерывное свойство, предложили использовать в качестве оценки степени хиральности молекулярной структуры (или ее фрагментов) так называемое расстояние симметрии (SD) – минимальное расстояние, необходимое для перемещения точек исходной (хиральной) формы для получения идеально симметричной формы ($SD = 0$) [19,20]: чем больше это значение, тем молекула более «хиральна» (верхний предел равен 100). Главное преимущество этого метода – возможность количественно сравнивать расстояние симметрии одного 3D-объекта относительно других элементов симметрии и находить локальные симметричные фрагменты. Позднее, теми же исследователями было предложено расширить возможности структурного анализа белков с помощью двумерной карты Рамачандрана путем создания трехмерной карты, включив статистический анализ количественной меры непрерывной хиральности аминокислотных остатков в каждой точке [21].

В работе [22] в качестве количественной оценки хиральности предлагается использовать отличие молекулы от ее образа, полученного в результате поворотов или зеркальных поворотов, т.е. количественная оценка хиральности связана с оценкой асимметрии молекулярной системы. В работе [23] проведен критический анализ метода функции диссимметрии молекул и ему подобных подходов, а также реализован усовершенствованный метод функции асимметрии, позволяющий более корректно и точно оценивать параметры асимметрии молекулы.

Основы физической теории хиральности при использовании одноэлектронных распределений плотности, прямо или косвенно определяемых молекулярными волновыми функциями, были развиты в работах П. Мези [24]. Другая попытка систематического построения теории хиральности на квантовохимическом уровне была предпринята А.В. Лузановым с соавт. [25]. Основная идея этой теории состоит в определении геометрических свойств пространственных кривых, связанных с траекториями электронов в молекулах. В качестве средней меры хиральности предлагается использовать индексы диссимметрии на основе оптической вращательной поляризуемости хиральных молекул.

Одним из более простых и универсальных, с нашей точки зрения, является подход к количественной оценке степени хиральности в иерархических структурах макромолекулярных систем, разработанный на кафедре биофизики МГУ [26]. Суть его состоит в построении последовательных векторов между соседними углеродами в цепи и определении их векторного произведения. Для определения знака хиральности спиральной вторичной структуры достаточным условием анализа является только взаимное расположение α -углеродов (C_α). Для оценки этого знака предложено использовать знак косинуса угла между вектором направления (суммой векторов между соседними атомами C_α) и вектором произведения (суммой всех векторных произведений).

Вышеизложенный метод был нами усовершенствован по следующим причинам. Во-первых, в качестве меры хиральности бралась длина вектора произведений, что не всегда приводило к правильной оценке хиральности (например, для двух последовательных правых спиралей, соединенных разными способами, в этом случае получаются кардинально разные результаты). Во-вторых, для оценки знака хиральности использовался знак косинуса угла между вектором направления и вектором произведения, что в определенных случаях могло привести к неверному определению знака хиральности.

Метод количественной оценки хиральности спиральных структур белков.

В качестве экспериментальных объектов были использованы спиральные структуры белков, представленные в международной базе данных PDB [27]. Рассмотрено 983 структуры белков – представителей 12 классов: оксидоредуктазы – 189, трансферазы – 86, гидролазы – 182, лиазы – 131, изомеразы – 113, лигазы – 89, транслказы – 130, шапероны – 15, вирусные белки – 26, структурные белки – 13, белки эндо- и экзоцитоза – 7, белки транспорта электронов – 4.

Сущность предлагаемого метода рассмотрим на модели полипептидной цепи, состоящей из n аминокислотных остатков и имеющей, соответственно, n атомов C_α в качестве опорных точек [28, 29]. Между каждыми двумя соседними опорными точками строим вектор v_i и для n опорных точек получаем $(n-1)$ векторов (рис. 1а). Для каждых трёх последовательных векторов рассчитываем их смешанное произведение (с учётом их координат):

$$([v_1, v_2], v_3) = (y_1 z_2 - y_2 z_1) x_3 + (z_1 x_2 - z_2 x_1) y_3 + (x_1 y_2 - x_2 y_1) z_3, \quad (1)$$

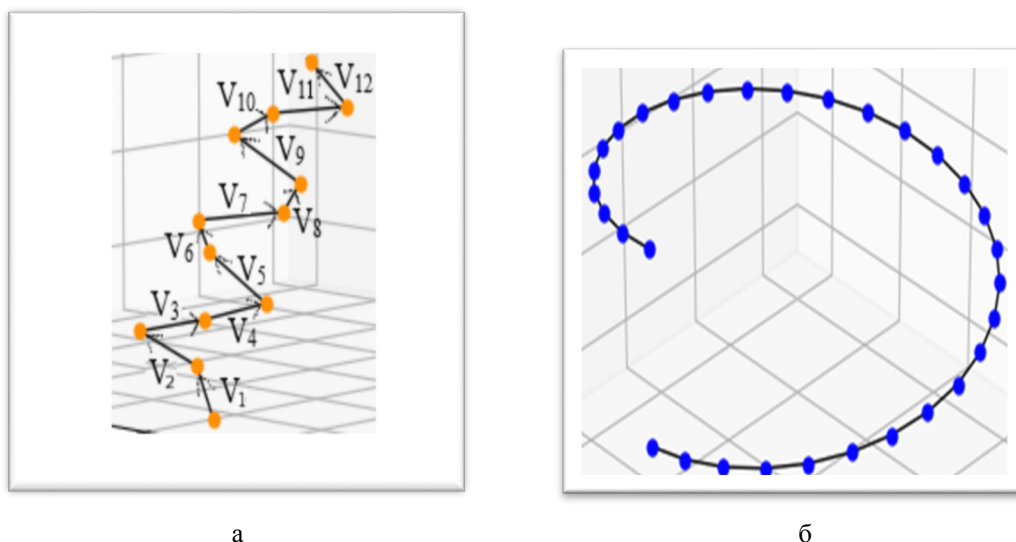


Рисунок 1. Модельная структура спирали белка: а – опорные точки и векторы; б – изображение цилиндрической винтовой линии с различным числом равномерно расположенных опорных точек

Сумма всех смешанных произведений может быть представлена в качестве характеристики хиральности спиральной структуры, и уравнение для её оценки можно записать следующим образом:

$$\chi = \sum_{i=1}^{n-3} ([v_i, v_{i+1}], v_{i+2}), \quad (2)$$

Исследована возможность нормировки хиральности спиральных белковых структур с соблюдением следующего принципа: поскольку хиральностью обладает физический объект, ее значение должно стремиться к некоторой постоянной величине при увеличении числа опорных точек, расположенных на том же объекте (то есть при увеличении плотности точек). Поэтому каждое смешанное произведение нормировалось на определенную степень k средней длины используемых в нем векторов. Подбор степени k осуществлялся исходя из следующего: поскольку основными объектами исследования являются белковые структуры с четко определенным расположением атомов углерода, в качестве эталона была взята цилиндрическая винтовая линия с равномерно расположенными точками (рис. 1б). Геометрическое исследование показало, что для сохранения конечной ненулевой хиральности при неограниченном увеличении числа точек следует взять пятую степень. Таким образом, нормировочный множитель рассчитывается по следующей формуле:

$$C_i = \left(\frac{1}{3} \sum_{j=0}^2 |v_{i+j}| \right)^5, \quad (3)$$

С учетом нормировки значение хиральности рассчитывается по следующей формуле:

$$\chi_{norm} = \sum_{i=1}^{n-3} \frac{([v_i, v_{i+1}], v_{i+2})}{C_i}, \quad (4)$$

С использованием разработанного метода получена карта нормированной хиральности для изученных белков. Карта представляет собой двумерный график, по горизонтальной оси которого отложена длина вторичной структуры в аминокислотных остатках (n), а по вертикальной оси – нормированная характеристика хиральности χ_{norm} (рис. 2). На картах правые α -спирали и 3_{10} -спирали располагаются в области $\chi_{norm} > 0$, а левые – $\chi_{norm} < 0$. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что, во-первых, α -спирали и 3_{10} -спирали представлены, в основном, правыми структурами, что соответствует теории знакопеременных хиральных структур и адекватно отражает данные, ранее представленные в научной литературе [3-6]. И, во-вторых, полученная характеристика хиральности линейно зависит от числа атомов в спирали.

В таблице 1 представлены данные диапазонов значений нормированной хиральности для представителей разных классов белков. Согласно проведенному исследованию, из общего количества идентифицированных α -спиралей примерно 99,4 % составляют α_R -спирали (правые α -спирали), а из общего количества 3_{10} -спиралей примерно 95,4 % составляют $(3_{10})_R$ -спирали (правые 3_{10} -спирали).

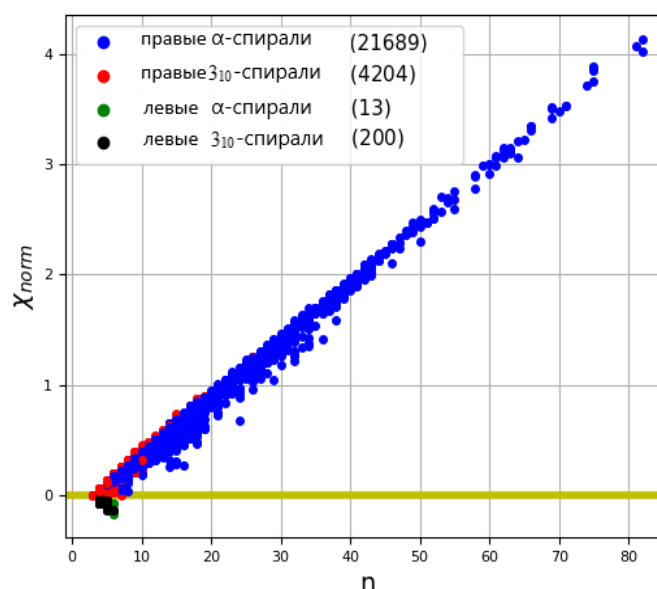


Рисунок 2. Карта нормированной хиральности изученных белков. В качестве экспериментальных объектов были использованы спиральные структуры белков, представленные в международной базе данных PDB

Что касается левых структур, то среди всех изученных классов белков левые спирали были идентифицированы почти во всех классах ферментов (табл. 2). Левые α -спирали составили 0.06 % от общего количества α -спиралей, а левые 3_{10} -спирали – 4.6 % от общего количества 3_{10} -спиралей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный метод оценки хиральности спиральных структур белков отличается небольшим количеством необходимой для его использования информации, а также простотой вычислений. Проведен анализ

Таблица 1. Диапазон значений нормированной хиральности для изученных классов белков

Класс фермента	α -Спирали				3_{10} -Спирали			
	α_R		α_L		$(3_{10})_R$		$(3_{10})_L$	
	общее кол-во	χ_{norm}	общее кол-во	χ_{norm}	общее кол-во	χ_{norm}	общее кол-во	χ_{norm}
Оксидоредуктазы	4180	0,024-3,005	6	(-0,054)-(-0,046)	735	0,008-1,725	13	(-0,115)-(-0,005)
Трансферазы	1669	0,015-1,559	-	-	191	0,025-0,881	6	(-0,122)-(-0,010)
Гидролазы	2949	0,026-3,528	3	(-0,047)-(-0,008)	373	0,034-0,773	43	(-0,132)-(-0,003)
Лиазы	1972	0,018-1,870	-	-	482	0,038-1,454	-	-
Изомеразы	2114	0,030-2,991	2	(-0,162), (-0,161)	348	0,004-1,263	1	(-0,001)
Лигазы	2965	0,007-1,425	-	-	659	0,002-1,420	15	(-0,015)-(-0,002)
Транслоказы	4525	0,009-4,019	-	-	1213	0,012-1,258	121	(-0,128)-(-0,005)
Шапероны	288	0,122-2,708	-	-	47	0,042-0,324	-	-
Вирусные белки	359	0,043-4,137	-	-	69	0,038-1,227	-	-
Структурные белки	172	0,097-3,532	-	-	17	0,044-0,180	2	(-0,118), (-0,035)
Белки эндо- и экзоцитоза	497	0,135-3,480	2	(-0,067), (-0,066)	34	0,043-0,479	-	-
Белки транспорта электронов	31	0,468-1,550	-	-	3	0,1-0,122	-	-

Таблица 2. Количество левых спиралей в изученных структурах белков

Класс белка	Общее кол-во спиралей (α -спиралей /спиралей 3_{10})	Кол-во левых спиралей (α -спиралей/ спиралей 3_{10})	% левых спиралей	
			α_L	$(3_{10})_L$
Оксидоредуктазы	4186/748	6/13	0,14	1,74
Трансферазы	1669/197	-/6	-	3,04
Гидролазы	2952/416	3/43	0,10	10,34
Лиазы	1972/482	-/-	-	-
Изомеразы	2116/349	2/1	0,09	0,29
Лигазы	2965/674	-/15	-	2,23
Транслоказы	4525/1334	-/121	-	9,07
Шапероны	288/47	-/-	-	-
Вирусные белки	359/69	-/-	-	-
Структурные белки	172/19	-/2	-	10,53
Белки эндо- и экзоцитоза	499/34	2/-	0,4	-
Белки транспорта электронов	31/3	-/-	-	-

хиральности структур α - и 3_{10} -спиралей для 983 белков. Полученные результаты соответствуют теории знакопеременных хиральных структур в иерархии белков. Построены карты хиральности вторичных спиральных структур для всех классов белков. Проведенный анализ вторичных белковых структур с использованием разработанного метода показал, что для всех изученных белков α -спирали и 3_{10} -спирали представлены, в основном, правыми структурами. Левые α -спирали составили 0,06 % от общего количества α -спиралей, а левые 3_{10} -спирали – 4,6 % от общего количества 3_{10} -спиралей. Скорее всего, образование левых 3_{10} -спиралей стерически более выгодно, чем образование более длинных левых α -спиралей. Примечательно, что наибольшее процентное содержание $(3_{10})_L$ -спиралей было обнаружено в гидролазах, транслоказах и структурных белках. Наибольший процент α_L -спиралей был идентифицирован в структурах белков эндо- и экзоцитоза. При этом в структурах лиаз, вирусных белков, шаперонов и белков транспорта электронов левых спиралей обнаружено не было. Данный метод можно рассматривать как шаг к раскрытию общих принципов и механизмов фолдинга белков.

Список литературы / References:

1. Cintas P. Chirality of living systems: a helping hand from crystals and oligopeptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, vol. 41, pp. 1139-1145.
2. Barron L.D. From Cosmic Chirality to Protein Structure: Lord Kelvin's Legacy. *Chirality*, 2012. doi: 10.1002/chir.22017
3. Tverdislov V.A., Malysheko E.V. On regularities in the spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of nonliving and living matter. *Physics Uspekhi*, 2019, vol. 62, no. 4, pp. 354-363.
4. Tverdislov V.A. Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 159-164.
5. Crick F.H.C. The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Cryst.*, 1953, vol. 6, pp. 689-692.
6. Barlow D.J., Thornton J.M. Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 201, pp. 601-619.
7. Efimov A.V. Chirality and Handedness of Protein Structures. *Biochemistry*, 2018, vol. 83, no 1, pp. 103-110.
8. Novotny Kleywegt G.J. A Survey of left-handed helices in protein structures. *Mol. Biol.*, 2005, vol. 347, no. 2, pp. 231-241.
9. Cao Ch., Wang G., Liu A., Xu Sh., Wang L., Zou Sh. A new secondary structure assignment algorithm using C_α backbone fragments. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, pp. 333-349.
10. Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, 1963, vol. 7, no. 1, pp. 95-99.
11. Harris A.B., Kamien R.D., Lubensky T.C. Molecular chirality and chiral parameters. *Rev. Mod. Phys.*, 1999, vol. 71, pp. 1745-1757.
12. Guye P.A. Influence de la constitution chimique des derives du carbone sur le sens et les variations de leur pouvoir rotatoire. *Compt. Rendus*, 1890, vol. 110, p. 714.
13. Ruch E., Schönhofer A. Näherungsformeln für spiegelungsantimetrische Moleküleigenschaften. *Theor. Chim. acta*, 1968, vol. 10, no. 2, pp. 91-110.
14. Randic M., Razinger M. Molecular shapes and chirality. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.*, 1996, vol. 36, no. 3, pp. 429-441.
15. Peng X-L., Fang K-T, Hu Q-N, Liang Yi-Z. Impersonality of the connectivity index and recomposition of topological indices according to different properties. *Molecules*, 2004, vol. 9, no. 12, pp. 1089-1099.
16. Zhao T., Zhang O., Long H., Xu L. Graph theoretical representation of atomic asymmetry and molecular chirality of benzenoids in two-dimensional space. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 7, p. e102043.

17. Buda A.B., Mislow K.A. A Hausdorff chirality measure. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, no. 15, pp. 6006-6012.
18. Petitjean M. Chiral mixtures. *J. Math. Physics*, 2002, vol. 43, no. 8, pp. 4147-4157.
19. Avnir D., Meyer A.V. Quantifying the degree of molecular shape. A chirality measure. *J. Molec. Struct. (Theochem.)*, 1991, vol. 226, pp. 211-222.
20. Zabrodsky H., Avnir D. Continuous Symmetry Measures, IV: Chirality. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, pp. 462-473.
21. Wang H., Avnir D., Tuvi-Arad I. Chiral Ramachandran plots II: general trends and protein chirality spectra. *Biochemistry*, 2018, vol. 57, no. 45, pp. 6395-6403.
22. Зоркий П.М., Афонина Н.Н. *Симметрия молекул и кристаллов*. М.: Изд-во Моск. Унта, 1979, 176 с. [Zorky P.M., Afonina N.N. *Symmetry of molecules and crystals*. Moscow: Unta, 1979, 176 p. (In Russ.)]
23. Alikhanidi S.E., Kuz'min V.E. Quantitative Evaluation of Molecular Chirality on Base of an Optimized Approach to Original and Reflected Structures Comparison. *Reports of NAS of Ukraine*, 1999, vol. 3, pp. 138-141.
24. Mezey P.G. Generalized chirality and symmetry deficiency. *J. Math. Chem.*, 1998, vol. 23, pp. 65-84.
25. Luzanov A.V. Positive chirality measures from chiroptical pseudoscalars: applications to carbon-containing molecular systems. *Functional materials*, 2015, vol. 22, no. 3, pp. 355-364.
26. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Kotov A.R., Tverdislov V.A., Ustinin M.N. Quantitative criteria of chirality in hierarchical protein structures. *Biophysics*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 155-166.
27. The Protein Data Bank. URL: <http://www.rcsb.org/>
28. Сидорова А.Э., Луценко А.О., Шпигун Д.К., Малышко Е.В., Твердислов В.А. Методы определения знака хиральности спиральных и суперспиральных структур белков. *Биофизика*, 2021, т. 66, № 3, с. 421-428. [Sidorova A.E., Lutsenko A.O., Shpigun D.K., Malyshko E.V., Tverdislov V.A. Methods to determine the chirality sign for helical and superhelical protein structures. *Biophysics*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 421-428. (In Russ.)]
29. Sidorova A.E., Malyshko E.V., Lutsenko A.O., Shpigun D.K., Bagrova O.E. Protein helical structures: defining handedness and localization features. *Symmetry*, 2021, vol. 13, no 5, p. 879.

METHOD FOR DETERMINING THE CHIRALITY OF PROTEIN HELICAL STRUCTURES

Shpigun D.K., Lutsenko A.O., Sidorova A.E.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory St., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: denish.den@mail.ru, aleksluchrus@yandex.ru, sky314bone@mail.ru

Abstract. In the present study, various approaches to the quantitation of the molecular chirality, one of the pressing problems of biochemical physics, are considered. A new relatively simple method for estimating chirality in protein secondary structures is proposed. The method is based on defining the reference (control) points – alpha-carbon atoms in the polypeptide chain followed by calculating the mixed products of bond vectors associated with relative position of these points. Special attention was given to the normalization of chirality in protein helical structures. We analyzed 983 proteins of 12 classes taken from the PDB database. Along with energetically favorable right-handed α - and 3_{10} -helices, the secondary structure motifs in the left-handed conformation were found. Based on the developed method a chirality map of protein helical structures was obtained. This method can be considered as a step towards extending the concept of chirality to hierarchically higher categories of objects - protein globules and supramolecular structures.

Key words: proteins, chirality, alpha-carbon, α -helix, 3_{10} -helix, chirality map.

ВЛИЯНИЕ СИЛЬНО СВЯЗАННЫХ МОЛЕКУЛ ВОДЫ НА ФОТОВОЗБУЖДЕНИЕ КРАСИТЕЛЯ ТИОНИНА В РАСТВОРЕ: КВАНТОВОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

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

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

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

² Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 19.07.2021

Аннотация. При помощи нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) на уровне X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD вычислен вибранный спектр поглощения тиазинового красителя тионина (ТН) в водном растворе. Данное исследование является логическим продолжением опубликованной ранее работы [L.O. Kostjukova et al. Optik 242 (2021) 167156], в которой водное окружение ТН задавалось неявно в приближении сплошной среды при помощи модели SMD. В настоящей работе использовалось комбинированное задание водного окружения: явным образом описывались пять молекул 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 ТН на ее ближайшую гидратную оболочку. Расчеты показали, что имеет место усиление этих Н-связей при фотовозбуждении красителя. При этом максимум вибранного спектра поглощения ТН испытывает батохромный сдвиг на 14 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 «ТН+5Н₂О». Выполнен анализ фотоиндуцированной поляризации молекулы красителя.

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

ВВЕДЕНИЕ

Тионин (3,7-диамино-фенотиазин-5, ТН, рис. 1) – фенотиазиновый краситель, впервые синтезированный Шарлем Лаутом в 1861 г.

ТН широко применяется для биологического окрашивания [1], фотосенсибилизации [2], фотоиндуцированной инактивации вирусов [3], фотоинициации полимеризации [4], в фотогальванических элементах [5] и нанокompозитных сенсорах [6-10]. При помощи оптических методов было установлено, что молекула ТН способна эффективно связываться с поверхностями графена [11,12], углеродных нанотрубок [13], наночастицами золота [13-16], глины [17-19], мембранами [20-21], различными макромолекулами [22,23], в том числе, с ДНК [24-26], РНК [27] и белками [28,29], мицеллами [30-32], квантовыми точками [33-35], циклодекстринами [36,37], железом [38-40], мезопорными метериалами [41], аминами [42]. Выполнено множество экспериментальных оптических исследований самого ТН – агрегации [43-52], гидрирования [53], радиолитического [54], триплетного состояния [51,55], фоторедукции [56-61], таутомерии [62], щелочного гидролиза [63], окислительной дегградации [64], электронных состояний [65] и сольватохромизма [66]. Теоретический анализ электронных состояний ТН был выполнен в [67-72]. Однако теоретический спектр поглощения красителя в водном растворе, совпадающий с экспериментальным ($\lambda_{\text{max}} \approx 597$ нм [44]), до недавнего времени не был получен. В частности, в [67-72] вычисленные величины максимума поглощения λ_{vert} оказались меньше экспериментальной λ_{max} . Возможной причиной такого расхождения явился неучет вибранной связи. Несмотря на множество работ, посвященных фотофизическим свойствам этого красителя, некоторые вопросы все еще вызывают разногласия. Одним из них является тип синглетного электронного перехода, соответствующий полосе поглощения в видимой области. В теоретических работах получено, что полоса поглощения ТН в видимой области спектра обусловлена переходом НОМО→LUMO ($S_0 \rightarrow S_1$), относящегося к $\pi \rightarrow \pi^*$ типу [67-72]. В работе [66] на основе спектроскопии термальной линзы авторы сделали вывод о существовании двух близко расположенных состояний S_1 (^1L_a и ^1L_b),

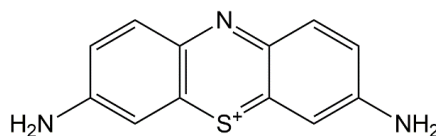


Рисунок 1. Молекула тионина

образованных связыванием π^* - и n -состояний. При этом в эксперименте ТН проявляет отрицательный сольватохромизм (гипсохромный сдвиг при увеличении полярности растворителя; например, $\lambda_{\max}$ в этаноле равно 603 нм [67], а в воде – 597 нм, как упоминалось выше), что, в общем, соответствует $n \rightarrow \pi^*$ типу перехода с уменьшением дипольного момента молекулы при возбуждении [77]. Авторы работы [67] утверждают о переходе $n \rightarrow \pi^*$ типа, обусловленном наличием $C=S^+$ пары атомов в составе хромофора (см. рис. 1). Исчезновение полосы поглощения с $\lambda_{\max}=597$ нм (т.е. обесцвечивание раствора) в сильноокислой среде с $pH < 2$ (протонирование n -электронов неподеленной пары, в результате чего они теряют свой несвязывающий характер) также свидетельствует и об $n \rightarrow \pi^*$ типе перехода [44]. Второй спорный момент заключается в следующем. Особенностью спектра поглощения ТН (как и принадлежащего к тому же тиазиновому семейству метиленового синего) является коротковолновое плечо ($\lambda_{\text{shoulder}}=558$ нм в водном растворе [52]). Большинство авторов традиционно считают, что это плечо обусловлено димерным поглощением (см., например, [44,48,50]). Однако плечо наблюдается и в спектрах сильно разбавленных растворов красителя, где доля димеров пренебрежимо мала (4 μM в [52]). Кроме того, плечо присутствует в спектрофотометрически разрешенном спектре мономера [48]. Вопрос усложняется тем, что димер имеет максимум поглощения, расположенный очень близко к плечу ($\lambda_{2\max} \approx 563$ нм в водном растворе [50]). Другие исследователи объясняют существование плеча взаимодействием с растворителем, но не раскрывают его сущности [52]. В работе [68] на основании теоретических вычислений (SCF MO (CI)) утверждается, что плечо соответствует переходу $S_0 \rightarrow S_2$, а главный пик поглощения обусловлен переходом $S_0 \rightarrow S_1$. Авторы работы [50,70] считают плечо вибронной субполосой.

В недавней работе [73] нами впервые был вычислен вибронный спектр поглощения АС в водном растворе, хорошо совпавший с экспериментальным по положениям главного максимума и плеча. Поскольку ТН, как и остальные тиазиновые 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 [73] было показано, что использование модели SMD [74] вместо PCM позволяет преодолеть это затруднение (впервые этот подход был использован другими авторами [75] для оксазиновых красителей). Наилучшее совпадение расчетного спектра с экспериментальным продемонстрировал функционал X3LYP [76]. Однако влияние сайт-специфических взаимодействий (водородных связей) с водным окружением в [73] 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 [77,78]. Важно также и обратное влияние возбуждения молекулы красителя на ее Н-связи с растворителем. В настоящей работе этот анализ выполнен путем комбинированного задания растворителя: пять молекул воды, образующие сильные Н-связи с молекулой АС, 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 [79], 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.

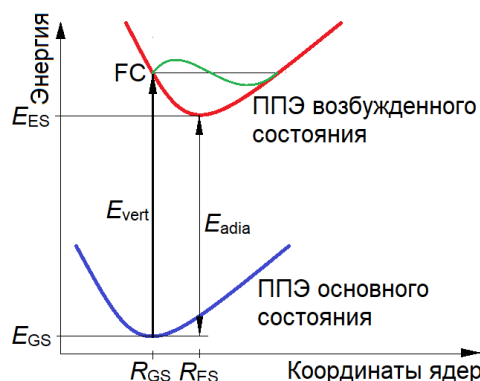


Рисунок 2. Энергетическая диаграмма вибронного перехода

Для расчета вибронных спектров однофотонного поглощения использовался обобщенный подход [80], 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:

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

где $\mathbf{Q}$ – нормальные координаты, взвешенные по массе. Член нулевого порядка в (2) соответствует приближению Франка-Кондона (сильные разрешенные переходы) [79] и поправке первого порядка к подходу Герцберга-Теллера (слабые запрещенные переходы) [81]. В настоящей работе для расчета вибронных спектров использовался общий метод Франка-Кондона-Герцберга-Теллера [82].

Расчет электронно-колебательных спектров требует вычисления интегралов перекрытия, которые зависят от нормальных колебательных мод основного и возбужденного состояний. Для интегрирования используется линейное преобразование Душинского [30]:

$$\mathbf{Q}_{GS} = \mathbf{J}\mathbf{Q}_{ES} + \mathbf{K} \quad (3)$$

где $\mathbf{J}$ – матрица Душинского, $\mathbf{K}$ – вектор сдвига. Выражения для $\mathbf{J}$ и $\mathbf{K}$ 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:

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

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, $\omega_{adia} = \frac{E_{adia}}{\hbar}$, E_{adia} – адиабатическая энергия (разность энергий основных колебательных состояний основного состояния) и возбужденные электронные состояния, 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 «ТН+5H₂O» представлена на рисунке 3. Согласно нашим расчетам, водородные связи ТН 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 Han (см., например, [77]).

Вибронный спектр поглощения системы «ТН+5H₂O» показан на рисунке 4.

Как видно из рисунка 4, расчетный максимум поглощения находится на $\lambda_{\text{vibron}} = 611 \text{ нм}$, в то время как экспериментальный спектр имеет $\lambda_{\text{max}} = 597 \text{ нм}$. Эта же величина была также получена нами теоретически в [20] для одиночной молекулы ТН на том же уровне теории X3LYP/6-31++G(d,p)/SMD. При этом форма спектра остается практически такой же. В частности, у спектра сохраняется коротковолновое плечо, обусловленное вибронными переходами №7 и №8 (табл. 1). Таким образом, пять сильных водородных связей молекулы красителя с его ближайшей гидратной оболочкой вызывают длинноволновый (батохромный сдвиг) максимума поглощения на 14 нм. Эта закономерность имела место при расчете энергий вертикальных переходов профламина

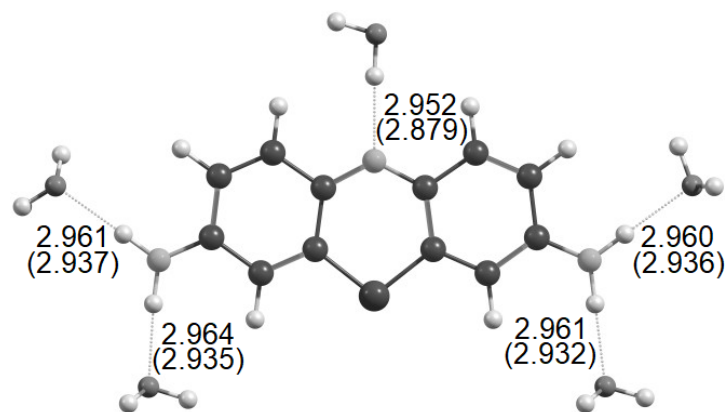


Рисунок 3. Расчетная структура гидратного комплекса ТН с пятью молекулами воды. Сильные водородные связи показаны пунктирными линиями. Их длины в Å (расстояния между тяжелыми атомами) указаны для основного и равновесного возбужденного (в скобках) состояний

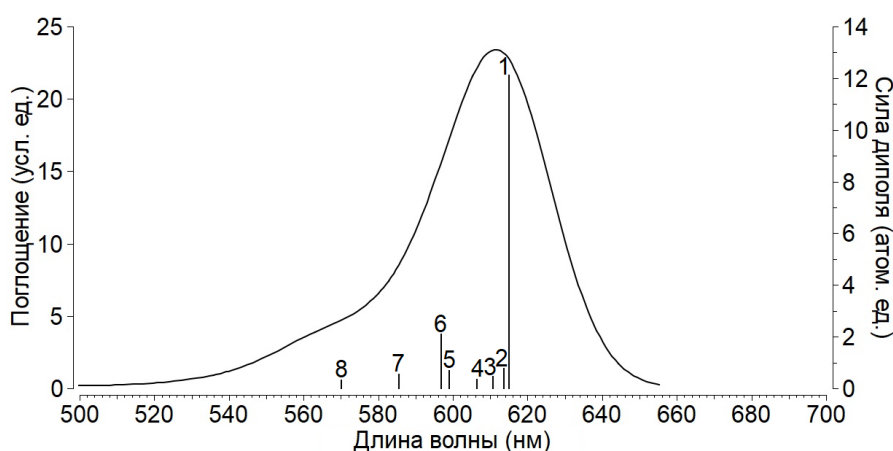


Рисунок 4. Расчетный спектр поглощения гидратного комплекса «ТН+5H₂O». Вертикальными линиями показаны силы диполя вибронных переходов из таблицы 1

в воде [78]. Ее можно объяснить следующим образом. Поскольку энергия взаимодействия с молекулами воды для АС 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 «ТН+5H₂O» в основном и возбужденном состояниях показаны на рисунке 5. 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 «ТН+5H₂O» составляет 41, соответственно, число нормальных мод колебаний $N=3 \times 41 - 6 = 117$.

Таблица 1. Вибронные переходы поглощения в комплексе «ТН+5H₂O»

№	Переход	λ (нм)	E (эВ)	ν (см ⁻¹)	I	p (атом. ед.)	Описание колебаний
1	$0_0 \rightarrow 0^0$	615	2,02	0	162600	12,1	-
2	$0_0 \rightarrow 3^1$	614	2,02	32,2	10130	0,753	Маятниковые колебания молекул воды в плоскости хромофора
3	$0_0 \rightarrow 13^1$	611	2,03	115	5978	0,442	Сжатие-растяжение водородных связей с молекулами воды
4	$0_0 \rightarrow 29^1$	606	2,04	230	4713	0,346	Изгибные колебания хромофора в его плоскости
5	$0_0 \rightarrow 42^1$	599	2,07	433	9320	0,676	Сжатие-растяжение центрального кольца хромофора вдоль его короткой оси
6	$0_0 \rightarrow 44^1$	597	2,08	495	28720	2,08	
7	$0_0 \rightarrow 59^1$	585	2,12	819	7736	0,549	Сдвиговые колебания боковых колец хромофора
8	$0_0 \rightarrow 77^1$	570	2,18	1281	4299	0,297	Сжатие-растяжение центрального кольца хромофора вдоль его длинной оси

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

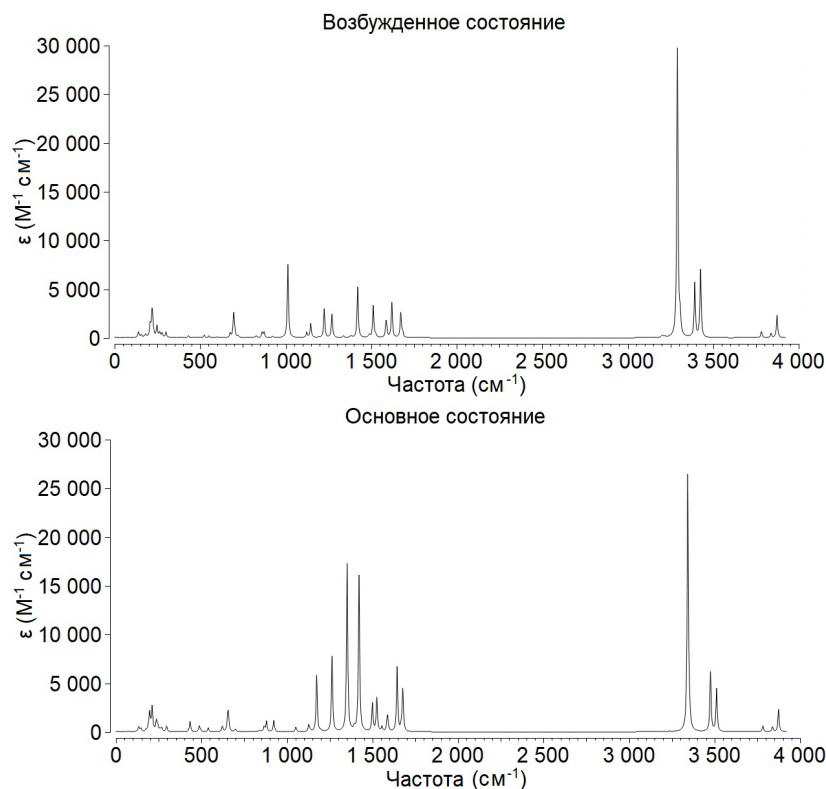


Рисунок 5. Теоретические спектры колебаний гидратного комплекса «ТН+5Н₂О»

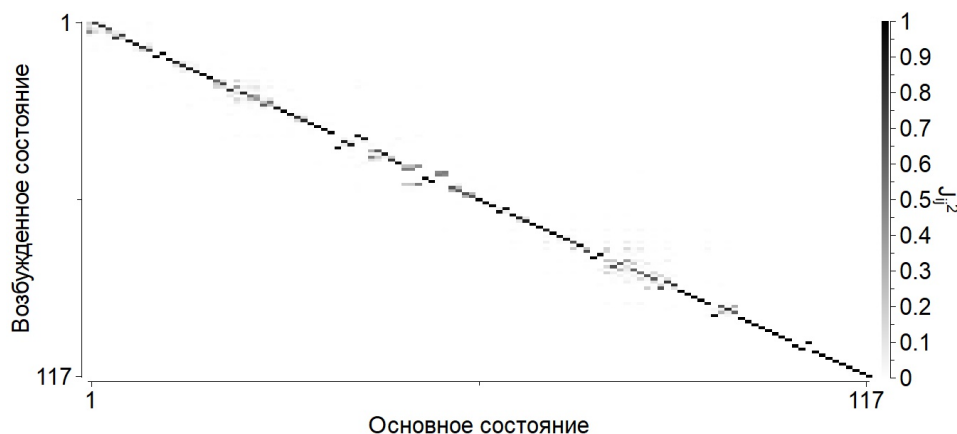


Рисунок 6. Матрица Душинского для системы «ТН+5Н₂О»

Как и в случае одиночной молекулы ТН в неявно заданной водной среде [73], полоса поглощения комплекса «ТН+5Н₂О» в видимой области соответствует синглет-синглетному переходу НОМО→LUMO. Комплекс содержит 168 электронов и, соответственно, 84 занятых молекулярных орбитали (МО). При этом МО №84 является НОМО, а МО №85 – LUMO (рис. 6). Однако, в целом, добавление сильно связанных молекул воды не изменяет существенно конфигураций данных граничных МО. Сумма франк-кондоновских факторов составила 99,76 %, следовательно, вкладом Герцберга-Теллера из (2) можно пренебречь.

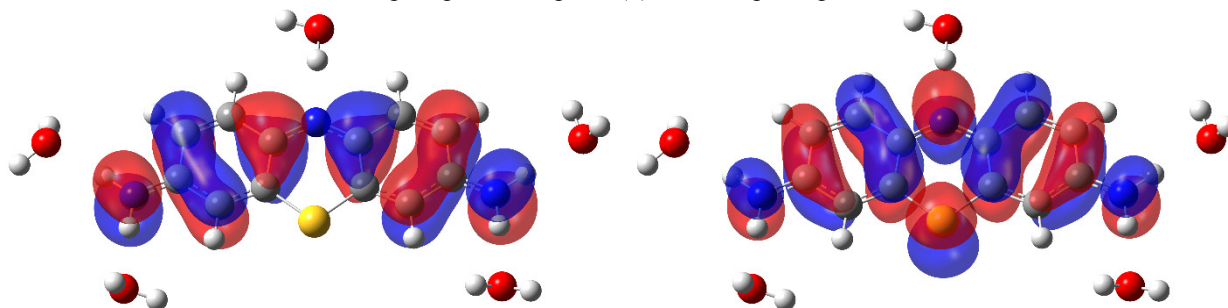


Рисунок 7. Граничные МО системы «ТН+5Н₂О», между которыми происходит рассматриваемый электронный переход: НОМО (слева) и LUMO (справа)

Таблица 2. Три наиболее низкоэнергетичных электронных перехода в системе «ТН+5H₂O»

№	Переход	λ_{vert} , нм	E_{vert} , эВ	f	Задействованные МО
1	S ₀ →S ₁	584	2,12	1,31	HOMO→LUMO
2	S ₀ →S ₂	481	2,58	0,0101	(HOMO-1)→LUMO
3	S ₀ →S ₃	341	3,63	0,0023	(HOMO-4)→LUMO

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 пяти сильно связанных с красителем молекул воды заметная поляризация при фотовозбуждении ТН имеет место только для одной – образующей водородную связь с гетероциклическим атомом кислорода О9 в центральном кольце хромофора (рис. 8 сверху). Данный атом претерпевает значительное изменение электронной плотности.

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 пяти молекул воды, образующих сильные водородные связи с молекулой ТН, вызывает батохромный сдвиг максимума и расчетного спектра поглощения в целом на 14 нм. При этом форма теоретического спектра, в частности его вибронного плеча, 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 пяти 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 четырех молекулах воды, а отрицательный – на центральном кольце хромофора и связанной с ним пятой молекулой воды.

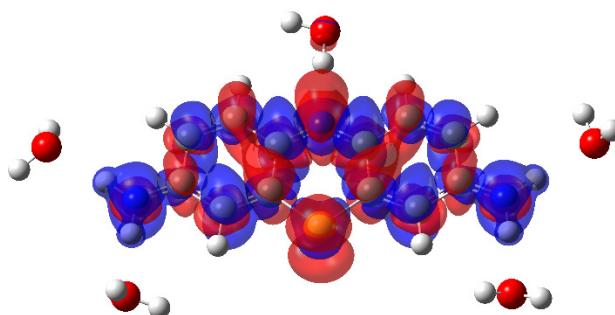


Рисунок 8. Разность $\Delta\rho$ электронных плотностей во франк-кондоновском и основном состояниях комплекса «ТН+5H₂O». Положительные значения $\Delta\rho$ показаны красным цветом, отрицательные – синим

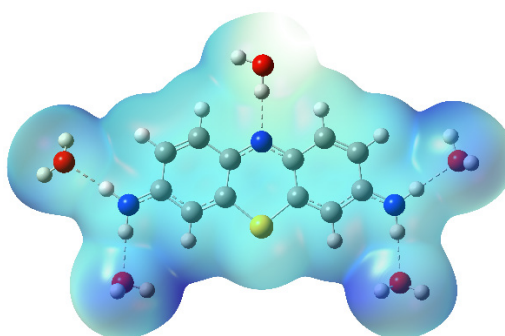


Рисунок 9. Карта распределения электростатического потенциала по ван-дер-ваальсовской поверхности системы «ТН+5H₂O» (равновесное возбужденное состояние). Более темный синий цвет соответствует большему значению положительного потенциала

Список литературы / References:

1. Kramer H., Windrum G.M. The metachromatic staining reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, 1955, vol. 3, pp. 227-237.
2. Shiyanovskaya I., Hepel M. Decrease of Recombination Losses in Bicomponent WO₃/TiO₂ Films Photosensitized with Cresyl Violet and Thionine. *J. Electrochem. Soc.*, 1988, vol. 145, pp. 3981-3985.
3. Jockusch S., Lee D., Turro N.J., Leonard E.F. Photo-induced inactivation of viruses: Adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Q β bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, vol. 93, pp. 7446-7451.
4. Neumann M.G., Rodrigues M.R. The mechanism of the photoinitiation of the polymerization of MMA by the thionine-triethanolamine system. *Polymer*, 1998, vol. 39, pp. 1657-1661.
5. Groenen E.J.J., de Groot M.S., de Ruiter R., de Wit N. Triton X-100 Micelles in the Ferrous/Thionine Photogalvanic Cell. *J. Phys. Chem.*, 1984, vol. 88, pp. 1449-1454.
6. Zhu L., Luo L., Wang Z. DNA electrochemical biosensor based on thionine-graphene nanocomposite. *Biosensors Bioelectronics*, 2012, vol. 35, pp. 507-511.
7. Hu B., Quhe R., Chen C., Zhuge F., Zhu X., Peng S., Chen X., Pan L., Wu Y., Zheng W., Yan Q., Lu J., Li R.-W., Electrically controlled electron transfer and resistance switching in reduced graphene oxide noncovalently functionalized with thionine. *J. Mater. Chem.*, 2012, vol. 22, pp. 16422-16430.
8. Afkhami A., Shirzadmehr A., Madrakian T., Bagheri H. New nano-composite potentiometric sensor composed of graphene nanosheets/thionine/molecular wire for nanomolar detection of silver ion in various real samples. *Talanta*, 2015, vol. 131, pp. 548-555.
9. Guo L., Zhang Q., Huang Y., Han Q., Wang Y., Fu Y., The application of thionine-graphene nanocomposite in chiral sensing for Tryptophan enantiomers. *Bioelectrochemistry*, 2013, vol. 94, pp. 87-93.
10. Shobha Jeykumari D.R., Ramaprabhu S., Sriman Narayanan S. A thionine functionalized multiwalled carbon nanotube modified electrode for the determination of hydrogen peroxide. *Carbon*, 2007, vol. 45, pp. 1340-1353.
11. Chen C., Zhai W., Lu D., Zhang H., Zheng W. A facile method to prepare stable noncovalent functionalized graphene solution with thionine. *Materials Res. Bull.*, 2011, vol. 46, pp. 583-587.
12. Krzyszkowska E., Walkowiak-Kulikowska J., Stienen S., Wojcik A. Thionine-graphene oxide covalent hybrid and its interaction with light. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, vol. 19, pp. 14412-14423.
13. Wang Z., Li M., Zhang Y., Yuan J., Shen Y., Niu L., Ivaska A. Thionine-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticle composites. *Carbon*, 2007, vol. 45, pp. 2111-2115.
14. Ruan C., Wang W., Gu B. Single-molecule detection of thionine on aggregated gold nanoparticles by surface enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.*, 2007, vol. 38, pp. 568-573.
15. Ding Y., Chen Z., Xie J., Guo R. Comparative studies on adsorption behavior of thionine on gold nanoparticles with different sizes. *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, vol. 327, pp. 243-250.
16. Jesna K.K., Ilanchelian M. Photophysical changes of thionine dye with folic acid capped gold nanoparticles by spectroscopic approach and its in vitro cytotoxicity towards A-549 lung cancer cells. *J. Mol. Liquids*, 2017, vol. 242, pp. 1042-1051.
17. Neumann M.G., Schmitt C.C., Gessner F. Time-Dependent Spectrophotometric Study of the Interaction of Basic Dyes with Clays II: Thionine on Natural and Synthetic Montmorillonites and Hectorites. *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, vol. 177, pp. 495-501.
18. 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.
19. Gigli L., Arletti R., Vitillo J.G., Alberto G., Martra G., Devaux A., Vezzali G. Thionine Dye Confined in Zeolite L: Synthesis Location and Optical Properties. *J. Phys. Chem. C*, 2015, vol. 119, pp. 16156-16165.
20. de Souza R.M., Siani P., Schmidt T.F., Itri R., Dias L.G. Methylene Blue Localization in (Hydroperoxidized) Cardiolipin Monolayer: Implication in Membrane Photodegradation. *J. Phys. Chem. B*, 2017, vol. 121, pp. 8512-8522.
21. SenVarma A., Bhowmik B.B. Photoinduced interaction of thionine with phospholipid and cholesterol in artificial membranes. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1991, vol. 8, pp. 295-305.
22. Viswanathan K., Natarajan P. Photophysical properties of thionine and phenosafranin dyes covalently bound to macromolecules. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1996, vol. 95, pp. 245-253.
23. Balasubramaniam E., Natarajan P. Photophysical properties of protoporphyrin IX and thionine covalently attached to macromolecules. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1997, vol. 103, pp. 201-211.
24. Paul P., Hossain M., Yadav R.C., Kumar G.S. Biophysical studies on the base specificity and energetics of the DNA interaction of photoactive dye thionine: Spectroscopic and calorimetric approach. *Biophys. Chem.*, 2010, vol. 148, pp. 93-103.
25. Paul P., Kumar G.S. Toxic interaction of thionine to deoxyribonucleic acids: Elucidation of the sequence specificity of binding with polynucleotides. *J. Hazard. Mat.*, 2010, vol. 184, pp. 620-626.
26. Paul P., Kumar G.S., Thionine Interaction to DNA: Comparative Spectroscopic Studies on Double Stranded Versus Single Stranded DNA. *J. Fluoresc.*, 2012, vol. 22, pp. 71-80.
27. Paul P., Kumar G.S. Targeting ribonucleic acids by toxic small molecules: Structural perturbation and energetics of interaction of phenothiazinium dyes thionine and toluidine blue O to tRNA^{phe}. *J. Hazard. Mat.*, 2013, vol. 263, pp. 735-745.

28. Shanmugaraj K., Anandakumar S., Ilanchelian M. Exploring the biophysical aspects and binding mechanism of thionine with bovine hemoglobin by optical spectroscopic and molecular docking methods. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014, vol. 131, pp. 43-52.
29. Manivel P., Anandakumar S., Ilanchelian M. Exploring the interaction of the photodynamic therapeutic agent thionine with bovine serum albumin: multispectroscopic and molecular docking studies. *Luminescence*, 2015, vol. 30, pp. 729-739.
30. Gokturk S., Talman R.Y. Effect of Temperature on the Binding and Distribution Characteristics of Thionine in Sodium Dodecylsulfate Micelles. *J. Solution Chem.*, 2008, vol. 37, pp. 1709-1723.
31. Porcal G.V., Arbeloa E.M., Bertolotti S.G., Previtali C.M. Photophysics of Thionine in AOT and BHDC reverse micelles. Quenching of the triplet state by aliphatic amines studied by transient absorption spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2017, vol. 346, pp. 187-193.
32. Gokturk S., Keskin G., Talman R.Y.C., Cakir N. Spectroscopic and conductometric studies on the interactions of thionine with anionic and nonionic surfactants. *Color. Technol.*, 2017, vol. 0, pp. 1-7.
33. Ovchinnikov O.V., Smirnov M.S., Kondratenko T.S., Ambrosevich S.A., Metlin M.T., Grevtseva I.G., Perepelitsa A.S. Forster resonance energy transfer in hybrid associates of colloidal Ag₂S quantum dots with thionine molecules. *J. Nanopart. Res.*, 2017, vol. 19, p. 403.
34. Smirnov M.S., Ovchinnikov O.V., Grevtseva I.G., Tesfamichael E.T., Tikhomirov S.A., Buganov O.V., Kondratenko T.S. Control of direction of nonradiative resonance energy transfer in hybrid associates of colloidal Ag₂S/TGA QDs with thionine molecules. *J. Nanopart. Res.*, 2019, vol. 21, p. 67.
35. Smirnov M.S., Ovchinnikov O.V., Perepelitsa A.S. Resonant Nonradiative Energy Transfer in Hybrid Associates of Thionine Molecules and Ag₂S Colloidal Quantum Dots with Different Luminescence Mechanisms. *Optics Spectrosc.*, 2019, vol. 126, pp. 62-69.
36. Sanyo H. Interactions of β - and γ -Cyclodextrins with Thionine and 2-Naphthalenesulfonate in Aqueous Solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2000, vol. 73, pp. 861-866.
37. Hecht C., Hermann P., Friedrich J., Chang C.-C., Chang T.-C. Thionin in a cyclodextrin nanocavity: Measuring local compressibilities by pressure tuning hole burning spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 2005, vol. 413, pp. 335-341.
38. Dixit N.S., Mackay R.A. Microemulsions as Photogalvanic Cell Fluids. The Surfactant Thionine-Iron(II) System. *J. Phys. Chem.*, 1982, vol. 86, pp. 4593-4598.
39. Suds Y., Shimoura Y., Sakata T., Tsubornura H. Photogalvanic Effect in the Thionine-Iron System at Semiconductor Electrodes. *J. Phys. Chem.*, 1978, vol. 82, pp. 268-271.
40. Ferreira M.I.C., Harriman A. Photoredox Reactions of Thionine. *Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1977, vol. 1, no. 73, pp. 1085-1092.
41. Xu W., Aydin M., Zakia S., Akins D.L. Aggregation of Thionine within AIMCM-48. *J. Phys. Chem. B*, 2004, vol. 108, pp. 5588-5593.
42. Murthy A.S.N., Bhardwa A.P., Charge-transfer Interactions of Thionine and Toluidine Blue with Amines. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1982, vol. 2, no. 78, pp. 1811-1814.
43. Rabinowitch E., Epstein L.F. Polymerization of dyestuffs in solution. thionine and methylene blue. *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, vol. 63, pp. 69-78.
44. Epstein L.F., Karush F., Rabinowitch E. A Spectrophotometric Study of Thionine. *J. Opt. Soc. Am.*, 1941, vol. 31, pp. 77-84.
45. Sheppard S.E., Geddes A.L. Effect of solvents upon the absorption spectra of dyes. V. Water as solvent: Quantitative examination of the dimerization hypothesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, vol. 66, pp. 2003-2009.
46. Haugen G., Hardwick R. Ionic Association in Solutions of Thionine. *J. Phys. Chem.*, 1963, vol. 67, pp. 725-731.
47. Haugen G., Hardwick R. Ionic Association in Solutions of Thionine. II. Fluorescence and Solvent Effects. *J. Phys. Chem.*, 1965, vol. 69, pp. 2988-2996.
48. Ballard R.E., Park C.H. Optical Absorption Bandshapes of Acridine Orange, Thionine, and Methylene Blue in Monomeric and Dimeric States. *J. Chem. Soc. (A)*, 1970, pp. 1340-1343.
49. Dewey T.G., Wilson P.S., Turner D.H. Solvent Effects on Stacking. A Kinetic and Spectroscopic Study of Thionine Association in Aqueous Alcohol Solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, vol. 100, pp. 4550-4554.
50. Lai W.C., Dixit N.S., Mackay R.A. Formation of H Aggregates of Thionine Dye in Water. *J. Phys. Chem.*, 1984, vol. 88, pp. 5364-5368.
51. Das S., Kamat P.V. Can H-Aggregates Serve as Light-Harvesting Antennae? Triplet-Triplet Energy Transfer between Excited Aggregates and Monomer Thionine in Aersol-OT Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 1999, vol. 103, pp. 209-215.
52. 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.
53. 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.
54. Liu Y., Yamamoto S., Fujiyama Y., Sueishi Y. Kinetic study on the reversible hydride transfer between methylene blue and thionine. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, vol. 2, pp. 2367-2371.
55. Guha S.N., Moorthy P.N., Kishore K., Naik D.B., Rao K.N. One-electron reduction of thionine studied by pulse radiolysis. *Proc. Ind. Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, 1987, vol. 99, pp. 261-271.

56. Kamat P.V., Lichtin N.N. Electron transfer in the quenching of protonated triplet thionine and methylene blue by ground state thionine. *J. Photochem.*, 1982, vol. 18, pp. 197-209.
57. Liu A., Kamat P.V. Dye-Capped Semiconductor Nanoclusters. One-Electron Reduction and Oxidation of Thionine and Cresyl Violet H-Aggregates Electrostatically Bound to SnO₂ Colloids. *Langmuir*, 1996, vol. 12, pp. 2190-2195.
58. Wildes P.D., Lichtin N.N. Indirect Measurement of the Thionine-Leucothionine Synproportionation Rate Constant by a Photochemical Perturbation Technique. *J. Phys. Chem.*, 1978, vol. 82, pp. 981-984.
59. Kamat P.V. Photoelectrochemistry in colloidal systems: interfacial electron transfer between colloidal TiO₂ and thionine in acetonitrile. *J. Photochem.*, 1985, vol. 28, pp. 513-524.
60. Usui Y. Photoreduction of methylene blue and thionine in ethanol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1965, vol. 38, pp. 206-215.
61. Somer G., Temize A. Photoreduction of thionine by water. *Photochem. Photobiol.*, 1984, vol. 40, pp. 575-580.
62. Hatchard C.G., Parke C.A. The photoreduction of thionine by ferrous sulphate. *Trans. Faraday Soc.*, 1961, vol. 57, pp. 1093-1106.
63. Weng K.C., Chiang C.-C., Cheng J.-Y., S.-Y. Cheng, R.I. Personov, T.-C. Chang, Investigation of tautomeric structures of thionin by satellite holes: matrix dependence. *Chem. Phys. Lett.*, 1999, vol. 302, pp. 347-353.
64. Mills, 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.
65. Katafias A., Fenska J. Sulfuric acid controlled oxidative degradation of azure B and thionine dyes by cerium(IV). *Int. J. Chem. Kinetics*, 2011, vol. 43, pp. 523-536.
66. Hempelmann U., Dorfmueller T. Thermal lens spectroscopy of the phenothiazine dye thionine in solution. *J. Mol. Liquids*, 1991, vol. 48, pp. 261-275.
67. 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.
68. Sommer U., Kramer H.E.A. A theoretical treatment of the electronic states of thionine and related molecules. *Photochem. Photobiol.*, 1971, vol. 13, pp. 387-398.
69. Homem-de-Mello P., Mennucci B., Tomasi J., da Silva A.B.F. The effects of solvation in the theoretical spectra of cationic dyes. *Theor. Chem. Acc.*, 2005, vol. 113, pp. 274-280.
70. Rodriguez-Serrano A., Daza M.C., Doerr M., Marian C.M. A quantum chemical investigation of the electronic structure of thionine. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, vol. 11, pp. 397-408.
71. Rodriguez-Serrano A., Rai-Constapel V., Daza M.C., Doerr M., Marian C.M. A theoretical study of thionine: spin-orbit coupling and intersystem crossing. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, vol. 11, pp. 1860-1867.
72. Rodriguez-Serrano A., Rai-Constapel V., Daza M.C., Doerr M., Marian C.M. Internal heavy atom effects in phenothiazinium dyes: enhancement of intersystem crossing via vibronic spin-orbit coupling. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, vol. 17, pp. 11350-11358.
73. Kostjukova L.O., Leontieva S.V., Kostjukov V.V. TD-DFT/DFT study of thionine in aqueous solution: Vibronic absorption spectrum and electronic properties. *Optik*, 2021, vol. 242, p. 167156.
74. 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.
75. Fleming S., Mills A., Tuttle T. Predicting the UV-vis spectra of oxazine dyes. *Beilstein J. Org. Chem.*, 2011, vol. 7, pp. 432-441.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. Condon E.U. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Phys. Rev.*, 1928, vol. 32, pp. 858-872.
80. 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.
81. Herzberg G., Teller E. Schwingungsstruktur der Elektronenübergänge bei mehratomigen Molekülen. *Z. Phys. Chem., Abt. B*, 1933, vol. 21, pp. 410-446.
82. Santoro F., Lami A., Improta 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 Q_x band of porphyrin as a case study. *J. Chem. Phys.*, 2008, vol. 128, p. 224311.
83. 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.

INFLUENCE OF STRONGLY BINDED WATER MOLECULES ON PHOTOEXCITATION OF THIONINE DYE IN SOLUTION: QUANTUM CHEMICAL ANALYSIS

Kostjukova L.O.¹, Voronin D.P.², Rybakova K.A.², Savchenko E.V.², Kostjukov V.V.²¹ Nakhimov Black Sea Higher Naval School*Dybenko st. 1a, Sevastopol, 299028, Russia*² Sevastopol 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 thionine (TH) in an aqueous solution was calculated. This study is a logical continuation of the previously published work [L.O. Kostjukova et al. *Optik* 242 (2021) 167156], in which the water environment of TH was set implicitly in the continuum approximation using the SMD model. In the present work, we used a combined setting of the aqueous environment: five 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 TH 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 of TH undergoes a bathochromic shift by 14 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 "TH+5H₂O" system have been built. The photoinduced polarization of the dye molecule was analyzed.

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

ОЦЕНКА ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Садовничук М.Д., Скоробогатова А.С.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
ул. Академическая 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: mariasadovnichuk@gmail.com
Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В современном мире особое место приобретают исследования, направленные на улучшение качества жизни населения, что определяет потребность в поиске новых эффективных способов диагностики и лечения патологий человека, основывающихся на принципах персонализированной медицины. В норме в организме поддерживается оптимальный микроэлементный баланс, который обеспечивает нормальный обмен веществ. Дисбаланс поступления и усвоения нутриентов закономерно ведет к нарушениям минерального обмена и появлению болезней. Поэтому, выявление и оценка сдвигов в обмене макро- и микроэлементов с последующей их коррекцией являются перспективным направлением современной диагностики. В работе методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой проведен анализ 29 образцов крови женщин различных возрастных групп. Анализ полученных данных показал статистически достоверное увеличение уровня железа, калия, магния, фосфора и селена у женщин старше 35 лет, которое может быть связано с физиологическими особенностями старения и замедления метаболических процессов с возрастом.

Ключевые слова: периферическая кровь, макро-, микроэлементы, дисбаланс, элементный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Большая роль в поддержании здоровья индивидов и регуляции физиологической деятельности организма принадлежит микро- и макроэлементам. В виду того, что многие химические элементы относятся к типу нутриентов и участвуют во всех в процессах, протекающих в организме человека, необходимо их постоянное поступление с продуктами питания и водой [4]. В связи с уникальностью воздействия каждого элемента на биологические функции организма, дисбаланс макро- и микроэлементов является сокрытой, но часто встречающейся причиной развития различных патологий.

Нарушения состояния здоровья, вызванные микроэлементным дисбалансом - микроэлементозы являются весьма распространенным патологическим состоянием [2,5]. На сегодняшний день перед исследователями остро стоит проблема поиска референтных значений содержания элементов в организме человека, поскольку не только пол, возраст и состояние здоровья влияет на их содержание в организме, но также биогеохимические провинции проживания индивидов формируют эндемические гипо- и гиперэлементозы [2].

Недостаточность физиологических представлений и несовершенные методы определения содержания в средах ограничивают изучение роли микроэлементов в функционировании организма, что, в свою очередь, затрудняет определение референтных значений содержания микро- и макроэлементов в различных субстратах организма [4].

Важным для определения элементного статуса организма является выбор субстрата для проведения исследований. Анализ элементного состава крови и ее компонентов отражает их текущий обменный статус, так как кровь является основной транспортной средой, в которой вещество находится с момента резорбции из желудочно-кишечного тракта до его аккумуляции или экскреции из организма [2]. Информация, полученная с помощью анализа крови, показывает обменные процессы между различными органами или метаболически активными отделами организма. Анализ крови на элементы обладает рядом преимуществ: например, при использовании цельной крови для анализа можно ограничиться взятием капиллярной крови (уменьшение инвазивности пробоотбора, преимущество при скрининговых исследованиях), в связи с высокой концентрацией химических элементов [3]. Образцы сыворотки крови давно используются для идентификации биомаркеров, связанных с различными заболеваниями, а также для клинической диагностики. Цельная кровь и сыворотка охотно используются для анализа на микроэлементы. Как правило, для измерения выбираются нутриенты в зависимости от их отношения к биологическим процессам [1].

Целью настоящего исследования является оценка элементного статуса крови женщин в зависимости от возраста методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась донорская кровь в консерванте гепарин. Общее количество женщин в группе наблюдения составляет 29 человек, из них младше 35 лет – 10, старше 35 лет – 19. Выбор порогового значения возраста обусловлен особенностями женского организма, в частности физиологическими изменениями, наступающие в предклиматический период. Данная периодизация также основывается на комплексе признаков: учитываются размеры тела, масса, окостенение скелета, развитие желез внутренней секреции и т.п.

Таблица 1. Пробоподготовка образцов

Кол-во образца, мл	HNO ₃ (65%), мл	H ₂ O ₂ (30%), мл
0,9	4,8	1,2
0,7	3,7	0,9
0,5	2,5	0,65
0,35	1,85	0,45
0,25	1,3	0,45

Таблица 2. Микроволновая программа для прибора Milestone Ethos-E

Шаг	Время	Температура	Мощность
1	2 минуты	85°C	До 1000 Вт
2	4 минуты	135°C	До 1000 Вт
3	5 минут	230°C	До 1000 Вт
4	15 минут	230°C	До 1000 Вт

Для подготовки образцов к дальнейшим исследованиям использовался разработанный протокол фирмы Milestone (Италия): DG-CL- 03 «Кровь» по микроволновой пробоподготовке периферической крови человека.

Был проведен ряд экспериментов по подбору соотношения количества образца, концентрированной азотной кислоты и перекиси водорода, а также физических условий и времени проведения процесса минерализации для дальнейшего измерения концентраций микроэлементов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. Экспериментально установлено, что максимальный объем, необходимый для проведения процесса пробоподготовки, составляет 1,5 мл, а минимальный – 0,5 мл (табл. 1).

Анализ элементного состава эритроцитов и плазмы выполнен методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе ICPE-9000 (Shimadzu, Япония).

Калибровочные графики построены с использованием стандартных растворов ГСО и фирмы «Merck». Информация о выбранных для анализа линиях эмиссии анализируемых растворов, наиболее оптимальных с точки зрения интенсивности и свободы от спектральных наложений, а также данные о приготовленных стандартах и условиях работы спектрометра вносятся в компьютерную программу прибора.

Построение калибровочных графиков, расчет концентрации анализируемых образцов, оценка статистических параметров измерения производилась автоматически программным обеспечением “ICPE Solution”.

Для каждой группы согласно стандартным статистическим формулам, были рассчитаны среднее значение, а также стандартная ошибка (пакет Statistica 10).

Статистический анализ включал определение типа распределения количественных признаков с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные, имеющие нормальное распределение, выражали в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ($\bar{X} \pm Sx$), анализировали с использованием параметрического критерия ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки уровня содержания микро- и макроэлементов в крови женщин в зависимости от возраста было исследовано 29 образцов, из них старше 35 лет $n=19$, младше 35 лет $n=10$. Полученные средние значения содержания изучаемых элементов в группе обследуемых женщин в зависимости от возраста представлены в таблице 3.

Таблица 3. Средние значения содержания элементов в цельной крови женщин в зависимости от возраста (* - $p<0,05$)

Исследуемый элемент	<35, мг/л	>35, мг/л
Ca	114,51 $\pm$ 35,64	105,68 $\pm$ 12,3
Fe	538,88 $\pm$ 43,83*	740,12 $\pm$ 100,93*
K	1356,96 $\pm$ 115,88*	2053,94 $\pm$ 381,31*
Mg	43,2 $\pm$ 7,64*	53,86 $\pm$ 10,36*
Na	2048,26 $\pm$ 226,57	1930,29 $\pm$ 287,63
P	405,47 $\pm$ 25,83*	664,85 $\pm$ 99,91*
Zn	23,73 $\pm$ 1,08	14,71 $\pm$ 5,01
Se	1,59 $\pm$ 0,73*	2,63 $\pm$ 1,08*

Таблица 4. Интервалы содержания элементов в цельной крови женщин в зависимости от возраста

Интервалы содержания исследуемых элементов	<35 min-max, мг/л	>35 min-max, мг/л
Ca	93,96 – 211,97	91,63 – 129,95
Fe	464,41 – 602,16	588,09 – 924,63
K	1155,96 – 1493,96	1325,28 – 2907,17
Mg	36,05 – 59,77	37,26 – 80,71
Na	1730,56 – 2495,05	849,35 – 2807,21
P	365,37 – 447,51	347,06 – 841,33
Zn	22,3-25,29	9,82 – 29,87
Se	0,69 – 2,78	0,96 – 6,21

По данным проведенного анализа нами были определены следующие интервалы содержания элементов в цельной крови женщин в зависимости от возраста (табл. 4).

Статистически достоверные различия были обнаружены в группах сравнения по следующим элементам: железо, калий, магний, фосфор, селен.

У женщин старшей возрастной группы (>35 лет) обнаружен статистически значимое увеличения содержания железа ($p=0,00013$) по сравнению с женщинами в возрасте до 35. Вероятно, это связано с физиологическими особенностями менструальных циклов и их зависимостью от возраста женщины. Наступления климактерических изменений организма начинается после 40 лет, что влияет на уровень экскреции и потребления железа. Также, обнаруженное различие в уровне данного элемента может быть связано со стилем жизни: молодые женщины уделяют больше внимания физическим упражнениям, в результате чего в крови увеличивается уровень тестостерона, который является антагонистом эстрогена, и влияет на метаболизм железа [2].

Повышенное содержания калия в крови женщин старше 35 лет по отношению к женщинам младше 35 ($p=0,0006$) может быть связано с разницей в скорости обменных процессов. Калий из организма преимущественно выводится с потом и мочой, а у женщин более младшего возраста наблюдается более высокий уровень метаболических процессов организма. Также, на увеличение уровня калия у женщин старше 35 влияет прием сердечных препаратов для поддержания стабильности артериального давления [7].

Обнаружено, что содержание магния в цельной крови женщин младше 35 достоверно снижено ($p=0,035$) по сравнению с женщинами старшей группы. Это может быть связано с повышенным потреблением магния клетками в период увеличения физических нагрузок, а также физиологических процессов, требующих высокого содержания этого элемента в клетках (роста, стресс, активный репродуктивный период) [6].

Обнаруженное увеличение содержания фосфора в крови женщин старше 35 по сравнению с более молодой группой ($p=0,0001$) может быть связано с замедлением обменных процессов в костной ткани и последующим депонированием данного макроэлемента [6].

Нами показано, что в крови женщин старше 35 лет наблюдается больший размах содержания ионов селена, чем в крови женщин группы сравнения. При этом обнаружено, что среднее содержание селена в крови женщин младше 35 достоверно ниже, чем в крови женщин старше 35 ($p=0,0071$). Вероятнее всего наблюдаемые различия связаны с гормональными особенностями женского организма: селен необходим формирующемуся организму для укрепления иммунитета, а также нормального образования гормонов щитовидной железы, следовательно, в более молодом возрасте наблюдается повышенное потребление данного микроэлемента [8].

Метаболические связи элементов цельной крови в зависимости от возраста доноров.

Для расширения диагностических возможностей элементного состава организма введены дополнительные коэффициенты, которые рассчитываются по величине соотношения связей химических элементов. Эти коэффициенты (табл. 5) рассматриваются как вспомогательная информация для изучения влияния различных факторов окружающей среды, а также текущих заболеваний на организм, а также их влияния друг на друга [3].

Таблица 5. Коэффициент соотношения химических элементов Ca/P и Ca/K в зависимости от возраста

Показатель	Возрастная категория	Полученное значение
Ca/P	<35	0,28
	>35	0,15
Ca/K	<35	0,08
	>35	0,0052

Коэффициент Са/Р рассматривается в качестве показателя активности энергетических процессов организма. Увеличение данного соотношения расценивают как недостаточность энергетического обеспечения метаболизма кальция. Известно, что кальций и фосфор взаимно дополняют друг друга в минерализации новообразуемой костной ткани, значимыми в этом процессе являются не только наличие дефицита фосфора, но и нарушение оптимального соотношения его с кальцием. Избыток кальция в сочетании с относительной недостаточностью фосфора приводит к образованию нерастворимого и неусваиваемого фосфорно-кальциевого комплекса [2].

Увеличение коэффициента Са/Р у женщин младше 35 лет по отношению к женщинам старше 35 лет, вероятнее всего, связано с особенностями обмена фосфора в организме (замедление обменных процессов и депонирование в костной ткани), в связи с чем при статистически не различающемся среднем значении кальция в крови женщин двух возрастных групп, мы получаем в группе >35 снижение коэффициента Са/Р за счет увеличения содержания фосфора в крови.

Коэффициент Са/К используется для оценки активности кальцийрегулирующих гормонов. Известно, что калий является важнейшим внутриклеточным макроэлементом и относится к «биоэлементам остеотропного действия», роль которого заключается в опосредованном участии в процессах метаболизма костной ткани, главным образом, обмене кальция. Увеличенные его значения, по мнению ряда исследователей, указывают на нарушение гормональной активности эндокринных желез, регулирующих обмен кальция [2].

Снижение значения коэффициента Са/К у женщин старше 35 лет связано с увеличением количества калия в крови, что указывает на снижение интенсивности метаболических процессов в организме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение возрастных групп женщин показало статистически достоверное увеличение уровня железа, калия, магния, фосфора и серы у женщин старше 35 лет. Обнаруженные колебания содержания эссенциальных микро- и макроэлементов в организме женщин в зависимости от возраста, вероятно, в первую очередь связаны с физиологическими особенностями старения и замедления метаболических процессов с возрастом.

Таким образом, полученные нами данные можно использовать при дальнейшем изучении метаболизма макро- и микроэлементов в зависимости от возрастной принадлежности для выявления дисбаланса нутриентов. Также, полученная информация может использоваться для разработки показателей нормального содержания эссенциальных микро-и макроэлементов у жителей г. Минска при проведении элементной оценки состояния организма.

Раннее обнаружение сдвигов в обмене минеральных элементов с последующей корректировкой их концентрации в организме человека определяет перспективное направление развития превентивной медицины, что, в свою очередь, позволяет подойти к решению ряда теоретических и практических вопросов, влияющих на показатели здоровья населения отдельных регионов.

Список литературы / References:

1. Степанова Ю.И. и др. Антиоксидантный статус крови при остром и хроническом нарушении мозгового кровообращения. *Мед. академ. журн.*, 2014, том 14, № 4, с. 41-47. [Stepanova Yu.I. and other Antioxidant status of blood in acute and chronic cerebrovascular accident. *Med. academic. zhurn.*, 2014, vol. 14, no. 4, pp. 41-47. (In Russ.)]
2. Гресь Н.А., Скального А.В. *Биоэлементный статус населения Беларуси: экологические, физиологические и патологические аспекты*. Минск: Харвест, 2011, с. 10-19. [Gres N.A., Skalny A.V. *Bioelement status of the population of Belarus: ecological, physiological and pathological aspects*. Minsk: Harvest, 2011, pp. 10-19. (In Russ.)]
3. Гресь Н., Слобожанина Е., Гузик Е. *Элементоз избытка алюминия: распространенность у населения клинические и биологические аспекты: монография*. Германия: LAP LAMBERT. Acad. Publ., 2014, 116 с. [Gres N., Slobozhanina E., Guzik E. *Elementosis of excess aluminum: the prevalence of clinical and biological aspects in the population: monograph*. Germany: LAP LAMBERT. Acad. Publ., 2014, 116 p. (In Russ.)]
4. Мартинчик А.Н., Маев И.В., Янушевич О.О. *Общая нутрициология: учебное пособие*. М.: МЕДпресс-информ, 2005, 392 с. [Martinchik A.N., Maev I.V., Yanushchevich O.O. *General Nutritionology: A Study Guide*. M.: MEDpress-inform, 2005, 392 p. (In Russ.)]
5. Bertram H.P. Spurenelemente: Analytik, toxikologische und medizinische klinische Bedeutung. Munchen, Wien, Baltimore. *Urban und Schwarzenberg*, 1992, p. 228.
6. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride / Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Washington (DC): National Academies Press (US); 1997.
7. Gil F., Hernandez A.F. Toxicological importance of human biomonitoring of metallic and metalloid elements in different biological samples. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 30, 2006, pp. 287-297.
8. Lu J., Holmgren A. Selenoproteins. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, pp. 723-727.

ASSESSMENT OF THE ELEMENTAL STATUS OF PERIPHERAL BLOOD OF WOMEN DEPENDING ON AGE

Sadovnichuk M.D, Skarabahatava A.S.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Belarus; e-mail: mariasadovnichuk@gmail.com

Abstract. The modern world acquires a special place of research, aimed at improving the quality of life of the population, which determines the need to find new effective methods for diagnosing and treating human pathologies based on the principles of personalized medicine. Normally, the body maintains an optimal microelement balance, which ensures a normal metabolism. An imbalance in the intake and assimilation of nutrients naturally leads to disorders of mineral metabolism and the appearance of diseases. Therefore, the identification and assessment of shifts in the exchange of macro- and microelements with their subsequent correction are a promising area of modern diagnostics. In this work, 29 blood samples of women of different age groups were analyzed using the method of atomic emission spectroscopy with inductively coupled plasma. Analysis of the data obtained showed a statistically significant increase in the level of iron, potassium, magnesium, phosphorus, and selenium in women over 35 years old, which may be associated with the physiological characteristics of aging and the slowing down of metabolic processes with age.

Key words: peripheral blood, macro-, microelements, imbalance, elemental analysis.

СЕРОВОДОРОД ВЫСТУПАЕТ МЕДИАТОРОМ NO-СИГНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ, ТЕМ САМЫМ СТИМУЛИРУЯ ДИСПЕРСИЮ БИОПЛЕНОК

Телегина Д.И.^{1,2}, Васильева С.В.³

¹ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Миусская площадь, 9, г. Москва, 125047, РФ; e-mail: daryakinder62@gmail.com

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

Трубецкая ул., 8, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ

³ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 117977, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Впервые был применен комплексный подход к изучению взаимодействия монооксида азота и сероводорода-газотрансмиттеров, которые продуцируются бактериальными клетками в качестве сигнальных молекул. При исследовании кристаллических нитрозильных комплексов железа было установлено, что комбинированная обработка NO-донором и сероводородом, при условии 2.5-кратного избытка H₂S на каждую NO-группу донора, стимулирует увеличение NO-сигнальной активности за счет образования более активных ДНКЖ с персульфидными лигандами в клетке, которые, в отличие от ДНКЖ с тиоловыми лигандами, дают характерный «узкий» ЭПР сигнал с $g_{\text{aver}} = 2,03$ ($g_{\perp} = 2.032$, $g_{\parallel} = 2,02$). Таким образом, H₂S выступает медиатором NO-сигнальной активности, тем самым стимулируя значительное увеличение уровня экспрессии гена *soxS*. Влияние комбинированной обработки на уровень экспрессии гена *sfiA* обнаружено не было. Данное явление обуславливает снижение уровня окислительного стресса при совместной обработке NO-донором и H₂S, что оказывает значительное влияние на снижение продуктивности формирования биопленок (в среднем на 30% относительно монообработки) и увеличение показателей дисперсии зрелых биопленок (в среднем на 25% относительно монообработки). Мы предполагаем, что применение комплексной обработки кристаллическими нитрозильными комплексами железа с сероводородом может быть востребовано для решения проблем борьбы с инфекциями, вызываемыми бактериальными биопленками.

Ключевые слова: монооксид азота, сероводород, биопленки, сигнальная активность.

В настоящее время одной из острых проблем современной медицины является способность бактерий к пленкообразованию. Так, бактерии, заключенные в биопленки, менее восприимчивы к широкому спектру противомикробных препаратов и иммунной защите хозяина [1]. Биопленки вовлечены в патогенез многочисленных хронических заболеваний, они составляют 65–80% от всех бактериальных инфекций по распространению, что только подчеркивает необходимость разработки новых стратегий лечения [2]. Потенциально перспективным способом борьбы выступает инициирование скоординированного рассеивания под действием адаптивного ответа на различные специфические сигналы, такие как уровень доступности питательных веществ, особенно железа, окислительного стресса, а также воздействием важной сигнальной молекулы монооксида азота (NO) [3]. На данный момент существует множество работ, посвященных донорам NO, в качестве перспективных регуляторов биопленок. Большинство известных NO доноров обладают рядом недостатков, например, образование токсичных продуктов в результате их разложения, из-за чего их клиническое применение ограничено. Следовательно, крайне востребованными выступают работы по разработке и дальнейшим исследованиям эндогенных носителей, естественных переносчиков NO, у которых бы отсутствовали данные недостатки. Одним из таких потенциально перспективных классов соединений, обуславливающих ослабленное токсическое действие, являются нитрозильные комплексы железа с различными лигандами, которые представляют собой биомиметики активных железо-серных кластеров [Fe-S] белков.

У ряда патогенных бактерий, в том числе *P. aeruginosa* и *E. coli*, способность к рассеиванию недавно была связана с уровнем нитрозативного стресса, который является результатом эндогенного и экзогенного воздействия активных форм азота. Так как помимо своих повреждающих свойств NO модулирует глобальные регуляторные сети путем взаимодействия с бактериальными регуляторами транскрипции SoxR [4], OxyR [5], и участвует в формировании SOS-ответа [6]. Так, SoxR, содержащий кластер [2Fe – 2S], активируется под действием NO в результате трансформирования SoxR в динитрозильный комплекс железа. Активированный SoxR, в свою очередь, стимулирует транскрипцию *soxS* гена, кодирующего регулятор SoxS, ответственного за активацию экспрессии SoxRS регулона, в состав которого входят 15 генов, в том числе и ген супероксиддисмутазы *sodA* [7].

В данной работе, в результате обобщения текущих знаний о молекулярных механизмах регуляции жизненного цикла пленкообразующих бактерий, которые подробно описаны в данном обзоре [8], исследовали тетранитрозильный биядерный комплекс железа с тиомочевинной $\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2)_2(\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4)$ (NOdII) и биядерный нитрозильный комплекс железа с тиосульфатным лигандом $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (NOdI). Подробные сведения о синтезе и свойствах данных кристаллических нитрозильных комплексов железа описаны в [9, 10].

Основываясь на том, что клетки *E. coli* с нокаутированным геном синтеза H_2S осуществляли сверхсинтез NO, было предположено, что существуют молекулярно-генетические механизмы взаимодействия данных “газотрансмиттеров”, связанные защитой с бактериальных клеток от различного рода стресса [11], поскольку H_2S , активная физиологическая форма которого не установлена, является потенциальным поглотителем пероксинитрита и других реактивных форм азота и кислорода [12]. H_2S -гораздо менее известная сигнальная молекула у бактерий, чем NO. Согласно [13] в *E. coli* L-цистеин является основным источником эндогенной продукции H_2S за счет совместного действия двух ферментов, генерирующих сероводород.

Целью данной работы было изучение сигнальных и регуляторных функций NO-доноров при взаимодействии с молекулой H_2S , оказывающих влияния на ДНК-репарационные системы и регуляцию биопленок. В качестве доноров H_2S использовали Na_2S и $NaHS$ (Sigma, США), который в результате гидролиза дают гидросульфидный анион (при физиологическом pH является основной формой существования сероводорода). В отличие от низко реакционноспособного H_2S , HS^- является мощным нуклеофилом, способным вступать в реакцию различными электрофилами с образованием разнообразных комплексов серы.

Амперометрическое определение NO-донорной способности катионных комплексов с помощью сенсорного электрода *amiNO-700* системы «*inNO Nitric Oxide Measuring System*» (Innovative Instruments, США) в экспериментах *in vivo* в комбинации с $Na_2S/NaHS$ продемонстрировало, что сульфиды не изменяют количество генерируемого донорами NO, оказывая лишь небольшое влияние на начальную стадию генерации (рис.1).

Изучение влияния комбинированного действия NO-доноров с $Na_2S/NaHS$ на активацию главных ДНК-репарационных систем SOS и SoxRS защиты клеток от стресса проводили на суспензионных культурах специально сконструированных генетически-модифицированных штаммов *E. coli PQ37* [*sfiA::lacZ*] и *E. coli TN530* [*soxS::lacZ*] соответственно. Активность β -галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих слияния гена *lacZ* с промоторами исследуемых генов, определяли по методу Миллера [14]. Было установлено, что $Na_2S/NaHS$ в концентрации 0,005 мМ-5 мМ не оказывают токсического и генотоксического действия, то есть не стимулируют увеличения экспрессии генов *sfiA* и *soxS*, на исследуемые культуры. Оптимальное соотношение NO: H_2S =1:2,5, то есть необходимо увеличение концентрации $Na_2S/NaHS$ в 2,5 раза на каждую NO-группу NO-донора для обеспечения наибольшего увеличения уровня экспрессии генов *sfiA* и *sfiA* (рис. 2).

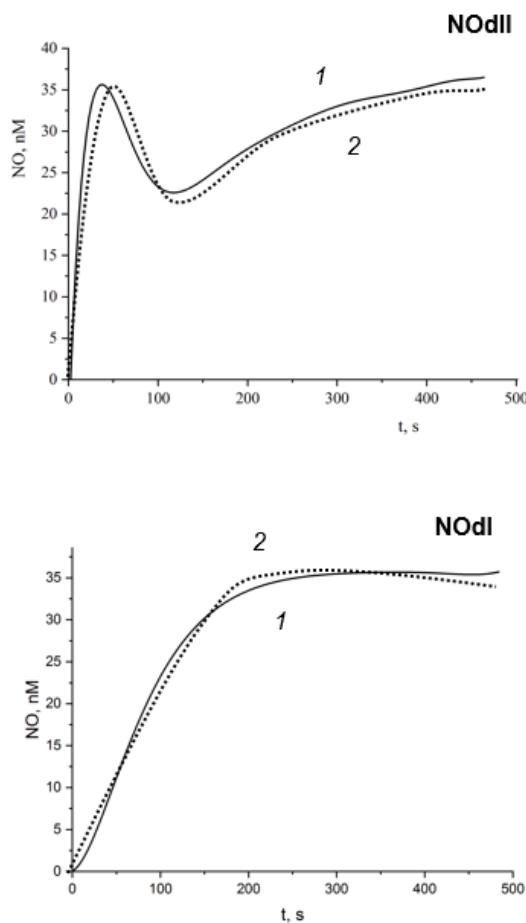


Рисунок 1. Кинетика донирования NO (нМ), генерируемого NO-донорами ($4 \cdot 10^{-6}$ М) в водных растворах при pH 7,4 и $T=25^\circ\text{C}$ в аэробных условиях, в чистом виде (1) или в комбинации с сероводородом[1:10](2)

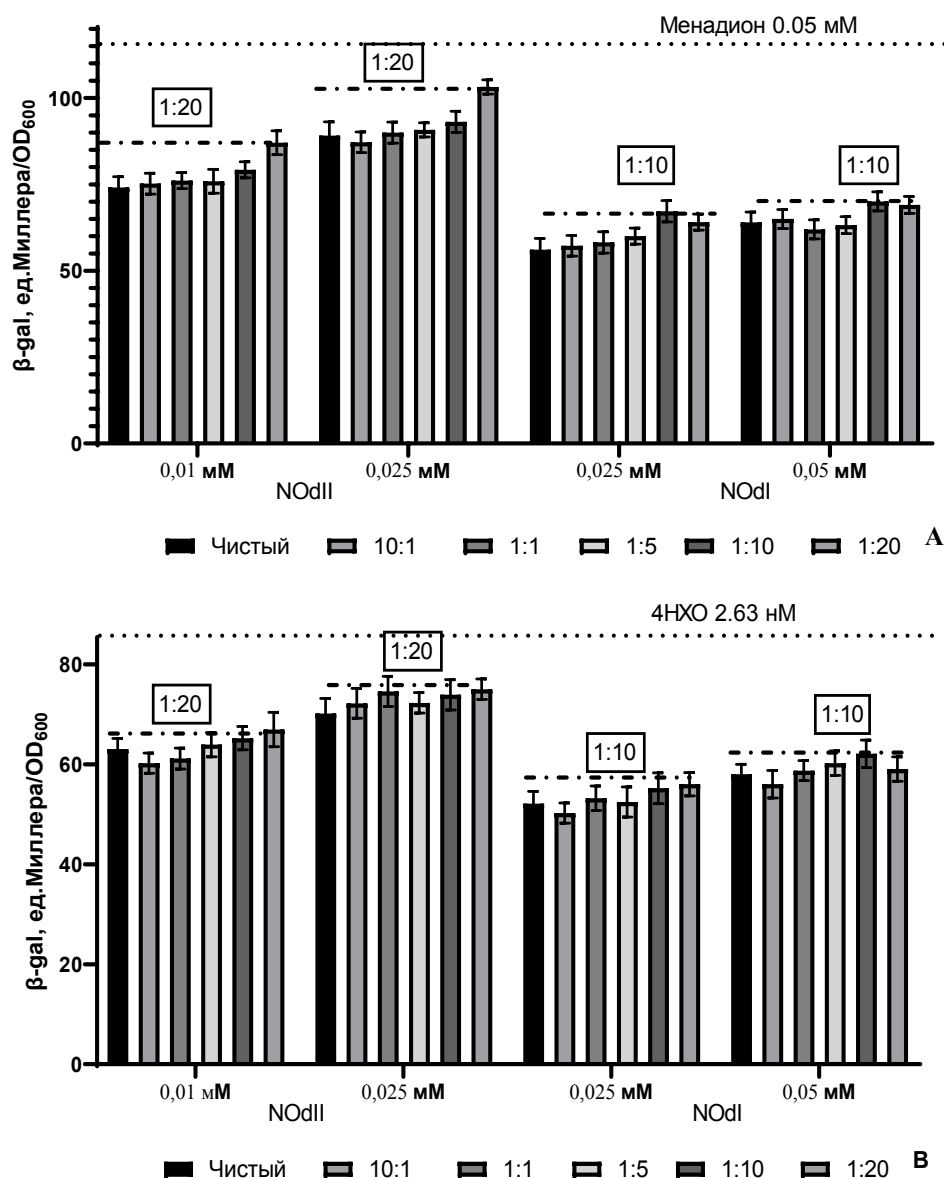


Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530 [*soxS::lacZ*](А) и *sfiA* в *E. coli* PQ37 [*sfiA::lacZ*](Б) в зависимости от соотношения NO:Na₂S. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4)

Разница между сигнальной активностью NaHS и Na₂S в комбинации с NO-донором являлась статистически незначимой (рис. 3). В дальнейшей работе в качестве донора сероводорода использовали NaHS.

Были определены дозовые зависимости экспрессии генов *soxS* и *sfiA* от концентрации NO-индукторов как в чистом виде, так и в комбинации с NaHS. Наблюдалось селективное увеличение экспрессии гена *soxS* после комбинированной обработки NO-донором и NaHS (в ранее определенных оптимальных соотношениях) по сравнению с уровнем экспрессии, индуцированным только нитрозильными комплексами железа (рис. 4А). Значительных изменений в экспрессии гена *sfiA* после комбинированной обработки по сравнению с обработкой только NOD не наблюдали (рис. 4Б).

Данные показатели коррелирует с результатами, которые были получены при анализе уровня окислительного стресса с использованием Флуорометра Qubit 3 (Invitrogen, Turner BioSystems, США) и 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI)—для флуоресцентного окрашивания ДНК. Было установлено, что при обработке клеток *E. coli* NaHS в комбинации с NODII наблюдается снижение уровня окислительного стресса относительно индивидуальной обработки клеток данными реагентами (рис. 5), что также свидетельствует о синергетическом действии NaHS при совместном использовании с донорами NO. Снижение уровня окислительного стресса было 2-кратным относительно использования чистых доноров оксида азота (продемонстрированы результаты для NODII, для NODI зависимости аналогичны).

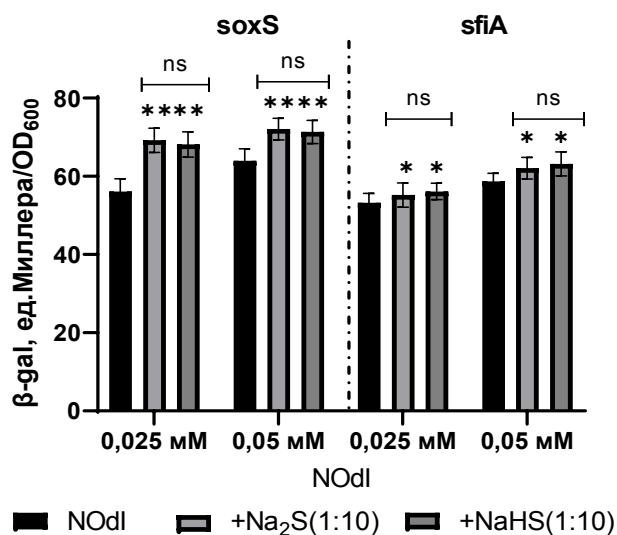


Рисунок 3. Зависимость уровня экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530 [*soxS*::*lacZ*] и *sfiA* в *E. coli* PQ37 [*sfiA*::*lacZ*] от вида сульфида используемого в комбинации Nod:H₂S. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4); *-P ≤ 0,1; **-P ≤ 0,01; ns-статистически незначимые различия по сравнению с необработанными контрольными образцами или между различными образцами

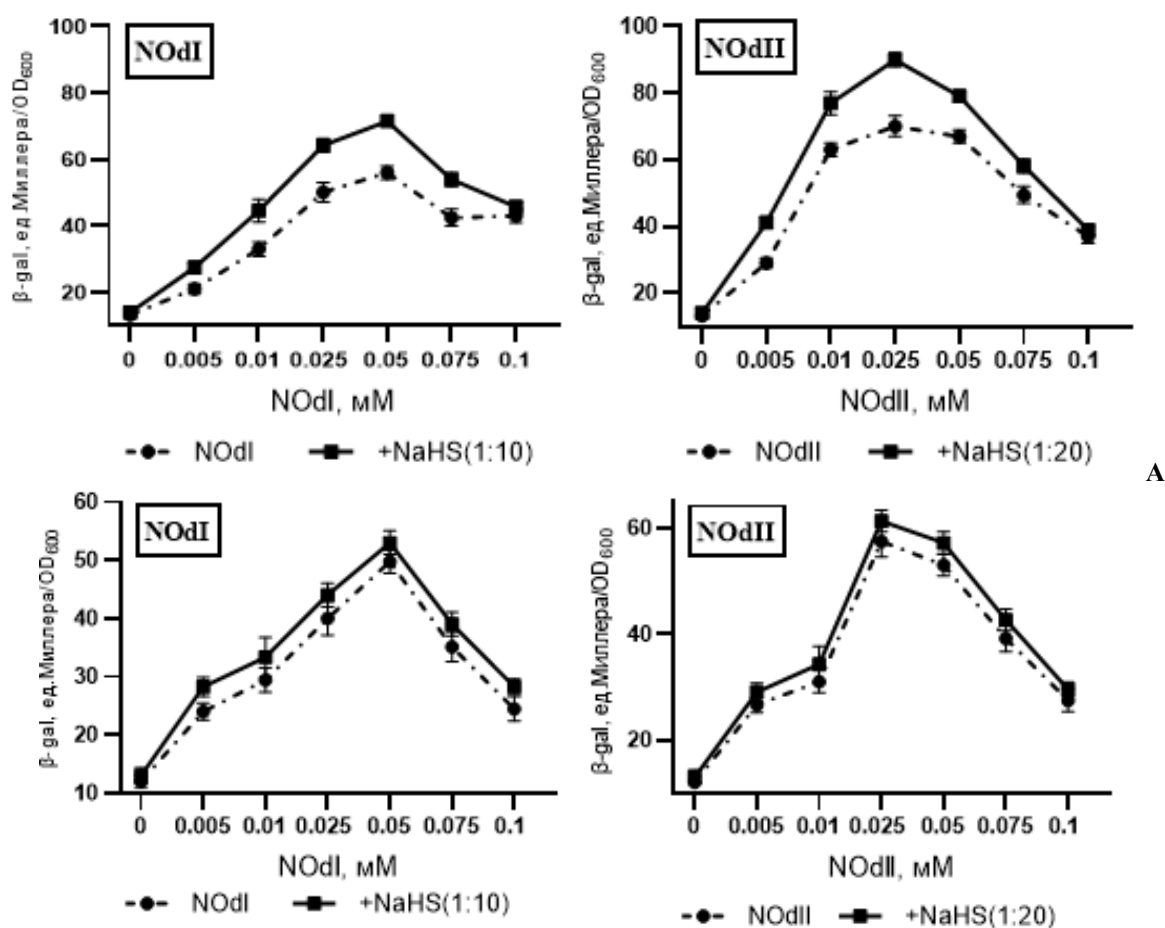


Рисунок 4. Дозовая зависимость экспрессии гена *soxS* в *E. coli* TN530 [*soxS*::*lacZ*] (А) и *E. coli* PQ37 [*sfiA*::*lacZ*] (Б), обработанной NO-индуктором и комбинацией Nod+NaHS. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4)

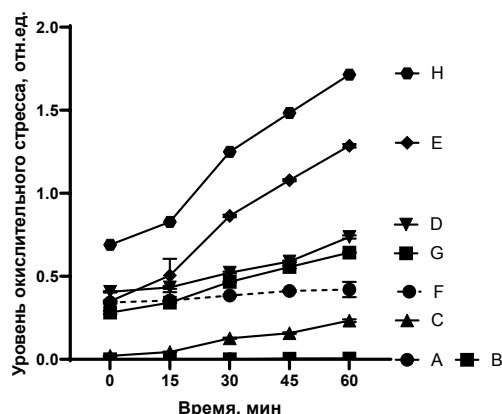


Рисунок 5. Уровень окислительного стресса (отн.ед.) в *E. coli* TN530 при pH = 7,4, обработанной NOd (индивидуально или в комбинации с H₂S): А – интактный контроль(PBS), В – NaHS 0,5 mM, С – NOdII 0,5 mM, D – Менадион 0,5 mM, Е – NOdII 0,5 mM, F – NaHS 0,5 mM, G – комбинация NOdII 0,5 mM+ NaHS 0,5 mM, H – сумма эффектов NOdII 0,5 mM+ NaHS 0,5 mM

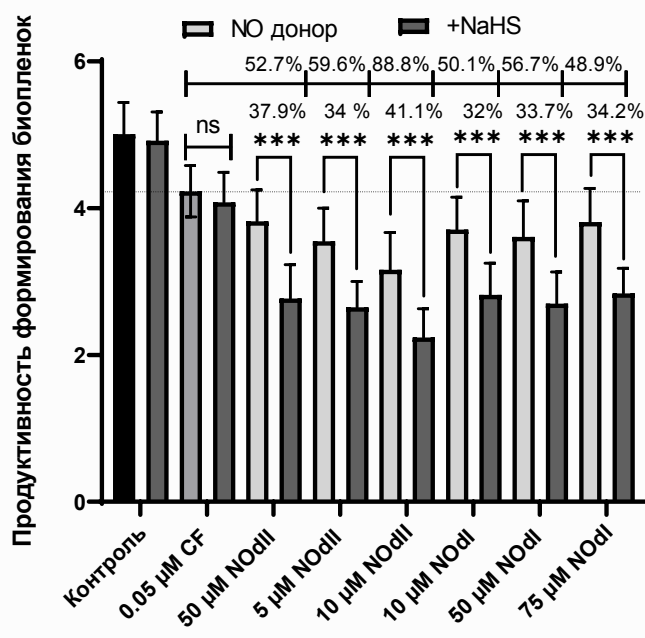


Рисунок 6. Снижение продуктивность формирования биопленок *P. aeruginosa* после инкубации клеток с NO-донором и комбинации NOd+NaHS/Na₂S в ранее установленных оптимальных соотношениях. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4); ***-P ≤ 0,001; ns-статистически незначимые различия по сравнению с необработанными контрольными образцами или между различными образцами

Исходя из полученных результатов, было логично предположить, что совместное использование NO-индукторов с NaHS/Na₂S будет значительно повышать эффективность снижения продуктивности формирования и увеличивать показатели дисперсии биопленок. Изучение биопленок производилось на модельном организме для исследования, *P. aeruginosa* PA103 (клинический изолят, лабораторная коллекция), согласно стандартному протоколу [15].

Так при обработке клеток *P. aeruginosa* NO-индукторами в ранее установленных оптимальных концентрациях продуктивность формирования биопленки снижалась в 1.5-2.5 раза, что превосходило эффект фторхинолонового антибиотика ципрофлоксацина (позитивный контроль). Обработка клеток 0,01–0,1 mM NaHS/Na₂S не повлияла на продуктивность образования биопленки. В случае комбинированной обработки с NaHS наблюдали еще большее снижение продуктивности формирования биопленок (рис. 6), при чем данная закономерность также наблюдалась при ранее установленных оптимальных соотношениях NOd:NaHS для экспрессии генов *soxS* и *sfiA*, что также подтверждает взаимосвязь данных процессов.

При оценке влияния ранее установленных оптимальных доз NOd на суточные биопленки *P. aeruginosa* в комбинации с NaHS в ранее определенных соотношениях (рис. 7). Было зарегистрировано значительное

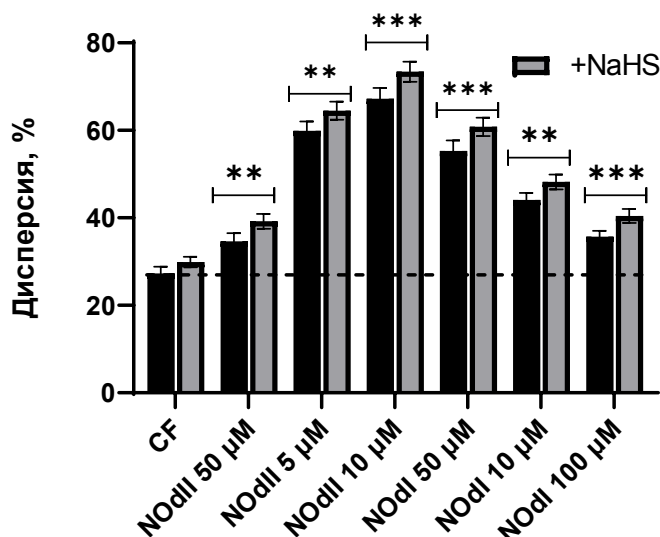


Рисунок 7. Показатели дисперсии суточных биопленок *P.aeruginosa* после 6-часовой инкубации с чистыми NO-донорами и комбинацией NOd+NaHS. Данные представляют собой средние значения; полосы ошибок указывают стандартные отклонения (n=4); *-P ≤ 0,1; **-P ≤ 0,01; ***-P ≤ 0,001-статистически незначимые различия по сравнению с необработанными контрольными образцами или между различными образцами

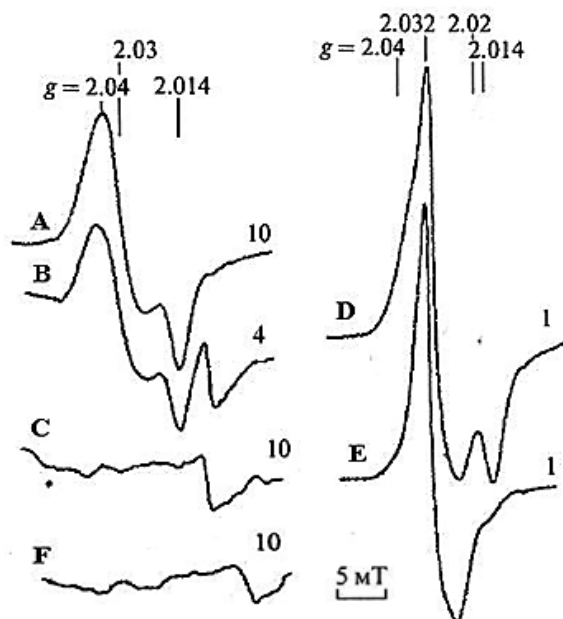


Рисунок 8. ЭПР спектры клеток *E. coli* TN530 [soxR::lacZ], инкубированных в жидкой среде LB при соответствующей обработке: А – 0,05 мМ NODII; В – 0,01 мМ NODII; С – контроль; D – 0,05 мМ NODII + 0,5 мМ Na₂S; E – 0,01 мМ NODII + 0,1 мМ Na₂S; F – 0,5 мМ Na₂S. Спектры ЭПР регистрировали при 77 К. Усиление сигнала спектрометра (относительные единицы) показано справа

увеличение дисперсии зрелых биопленок, что еще раз указывает на то, что процессы первичного прикрепления и дисперсии зрелой биопленки регулируются одинаковыми молекулярными путями, как следствие, H₂S-опосредованная медиация NO-сигнальной активности снижает продуктивность формирования биопленок, так и стимулирует рассеивание зрелой биопленки.

Увеличение экспрессии гена *soxS* и снижение продуктивности формирования биопленки при совместной обработке NOd с NaHS/Na₂S, коррелировало с ростом количества белков, содержащих в своем составе ДНКЖ с перисульфидными лигандами, определение которых осуществлялось с помощью метода ЭПР-спектроскопии. В клетках обработанных NO-донорами наблюдали сигнал ЭПР ДНКЖ с тиоловыми лигандами с $g_{aver} = 2,03$ ($g_{\perp} = 2,04$, $g_{\parallel} = 2,014$; рис. 8 А,В). При обработке клеток комбинацией NOd+ NaHS/Na₂S (1:20) происходило изменение сигнала на “узкий” сигнал ДНКЖ с перисульфидными лигандами с $g_{aver} = 2,03$ ($g_{\perp} = 2,032$, $g_{\parallel} = 2,02$; рис. 8 D,E), при этом интенсивность была в два раза больше, чем у тиола. Механизмы, лежащие в основе формирования таких “узких” сигналов в спектрах ЭПР, подробно обсуждались в работе [16].

Итак, установлено, что увеличение экспрессии гена *soxS* и снижение продуктивности формирования биопленок в результате комбинированной обработки NOd+NaHS/H₂S опосредуемо образованием в клетке ДНКЖ с персульфидными лигандами, а не как в случае монообработки NO-донорами – с тиоловыми. Предполагается, что активность таких комплексов выше, чем активность ДНКЖ с тиоловыми лигандами. Выдающиеся антиоксидантные свойства NO обусловлены именно его способностью связываться с клеточным железом, которое играет ключевую роль в сигнальном процессе с продукцией ДНКЖ и в опосредованной АФК токсичности при обработке биопленок: в обоих случаях NO является важным фактором окружающей среды [17].

Действительно, подробная химическая природа перекрестного взаимодействия между сульфидом и ДНКЖ в настоящее время остается неясной, но особое внимание уделяется двум химическим продуктам- нитрозотиолу HSNO и нитрозоперсульфиду SSNO[•], что объясняет устойчивую биоактивности S-нитрозотиолов после реакции с сульфидом [18-20].

Так, H₂S, в отличие от NO, не действует как типичная сигнальная молекула у бактерий. Он взаимодействует с истинными сигналами NO, чтобы обеспечить механизмы NO-сигнализации для оптимизации контроля проблем со стрессом. Таким образом можно заключить, что сероводород выступает медиатором NO-сигнальной активности за счет образования более активных ДНКЖ с персульфидными лигандами в клетке, что, в свою очередь, также способствует снижению уровня окислительного стресса [21] и понижению продуктивности формирования и увеличения показателей дисперсии биопленок.

Таким образом, способность H₂S модулировать NO-сигнальную активность может быть использована в качестве крайне перспективной стратегии борьбы с биопленочными инфекциями при использовании NO-доноров в качестве агентов регуляции формирования и дисперсии биопленок.

Список литературы / References:

1. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov*, 2003, vol. 2, no. 2, pp. 114-122. doi: 10.1038/nrd1008
2. Macia M., Del Pozo J., Diez-Aguilar M., Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*, 2018, vol. 36, no. 6, pp. 375-381. doi: 10.1186/s12951-016-0246-1
3. Barraud N., Schleheck D., Klebensberger J., Webb J., Hassett D., Rice S., Kjelleberg S. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol*, 2009, vol. 191, no. 23, pp. 7333-7342. doi: 10.1128/JB.00975-09
4. Ding H., Dimple B. Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2000, vol. 97, no. 10, pp. 5146-5150.
5. Lee S.J., Kim D.G., Lee K.Y., Koo J.S., Lee B.J. Regulatory mechanisms of thiol-based redox sensors: lessons learned from structural studies on prokaryotic redox sensors. *Arch Pharm Res.*, 2018, vol. 41, no. 6, pp. 583-593. doi:10.1007/s12272-018-1036-0
6. Lobysheva I.I., Stupakova M.V., Mikoyan V.D., Vasilieva S.V., Vanin A.F. Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. *FEBS Lett*, 1999, vol. 454, no. 3, pp. 177-180. doi:10.1016/s0014-5793(99)00777-2
7. Vasilieva S.V., Stupakova M.V., Lobysheva I.I., Mikoyan V.D., Vanin A.F. Activation of the *Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors. *Biochemistry (Mosc)*, 2001, vol. 66, no. 9, pp. 984-988. doi:10.1023/a:1012317508971
8. Kim S.K., Lee J.H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol*, 2016, vol. 54, no. 2, pp. 71-85. doi:10.1007/s12275-016-5528-7
9. Emelianova N.S., Shmatko N.Yu., Sanina N.A. Experimental and quantum-chemical simulation of pH-medium effects on the NO-donor activity of mononuclear nitrosyl iron complex [Fe(SC(NH₂)₂)₂(NO)₂]¹ · H₂O. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Khim.*, 2015, no. 10, pp. 2344-2350.
10. Aldoshin S.M., Sanina N.A., Davydov M.I. A new class of nitric oxide donors. *Her. Russ. Acad. Sci.*, 2016, vol. 86, pp. 158-163. doi: 10.1134/S1019331616030096
11. Tinajero-Trejo M., Jesse H., Poole R. Gasotransmitters, poisons, and antimicrobials: it's a gas, gas, gas! *F1000Prime Rep.*, 2013, vol. 5, no. 28. doi:10.12703/P5-28
12. Scammahorn J.J., Nguyen I., Bos E.M., Van Goor H., Joles J.A. Fighting Oxidative Stress with Sulfur: Hydrogen Sulfide in the Renal and Cardiovascular Systems. *Antioxidants (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 3. doi: 10.3390/antiox10030373
13. Lloyd D. Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger? *Trends Microbiol.*, 2006, vol. 14, no. 10, pp. 456-462.
14. Miller J. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harb. Lab. Press., 1972.
15. Васильева С.В., Стрельцова Д.А., Старостина И.А., Санина Н.А. Оксид азота участвует в регуляции сборки Fe-S-кластеров белков и формировании биопленок клетками *Escherichia coli*. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая. Академическая наука*, 2013, № 4, с. 398-404. [Vasilyeva S.V., Streltsova D.A., Starostina I.A., Sanina N.A. Nitric oxide participates in the regulation of the assembly of Fe-S-clusters of proteins and the formation of biofilms by *Escherichia coli* cells. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk. Seriya biologicheskaya*, 2013, vol. 4, pp. 398-404. (In Russ.)]

16. Vanin A.F. et al. EPR Characterization of mononuclear dinitrosyl iron complex with persulfide as a new representative of dinitrosyl iron complexes in biological systems: An Overview. *Appl. Magn. Reson.*, 2014, vol. 45, no. 4, pp. 375-387.
17. Vanin A.F. Nitric Oxide 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
18. Whiteman M., Li L., Kostetski I., Chu S.H., Siau J.L., Bhatia M., Moore P.K. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, vol. 343, no. 1, pp. 303-310. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.154
19. Dillon K.M., Carrazzone R.J., Matson J.B., Kashfi K. The evolving landscape for cellular nitric oxide and hydrogen sulfide delivery systems: A new era of customized medications. *Biochem Pharmacol.*, 2020, vol. 176, 113931. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113931
20. Ozfidan-Konakci C., Yildiztugay E., Elbasan F., Kucukoduk M., Turkan I. Hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) alleviate cobalt toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) by modulating photosynthesis, chloroplastic redox and antioxidant capacity. *J. Hazard Mater.*, 2020, vol. 388, 122061. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020
21. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 2011, vol. 334, no. 6058, pp. 986-990. doi: 10.1126/science.1209855

HYDROGEN SULFIDE MEDIATES NO-SIGNALING ACTIVITY, THEREBY STIMULATING BIOFILM DISPERSION

Telegina D.I.^{1,2}, Vasilieva S.V.³

¹ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia
Miusskaya square, 9, Moscow, 125047, Russia; e-mail: daryakinder62@gmail.com

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Trubetskaya st., 8, Moscow, 119991, Russia

³ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina st., 4, Moscow, 117977, Russia; e-mail: svvs0709@mail.ru

Abstract. In this study we first took an integrated approach to the interaction of NO and H₂S gases, produced by the bacterial cells within their signaling potencies in DNA repair responses to oxidative damages and control of bacterial biofilm production. In the study of crystalline nitrosyl iron complexes, it was found that combined treatment with an NO donor and hydrogen sulfide, under the condition of a 2.5-fold excess of H₂S for each NO-donor group, stimulates an increase in NO-signaling activity due to the formation of more active DNICs with persulfide ligands in the cell, which, in contrast to DNIC with thiol ligands, give a characteristic “narrow” EPR signal with $g_{aver} = 2.03$ ($g_{\perp} = 2.032$, $g_{\parallel} = 2.02$). Thereby, H₂S acts as a mediator of NO signaling activity, thereby stimulating a significant increase in the level of soxS gene expression. The effect of the combined treatment on the level of sfiA gene expression was not found. This phenomenon causes a decrease in the level of oxidative stress during joint treatment with a NO donor and H₂S, which has a significant effect on a decrease in the productivity of biofilm formation (on average by 30% relative to mono-treatment) and an increase in the dispersion indicators of mature biofilms (on average by 25% relative to mono-treatment). We suppose that our findings with the complex NO-donors with H₂S application may be useful in solving the bacterial biofilm problems.

Key words: nitric oxide, hydrogen sulfide, biofilm, signaling functions.

ИК СПЕКТРЫ И СТРУКТУРА ХРОМЕНОПИРИДИНКАРБОНИТРИЛЬНЫХ СИСТЕМ

Ивлиева (Перетокина) И.В., Мещерякова А.А., Бабков Л.М., Сорокин В.В.

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

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Методом функционала плотности B3LYP/6-31G(d) построены структурно-динамические модели таутомеров соединения 5-амино-2,4-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,4,10b-тетрагидро-1H-хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрила и 4-амино-2,5-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,5,10b-тетрагидро-1хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрила. Минимизирована энергия, рассчитаны структуры, частоты нормальных колебаний в гармоническом приближении и распределение интенсивности в ИК спектре молекулы. Проведена интерпретация ИК смеси аминокимино таутомеров, измеренного в диапазоне 400—3700 см⁻¹ при комнатной температуре.

Ключевые слова: 5-амино-2,4-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,4,10b-тетрагидро-1H-хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрил, 4-амино-2,5-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,5,10b-тетрагидро-1хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрил, хроменопиридинкарбонитрильные системы, геометрическая структура, ИК спектр.

Изучение хромено[3,4-с]пиридинкарбонитрильных систем имеет важное значение для биологии и медицины, поскольку хроменопиридиновый фрагмент обладает противомикробной, противоопухолевой, антибактериальной, противовоспалительной и другими видами биологической активности [1-5].

Целью нашей работы было исследование строения и колебательных ИК спектров ранее неизвестных хроменопиридинкарбонитрильных систем: 5-амино-2,4-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,4,10b-тетрагидро-1H-хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрила (I) и 4-амино-2,5-диимино-3-(пиридин-2-ил)-2,3,5,10b-тетрагидро-1хромено[3,4-с]пиридин-1-карбонитрила (II). Эти системы реализуются в виде смеси аминокимино таутомеров, что ранее было доказано с помощью одномерной (ЯМР ¹H) и двумерной (HSQC ¹H/¹³C и HMBC ¹H/¹³C) спектроскопии [1, 2].

В работах [7,8,9] авторы описывают многостадийный синтез ряда производных хромено[3,4-с]пиридина. Нами предложен двухстадийный синтез подобных систем отличающейся простотой и экологичностью [3, 8]. При этом полученные продукты реализовывались в виде смеси таутомеров в соотношении 49,56 : 50,44%. Для установления их структуры чаще всего используются такие методы, как ЯМР спектроскопия, РСтА и др. Однако установление строения исследуемых в работе поли(гетеро)ароматических систем указанными методами весьма затруднительно. В данной ситуации эту проблему можно разрешить на основе методов квантовой химии и спектроскопии. Высокий уровень развития современных методов построения структурно-динамических моделей позволяет установить строение молекулы и рассчитать ее колебательный спектр.

Целью нашей работы было построение структурно-динамических моделей соединений (I) и (II), в частности, их структуры и ИК спектров, и интерпретация на этой основе ИК спектра смеси таутомеров.

Построение структурно-динамических моделей соединений (I) и (II) проведено методом B3LYP/6-31g(d) [10,11], реализованным в программном пакете GAUSSIAN'03 [12]. ИК спектры рассчитаны в гармоническом приближении.

На рисунке 1 приведено строение таутомеров (I) и (II). Таутомеры (I) и (II) отличаются друг от друга расположением групп =NH и -NH₂. В таблице 1 приведены вычисленные геометрические параметры соединений (I) и (II). На основе их анализе установлено, что таутомерный переход оказывает значительное влияние на геометрические параметры всего соединения. Наиболее значительны изменения связей C₈-C₁₀, C₈-C₉ и угла O₁₆-C₉-C₁₀. Изменения длин связей в группах R6 и R7 не превышает 0,01 Å. Меняется угол, определяющий ориентацию кольца R4 относительно остальной части молекулы, меняются длины некоторых связей.

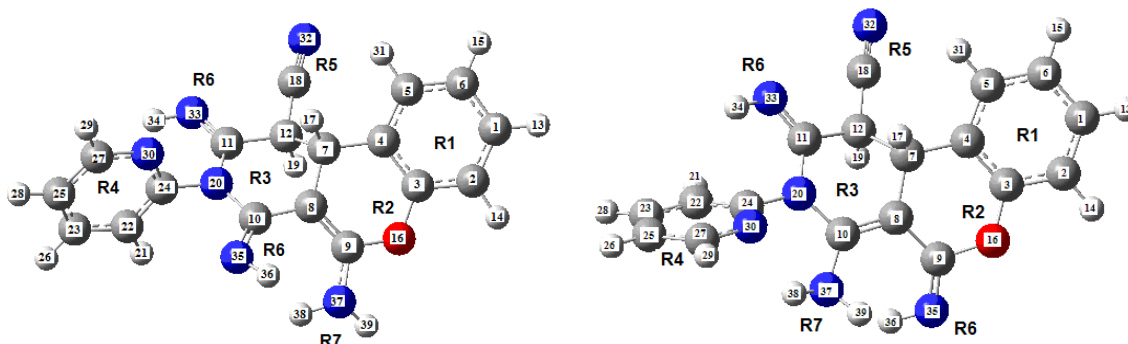


Рисунок 1. Строение соединений (I) и (II)

Таблица 1. Геометрические параметры соединений (I) и (II)

Связь	Длина связи, А		Связь	Длина связи, А	
	(I)	(II)		(I)	(II)
C ₁₂ -C ₇	1,568	1,570	C ₁₀ -N ₃₇	-	1,387
C ₁₁ -C ₁₂	1,536	1,530	C ₈ -C ₉	1,362	1,467
C ₄ -C ₇	1,515	1,513	C ₉ -O ₁₆	1,359	1,377
C ₇ -C ₈	1,510	1,519	C ₂₇ -N ₃₀	1,339	1,341
C ₁₂ -C ₁₈	1,468	1,465	C ₂₄ -N ₃₀	1,331	1,336
C₈-C₁₀	1,463	1,371	C ₁₀ =N ₃₅	1,290	-
C ₂₀ -N ₂₄	1,445	1,434	C ₁₀ =N ₃₅	-	1,281
C ₁₀ -N ₂₀	1,416	1,415	C ₁₁ =N ₃₃	1,274	1,271
C₁₁-N₂₀	1,407	1,424	C ₁₈ =N ₃₂	1,160	1,160
C ₄ -C ₅	1,402	1,403	N ₃₃ -H ₃₄	1,022	1,021
C ₆ -C ₁	1,397	1,398	N ₃₅ -H ₃₆	1,021	1,018
C ₃ -C ₄	1,396	1,398	N ₃₇ -H ₃₈	1,014	1,013
C ₂₄ -C ₂₂	1,396	1,402	N ₃₇ -H ₃₉	1,013	1,016
C ₂₃ -C ₂₅	1,395	1,396	C ₇ -H ₁₇	1,099	1,101
C ₂₅ -C ₂₇	1,395	1,393	C ₁₂ -H ₁₉	1,099	1,099
C ₂ -C ₃	1,393	1,398	C ₂₇ -H ₂₉	1,088	1,088
C ₅ -C ₆	1,393	1,392	C ₁ -H ₁₃	1,086	1,087
C ₁ -C ₂	1,392	1,389	C ₆ -H ₁₅	1,086	1,086
C ₂₂ -C ₂₃	1,392	1,392	C ₂₃ -H ₂₆	1,086	1,086
C ₃ -O ₁₆	1,388	1,372	C ₂₅ -H ₂₇	1,086	1,085
C₉-N₃₇	1,377	-	C ₂ -H ₁₄	1,085	1,085
Угол			Угол		
C ₁₂ -C ₁₈ =C ₃₂	175	176	C ₂₄ -C ₂₂ -C ₂₃	118	118
C ₈ -C ₁₀ =N ₃₅	128	-	C ₃ -C ₄ -C ₅	117	118
C ₁₀ -N ₂₀ -C ₁₁	126	121	C ₂₇ -N ₃₀ -C ₂₄	117	118
C ₂₅ -C ₂₇ -N ₃₀	124	124	C ₇ -C ₈ -C ₁₀	117	117
C ₈ -C ₁₀ -N ₃₇	-	124	C ₇ -C ₁₂ -C ₁₈	117	117
N ₃₀ -C ₂₄ -C ₂₂	124	123	C ₁₀ -N ₂₀ -C ₂₄	117	120
O₁₆-C₉-C₈	124	117	N ₂₀ -C ₁₁ -C ₁₂	116	114
C ₄ -C ₃ -O ₁₆	122	124	C ₈ -C ₁₀ -N ₂₀	115	120
C ₂ -C ₃ -C ₄	122	121	C ₉ -N ₃₇ -H ₃₈	115	-
C ₉ -C ₇ -C ₈	121	122	H ₃₈ -N ₃₇ -H ₃₉	115	110
C ₄ -C ₅ -C ₆	121	121	C ₉ -N ₃₇ -H ₃₉	114	-
C ₅ -C ₆ -C ₁	120	120	C ₁₀ -N ₃₇ -H ₃₈	-	114
C ₇ -C ₄ -C ₃	120	120	O ₁₆ -C ₉ =N ₃₅	-	113
C ₆ -C ₁ -C ₂	120	120	C ₈ -C ₇ -C ₄	112	113
N ₂₀ -C ₂₄ -C ₂₂	120	120	C ₁₁ =N ₃₃ -H ₃₄	112	113
C ₂₂ -C ₂₃ -C ₂₅	119	119	C ₄ -C ₇ -C ₈	112	122
C ₁ -C ₂ -C ₃	119	120	C ₁₀ -N ₃₇ -H ₃₉	-	112
C ₃ -O ₁₆ -C ₉	119	122	C ₉ =N ₃₅ -H ₃₆	-	111
C ₁₂ -C ₁₁ =N ₃₃	118	119	C₁₁-C₁₂-C₇	110	106
C ₂₃ -C ₂₅ -C ₂₇	118	118	C ₁₀ =N ₃₅ -H ₃₆	110	-

ИК спектр образца измерен при комнатной температуре на Фурье спектрофотометре Shimadzu IRAffinity-1. На рисунке 2 приведен измеренный спектр смеси таутомеров. В таблице 2 приведены наиболее частоты наиболее характерных колебаний.

Для удобства интерпретации проведена широко используемая процедура масштабирования рассчитанных частот [13,14]. Для области свыше 1500 см⁻¹ был использован масштабирующий множитель 0,95, для области 1500-1450 см⁻¹ – 0,96, для области 1450-1400 см⁻¹ – 0,97, для области 1400-1300-см⁻¹ – 0,98, для области 1300-1150 см⁻¹ – 0,99.

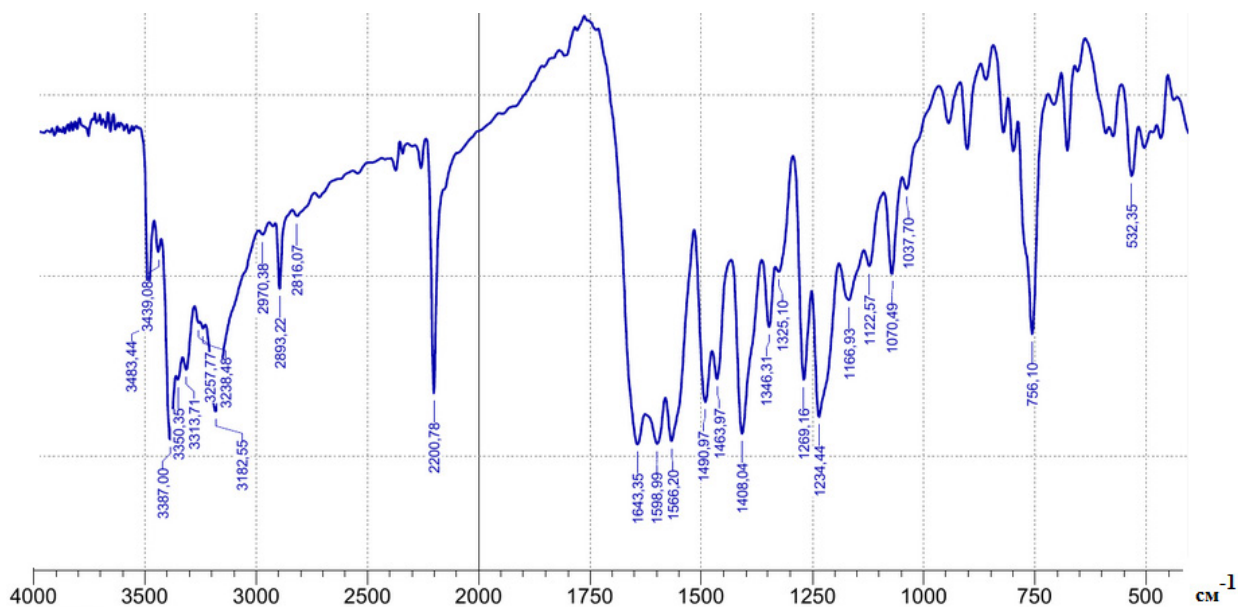


Рисунок 2. Экспериментальный спектр смеси таутомеров

Таблица 2. Измеренный и рассчитанные ИК спектры таутомеров (I) и (II)

$\nu_{\text{эксп}}, \text{см}^{-1}$	$\nu_{\text{теор}}, \text{см}^{-1}$		$I, \text{км/моль}$		Формы колебаний	
	I	II	I	II	I	II
532 (сл.)	537	542	0,2	17,3	$\chi_{R1}(\text{CCCC}), \chi_{R4}(\text{CCCN}), \chi_{R4}(\text{HCCC}), \chi_{R4}(\text{CCCC}), \chi_{R1}(\text{CCCH}), \chi_{R2R1R3}(\text{OCCC}), \chi_{R3R4}(\text{CNCN}), \chi_{R1R2}(\text{CCOC}), \chi_{R3R4}(\text{CNCC}), \chi_{R4}(\text{HCCN}), \chi_{R4R3R6}(\text{CNC=N})$	$\chi_{R1}(\text{CCCC}), \chi_{R1}(\text{CCCH}), \chi_{R2R1R3}(\text{OCCC}), \chi_{R1R2}(\text{CCOC}), \chi_{R1R2}(\text{CCCO})$
	550	551	14,1	7,8	$\chi_{R1}(\text{CCCC}), \chi_{R1}(\text{CCCH}), \chi_{R3R1R2}(\text{CCCO}), \chi_{R4}(\text{CCCH}), \chi_{R4}(\text{CCCN}), \chi_{R1R2}(\text{CCOC}), \chi_{R4}(\text{CCCC}), \chi_{R1R2}(\text{CCCO})$	$\chi_{R4}(\text{CCCN}), \chi_{R4}(\text{CCCH}), \chi_{R4}(\text{CCCC}), \chi_{R3R4}(\text{CNCN}), \chi_{R4R3R6}(\text{CNC=N}), \chi_{R4}(\text{HCCN}), \chi_{R1}(\text{CCCC}), \chi_{R3R4}(\text{NCNC}), \chi_{R3R4}(\text{NCCC}), \chi_{R3R1R2}(\text{CCCO})$
756 (с.)	762	-	10,1	-	$\chi_{R4}(\text{NCCH}), \chi_{R4}(\text{HCCC}), \chi_{R3R4}(\text{NCCH}), \chi_{R4}(\text{CCNC})$	-
	-	764	-	7,9	-	$\chi_{R4}(\text{NCCH}), \chi_{R4}(\text{HCCC}), \chi_{R3R2R6}(\text{CC=NH}), \chi_{R3R2R6}(\text{CCC=N}), \chi_{R4}(\text{CCNC}), \chi_{R4}(\text{CCCN})$
	-	768	-	52,1	-	$\chi_{R3R7}(\text{CCNH}), \chi_{R3R7}(\text{NCNH}), \chi_{R3R2R6}(\text{CC=NH}), \chi_{R1}(\text{CCCH}), \chi_{R2R3R7}(\text{CCCN})$
	-	773	-	126,0	-	$\chi_{R3R7}(\text{CCNH}), \chi_{R4}(\text{NCCH}), \chi_{R4}(\text{CCCH}), \chi_{R3R7}(\text{NCNH}), \chi_{R3R2R6}(\text{CC=NH}), \chi_{R2R3R7}(\text{CCCN}), \chi_{R3R2R6}(\text{CCC=N})$
1037(сл.)	-	1054	-	137,6	-	$Q_{R2}(\text{CO}), \beta_{R2R6}(\text{C=NH}), \beta_{R3R6}(\text{C=NH})$
	1061	-	3,3	-	$Q_{R3}(\text{CC}), Q_{R3R5}(\text{CC})$	-
	-	1066	-	20,1	-	$Q_{R3}(\text{CC}), Q_{R3R5}(\text{CC}), Q_{R4}(\text{CC}), Q_{R3}(\text{CN}), \beta_{R4}(\text{CCH})$
	1069	-	15,5	-	$Q_{R1}(\text{CC}), Q_{R3R5}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3R6}(\text{C=NH}), Q_{R3}(\text{CC})$	-

$V_{\text{эксп}}, \text{см}^{-1}$	$V_{\text{теор}}, \text{см}^{-1}$		$I, \text{км/моль}$		Формы колебаний	
	I	II	I	II	I	II
1070 (ср.)	1071	-	23,4	-	$Q_{R4}(\text{CC}), \beta_{R4}(\text{CCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH}), Q_{R3}(\text{CC}), Q_{R3 R5}(\text{CC}), \gamma_{R4}(\text{CNC})$	-
	-	1073	-	13,2	-	$Q_{R3}(\text{CC}), Q_{R3 R5}(\text{CC}), Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \chi_{R3}(\text{HCCH})$
	-	1081	-	93,9	-	$Q_{R2}(\text{CO}), \beta_{R2 R6}(\text{C=NH}), \beta_{R1}(\text{CCH}), Q_{R1}(\text{CC}), Q_{R5 R3}(\text{CC})$
	1084	-	60,6	-	$\beta_{R2 R7}(\text{CNH}), Q_{R2}(\text{CO}), \beta_{R1}(\text{CCH})$	-
1122 (ср.)	1138	-	32,4	-	$\beta_{R1}(\text{CCH}), Q_{R1}(\text{CC}), \gamma_{R1}(\text{CCC}), Q_{R1 R2}(\text{CO}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH})$	-
	-	1143	-	2,2	-	$\beta_{R1}(\text{CCH}), Q_{R1}(\text{CC}), Q_{R3}(\text{CN}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \gamma_{R1}(\text{CCC}), \gamma_{R1 R3}(\text{CCC})$
	-	1144	-	32,3	-	$Q_{R3}(\text{CN}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R3 R7}(\text{CN}), \beta_{R1}(\text{CCH})$
	1175	-	1,5	-	$\beta_{R4}(\text{CCH})$	-
1167(ср.)	1177	-	26,6	-	$\beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R3}(\text{CC})$	-
	-	1177	-	7,4	-	$\beta_{R4}(\text{CCH})$
	-	1180	-	1,9	-	$\beta_{R1}(\text{CCH})$
	1186	-	39,7	-	$\beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R3}(\text{CC}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH})$	-
	-	1195	-	71,9	-	$\beta_{R3 R7}(\text{CNH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R3 R2}(\text{CC}), Q_{R3}(\text{CC})$
	1206	-	67,8	-	$\beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R3}(\text{CN}), \chi_{R3}(\text{NCCH}), \gamma_{R3 R4}(\text{CNC})$	-
1234(с.)	1228	-	4,7	-	$Q_{R3}(\text{CC}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \beta_{R2 R7}(\text{CNH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \chi_{R3}(\text{NCCH}), \beta_{R1}(\text{CCH}), Q_{R2 R7}(\text{CN}), \chi_{R2 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH}), \chi_{R3 R6}(\text{HCC=N})$	-
	-	1237	-	18,3	-	$\chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH}), Q_{R1 R3}(\text{CC}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH})$
	1252	-	102,6	-	$Q_{R4}(\text{CC}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \beta_{R4}(\text{CCH})$	-
1269(с.)	-	1262	-	217,6	-	$\beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \beta_{R5 R3}(\text{CCH}), \chi_{R6 R3}(\text{N=CCH}), \chi_{R3}(\text{HCCN}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), Q_{R4 R3}(\text{CN})$
	1260	-	94,6	-	$Q_{R1 R2}(\text{CO}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \beta_{R2 R7}(\text{CNH}), Q_{R4 R3}(\text{CN}), Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH})$	-
	-	1268	-	113,4	-	$\chi_{R3}(\text{HCCH}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), Q_{R1}(\text{CC})$

$\nu_{\text{эксп}}, \text{см}^{-1}$	$\nu_{\text{теор}}, \text{см}^{-1}$		$I, \text{км/моль}$		Формы колебаний	
	I	II	I	II	I	II
	1281	1280	121,9	45,5	$\chi_{R3}(\text{HCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH})$	$(\text{CC}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH}), Q_{R1 R2}(\text{CO}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH})$ $\chi_{R3}(\text{HCCH}), Q_{R1 R2}(\text{CO}), Q_{R4 R3}(\text{CN}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R1}(\text{CCH})$
1325(сл.)	1324	-	40,8	-	$\chi_{R3}(\text{CCCH}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \beta_{R5 R3}(\text{CCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), Q_{R4 R3}(\text{CN}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R3 R6}(\text{HCC=N}), \beta_{R4}(\text{CCH}), Q_{R4}(\text{CC}), Q_{R3 R4}(\text{CN}), \chi_{R3}(\text{NCCH})$	-
	-	1326	-	134,1	-	$Q_{R4}(\text{CN}), Q_{R4}(\text{CC}), \beta_{R4}(\text{CCH}), \beta_{R5 R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \beta_{R2 R6}(\text{C=NH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), Q_{R4 R3}(\text{CN}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R3 R6}(\text{HCC=N}), \chi_{R3}(\text{NCCH})$
	1331	1334	0,8	4,3	$\beta_{R4}(\text{NCH}), \beta_{R4}(\text{CCH})$	
	-	1335	-	15,7	-	$\chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), Q_{R3}(\text{CC}), \beta_{R2 R6}(\text{C=NH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), Q_{R1 R3}(\text{CC}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \beta_{R4}(\text{NCH})$
	1345	-	63,6	-	$\chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \chi_{R5 R3}(\text{CCCH})$	-
1346(сп.)	-	1353	-	101,3	-	$\beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R2 R3}(\text{CCCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), Q_{R1}(\text{CC}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH})$
	1354	-	17,3	-	$\beta_{R1}(\text{CCH}), Q_{R1}(\text{CC}), \chi_{R2 R3}(\text{CCCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), Q_{R1 R3}(\text{CC})$	-
	1352	1350	118,0	83,3	$\chi_{R3}(\text{CCCH}), \chi_{R2 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R3 R6}(\text{HCC=N}), \chi_{R3}(\text{NCCH}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \beta_{R5 R3}(\text{CCH}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH})$	$\chi_{R3 R6}(\text{HCC=N}), \beta_{R5 R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R3}(\text{NCCH}), \chi_{R1 R3}(\text{CCCH}), \chi_{R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \chi_{R2 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH})$
	-	1365	-	209,0	-	$\chi_{R3 R5}(\text{HCCC}), \beta_{R1 R3}(\text{CCH}), \chi_{R3}(\text{HCCC}), \chi_{R2 R3}(\text{CCCH}), \beta_{R3}(\text{CCH}), \beta_{R2 R6}(\text{C=NH})$
	-	1372	-	24,3	-	$Q_{R3}(\text{CN}), \beta_{R3 R7}(\text{CNH}), Q_{R3 R7}(\text{CN}), \beta_{R2 R6}(\text{C=NH}), \gamma_{R3 R7}(\text{CCN})$
1408 (с.)	1400	-	314,8	-	$\beta_{R3 R6}(\text{C=NH}), Q_{R3}(\text{CN}), Q_{R3}(\text{CC}), \chi_{R3}(\text{HCCH}), \chi_{R3 R5}(\text{HCCC})$	-
1491(с.)	-	1533	-	470,8	-	$Q_{R3}(\text{CC}), \beta_{R3 R7}(\text{CNH}), Q_{R2 R6}(\text{C=N}), Q_{R2 R3}(\text{CC}), \delta_{R7}(\text{HNH})$

$\nu_{\text{эксп}}, \text{см}^{-1}$	$\nu_{\text{теор}}, \text{см}^{-1}$		$I, \text{км/моль}$		Формы колебаний	
	I	II	I	II	I	II
1566(с.)	1564	-	59,0	-	$Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \delta_{R7}(\text{HNH}), Q_{R3 R6}(\text{C=N}), Q_{R4}(\text{CC}), \beta_{R4}(\text{CCH})$	■
	-	1566	-	109,2	-	$Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH})$
	-	1573	-	119,6	-	$Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH})$
1597(с.)	1590	-	9,1	-	$Q_{R1}(\text{CC}), \beta_{R1}(\text{CCH}), \delta_{R7}(\text{HNH}), \gamma_{R1}(\text{CCC})$	■
	-	1611	-	261,9	-	$Q_{R2 R6}(\text{C=N}), Q_{R3}(\text{CC}), \gamma_{R3 R2}(\text{CCO})$
	1622	-	621,0	-	$Q_{R3 R6}(\text{C=N}), Q_{R3 R2}(\text{CC}), \delta_{R7}(\text{HNH}), \beta_{R2 R7}(\text{CNH}), Q_{R2 R7}(\text{CN})$	■
	-	1627	-	65,4	-	$\delta_{R7}(\text{HNH})$
1643(с.)	1644	-	64,2	-	$Q_{R3 R6}(\text{C=N}), Q_{R2 R3}(\text{CC}), Q_{R2 R7}(\text{CN})$	■
	-	1644	-	162,0	-	$Q_{R3 R6}(\text{C=N})$
2200(с.)	2252	2254	5,6	5	$Q_{R5}(\text{C=N}), Q_{R3 R5}(\text{CC})$	
3439(сл.) 3483(сл.)	3466	3439	43,4	63,2	$q_{R7}(\text{NH})$	

*— использованы общепринятые обозначения координат: валентные колебания связей — q, Q , плоские деформационные колебания — γ, β — с участием одного атома Н, $\delta = \delta(\text{HCH})$, неплоские деформационные колебания — χ

Результаты расчета ИК спектров соединений (I) и (II) весьма громоздки. Мы остановимся на описании лишь наиболее существенных моментов, касающихся их интерпретации. Колебания в соединениях (I) и (II) сильно делокализованы. Спектрально-структурные признаки этих соединений, как оказалось, выделить довольно трудно. Тем не менее, в ходе анализа ИК спектров были идентифицированы полосы, наиболее характерные для того или иного таутомера. Такие полосы есть во всех областях спектра. В частности, интенсивные колебания в области $2295\text{--}2210\text{см}^{-1}$ и $1580\text{--}1640\text{см}^{-1}$, относящиеся к колебаниям групп $\text{C}\equiv\text{N}$, $=\text{NH}$, --NH_2 , являются спектрально-структурными признаками таутомеров.

Наличие колебаний с частотами 3439см^{-1} и 3483см^{-1} в измеренном ИК спектре обусловлены таутомерным переходом. Колебание с частотой 3483см^{-1} соответствует валентному колебанию $q(\text{NH})$ группы NH_2 с частотой 3466см^{-1} соединения (I), а колебание с частотой 3439см^{-1} соответствует колебанию $q(\text{NH})$ группы NH_2 с частотой 3439см^{-1} соединения (II).

Колебание с частотой 1346см^{-1} измеренного спектра соответствует колебанию с частотой 1353см^{-1} соединения (II) — это неплоское деформационное колебание фрагмента, непосредственно прилегающего к группам $=\text{NH}$ и --NH_2 .

Колебание с частотой 1234см^{-1} измеренного спектра соответствует колебанию с частотой 1253см^{-1} соединения (I) — это неплоское колебание кольца R_4 , угол ориентации которого изменяется при таутомерном переходе.

Колебание 1037см^{-1} измеренного спектра соответствует колебанию с частотой 1054см^{-1} соединения (I), это — неплоское деформационное колебание связи C--O .

Основной полученный результат проведенных исследований таков: установлено строение таутомеров (I) и (II), подтверждено наличие этих соединений в смеси таутомеров и дана интерпретация измеренного ИК спектра. На примере поли(гетеро)ароматических систем с хроменопиридинкарбонитрильным фрагментом показано, что использование теоретических методов определения структуры и моделирование колебательных спектров вполне оправдано при недостаточных экспериментальных данных или их полном отсутствии.

Список литературы / References:

1. Nunez-Vergara L.J., Squella J.A., Navarrete-Encina P.A., Vicente-Garcia E., Preciado S., Lavilla R. Chromenopyridines: promising scaffolds for medicinal and biological chemistry. *Curr. Med. Chem.*, 2011, vol. 18, pp. 4761-4785.
2. Fouad S.A. et al. Synthesis of Chromen-2-one, Pyrano [3, 4-c] chromene and Pyridino [3, 4-c] chromene Derivatives as Potent Antimicrobial Agents, *Croatica Chemica Acta.*, 2018, vol. 91, no. 1, pp. 99-108.
3. Oliveira-Pinto S. et al. Unravelling the anticancer potential of functionalized chromeno [2, 3-b] pyridines for breast cancer treatment, *Bioorganic Chemistry*, 2020, vol. 100, p. 103942

4. Mohareb R.M., Megally Abdo N.Y., Gamaan M.S. Uses of cyclohexan - 1, 3 - dione for the synthesis of tetrahydrochromeno [3, 4 - c] chromen derivatives with anti - tumor activities. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2020, vol. 57, no. 6, pp. 2512-2527.
5. Chen H., Huang M., Li X., Liu L., Chen B., Wang J., Lin Y. Phochrodines A–D, first naturally occurring new chromenopyridines from mangrove entophytic fungus *Phomopsis* sp. 33. *Fitoterapia*, 2018, vol. 124, pp. 103-107.
7. Helal M.H. et al. One-step synthesis of chromene-3-carboxamide, bischromene, chromeno [3, 4-c] pyridine and bischromeno [3, 4-c] pyridine derivatives for antimicrobial evaluation. *Journal of Chemical Research*, 2010, vol. 34, no. 8, pp. 465-469.
8. Ammar Y.A., El-Gaby M.S.A., Salem M.A. Cyanoacetanilides intermediates in heterocyclic synthesis. Part 6: Preparation of some hitherto unknown 2-oxypyridine, bipyridine, isoquinoline and chromeno [3, 4-c] pyridine containing sulfonamide moiety. *Arabian Journal of Chemistry*, 2014, vol. 7, no. 5, pp. 615-622.
9. Elagamey A.G. et al. An efficient synthesis and antibacterial activity of pyrido [2, 3 - d] pyrimidine, chromeno [3, 4 - c] pyridine, pyridine, pyrimido [2, 3 - c] pyridazine, enediamines, and pyridazine derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2016, vol. 53, no. 6, pp. 1801-1806.
10. 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.)]
11. Попл Дж. А. Квантово – химические модели. *УФН*, 2002, т. 172, № 3, с. 349-356. [Popl J. A. Quantum-chemical models. *UFN*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 349-356. (In Russ.)]
12. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. *Gaussian03, Revision B.03*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA., 2003, 302 p.
13. Yoshida H., Ehara A., Matsuura H. Density functional vibrational analysis using wave number-linear scale factors. *Chem. Phys. Lett.*, 2000, vol. 325, no. 4, pp. 477-483.
14. Yoshida H., Takeda K., Okamura J., Ehara A., Matsuura H. New Approach to Vibrational Analysis of Large Molecules by Density Functional Theory: Wavenumber-Linear Scaling Method. *J. Phys. Chem. A.*, 2002, vol. 106, no. 14, pp. 3580-3586.

IR SPECTRA AND STRUCTURE OF CHROMENOPYRIDINE CARBONITRILE SYSTEMS

Ivlieva (Peretokina) I.V., Mecheryakova A. A., Babkov L.M., Sorokin V.V.

Saratov State University

Astrakhanskaya str., 83, Saratov, 410012, Russia; e-mail: lmbabkov@gmail.com

Abstract. IR spectrum of a mixture of amino-imino tautomers such as 5-amino-2,4-diimino-3-(pyridine-2-yl)-2,3,4,10 b-tetrahydro-1H-chromeno[3,4-c]pyridine-1-carbonitrile (I) and 4-amino-2,5-diimino-3-(pyridine-2-yl)-2,3,5,10 b-tetrahydro-1-chromeno[3,4-c]pyridine-1-carbonitrile (II) was interpreted. Density functional theory B3LYP/6-31G (d) method implemented in the GAUSSIAN 03 software package was used for modeling the structures and IR spectra of molecules. Geometrical structure of the tautomers were observed. The IR spectrum was interpreted.

Key words: 5-amino-2,4-diimino-3-(pyridine-2-yl)-2,3,4,10 b-tetrahydro-1H-chromeno[3,4-c]pyridine-1-carbonitrile, 4-amino-2,5-diimino-3-(pyridine-2-yl)-2,3,5,10 b-tetrahydro-1-chromeno[3,4-c]pyridine-1-carbonitrile, chromenopyridine carbonitrile systems, geometrical structure, IR spectrum.

ВЫСОКОЧАСТОТНАЯ СОНОГРАФИЯ СЕРДЕЧНО СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ РАЗВИТИИ НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Бурлаков А.Б., Титов С.А., Зыкова Л.А.

Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН
ул. Бутилова, 15, г. Москва, 117342, РФ; e-mail: burlakovao@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. В работе описана методика высокочастотного ультразвукового исследования *in vivo* сердечно сосудистой системы низших позвоночных на ранних стадиях их развития. Основой экспериментальной установки, используемой в исследованиях, является сканирующий акустический микроскоп с пространственным разрешением 20 мкм, совмещенный с оптическим инвертированным микроскопом. Показано, что пространственная и временная разрешающие способности сонографического модуля являются достаточными для визуализации структуры сердца и регистрации движения его компонентов. Экспериментальные работы выполнены на особях *Misgurnus fossilis* и *Danio rerio*, находящихся на предличиночной стадии развития. Исследуемые организмы после иммобилизации помещались в иммерсионную ячейку сонографического модуля, а ультразвуковые данные записывались в зависимости от пространственных координат и времени. Полученные ультразвуковые сканы отчетливо показывают структурные элементы сердца, на них различаются отражения ультразвуковых сигналов от стенок сердца и элементов крови. В сканах выявляется периодичность ультразвукового пространственно–временного сигнала по временной переменной, соответствующая ритму сердечной деятельности. Продемонстрировано, что по выделенным ультразвуковым сигналам можно определить траекторию движения стенок сердца в различных его областях, а также проводить измерения скорости кровотока. Найдено, что вертикальная компонента скорости элементов крови составляет примерно 0,8 и 0,08 мм/с во время систолы и в паузе, соответственно.

Ключевые слова: низшие позвоночные, сердечно сосудистая система, сонография, сканирующий акустический микроскоп.

В настоящее время эмбрионы рыб являются популярным модельным объектом для исследований в области биологии развития, генетики, экологии, медицины [1-3]. Использование эмбриональной модели в исследовательских работах является весьма перспективным, поскольку дает возможность проследить влияние различных факторов на живые системы в период стремительного усложнения, когда даже незначительные возмущающие воздействия могут приводить к нарушениям программы развития и появлению видимых аномалий. Особенно интересны в этом отношении эмбрионы низших позвоночных, развитие которых происходит во внешней среде и доступно для непосредственного наблюдения.

Для исследования процессов развития эмбрионов рыб широко используются оптические методы [4-6]. Однако с их помощью зачастую оказывается затруднительным визуализировать области живых объектов, которые являются малоконтрастными для оптического излучения или располагаются под непрозрачными слоями. В значительной степени преодолеть указанные затруднения позволяют ультразвуковые методы визуализации. Существующие в настоящее время сонографические установки эффективны для исследования сердечно сосудистой системы и измерения параметров кровотока взрослых особей рыб [7-11]. Вместе с тем, исследование сердца эмбриона или личинки рыбы, имеющего характерные размеры 0,10–0,15 мм с помощью подобных приборов представляется затруднительным вследствие недостаточно высокого разрешения. Более высокое пространственное разрешение позволяет достигнуть метод сканирующей акустической микроскопии, который был успешно применен для наблюдения различных структур зародыша, его роста, деления клеток и характеристики упругих свойств тканей [12,13]. В данной работе разработана методика и проведено сонографическое исследование сердечно сосудистой системы эмбрионов и личинок рыбы вьюна *Misgurnus fossilis* с помощью сканирующего акустического микроскопа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на особях вьюна *Misgurnus fossilis*, классическом объекте биологии развития. Самок, отловленных из природы, содержали в холодильнике при температуре 4-5°C. Для ускорения созревания самок применяли гормональную стимуляцию хорионическим гонадотропином (ХГ) при комнатной температуре. Получение половых продуктов и искусственное осеменение проводили по стандартной методике [3]. Оплодотворенные яйцеклетки тщательно промывали двумя порциями свежей воды. После этого зародышей размещали в термостате с температурой 17°C. Стадии развития определяли по таблицам нормального развития вьюна [3]. Эмбрионов на заключительных стадиях развития и вылупившихся личинок использовали для сонографического исследования. Для иммобилизации живых объектов использовали 2 % процентный раствор лидокаина, в который организм помещали на 2 минуты перед перенесением в экспериментальную установку.

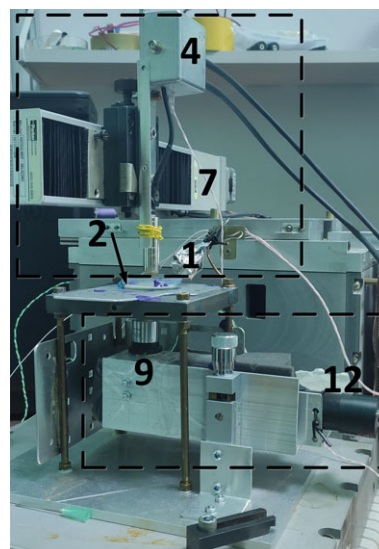
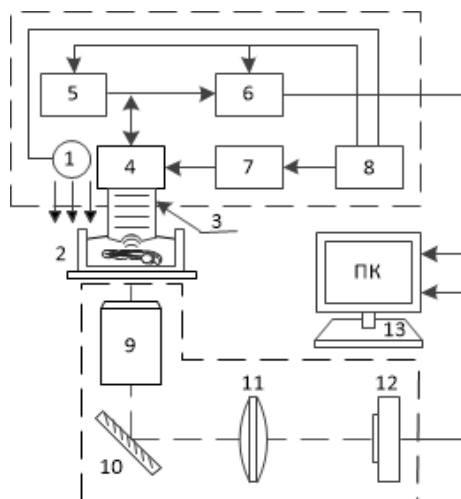


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки: 1 – светодиод; 2 – исследуемый объект; 3 – акустическая линза; 4 – ультразвуковой преобразователь; 5 – генератор сигналов; 6 – приемный блок с АЦП; 7 – механический сканер; 8 – контроллер; 9 – микрообъектив; 10 – зеркало; 11 – линза; 12 – камера; 13 – компьютер

Схема установки приведена на рисунке 1. Личинку 2 погружали в воду, служащей в качестве иммерсионной жидкости. Акустический объектив, состоящий из ультразвукового преобразователя 4 и линзы 3, генерировал зондирующие импульсные волны и принимал отраженные от объекта эхо-сигналы. Для возбуждения преобразователя использовался генератор электрических импульсов 5, а прием отраженных сигналов осуществлялся с помощью приемного блока 6, состоящего из малошумящего широкополосного усилителя, аналогового фильтра и аналого-цифрового преобразователя. Для получения ультразвукового изображения акустический объектив механически перемещался в поперечных направлениях посредством двух-координатного сканера 7.

Частотный диапазон акустического микроскопа, определяемый используемым ультразвуковым объективом, составлял 70 ± 30 МГц, а угловая апертура – 40° . Данные параметры прибора обеспечивали пространственное продольное и поперечное разрешение примерно 20 мкм [13].

Описанный сонографический модуль был совмещен с инвертированным оптическим микроскопом, состоящим из микрообъектива 9, зеркала 10 и линзы 11, формирующей изображение в плоскости цифровой видеокамеры 12. Изображение объекта 2 регистрировалось снизу через прозрачное дно иммерсионной ячейки. Для освещения объекта использовался светодиод 1. Получаемые оптические изображения объекта совместно с ультразвуковыми данными передавались в компьютер 13 для дальнейшей обработки и визуализации. Наличие оптического микроскопа позволяло производить настройку положения личинки, контролировать ее состояние в процессе эксперимента и использовать получаемые видеоданные при интерпретации результатов эксперимента.

МЕТОДИКА УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СЕРДЦА

Ультразвуковое наблюдение движения органов организмов в области сердца основано на записи отраженных эхо-сигналов в зависимости от продольной координаты z и времени T . Регистрация таких пространственно-временных сигналов, называемых М-сканами, производится при различных положениях продольной оси акустического объектива x, y относительно исследуемой области организма (рис. 2 (а)). Время записи одного М-скана покрывало несколько периодов биения сердца и составляло в данном эксперименте 2,5 с. Пример типичного М-скана показан на рисунке 2 (б) в виде полутонного изображения, в котором уровень сигнала отображается градациями серого. По вертикали изображения откладывается продольная координата z , по горизонтали – время T .

В приведенном М-скане выделяются несколько характерных ультразвуковых откликов, порождаемых отражениями от акустических неоднородностей. Отклик А (рис. 2 (б)), расположенный наиболее близко к поверхности организма, образован отражением ультразвука от наружной стенки сердца, отклики S и D производятся рассеянием волн на элементах крови, а отклик В образован отражениями от противоположной стенки сердца и других более глубоко расположенных тканей. Наблюдается очевидная периодичность двигательной активности стенок с периодом примерно 0,8 с. В пространстве между стенками имеют место сигналы, отраженные от движущихся элементов крови. Тонкая структура этих сигналов показывает разнородность пространственного распределения элементов крови. Характер движения крови изменяется в зависимости от функционального периода в сердечном ритме, что позволяет выделить фазы систолы S и диастолы D.

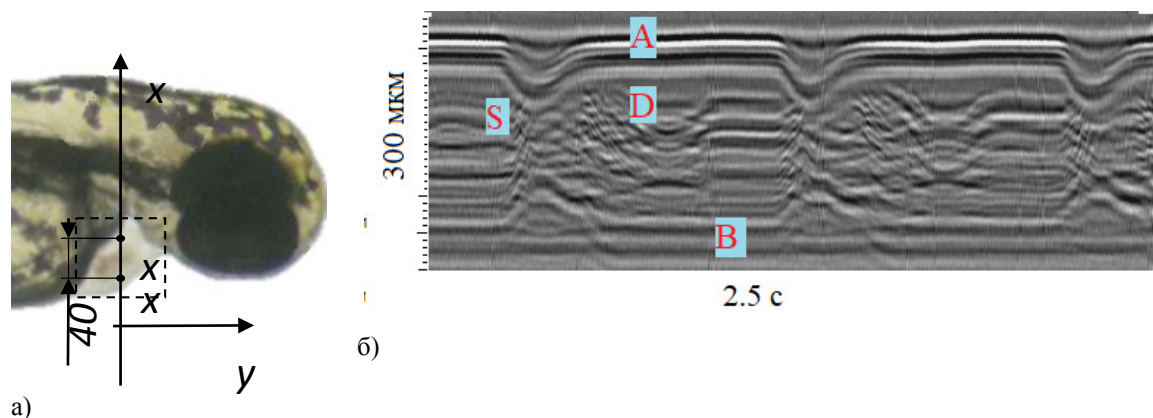


Рисунок 2. Оптическое изображение области сердца (а) и ультразвуковой пространственно временной сигнал (М-скан) (б)

Для визуализации поперечного сечения сердца, измерение производится в других положениях объектива x , и путем цифровой обработки данных осуществляется синхронизация М-сканов по отношению к фазам сердечного ритма. Трехмерная визуализация работающего сердца возможна путем регистрации данных в зависимости не только от x , но и от y .

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Разработанная методика была применена для *Danio rerio* на предличиночной стадии развития спустя сутки после вылупления из икринки. Оптическое изображение объекта (рисунок 2(а)) дает наглядное представление об исследуемой области сердца. На рисунке показано сечение, вдоль которого располагались точки регистрации ультразвуковых сигналов x_i . Некоторые из ультразвуковых М-сканов, полученных на протяжении нескольких секунд каждый, показаны на рисунке 3 в формате $s(t, T)$, где t – задержка сигналов при распространении волны вдоль оси z вглубь организма. Показанные сканы измерены с шагом 8 мкм в диапазоне 40 мкм между соседними точками x_{32} и x_{42} .

На изображениях можно обнаружить и распознать несколько характерных ультразвуковых эхосигналов, демонстрирующих явную периодичность движения. Период данного сигнала ΔT_h составляет примерно 0,6 с, что соответствует естественному ритму сердца. В данном случае поверхностный сигнал R практически стабилен, наблюдаются лишь незначительные смещения. Вместе с тем, непосредственно под поверхностью обнаруживается еще один слой, претерпевающий заметные смещения с частотой биения сердца. Сигнал H показывает периодическое движение внутренних мышечных стенок сердца. Между стенками сердца генерируется сигналы В, которые являются отраженными от движущихся элементов крови. Видно, что расстояние между сигналами R и H меняются не только в зависимости от времени, но и от расстояния, что обусловлено формой сердца.

В наблюдаемых сигналах распознаются фазы систолы, когда имеет место встречное движение сигналов, и фазы диастолы, когда стенки движутся в противоположных направлениях. Сигналы показывают, что плавные смещения сменяются резкими движениями с большими скоростями и ускорениями, особенно в начале систолы. Движение крови В также носит импульсный характер, причем вертикальная скорость движения элементов крови может превосходить скорость движения стенок.

ИЗМЕРЕНИЕ СКОРОСТИ КРОВОТОКА

По ультразвуковому отклику В можно исследовать течение крови, характер которой меняется на различных участках со временем T , а также проводить измерения скорости кровотока. Способ измерения скорости движения элементов крови в сердце предличинки проиллюстрирован на рисунке 4. За некоторое время ΔT_b частицы проходят по вертикали расстояние, пропорциональное изменению задержки ультразвукового сигнала.

Зная скорость распространения звука в среде C_w , скорость движения частиц крови можно рассчитать по формуле:

$$V = \frac{\Delta t \cdot C_w}{2\Delta T_b}, \quad (1)$$

где Δt – изменение задержки ультразвукового сигнала за время ΔT_b , а в качестве скорости звука в тканях организма можно использовать приближенную величину $C_w \approx 1500$ м/с, полученную ранее для эмбриона вьюна [12]. Значения вертикальной компоненты скорости крови составили: $V=0,083$ мм/с в паузе между ударами сердца (область В₁) и $V=0,75$ мм/с во время систолы (область В₂).

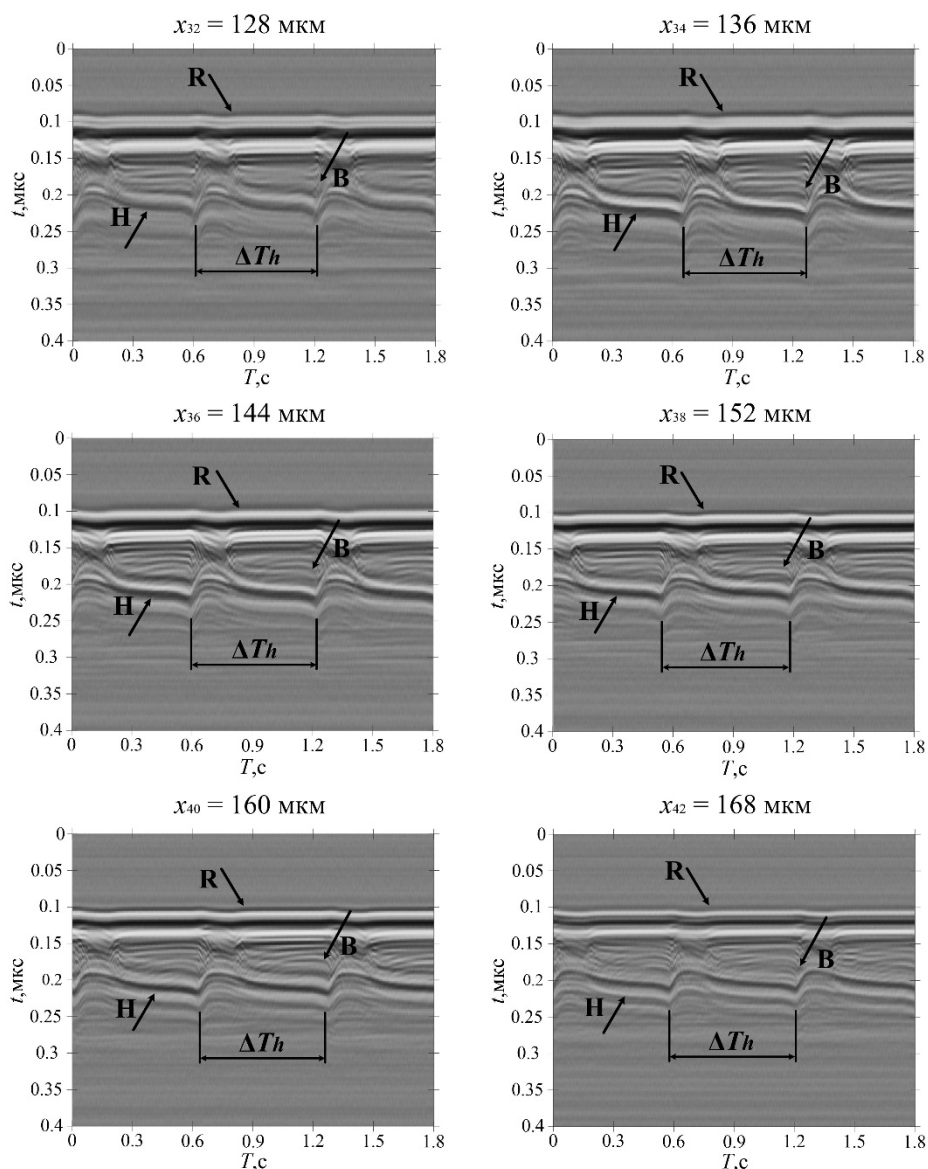


Рисунок 3. Ультразвуковые сигналы, измеренные в различных точках сердца

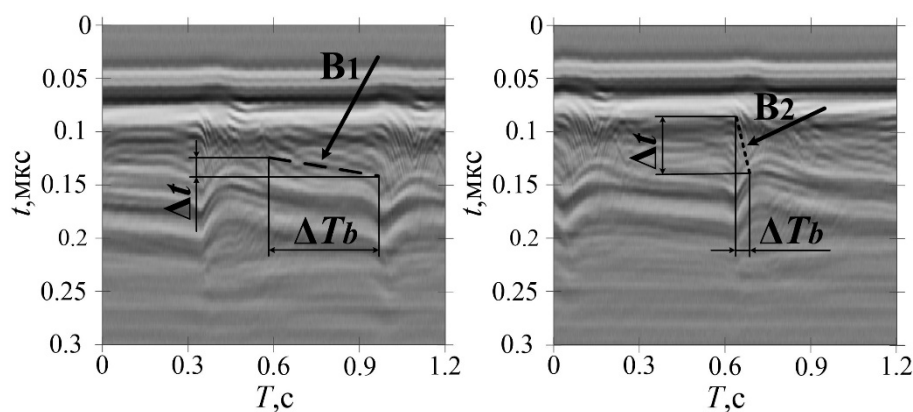


Рисунок 4. Измерение скорости кровотока по ультразвуковым данным

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что разработанная методика сонографического исследования *in vivo* малых организмов может быть использована для визуализации сердечно сосудистой системы низших позвоночных на ранних стадиях развития. Показано, что пространственное и временное разрешение ультразвукового модуля являются достаточными для наблюдения структуры сердца и движения его

компонентов, продемонстрировано, что по ультразвуковым данным можно проводить измерения скорости движения стенок сердца и элементов крови на разных фазах сердечного периода.

Вместе с тем следует отметить, что полученные результаты являются предварительными и развитие предложенной методики позволит существенно расширить ее возможности. Так путем цифровой обработки массивов ультразвуковых данных представляется возможным получать анимационные двухмерные и трехмерные изображения работающего сердца, строить карту скоростей движения элементов крови, вычислять интегральные параметры сердечно-сосудистой системы, принятые в кардиологических исследованиях. Объединение и совместная обработка ультразвуковых и видео данных, которые могут одновременно регистрироваться с помощью разработанной экспериментальной установки, потенциально могут существенно повысить информативность проводимых исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Государственного задания № 0069-2019-0009.

Список литературы / References:

1. Giardoglou P., Beis D. On Zebrafish Disease Models and Matters of the Heart. *Biomedicines*, 2019, vol. 7, no. 1, p. 15.
2. Бурлаков А.Б., Мачихин А.С., Хохлов Д.Д., Гадзаов А.Ф. Использование акустооптики для выявления локальной гетерогенности желтка в период подготовки к появлению спонтанной двигательной активности у эмбрионов вьюна, *Misgurnus fossilis*. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2019, № 2, с. 47-53. [Burlakov A.B., Machikhin A.S., Khokhlov D.D., Gadzaov A.F. Using acousto-optics to identify local heterogeneity of the yolk in preparation for the appearance of spontaneous locomotor activity in embryos of the loach, *Misgurnus fossilis*. *Biomeditsinskaya radioelektronika*, 2019, no. 2, pp.47-53. (In Russ.)]
3. Костомарова А.А. *Объекты биологии развития*. М.: Наука, 1975, с. 321. [Kostomarova A.A. *Developmental biology objects*. М.: Nauka, 1975, p. 321. (In Russ.)]
4. Daetwyler S., Günther U., Modes C.D., Harrington K., Huisken J. Multi-sample SPIM image acquisition, processing and analysis of vascular growth in zebrafish. *Development*, 2019, vol. 146, no. 6, dev173757, pp. 1-10.
5. Keller P.J., Schmidt A.D., Wittbrodt J., Stelzer E.H.K. Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy. *Science*, 2008, vol. 322, no. 5904, pp. 1065-1069.
6. Salman H.E., Yalcin H.C. Advanced blood flow assessment in Zebrafish via experimental digital particle image velocimetry and computational fluid dynamics modeling. *Micron*, 2020, vol. 130, no. 3, 10280.
7. Sun L., Lien C.L., Xu X., Kirk Shung. K. In Vivo Cardiac Imaging of Adult Zebrafish Using High Frequency Ultrasound (45-75 MHz). *Ultras. Med. Biol.* 2008, vol. 34, no. 1, pp. 31-39.
8. Huang C.C., Su T.H., Shih C.C. High-resolution tissue Doppler imaging of the zebrafish heart during its regeneration. *Zebrafish*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 48-57.
9. Wang L.W., Huttner I.G., Santiago C.F., Kesteven S.H., Yu Z.Y., Feneley M.P., Fatkin D. Standardized echocardiographic assessment of cardiac function in normal adult zebrafish and heart disease models. *Dis. Model. Mech.*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 63-76.
10. Fanga Y., Suna Y., Luo C., Gu J., Shi Z., Lu G., Silvestre J.-S., Chen Z. Evaluation of cardiac dysfunction in adult zebrafish using high frequency echocardiography. *Life Sciences*, 2020, vol. 253, p. 117732.
11. Evangelisti A., Schimmel K., Joshi S., Shah K., Fisch S., Alexander K.M., Liao R., Morgado I. High-Frequency Ultrasound Echocardiography to Assess Zebrafish Cardiac Function. *J. Vis. Exp.*, 2020, Mar 12, vol. 157, e60976.
12. Титов С.А., Бурлаков А.Б., Зинин П.В., Богаченков А.Н. Измерение скорости звука в тканях эмбрионов костистых рыб. *Изв. РАН. Сер. Физическая*, 2021, том 85, № 1, с. 140-144. [Burlakov A.B., Titov S.A., Zinin P.V., Bogachenkov A.N. Measuring the Speed of Sound in Tissues of Teleost Fish Embryos. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2021, vol. 85, no. 1, pp. 103-107. (In Russ.)]
13. Burlakov A.B., Titov S.A., Bogachenkov A.N. Ultrasonic monitoring of early development of lower vertebrate embryos. *J. of Physics: Conf. Series*, 2020, vol. 1679.

HIGH FREQUENCY SONOGRAPHY OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM IN THE EARLY DEVELOPMENT OF THE LOWER VERTEBRATES

Burlakov A.B., Titov S.A., Zykova L.A.

Scientific and Technological Center of Unique Instrumentation of RAS
Butlerova str., 15, Moscow, 117342, Russia; e-mail: burlakovao@mail.ru

Abstract. The paper describes the technique of high-frequency ultrasound examination *in vivo* of the cardiovascular system of lower vertebrates at the early stages of their development. The basis of the experimental setup used in the research is a scanning acoustic microscope with a spatial resolution of 20 μm , combined with an optical inverted microscope. It is shown that the spatial and temporal resolution of the sonographic module is sufficient for visualizing the structure of the heart and recording the movement of its components. Experimental work was carried out on individuals of *Misgurnus fossilis* and *Danio rerio* at the larval stage of development. The studied organisms after immobilization were placed in the immersion cell of the sonographic module, and the ultrasound data was recorded depending on the spatial coordinates and time. The received ultrasound scans clearly show the structural elements of the heart, they differ in the reflections of ultrasound signals from the walls of the heart and blood elements. The scans reveal the frequency of the ultrasonic spatio-temporal signal in terms of the temporal variable, which corresponds to the rhythm of cardiac activity. It has been demonstrated that the selected ultrasound signals can be used to determine the trajectory of the heart walls in its various regions, as well as to measure the blood flow velocity. It was found that the vertical component of the velocity of blood elements is approximately 0.8 and 0.08 mm / s during systole and in pause, respectively.

Key words: lower vertebrates, cardiovascular system, sonography, scanning acoustic microscope.

ОЦЕНКА СКОРОСТИ ДЕГРАДАЦИИ КАРКАСНЫХ ГУБОК НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА *IN SITU* ПО ДАННЫМ АКУСТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Храмцова Е.А.¹, Куликова О.Р.¹, Ушмаров Д.И.², Антипова К.Г.³, Луканина К.И.³,
Гуменюк С.Е.², Левин В.М.¹, Григорьев Т.Е.³

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: alyonushk@gmail.com

² Кубанский государственный медицинский университет
ул. Митрофана Седина, 4, г. Краснодар, 350063, РФ

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123182, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Гистологические исследования в регенеративной медицине – один из самых достоверных методов изучения вариативной реактивности и адаптивной изменчивости клеток и тканей при воздействии каких-либо факторов. Однако, обработка химическими фиксаторами, дегидратация, изготовление срезов и окрашивание образцов, являясь неотъемлемой частью гистологической пробоподготовки для последующей оптической микроскопии, приводят к невозможности получения максимально точной информации о витальном состоянии тканей исследуемого образца. В данной работе предложен метод акустической микроскопии как безопасный, неинвазивный и витальный способ исследования микроструктуры губчатого материала на основе хитозана после имплантации в организм крысы. Хитозан – природный биосовместимый полимер, обладает гемостатической активностью, а также антибактериальным и антисептическим действием, благодаря чему широко применяется в тканевой инженерии, терапии инфекционных заболеваний, медицине катастроф [1]. Эксплантаты исследовались методами акустической и оптической микроскопии с применением гистологических методик. Оценена скорость деградации каркасных губок на основе хитозана в условиях асептических и гнойных ран. В результате настоящего исследования показана эффективность акустической микроскопии в качестве неинвазивного, неразрушающего инструмента для визуализации результатов процесса биодеградации губчатых матриц на основе хитозана.

Ключевые слова: матрикс, хитозан, губки, акустическая микроскопия.

Регенеративная медицина – непрерывно развивающаяся область медицины, основным интерес которой заключается в изучении механизмов взаимодействия биосовместимых материалов с живым организмом. Особую ценность представляют материалы, обладающие определенной прочностью, микроструктурой, проницаемостью и способность регулирования роста и адгезии клеток [2,3].

Наравне с активным развитием самой области регенеративной медицины, растет потребность в количественных методах визуализации и анализа упругих свойств матрикса неинвазивными и неразрушающими методами в результате естественной деградации внутри организма. Имеющиеся в настоящее время в распоряжении исследователей методы визуализации и оценки объемной микроструктуры – это электронная и оптическая микроскопия с различными видами гистологической подготовки объектов, требуют нарушения целостности матриц. Основной проблемой этих методик является их непосредственное воздействие на объект (обработка с помощью химических фиксаторов, изготовление срезов, окрашивание и т.д.), в результате чего невозможно получение адекватной информации о реальном состоянии исследуемого образца. С учетом этого для анализа микроструктуры матриц *in situ* был предложен метод акустической микроскопии [4-6].

Для адекватного запуска процесса регенерации, функциональное раневое покрытие должно изолировать место повреждения, обладать антибактериальными свойствами, с одной стороны обладать механической прочностью, но с другой – не травмировать окружающие ткани, по возможности сорбировать накапливающийся экссудат, нести на себе лекарственные препараты и т.д. [7, 8].

В рамках данной работы были исследованы губчатые материалы на основе хитозана. Матрицы на основе хитозана способствуют быстрой регенерации тканей, т.к. хитозан вызывает миграцию клеток иммунной системы (макрофагов) в район повреждения, а также обладает ангиогенной активностью (т.е. способен вызывать васкуляризацию тканей). Исходя из этого можно сделать вывод, что матрицы, содержащие большую концентрацию хитозана, эффективнее в плане обеззараживания и заживления ран [9].

С целью стандартизации условий имплантации, хитозановые импланты устанавливались в предварительно подготовленные соединительнотканые капсулы [10]. В дальнейшем эксплантаты исследовались с применением оптической и акустической микроскопии, гистологических методик.

Образцы изготавливали из 1 и 3 вес.% растворов хитозана (Primex ChiroClear HQG 800, Исландия, Mw = 600 кДа) в 2% уксусной кислоте/H₂O. В качестве сшивающего агента использовали 2,5 вес.% глутарового альдегида (ГА) (Sigma Aldrich, США). Бидистиллированную воду получали на установке Millipore Milli-Q Synthesis. Растворы полимера гомогенизировали на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Тес при комнатной температуре 48 часов. В готовые растворы хитозана добавляли ГА (из расчета 0,5% ГА от массы полимера) и

размешивали в течение 15 минут. Часть смеси замораживали изотропно. Для этого ее распределяли в ячейки 12-луночного планшета и помещали в морозильную камеру рефрижератора 24 часа. Другую часть смеси замораживали в условиях направленного роста кристаллов растворителя в емкостях с латунным дном и фторопластовыми стенками на медном стержне, охлаждаемом жидким азотом. Такая система обеспечивает температурный градиент в выделенном направлении. Замороженные образцы высушивали методом сублимационной сушки на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC в течение 48 часов.

Исследование проведено на 8 белых лабораторных нелинейных крысах-самцах с массой тела 286–310 г., с разделением на группы по 4 крысы в каждой. Формирование соединительнотканной капсулы проводилось под общей анестезией, путем в/м введения 0,2 мл «Телазола», с последующей фиксацией крысы на столе в положении на животе и бритьем операционного поля размерами 4x4 см, а также его трехкратной обработкой йодопионом 5% и однократной - раствором хлоргексидина биглюконата 3%. Скальпелем произвели линейный разрез по паравerteбральной линии на расстоянии 1,5 см. от средней линии. Рассечена кожа, подкожная жировая клетчатка и поверхностная фасция, мышца разведена на глубину до 1,5 см. В рану введен имплант. Первой группе крыс для моделирования асептической раны ввели стерильные гидрофильные полимерные импланты шаровидной формы диаметром 1,5–1,6 см. и массой 1,73–1,75 гр. Второй группе крыс для моделирования гнойной раны ввели полимерные пористые импланты с бактериальной суспензией, содержащей 4 мл. *Ps. aeruginosa* 109 КОЕ/мл, шаровидной формы диаметром 1,5–1,6 см. и массой 1,73–1,75 гр. Раны ушиты 3-мя узловыми швами, с прошиванием фасции и 2-мя кожными швами. На 7-е сутки хирургическим путем под общей анестезией (в/м 0,1 мл. «Телазола») производилась замена имплантов на направленные и ненаправленные каркасные губки на основе хитозана.

На 6-е сутки после имплантации каркасных губок соединительнотканная капсула, содержащая матрикс, была извлечена хирургическим путем и исследована методами акустической и оптической микроскопии. Также проведено гистологическое исследование тканей капсулы и матрикса.

Хирургические вмешательства проводились с соблюдением требований гуманного обращения с животными и правил этики экспериментальных исследований на животных. Весь послеоперационный период крысы находились под наблюдением в стандартных общепринятых условиях содержания и свободным доступом к пище и воде.

Визуализация соединительнотканной капсулы с матриксом из каркасных губок на основе хитозана производилась на сканирующем импульсном акустическом микроскопе SIAM-2011. Данный микроскоп разработан сотрудниками лаборатории акустической микроскопии ИБХФ РАН. Для исследования эксплантата применялась длиннофокусная линза с рабочей частотой 50 МГц. Иммерсионной жидкостью была бидистиллированная вода комнатной температуры 25 ± 2 °C. Полученное изображение, обработанное при помощи программного обеспечения микроскопа, представляет собой градации серого и отражает вариации локальных упругих свойств матрикса и степень его сохранности.

Определение расположения биоискусственного матрикса в области его имплантации зачастую представляет самостоятельную сложную задачу. В данном случае, предварительно сформированная соединительнотканная капсула эффективно локализует область имплантации и обладает высоким акустическим контрастом относительно импланта и окружающих тканей за счет высоко содержания коллагеновых волокон (рис. 1).

Губчатый имплант перед установкой представлял собой цилиндр и площадь сечения была вычислена по формуле (1) для круга:

$$S_I = \pi r^2 \quad (1)$$

где r – радиус круга.

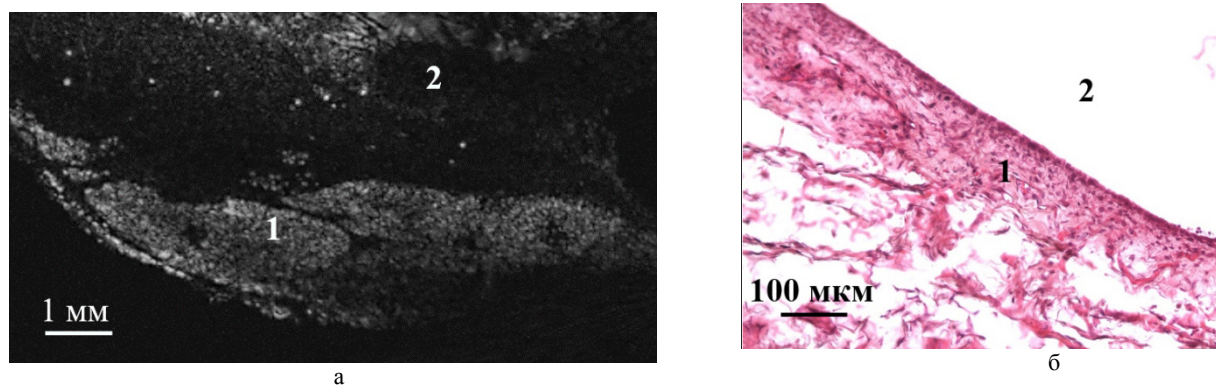


Рисунок 1. Сравнение ультразвукового (а) и гистологического (б) изображений соединительнотканной капсулы в месте имплантации матрикса. 1 – соединительнотканная капсула, 2 – внутренняя полость. Толщина акустического среза 47 мкм

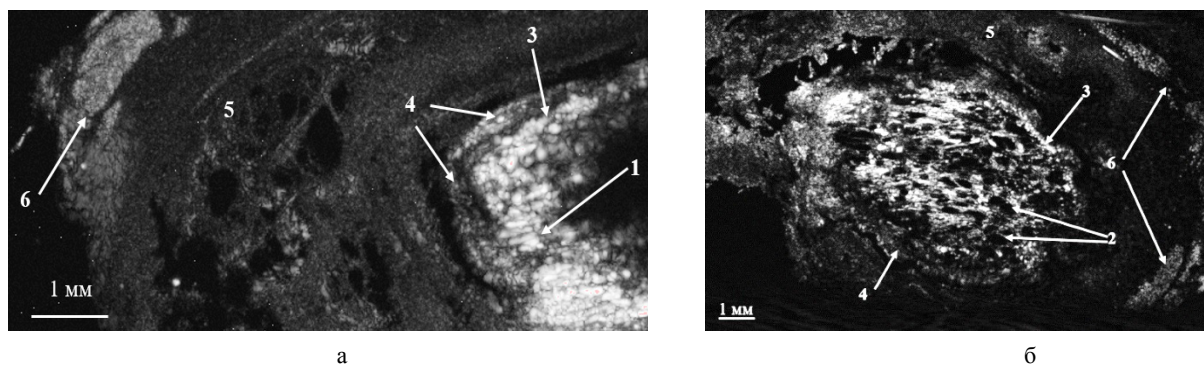


Рисунок 2. Сравнение ультразвуковых изображений направленного (а) и ненаправленного (б) губчатого матрикса на основе хитозана: 1 – направление пор, 2 – срез через пору; 3 – граница интактного матрикса, 4 – матрикс с клетками, 5 – внутренний объем соединительно тканной капсулы, 5 – соединительнотканная капсула. Толщина акустических срезов мкм и мкм соответственно

После имплантации геометрия матрикса претерпела изменения и его сечение было рассчитано по формуле (2) для эллипса:

$$S_2 = \pi r R \quad (2)$$

где r – меньший радиус эллипса, R – больший радиус эллипса.

С помощью ультразвуковых методик были получены изображения и проведены измерения площади матрикса. Ввиду существенных различий в упруго-механических свойствах между сохранной частью матрикса и той, в которую мигрировали клетки, эта граница хорошо видна на акустических изображениях.

Отличие в методиках изготовления губчатых матриксов с одноосно ориентированными (направленными) и изотропно разориентированными (ненаправленными) порами приводит к формированию пор различного диаметра. У ненаправленных матриксов этот диаметр составляет около 100 мкм, у направленных – 30 мкм, что вызывает затруднения в миграции макрофагов в объем направленного матрикса (рис. 2).

В результате данного исследования установлено, что на сроке до 1 недели после имплантации наибольшее влияние на скорость набухания стенки матрикса и миграцию клеток в его объем влияет морфология исходно матрикса, и в меньшей степени тип раны и концентрация хитозана в исходном растворе. Отличие в данных по образцу №5 после имплантации по всей видимости связано со сдвигом плоскости поперечного сечения образца матрикса относительно оси сканирования.

Таблица 1. Изменение интактной площади сечения губчатых матриксов на основе хитозана до и после имплантации по данным акустической микроскопии

№ образца	концентрация исходного раствора хитозана, %	тип раны	тип матрикса	S_1 , см ²	S_2 , см ²	интактный матрикс, %
1	3	асептическая	направленный	1,88	0,18	9,6
2	3	асептическая	ненаправленный	1,83	0,098	5,3
3	1	асептическая	направленный	1,79	0,41	22,9
4	1	асептическая	ненаправленный	1,81	0,24	13,4
5	3	гнойная	направленный	1,81	0,28	15,5
6	3	гнойная	ненаправленный	1,77	0,4	22,6
7	1	гнойная	направленный	1,81	0,52	28,7
8	1	гнойная	ненаправленный	1,77	0,233	12,9

Показана эффективность акустической микроскопии в качестве неинвазивного, неразрушающего инструмента для визуализации результатов взаимодействия разных типов губчатых матриц на основе хитозана с тканями организма.

Список литературы / References:

1. El-banna F., Mahfouz M., Leporatti S., El-Kemary M., and Hanafy N. Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels: *Appl. Sci.*, 2019, vol. 9, no. 11, p. 2193. doi: 10.3390/app9112193
2. Meng Q., Sun Y., Cong H., Hu H. & Xu F. (2021) An overview of chitosan and its application in infectious diseases: *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 11, pp. 1340-1351. doi: 10.1007/s13346-021-00913-w
3. Gumenyuk A., Ushmarov D., Gumenyuk S., Gayvoronskaya T., Sotnichenko A., Melkonyan K., Manuylov A., Antipova K., Lukanina K., Grigoriev T., Domenyuk D. Potential Use of Chitozan-Based Multilayer Wound Covering in Dental Practice: *Archiv Euromedica*, 2019, vol. 9, no. 3, pp. 76-80. doi: 10.35630/2199-885X/2019/9/3.24
4. Nwe N., Furuike T. and Tamura H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from *Gongronella butleri*: *Materials*, 2009, vol. 2, pp. 374-398. doi: 10.3390/ma2020374
5. Kim K., Wagner W.R. Non-invasive and Non-destructive Characterization of Tissue Engineered Constructs Using Ultrasound Imaging Technologies: A Review. *Annals of biomedical engineering*, 2016, vol. 44, no. 3, pp. 621-635. doi: 10.1007/s10439-015-1495-0
6. Mansour J.M., Gu Di-Win M., Chung C., Heebner J., Althans J., Abdalian S., Schluchter M., Liu Y., Welter J. Towards the feasibility of using ultrasound to determine mechanical properties of tissues in a bioreactor: *Annals of Biomedical Engineering*, 2014, vol. 40, no. 10, pp. 2190-2202. doi: 10.1007/s10439-014-1079-4
7. Ruland A., Chen X., Khansari A., D Fay C., Gambhir S., Yue Z., Wallace G. A contactless approach for monitoring the mechanical properties of swollen hydrogels: *Soft Matter*, 2018, vol. 14, no. 35, pp. 7228-7236. doi: 10.1039/c8sm01227j
8. Nguyen C., Nguyen B., Hsieh M. Curcumin-Loaded Chitosan/Gelatin Composite Sponge for Wound Healing Application: *International Journal of Polymer Science*, 2013, vol. 2. doi: 10.1155/2013/106570
9. Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 2011, vol. 29, no. 3, pp. 322-337. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.005
10. Гуменюк С.Е., Гайворонская Т.В., Гуменюк А.С., Ушмаров Д.И., Исянова Д.Р. Моделирование раневого процесса в экспериментальной хирургии. *Кубанский научный медицинский вестник*, 2019, т. 26, № 2. [Gumenyuk S.E., Gaivoronskaya T.V., Gumenyuk A.S., Ushmarov D.I., Isyanova D.R. Modeling the wound process in experimental surgery. *Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2019, vol. 26, no. 2. (In Russ.)] doi: 10.25207/1608-6228-2019-26-2-18-25

EVALUATION OF THE DEGRADATION RATE FOR CHITOSAN SPONGEOUS SCAFFOLDS *IN SITU* BY MEAN OF ACOUSTIC MICROSCOPY

Khramtsova E.A.¹, Kulikova O.R.¹, Ushmarov D.I.², Antipova K.G.³, Lukanina K.I.³, Gumenyuk S.E.², Levin V.M.¹, Grigoriev T.E.³

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina st., 4 Moscow, 119334, Russia; e-mail: alyonushk@gmail.com

² Kuban State Medical University
Sedina st., 4 Krasnodar, 350063, Russia

³ National Research Center "Kurchatov Institute"
Akademika Kurchatova pl., 1 Moscow, 123098, Russia

Abstract. Histological studies in regenerative medicine are one of the most reliable methods for studying the variable reactivity and adaptive variability of cells and tissues under the influence of outer factors. However, processing with chemical fixatives, dehydration, making sections and staining of samples, being an integral part of histological sample preparation for subsequent optical microscopy, lead to the impossibility of obtaining the most accurate information about the vital state of the tissues of the sample under study. In this work, the method of acoustic microscopy is proposed as a safe, non-invasive and vital method for studying the microstructure of a spongy scaffolds based on chitosan after implantation into a rat's body. Chitosan is a natural biocompatible polymer, has hemostatic activity, as well as antibacterial and antiseptic, due to which it is widely used in tissue engineering, therapy of infectious diseases, and disaster medicine [1]. The explants were examined by acoustic and optical microscopy using histological techniques. The rate of degradation of spongy scaffolds based on chitosan under conditions of aseptic and purulent wounds was estimated. As a result of this study, the effectiveness of acoustic microscopy as a non-invasive, non-destructive tool for visualizing the results of the biodegradation of scaffolds based on chitosan has been demonstrated.

Key words: spongy scaffold, chitosan, acoustic microscopy.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ ПЛАЗМЕННЫХ СТРУЙ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Евтина А.А.^{1,2}, Булдаков М.А.², Нехорошев В.О.³, Ландль Н.В.³, Чердынцева Н.В.^{1,2},
Королев Ю.Д.³

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет

г. Томск, РФ

² Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

г. Томск, РФ, e-mail: anastasiya10152@gmail.com

³ Институт сильноточной электроники СО РАН

г. Томск, РФ

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Существующая литература демонстрирует наличие противоопухолевого действия низкотемпературной плазмы как *in vitro* на разных клеточных линиях, так и *in vivo*. Данное направление интенсивно изучается в последнее время, однако, исследования осложняются ввиду большого разнообразия объектов исследования и недостаточной изученности плазменных струй. В данной работе изучалось влияние низкотемпературной плазменной струи на пролиферацию опухолевых клеток HeLa как в различных режимах обработки клеточной культуры, так и при вариации параметров источника плазмы. Низкотемпературные плазменные струи были получены на основе импульсного электрического разряда, поддерживаемого в потоке воздуха при атмосферном давлении. С целью поиска оптимальных условий варьировались частота следования импульсов напряжения от 0,5 до 4,2 кГц, время экспозиции от 30 до 240 с, количество повторов обработки и длительность паузы между повторами (10 минут, 24 часа, 72 часа). Было показано, что данный тип физического воздействия способен подавлять рост опухолевых клеток до 85% по сравнению с группой контроля. Данный эффект зависит как от частоты следования импульсов тока разряда, так и от времени воздействия. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования низкотемпературных плазменных струй для подавления пролиферации опухолевых клеток.

Ключевые слова: низкотемпературная плазма, разряд в потоке газа, плазменная струя, онкология, пролиферация, HeLa.

В настоящее время большинство людей в мире умирает по причине возникновения злокачественных новообразований. За последние 10 лет заболеваемость раком в мире выросла на 33% [1]. Поэтому онкологические заболевания широко признаны как угроза глобальному развитию мирового населения. Универсального лечения злокачественных новообразований не найдено, поскольку результат терапии во многом зависит как от чувствительности самих опухолевых клеток, так и от типа и характеристик воздействующего фактора. На современном этапе развития достигнуты определенные успехи, которые связаны с усовершенствованием методик хирургии, лучевой терапии, химиотерапии. Данные методики хорошо зарекомендовали себя благодаря высоким терапевтическим эффектам, однако, несмотря на их достоинства, у них существует один большой недостаток – помимо опухолевых клеток, страдают и нормальные, окружающие опухоль ткани. Комплекс побочных эффектов терапии приводит к снижению качества жизни пациентов, увеличению сроков лечения, а в ряде случаев и к отказу от данного вида терапии. Следовательно, проблема повышения эффективности лечения злокачественных новообразований и снижения побочных эффектов является чрезвычайно актуальной.

Для решения вышеописанной проблемы необходима методика терапии онкологических заболеваний, дающая выраженный противоопухолевый эффект при минимальном негативном влиянии на окружающие опухоль здоровые ткани. В представленной работе рассматривается влияние низкотемпературной плазменной струи, получаемой на основе разряда атмосферного давления в потоке воздуха, как физического фактора воздействия на опухолевые клетки.

В общем случае, плазменные струи формируются на выходе электродной системы в условиях, когда газ проходит через область плазмы разряда. Таким образом, в струе содержатся различные химически и биологически активные частицы, что обуславливает широкий спектр применения таких систем [2-4]. Благодаря наличию в плазме свободных радикалов и активных молекул, таких как озон, супероксид-анион, диоксид азота и других, она может применяться в биомедицинских исследованиях, связанных со стерилизацией, изменением свойств поверхности биоматериала, заживлением ран, свертыванием крови, а также лечением рака [5-8].

Обзор имеющейся литературы в области терапии злокачественных новообразований показал, что после прямого воздействия низкотемпературной плазмой на опухолевые клетки наблюдается противоопухолевый эффект для различных типов рака *in vitro* и *in vivo* [9-13]. Первые исследования, демонстрирующие противоопухолевое действие плазмоактивированной среды (РАМ) на клеточные линии глиобластомы, были проведены группой ученых во главе с Танаком [14]. Эксперименты *in vitro* показали изменение физиологического состояния опухолевых клеток, приводящее к апоптозу или некрозу, в зависимости от типа клеток и параметров

воздействия (мощность разряда, время воздействия) [15]. Также было отмечено, что плазма может не только продуцировать активные радикалы в окружающую среду, но и индуцировать генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках, приводя к их гибели [7,16]. В экспериментах, проведенных *in vivo*, было зафиксировано снижение роста подкожных опухолей у мышей, а также стимуляция иммунного ответа на прогрессирование опухоли [3].

При исследовании действия плазменной струи на клеточные линии меланомы было показано, что струя способна не только индуцировать клеточную гибель посредством собственных продуктов, но и восстанавливать чувствительность химиорезистентных раковых клеток к определенным лекарствам. Одним из примеров является то, что обработка плазмой вызвала синергическую цитотоксичность доксорубина и эпирубина, что приводило к усилению реакции повреждения ДНК (усиление фосфорилирования АТМ, очагов γ -H2AX и образование микроядер) [17]. Другим примером является то, что после обработки плазменной струей наблюдалось восстановление чувствительности резистентных к темозоломиду (TMZ) клеток глиобластомы после терапии TMZ [18]. Также было показано восстановление чувствительности к препаратам клеток колоректального рака, изначально резистентных к лиганду, индуцирующему апоптоз (TRAIL) [19]. Кроме того, главной и отличительной особенностью плазмы является ее селективное воздействие на различные типы клеток, выраженное в подавлении роста опухолевых клеток и стимуляции функций здоровых, например, стволовых [7, 21].

Несмотря на перспективность использования плазменных струй в терапии злокачественных новообразований, на сегодняшний день практически отсутствует информация о механизмах действия плазменных струй на опухолевые и нормальные клетки. Необходимы исследования по поиску оптимальных режимов воздействия струи, приводящих к опухоли-повреждающему действию при условии сохранения либо незначительного подавления функций нормальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была проведена на культуре опухолевых клеток линии HeLa (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург) – рак шейки матки. Клетки инкубировали в чашках Петри во влажной среде, содержащей 5% CO₂, при температуре 37 °С. Для культивирования клеток использовалась среда RPMI-1640 (Панэко, Россия), содержащая 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и 5% антибиотика (пенициллин, стрептомицин) (Панэко, Россия). Перед обработкой опухолевые клетки были посажены в чашки Петри площадью 9,2 см² в количестве 150 тыс. клеток и инкубировались не менее 24 часов.

Схема экспериментальной установки для получения низкотемпературной плазменной струи приведена на рисунке 1.

Плазменная струя формируется на основе импульсного электрического разряда, поддерживаемого в потоке воздуха. Разряд зажигается в электродной системе, состоящей из кварцевой трубки 1 (внутренний диаметр 10 мм, толщина стенки около 1 мм), внутри которой размещен спиралевидный электрод 2 из нержавеющей стали (диаметр проволоки 0,5 мм, диаметр витка 5 мм, длина намотки 25 мм). Внешний (заземленный) электрод 3 выполнен в виде цилиндра из алюминиевой фольги толщиной 9 мкм и длиной 40 мм, плотно прилегающего к внешней стенке трубки 1. Изогнутое сопло 4 изготовлено из силиконовой трубки внутренним диаметром 12 мм и длиной 30 см. Поток воздуха с величиной массового расхода до 0.05 г/с и относительной влажностью от 30 до 40% способствует формированию плазменной струи и обеспечивает перенос активных частиц из области плазмы разряда через сопло 4 на обрабатываемый образец 5. Поскольку область плазмы разряда расположена на значительном расстоянии от выходного отверстия сопла, на выходе из системы отсутствуют электрические поля,

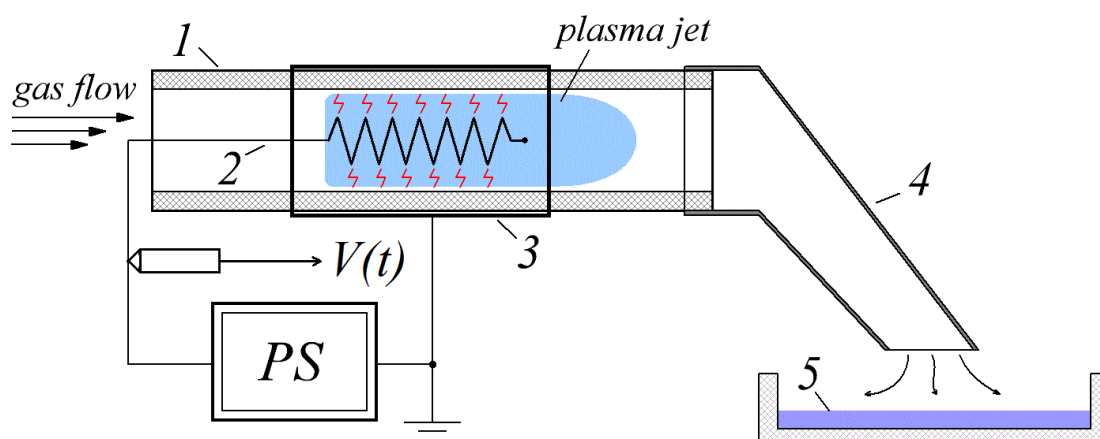


Рисунок 1. Упрощенная схема экспериментальной установки для обработки клеток низкотемпературной плазменной струей при атмосферном давлении

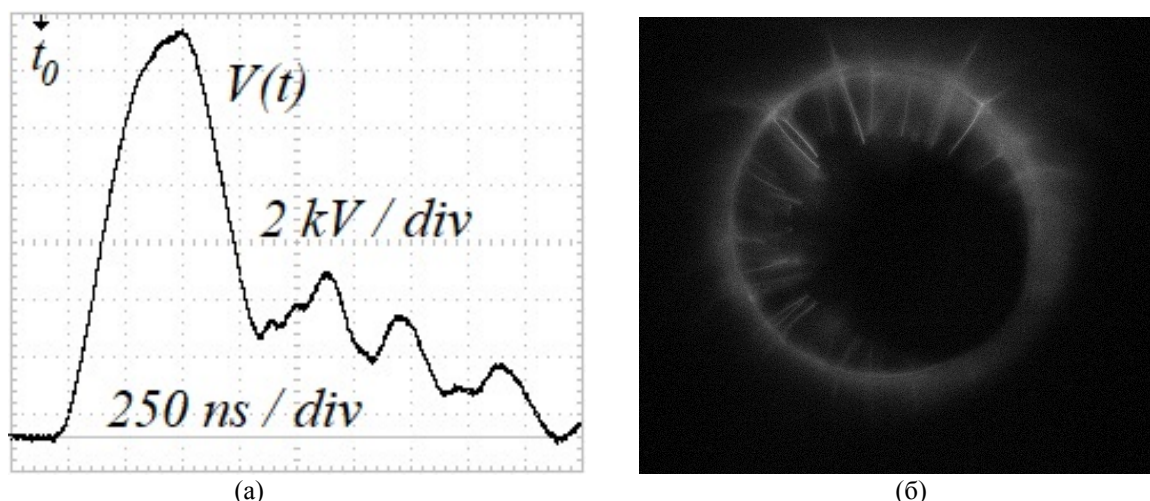


Рисунок 2. Осциллограмма импульса напряжения $V(t)$ на внутреннем электроде (а), совместно с картиной свечения разряда (б). Момент времени t_0 соответствует началу экспозиции CCD-камеры

ультрафиолетовое излучение. Обработка производится, в основном, химически активными соединениями и метастабильными частицами, имеющими значительное время жизни, превышающее 1 с. В предварительных экспериментах с помощью газоанализаторов ПЭМ-2М и Циклон-5 исследовался состав газа в струе на выходе из системы. Выявлено, что в состав газа в струе входят озон в концентрации до $0,5 \text{ г/м}^3$, пероксид водорода и оксиды азота в малых количествах. Несмотря на относительно низкую концентрацию, эти соединения обладают высокой реакционной способностью и могут изменять физиологическое состояние клеток [22].

Источник питания PS обеспечивает зажигание и поддержание разряда в потоке воздуха. На рисунке 2(а) приведена типичная осциллограмма импульса напряжения положительной полярности на газоразрядном промежутке $V(t)$, полученная с помощью высоковольтного пробника Tektronix P6015A и осциллографа Tektronix TDS1012B. На рисунке 2(б) показано фото свечения разряда, полученное с помощью быстродействующей CCD-камеры SensiCam 12bit.

Из осциллограммы на рис.2(а) видно, что на потенциальном электроде 2 формируется импульс напряжения амплитудой до 15 кВ с временем переднего фронта менее 300 нс и активной длительностью импульса на уровне 800 нс. Частота следования импульсов регулируется в диапазоне от 500 Гц до 4,2 кГц. Емкость диэлектрического барьера, находящегося в газоразрядном промежутке, ограничивает поступление энергии в плазму. Таким образом, при емкости барьера 5.6 пФ, максимальной частоте следования импульсов напряжения 4,2 кГц и амплитуде напряжения 15 кВ, уровень электрической мощности, вводимой в плазму разряда, оценивается на уровне 3 Вт. При вариации частоты следования импульсов напряжения изменяется, соответственно, мощность, вводимая в плазму разряда, что влияет на температуру газа на выходе из трубки 1. При максимальной частоте следования импульсов напряжения и указанной величине массового расхода воздуха температура газа в струе не превышала 45 °С непосредственно на торце трубки 1. Температура газа измерялась с помощью термопары и цифрового термометра TM-902C. В ходе эксперимента температура газа в струе на выходе из сопла 4 не превышала 38 °С.

На изображении, приведенном на рисунке 2(б), видно, что картина свечения представлена серией микроразрядов, протекающих в промежутке между спиральным электродом и внутренней поверхностью трубки 1. Камера располагалась под небольшим углом относительно оси газоразрядной системы. За время экспозиции 30 мкс развивается большое количество микроразрядов с контрагированным столбом плазмы, заполняющих объем газоразрядного промежутка. В связи с импульсным характером процесса, газоразрядные явления в промежутке можно классифицировать как совокупность большого количества искровых разрядов, в которых длительность импульса тока и суммарная энергия в импульсе ограничивается емкостью диэлектрического барьера. Кроме того, при повышенной частоте следования импульсов возможно протекание тока через остаточную плазму предшествующих разрядов.

В ходе работы изучался эффект воздействия низкотемпературной плазменной струи на опухолевые клетки линии HeLa как в различных режимах работы источника плазмы, так и при различных режимах обработки клеточной культуры. Для поиска оптимальных условий варьировались следующие параметры: частота следования импульсов напряжения (0,5-4,2 кГц), время экспозиции (от 30 до 240 с), количество повторов обработки (одно-, дву- и четырехкратное), время между повторами обработки (10 минут, 24 часа, 72 часа).

Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста на 1-е и 5-е сутки после воздействия низкотемпературной плазмы. Анализ основан на измерении метаболической активности клеток [23]. К клеткам добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид тетразолий (МТТ) в конечной концентрации 5 мг/мл, затем клетки инкубировали в течение 4 часов. В течение этого времени метаболически активные клетки восстанавливают соли тетразолия (МТТ) до фиолетовых формазановых соединений, которые нерастворимы в воде и осаждаются в клетках. После инкубации супернатант удаляли, а осадок растворяли

диметилсульфоксидом (ДМСО). Затем измеряли оптическую плотность полученных растворов с помощью спектрофотометра (Thermo Scientific Multiskan FC, США) на длине волны 620 нм. Пролиферативная активность клеток выражена в виде индекса ингибирования I , который рассчитывается по формуле:

$$I = \frac{A-B}{A} * 100\%,$$

где A – значение оптической плотности в группе контроля; B – значение оптической плотности в опытной группе.

В качестве контроля во всех экспериментах использовались культуры клеток, подвергавшиеся всем аналогичным манипуляциям, что и обработанные плазмой, за исключением самого фактора воздействия. Полученные результаты подвергали статистической обработке, при которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателя, его стандартное отклонение (при уровне значимости $p < 0,05$). Значимость различий определялась с помощью непараметрического критерия Уилкоксона. Все статистические процедуры были проведены с помощью программного обеспечения Statistica 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам экспериментов было показано, что воздействие струей низкотемпературной плазмы атмосферного давления приводит к ингибированию пролиферативной активности клеток HeLa. При изменении режимов воздействия параметров установки были получены зависимости клеточной пролиферации от частоты, времени экспозиции и количества повторов обработки клеток (рис. 3-5).

Для установления частотной зависимости ингибирования пролиферативной активности опухолевых клеток был проведен эксперимент с варьированием частот повторения импульсов напряжения в диапазоне от 0,5 до 4,2 кГц (рис. 3).

В соответствии с результатами измерений, при повышении частоты следования импульсов увеличивается концентрация активных частиц и озона на выходе из системы. Однако, после достижения определенной концентрации дальнейшее ее повышение не оказывает значимого эффекта на пролиферацию клеток. Было установлено, что наибольшее снижение клеточного роста наблюдается в группе с частотой 2 кГц и временем экспозиции 240 с. Ингибирование пролиферативной активности опухолевых клеток HeLa в данной группе составило 49% на 1-е сутки после воздействия низкотемпературной плазмой.

В ходе поиска оптимального времени экспозиции были проведены опыты с различным временем обработки от 30 до 240 с (рис. 4).

Из результатов эксперимента следует, что время воздействия плазмой влияет на клеточный ответ. Максимальное значение индекса ингибирования пролиферации (более 40%) наблюдалось в группах с временем воздействия 180 и 240 с. Однако, с увеличением времени воздействия в два раза (от 120 до 240 секунд) статистически значимых различий между группами практически не наблюдалось. Поэтому для дальнейшего исследования время экспозиции 120 с было определено как оптимальное.

Дополнительно были проведены исследования с повторной обработкой опухолевых клеток в выбранном режиме работы источника плазмы (рис. 5).

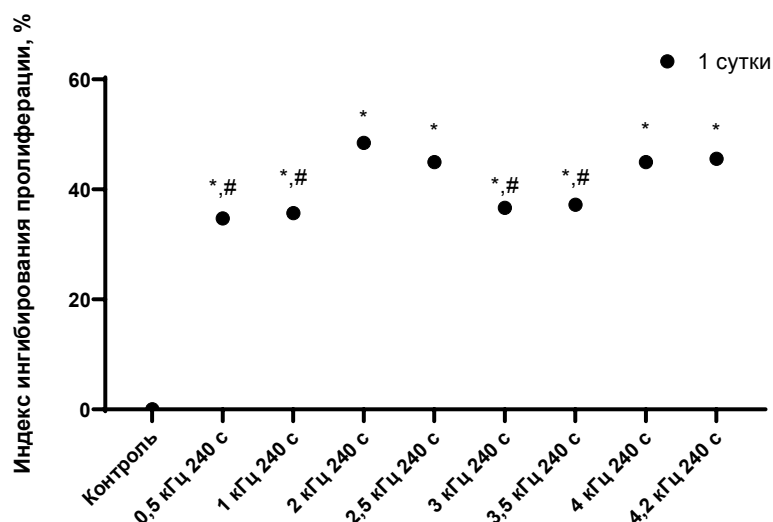


Рисунок 3. Индекс ингибирования пролиферативной активности клеток HeLa на 1-е сутки после воздействия плазменной струи атмосферного давления с разными частотами разряда. Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; # – 2 кГц 240 с

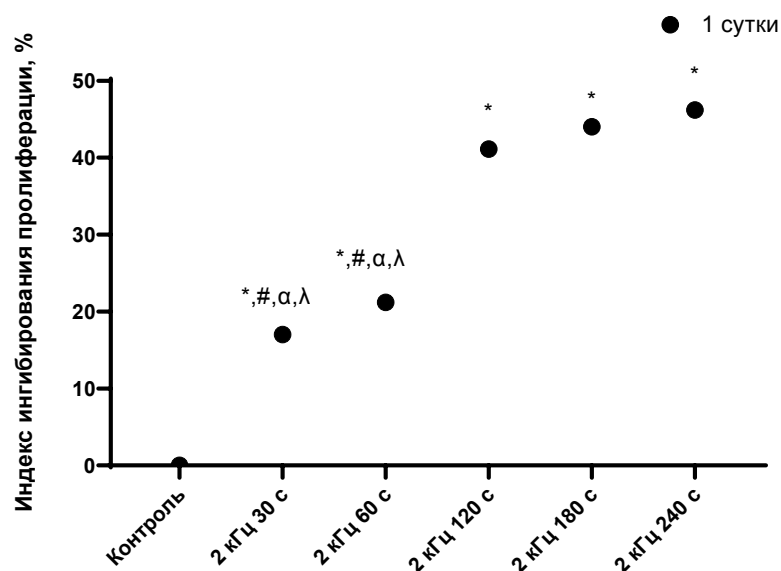


Рисунок 4. Индекс ингибирования пролиферативной активности клеток HeLa на 1-е сутки после воздействия плазменной струи атмосферного давления с разным временем экспозиции. Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; # – 2 кГц 120 с; α – 2 кГц 180 с; λ – 2 кГц 240 с

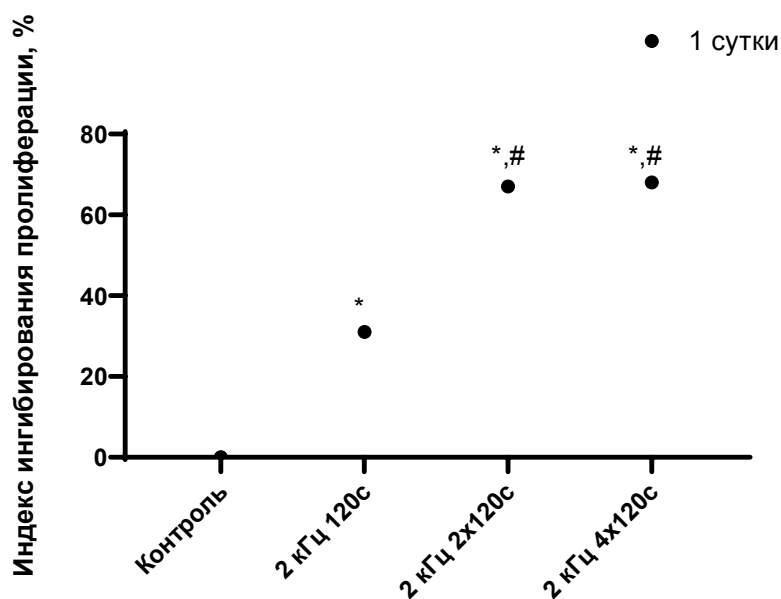


Рисунок 5. Индекс ингибирования пролиферативной активности клеток HeLa на 1-е сутки после воздействия плазменной струи атмосферного давления с разным количеством повторов обработки. Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; # – 2 кГц 120 с

В ходе работы показано, что двукратная обработка клеток HeLa приводит к большему снижению пролиферативной активности, чем однократная. Однако, при четырехкратном воздействии плазмой не было обнаружено увеличения исследуемого показателя, что может быть связано с насыщением химически активными частицами объема обрабатываемой среды. Таким образом, на 1-е сутки индекс ингибирования пролиферации 68% достигается при двукратной обработке с повторением через 10 минут. Дальнейшее повышение кратности повторения обработки не оказывает видимого влияния на пролиферативную активность клеток HeLa.

Далее было проведено исследование по влиянию времени между первой и повторной обработкой на ингибирование клеточной пролиферации (рис. 6). Обработка плазменной струей осуществлялась с повторением через 10 минут, 24 часа и 72 часа после первой обработки.

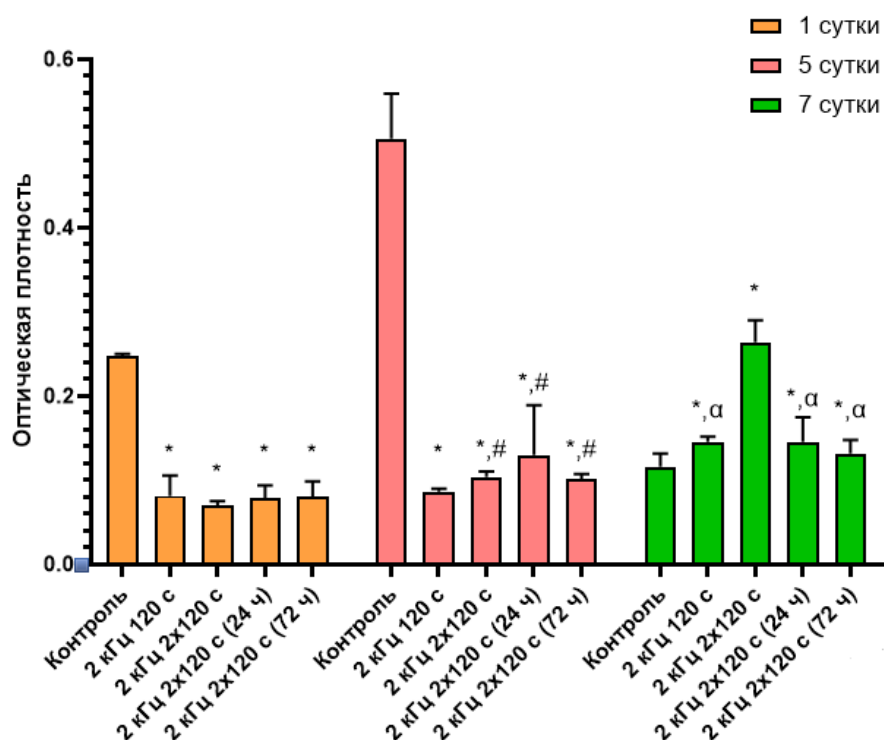


Рисунок 6. Пролиферативная активность клеток HeLa на 1-е, 5-е и 7-е сутки после воздействия плазменной струи атмосферного давления с разными параметрами обработки. Примечание: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; # – 2 кГц 120 с

Выявлено, что изменение времени между повторами слабо влияет на пролиферативную активность. Более того, на 5-е сутки после воздействия плазмой наблюдались статистически значимые различия между группами с двукратной и однократной обработкой. Однако, максимальное значение ингибирования пролиферативной активности опухолевых клеток было обнаружено в группе с однократным воздействием (2 кГц 120 с) и достигало 85%. Следует отметить, что пролиферативная активность в опытных группах практически не отличается на 1-е и 5-е сутки после плазменной обработки, что свидетельствует о её остановке или прекращении. Кроме того, в ходе эксперимента было обнаружено снижение пролиферативной активности опухолевых клеток к 7-м суткам в контрольной группе, что связано с недостатком питательных веществ, поскольку в течение всего времени не производилась смена среды.

Таким образом, в ходе работы было показано, что обработка плазменными струями при атмосферном давлении при времени воздействия в диапазоне от 30 до 240 секунд и различной кратности воздействия плазмой может ингибировать пролиферативную активность опухолевых клеток человека *in vitro*. Ингибирование пролиферативной активности клеток HeLa было максимальным после однократного воздействия с частотой 2 кГц и длительностью воздействия 120 с и наиболее выражено на 5-е сутки после обработки. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о высоком потенциале использования низкотемпературной плазмы как противоопухолевого агента.

Список литературы / References:

1. *Новости онкологии*: [Электронный ресурс]. URL: <http://www.oncology.ru/news/2019/10/14/> (Дата обращения: 10.02.2021). [*Oncology news* (In Russ.)]
2. Park G.Y., Park S.J., Choi M.Y., Koo I.G., Buyn J.H., Hong J.H., Sim J.Y., Collins G.J., Lee J.K. Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications. *Plasma Sources Sci Technol.*, 2012, vol. 21, no. 4, p. 043001. doi: 10.1088/0963-0252/21/4/043001
3. Korolev Y.D., Frants O.B., Landl N.V., Geyman V.G., Matveev I.B. Nonsteady-state gas-discharge processes in plasmatron for combustion sustaining and hydrocarbon decomposition. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 2009, vol. 37. doi: 10.1088/2399-6528/ab361a
4. Lu X., Naidis G.V., Laroussi M., Reuter S., Graves D.B., Ostrikov K. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects. *Physics Reports*, 2016, vol. 630, no. 1. doi: 10.1016/j.physrep.2016.03.003
5. Laroussi M. Low-temperature plasma jet for biomedical applications: a review. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 2015, vol. 43, no. 703. doi: 10.1109/TPS.2015.2403307

6. Dayun Y., Haijie X., Wei Z., Niki N., Lijie Grace Z., Ka B., Keidar M. The role of aquaporins in the anti-glioblastoma capacity of the cold plasma-stimulated medium. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2017, vol. 50, no. 055401. doi: 10.1088/1361-6463/aa53d6
7. Isbary G., Koritzer J., Mitra A. et al. Ex vivo human skin experiments for the evaluation of safety of new cold atmospheric plasma devices. *Clinical Plasma Medicine*, 2013, vol. 1. doi: 10.1016/J.CPME.2012.10.001
8. Graves D.B. Low temperature plasma biomedicine: A tutorial review. *Phys. Plasmas*, 2014, vol. 21. doi: 10.1063/1.4892534
9. Akishev Y.S. Non-thermal plasma at atmospheric pressure and its opportunities for applications. *Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved., Khim. Tekhnol.*, 2019, vol. 62, no. 26. doi: 10.6060/ivkkt.20196208.5908
10. Zimu Xu., Yan Lan, Jie Ma, Jie Shen et.al. Applications of atmospheric pressure plasma in microbial inactivation and cancer therapy: a brief review. *Plasma Sci. Technol.*, 2020, vol. 22. doi: 10.1088/2058-6272/ab9ddd
11. Hirst A.M., Frame F.M., Arya M., Maitland N.J., O'Connell D. Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. *Tumor Biology*, 2016, vol. 37. doi: 10.1007/s13277-016-4911-7
12. Schneider C., Arndt S., Zimmermann J.L., Li Y. et al. Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells. *Biological Chemistry*, 2018. doi: 10.1515/hsz-2018-0193
13. Keidar M., Walk R., Shashurin A., Srinivasan P., Sandler A., Dasgupta S., Ravi R., Guerrero-Preston R., Trink B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British journal of cancer*, 2011, vol. 105, no. 9. doi: 10.1038/bjc.2011.386
14. Utsumi F., Kajiyama H., Nakamura K., Tanaka H. et al. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PloS one*, 2013, vol. 8, no. 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0081576
15. Tanaka H., Mizuno M., Katsumata Y., Ishikawa K., Kondo H. et al. Oxidative stress-dependent and -independent death of glioblastoma cells induced by non-thermal plasma-exposed solutions. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9. doi: 10.1371/journal.pone.0247589
16. Miller V., Lin A., Fridman A. Why Target Immune Cells for Plasma Treatment of Cancer. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2016, vol. 36. doi: 10.1007/s11090-015-9676-z.
17. Fridman A. *Plasma Chemistry* (Cambridge University Press, New York), 2008.
18. Yan D., Sherman J.H., Cheng X., Ratovitski E., Canady J., Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Applied Physics Letters*, 2014, vol. 105, no. 22. doi: 10.1063/1.4902875
19. Ishaq M., Han Z.J., Kumar S., Evans M.D., Ostrikov K. Atmospheric-pressure plasma- and TRAIL-induced apoptosis in TRAIL-resistant colorectal cancer cells. *Plasma Processes and Polymers*, 2015, vol. 12, no. 6. doi: 10.1002/ppap.201400207
20. Gamaleev V., Iwata N., Ito G., Hori M., Hiramatsu M., M. Ito. Scalable treatment of flowing organic liquids using ambient-air glow discharge for agricultural applications. *Appl. Sci.*, 2020, vol. 10. doi: 10.3390/app10030801
21. Kawasaki T., Mitsugi F., Koga K., Shiratani M. Local supply of reactive oxygen species into a tissue model by atmospheric-pressure plasma-jet exposure. *J. Appl. Phys.*, 2019, vol. 125. doi: 10.1063/1.5091740
22. Korolev Y.D., Frants O.B., Landl N.V., Kasyanov V.S., Galanov S.I., Sidorova O.I., Kim Y., Rosocha L.A., Matveev I.B. Propane oxidation in a plasma torch of a low-current nonsteady-state plasmatron. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 2012, vol. 40. doi: 10.1109/TPS.2011.2176557
23. Tolosa L., Donato M.T., Gomez-Lechon M.J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay Protocols in In Vitro Hepatocyte Research. *Methods Mol Biol*, 2015, vol. 1250. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26

EFFECT OF LOW-TEMPERATURE PLASMA JETS ON TUMOR CELL PROLIFERATION

Evtina A.A.^{1,3}, Buldakov M.A.³, Nekhoroshev V.O.², Landl N.V.², Cherdyntseva N.V.^{1,3},
Korolev Y.D.²¹ National research Tomsk state university
Tomsk, Russia² Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
Tomsk, Russia; e-mail: anastasiya10152@gmail.com³ Institute of High Current Electronics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
Tomsk, Russia

Abstract. The existing literature demonstrates the presence of antitumor effect of low-temperature plasma both in vitro on different cell lines and in vivo. This area has been intensively studied recently, however, research is complicated due to the large variety of research objects and insufficient knowledge of plasma jets. In this paper, the effect of a low-temperature plasma jet on the proliferation of HeLa tumor cells was studied. Results of experiments in different modes of cell culture processing and with variations in the parameters of the plasma source were presented. Low-temperature plasma jets were obtained using of a pulsed electric discharge sustained in the air flow at atmospheric pressure. In order to find optimal conditions, the repetition frequency of voltage pulses from 0.5 to 4.2 kHz, the exposure time from 30 to 240 s, the number of processing repetitions and the duration of the pause between repetitions (10 minutes, 24 hours, 72 hours) were varied. It was shown that this type of physical impact is able to suppress the growth of tumor cells up to 85% compared to the control group. This effect depends both on the repetition frequency of the discharge current pulses and on the time of exposure. The obtained data show the prospects of using low-temperature plasma jets to suppress the tumor cells proliferation.

Key words: low-temperature plasma, discharge in a gas stream, plasma jet, oncology, proliferation, HeLa.

СТРУКТУРА И КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ ИЗОМЕРОВ ДИГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ. ТЕОРИЯ, ЭКСПЕРИМЕНТ

Финашкин Д.С., Бабков Л.М.

Саратовский государственный университет

ул. Астраханская, 83, г. Саратов, 410012, РФ; e-mail: denis.finashkin@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. В данной работе методом теории функционала плотности B3LYP/6-31G(d) с помощью программного комплекса GAUSSIAN проведено моделирование структуры и колебательных спектров изомеров дигидроксибензойной кислоты и их димеров: рассчитаны минимальная энергия, геометрическая структура, составляющие дипольного момента, частоты нормальных колебаний, их интенсивности в ИК спектре. Результаты моделирования указывают на сильное влияние на ИК спектры изомеров межмолекулярных водородных связей, проявляющихся в аномальном уширении полос и увеличении интенсивности в измеренных ИК спектрах в области выше 3000 см⁻¹. Водородная связь отнесена к среднему типу. Установлено, что в этой же области ИК спектров некоторых изомеров ДГОВК проявляются внутримолекулярные водородные связи. На основе полученных в ходе моделирования результатов идентифицированы различные изомеры ДГОВК и интерпретированы их ИК спектры.

Ключевые слова: дигидроксибензойная кислота, ДГОВК, моделирование, метод теории функционала плотности, ИК спектр, колебательный спектр, частота, интенсивность.

Дигидроксибензойные кислоты (ДГОВК) являются подклассом гидроксибензойных кислот, обладающих двумя гидроксильными группами, относительное положение которых определяет свойства молекул. Существует 6 структурных изомеров ДГОВК, которые различаются положением ОН-групп: 2,3-ДГОВК (пирокатеховая кислота), 2,4-ДГОВК (β-резорциловая кислота), 2,5-ДГОВК (гентиизиновая кислота), 2,6-ДГОВК (γ-резорциловая кислота), 3,4-ДГОВК (протокатеховая кислота), 3,5-ДГОВК (α-резорциловая кислота). Структура молекул ДГОВК схематично представлена на рисунке 1. Данные кислоты имеют широкое применение в различных областях: от пищевой сферы и косметической промышленности до производства пластмасс и фармации, поэтому так важно знать свойства различных изомеров этой кислоты и уметь предугадывать их исходя из результатов компьютерного моделирования.

В природе в обычных условиях эти кислоты, как и многие другие представители класса карбоновых кислот, существуют в виде димеров, образованных межмолекулярными водородными связями [2]. В таких Н-комплексах карбоксильные группы двух мономеров соединены в плоское димерное кольцо, являющееся их спектрально-структурным признаком. С учётом сказанного целесообразно построение структурно-динамических моделей как изолированных молекул ДГОВК, так и их Н-комплексов, представленных димерами.

Моделирование проводилось на основе метода теории функционала плотности (ТФП), реализованного в программных комплексах GAUSSIAN [3]. В расчётах использовался функционал плотности B3LYP, и базис 6-31G(d) [4,5]. Рассчитаны основные параметры молекул: минимизированные энергии, оптимизированные геометрии, дипольные моменты, колебательные спектры, интенсивности в инфракрасном (ИК) спектре. Измеренные в результате эксперимента спектры были взяты из базы данных спектров органических веществ, принадлежащей японскому Национальному институту передовой науки и технологии (английская аббревиатура – «AIST») [6].

На рисунке 2 приведено строение ядер Н-комплексов изомеров ДГОВК, образованных в результате объединения молекул в димеры за счёт обобществления протонов карбоксильных групп, и указаны их рассчитанные геометрические параметры. Из рисунка видно, что углы О-Н-О, образованные посредством внешних водородных связей, несильно различаются, находясь в диапазоне 177,5° ± 1°, то есть с расхождением в ~0,56%. В то же время длины связей О-Н различаются немного значительнее – диапазон значений находится в области 1,688 ± 0,016 Å, а расхождение равно ~0,95%.

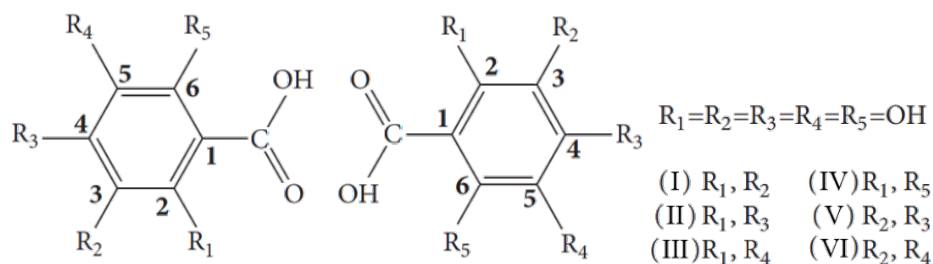


Рисунок 1. Структурные формулы димеров ДГОВК (I, II, III, IV, V и VI) с указанием атомной маркировки и их тривиальных названий [1]

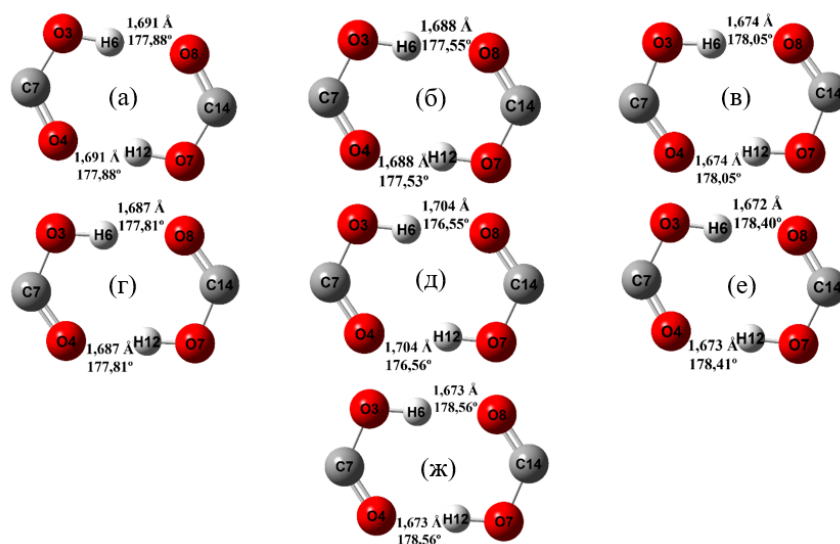


Рисунок 2. Геометрические параметры димерного кольца Н-комплексов ДГОБК: а) 2,3-ДГОБК; б) 2,4-ДГОБК; в) 2,5-ДГОБК; г) 2,5-ДГОБК' (конформер); д) 2,6-ДГОБК; е) 3,4-ДГОБК; ж) 3,5-ДГОБК

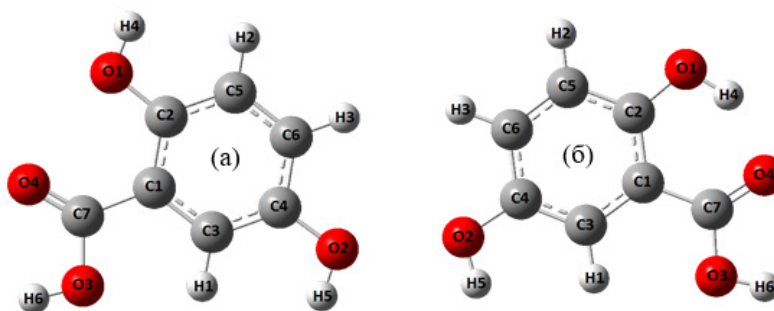


Рисунок 3. Структуры молекул 2,5-ДГОБК (а) и 2,5-ДГОБК' (б)

Дополнительно проведено моделирование структуры и ИК спектра димера конформера 2,5-ДГОБК', отличающегося от конформера 2,5-ДГОБК поворотом связи O1-H4 по направлению к атому кислорода O4 (помечен штрихом ') и образованием внутренней водородной связи, что ярко проявляется в спектре в области выше 3000 см⁻¹. Структуры конформеров 2,5-ДГОБК и 2,5-ДГОБК' показаны на рисунке 3.

Дипольные моменты и минимизированные энергии димеров ДГОБК приведены в таблице 1. С помощью процедуры масштабирования рассчитанных частот, широко используемой в мировой практике, см., например, [7-9], минимизированы расхождения между измеренными и рассчитанными частотами, обусловленные ограниченностью гармонического приближения. В диапазоне от 3000 см⁻¹ и выше рассчитанные частоты колебаний превышают измеренные на 150-200 см⁻¹, и масштабирующий множитель для этой области равен 0,95. Масштабирование рассчитанных частот позволило устранить обусловленную гармоническим приближением систематическую ошибку и неявно учесть механический ангармонизм. Использование масштабирования признано целесообразным в мировом научном сообществе: оно делает удобным сравнение и анализ измеренного и рассчитанного спектров, с целью интерпретации спектров соединений, в частности спектров гомологических рядов каких-либо соединений или рядов их замещённых.

Таблица 1. Дипольные моменты и энергии димеров ДГОБК

Димер	d _x , Дебая	d _y , Дебая	d _z , Дебая	d _{total} , Дебая	Е, Хартри
2,3-ДГОБК	0,0012	-0,0001	0,0006	0,0013	-1142,56595091
2,4-ДГОБК	0,0035	-0,0003	-0,0008	0,0036	-1142,57065622
2,5-ДГОБК	0,0004	-0,0006	-0,0001	0,0007	-1142,52202446
2,5-ДГОБК'	0,0005	0,0001	-0,0001	0,0005	-1142,55719452
2,6-ДГОБК	-0,0010	-0,0001	0,0004	0,0011	-1142,55081695
3,4-ДГОБК	0,0012	0,0001	0,0008	0,0014	-1142,54440461
3,5-ДГОБК	0,0007	-0,0001	0,0001	0,0007	-1142,54047583

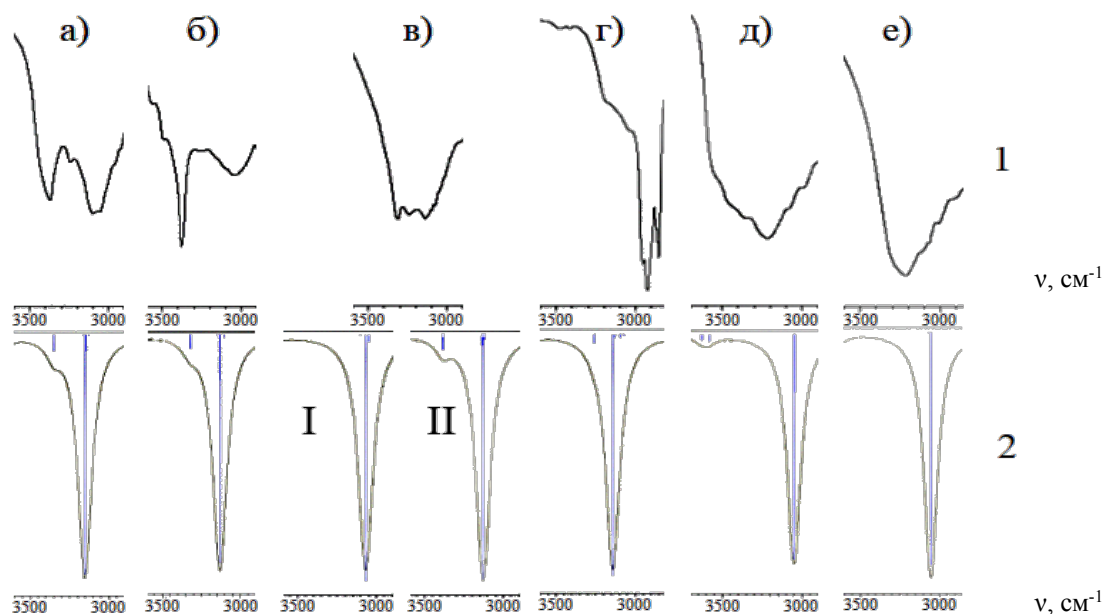


Рисунок 4. Экспериментальные (1) и рассчитанные (2) интенсивности в ИК спектре димеров ДГОВК в области от ~ 2900 до ~ 3600 см^{-1} : а) 2,3-ДГОВК; б) 2,4-ДГОВК; в) 2,5-ДГОВК (I) и 2,5-ДГОВК' (II); г) 2,6-ДГОВК; д) 3,4-ДГОВК; е) 3,5-ДГОВК

Проявление влияния положения ОН-групп в спектрах изомеров ДГОВК очевидно и весьма ощутимо. На рисунке 4 показаны экспериментальные и рассчитанные интенсивности в ИК спектре димеров ДГОВК в области от ~ 2900 до ~ 3600 см^{-1} , где проявляются валентные колебания ОН-связей.

Результаты моделирования явно показывают сильное влияние на ИК спектр образовавшихся в димерном кольце межмолекулярных водородных связей Н6--О8 и Н12--О4, проявляющихся в аномальном уширении полос и увеличении интенсивности от 4888 км/моль в димере 3,4-ДГОВК до 6071 км/моль в димере 2,6-ДГОВК. Частоты колебаний ОН-связей димеров молекул ДГОВК отличаются друг от друга незначительно, находясь в диапазоне 3050 ± 35 см^{-1} . На формирование структуры полос измеренных ИК спектров в данной области влияют и внутренние водородные связи Н4--О4. Их наличие проявляется в спектрах димеров 2,3-, 2,4-, 2,6-ДГОВК и 2,5-ДГОВК' менее широкими полосами по сравнению с полосами, обусловленными внешними ОН-связями, но тоже довольно заметными по интенсивности – от 226 км/моль у 2,6-ДГОВК до 421 км/моль у 2,3-ДГОВК.

Сравнение других областей колебательных спектров димеров ДГОВК (рис. 5) показывают незначительные различия в их интенсивностях, однако стоит отметить, что положение гидроксильных групп относительно фенильного кольца всё же влияет на расположение полос интенсивности в ИК спектре. Так, к примеру, частоты, соответствующие неплоским деформационным колебаниям выхода связей ОН из плоскости гидроксильного кольца (ядра Н-комплекса), не имеют чётко определённого места в спектральной картине и отличаются в различных группах молекул: в соединениях с наличием внутренней водородной связи (2,3-, 2,4-, 2,6-ДГОВК и 2,5-ДГОВК') частоты, отвечающие за оба колебания, находятся в диапазонах 874 ± 6 см^{-1} для разнонаправленных движений связей и 929 ± 5 см^{-1} для сонаправленного движения соответственно, в то время как у димеров, не содержащих внутренних водородных связей, наблюдается смещение данных полос в более высокочастотную область, а именно: 915 ± 5 см^{-1} – для разнонаправленного движения и 964 ± 5 см^{-1} – для сонаправленного движения. Одновременно с этим частоты, соответствующие неплоским деформационным колебаниям выхода связей ОН из плоскости фенильных колец, подвержены большей вариативности при рассмотрении спектров молекул – у большинства молекул данные колебания лежат в области 405 ± 30 см^{-1} (для обоих видов движения – сонаправленного и разнонаправленного), в то время как у конформера 2,5-ДГОВК' соответствующие колебания лежат в более высокочастотной области: 713 см^{-1} – для разнонаправленного движения связей и 714 см^{-1} – для сонаправленного движения.

Исходя из результатов проведенного моделирования, дана интерпретация измеренных ИК спектров изомеров ДГОВК, на основе анализа измеренных и рассчитанных ИК спектров. установлена связь "спектр-структура", позволяющая идентифицировать различные изомеры ДГОВК.

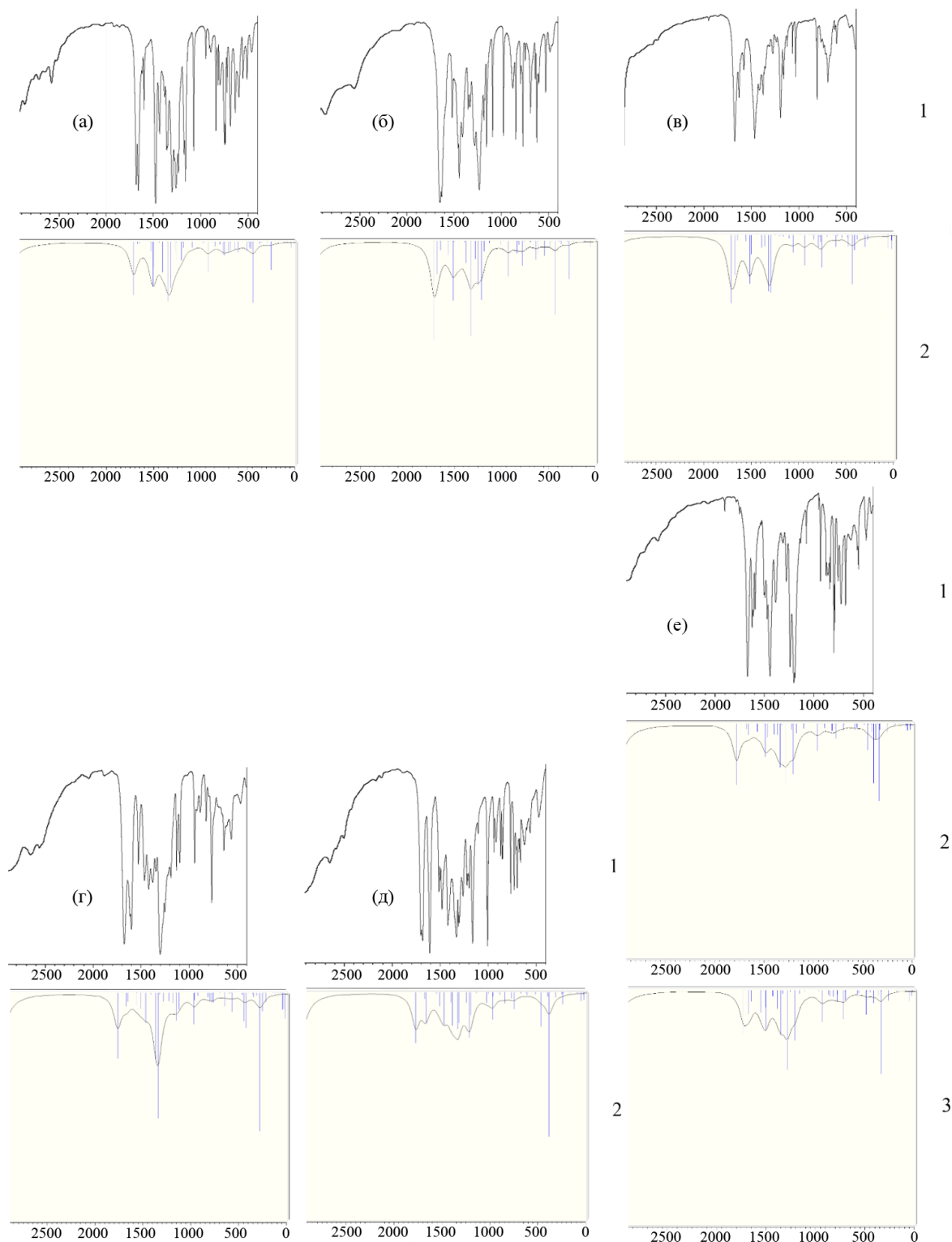


Рисунок 5. Экспериментальные (1) и рассчитанные (2,3) интенсивности в ИК спектре димеров ДГОВБ в области от 0 до ~ 2900 см^{-1} : а) 2,3-ДГОВБ; б) 2,4-ДГОВБ; в) 2,6-ДГОВБ; г) 3,4-ДГОВБ; д) 3,5-ДГОВБ; е) 2,5-ДГОВБ (2) и 2,5-ДГОВБ' (3)

Список литературы / References:

1. Milenkovic D., Dorovic J., Jeremic S., Dimitric Markovic J.M., Avdovic E.H., Markovic Z. Free Radical Scavenging Potency of Dihydroxybenzoic Acids. *Journal of Chemistry*, 2017.
2. Бабков Л.М., Пучковская Г.А., Макаренко С.П. Гаврилко Г.А. *ИК спектроскопия молекулярных кристаллов с водородными связями*. Киев: Наукова думка, 1989, 160 с. [Babkov L.M., Puchkovskaya G.A., Makarenko S.P. Gavrilkov G.A. *IR spectroscopy of molecular crystals with hydrogen bonds*. Kiev: Naukova Dumka, 1989, 160 p. (In Russ.)]

3. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R. et al. *Gaussian03, Revision B.03*, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003, 302 p.
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, т. 172, № 3, с. 349-356. [Popl J.A. Quantum chemical models. *UFN*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 349-356. (In Russ.)]
6. AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. Обращение к ресурсу 26.04.2020.
7. Yoshida H., Ehara A., Matsuura H. Density functional vibrational analysis using wave number-linear scale factors. *Chem. Phys. Lett.*, 2000, vol. 325, no. 4, pp. 477-483.
8. Yoshida H., Takeda K., Okamura J., Ehara A., Matsuura H. New Approach to Vibrational Analysis of Large Molecules by Density Functional Theory: Wavenumber-Linear Scaling Method. *J. Phys.Chem. A.*, 2002, vol. 106, no. 14, pp. 3580-3586.
9. Березин К.В., Нечаев В.В., Кривохижина Т.В. Применение метода линейного масштабирования частот в расчетах нормальных колебаний многоатомных молекул. *Оптика и спектр*, 2003, т. 94, № 3, с. 398-401. [Berezin K.B., Nechaev V.B., Krivokhizhina T.B. Application of the method of linear scaling of frequencies in calculations of normal vibrations of polyatomic molecules. *Optics and Spectrum*, 2003, vol. 94, no. 3, pp. 398-401. (In Russ.)]

STRUCTURE AND VIBRATIONAL SPECTRA OF DIHYDROXYBENZOIC ACID ISOMERS.

THEORY, EXPERIMENT

Finashkin D.S., Babkov L.M.

Saratov State University

Astrakhanskaya str., 83, Saratov, 410012, Russia; e-mail: denis.finashkin@mail.ru

Abstract. In this paper, the structure and vibrational spectra of dihydroxybenzoic acid isomers and their dimers are modeled using the density functional theory B3LYP/6-31G(d) using the GAUSSIAN software package: the minimum energy, the geometric structure, the components of the dipole moment, the frequencies of normal vibrations, their intensities in the IR spectrum are calculated. The simulation results indicate a strong influence on the IR spectra of the isomers of intermolecular hydrogen bonds, manifested in an anomalous broadening of the bands and an increase in the intensity in the measured IR spectra in the region above 3000 cm⁻¹. The hydrogen bond is assigned to the average type. It is established that intramolecular hydrogen bonds are manifested in the same region of the IR spectra of some isomers of DHBA. Based on the results obtained during the simulation, various isomers of DHBA were identified and their IR spectra were interpreted.

Key words: dihydroxybenzoic acid, DHBA, modeling, density functional theory method, IR spectrum, vibrational spectrum, frequency, intensity.

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ
ГЕМОГЛОБИНА С АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА И АЗОТА**
Грачёв Д.И.^{1,2}, Шумаев К.Б.^{2,3}, Медведева В.А.^{1,2}, Фефлер А.С.¹, Космачевская О.В.³,
Рыуге Э.К.^{1,2}

¹ Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: di.grachev@physics.msu.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России

3-я Черепковская ул., 15А, г. Москва, 121552, РФ

³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ленинский проспект, 33, стр. 2, г. Москва, РФ

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. В данной работе рассмотрено действие активных форм кислорода и азота на комплексы NO с гемоглобином в условиях, моделирующих различные физиологические и патофизиологические состояния. Хорошо известно, что активные формы кислорода, галогенов (гипохлорит), активные формы азота: пероксинитрит, нитрилхлорид и другие свободные радикалы участвуют в воспалительных реакциях и в патогенезе различных заболеваний важнейших систем организма человека и животных. Стабилизированные формы оксида азота (NO), связанного с гемоглобином: комплексы NO с гемовым железом (HbNO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), образующиеся на тиоловых группах цистеиновых остатков гемоглобина (Hb-ДНКЖ) являются важными физиологическими формами оксида азота. Особый интерес для исследования представляет участие подобных комплексов NO в процессах, связанных с окислительным стрессом. Нами было показано, что пероксинитрит и гипохлорит количественно разрушают Hb-ДНКЖ, причём в случае с гипохлоритом не происходит нитрозилирования гемовой группы гемоглобина. Кроме того, показано антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ при взаимодействии с алкоксильным и алкилперекисным радикалами, полученными при добавлении гидропероксида трет-бутила к раствору метгемоглобина, что моделирует перекисное окисление, возникающее при окислительном стрессе. Полученные данные позволяют улучшить понимание роли комплексов оксида азота с гемоглобином в балансе между антиоксидантными и прооксидантными системами в организме.

Ключевые слова: активные формы кислорода и азота, гемоглобин, спектроскопия ЭПР.

ВВЕДЕНИЕ

Комплексы NO с гемовым железом (HbNO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), образующиеся на тиоловых группах цистеиновых остатков гемоглобина (Hb-ДНКЖ) хорошо описаны в различных исследованиях [1,2]. Действие данных комплексов NO в процессах редокс-стресса в организме, во многом, требует дальнейшего изучения.

Активные формы кислорода, галогенов (такие как, например, гипохлорит), активные формы азота (например, пероксинитрит, нитрилхлорид) участвуют в воспалительных реакциях и в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний, хронических воспалительных заболеваний, онкологических заболеваний и нейродегенеративных расстройств [3, 4]. Все эти процессы сопровождаются развитием окислительного и нитрозативного стрессов [5]. Вместе с тем, в биологических системах оксид азота (NO) выступает в качестве как прооксиданта, так и антиоксиданта [6]. Такое двойственное действие NO определяется его реакциями с редокс-активными соединениями, в том числе с другими свободными радикалами, ионами переходных металлов и тиолами.

В результате взаимодействия NO с гемовым и негемовым железом образуются нитрозильные комплексы железа. С этими комплексами связаны сигнальные и регуляторные функции NO [7]. Также, ранее нами было показано, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью [2,6]. В тиолсодержащих мооядерных ДНКЖ ион железа координирован с двумя нитрозильными (NO⁺) и двумя тиольными лигандами (RS⁻) {общая формула: (RS⁻)₂Fe⁺(NO⁺)₂}. Лигандами этих ДНКЖ могут быть низкомолекулярные тиолы и SH-группы цистеиновых остатков белков. С другой стороны, лигандами ДНКЖ могут быть остатки гистидина и анионы фосфата. Считается, что с антиоксидантными свойствами содержащих глутатион комплексов (GS-ДНКЖ) связано их цитопротекторное действие в ходе индуцированного гипохлоритом гемолиза эритроцитов [8], а также в условиях окислительного стресса при ишемическом поражении сердечной ткани [9]. Предположительно, разрушение ДНКЖ при окислительном и нитрозативном стрессе, может быть важным элементом регуляции метаболизма NO, а также влиять на сигнальную функцию этой молекулы.

В настоящей работе было рассмотрено взаимодействие двух вариантов нитрозильных комплексов гемоглобина, а также глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ) с органическими свободными радикалами (алкоксильным, алкилпероксильным) и такими сильными окислителями, как гипохлорит и нитрилхлорид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексы оксида азота (NO) с гемоглобином исследовались методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) на человеческих эритроцитах и в системе с бычьим гемоглобином. Продукция органических радикалов также оценивалась методом спектроскопии ЭПР при помощи спиновой ловушки DERMPO.

В работе использовались реактивы, полученные от Sigma-Aldrich (США) и Cayman Chemical Europe (Эстония). Человеческие эритроциты были получены в клинично-диагностической лаборатории НМИЦ Кардиологии. Эритроциты отмывали центрифугированием в изотоническом растворе 0,9% NaCl при ускорении 1000g в течение 5 мин, затем надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в изотоническом растворе 0,9% NaCl, после чего процедуру повторяли еще два раза. Гемоглобиновые ДНКЖ получали добавлением к раствору метгемоглобина (0,5 мМ) фосфатных ДНКЖ в молярном соотношении 1:2,75.

Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25 °С) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), а также малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП «КБСТ» БГУ (Беларусь). На Varian E-109E СВЧ мощность 10 мВт, частота СВЧ излучения 9,15 ГГц. На ESR 70-03 XD/2 частота СВЧ 9,35 ГГц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В реакционной смеси, которая содержала дезоксигемоглобин, глутатионовые динитрозильные комплексы железа и синтетический донор NO (DEA/NO), был зарегистрирован как сигнал ЭПР ДНКЖ с g-фактором 2,03, так и сигнал нитрозилированного гемового железа (HbNO). Полученный спектр ЭПР представлен на рисунке 1.

Было исследовано действие различных концентраций гипохлорита и нитрилхлорида на гемоглобиновые ДНКЖ, полученные при взаимодействии гемоглобина с нестабильными фосфатными ДНКЖ (ДНКЖ-РО4). Показано, что гипохлорит количественно разрушает Hb-ДНКЖ. Также, в эту реакционную смесь добавляли нитрит натрия с целью получения нитрилхлорида (NO_2Cl). Спектры ЭПР, отражающие кинетику разрушения Hb-ДНКЖ в этих условиях представлены на рисунке 2.

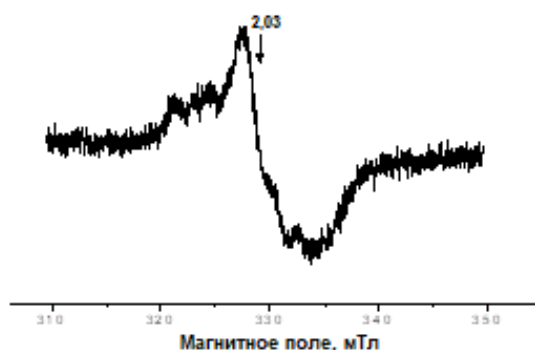


Рисунок 1. Суперпозиция спектров ЭПР HbNO и Hb-ДНКЖ. Исходная реакционная смесь содержала $[\text{Hb}] = 0,5$ мМ, $[\text{DEA/NO}] = 3,2$ мМ, $[\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2] \approx 70$ мМ

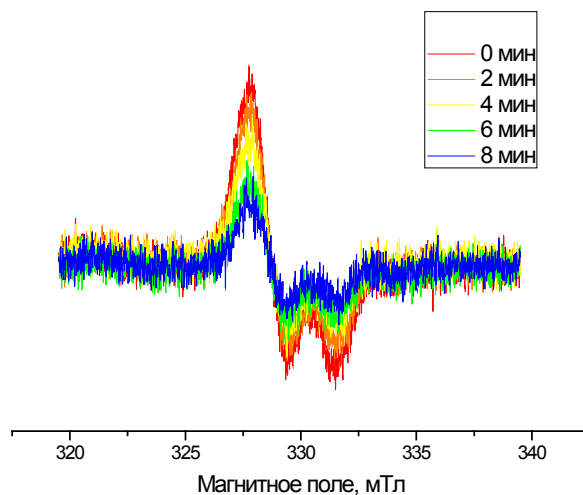


Рисунок 2. Разрушение гемоглобиновых ДНКЖ ($[\text{Hb-ДНКЖ}] = 0,4$ мМ) под действием гипохлорита, $[\text{NaOCl}] = 0,1$ мМ при добавлении нитрита натрия $[\text{NaNO}_2] = 10$ мМ

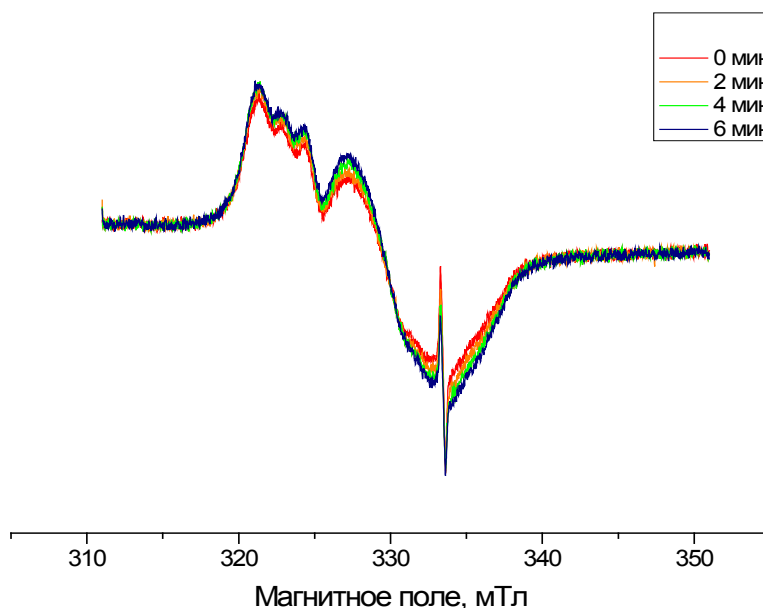
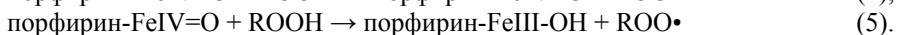
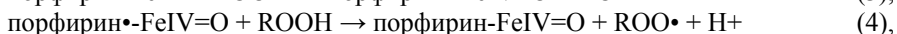
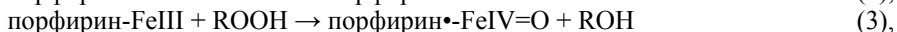
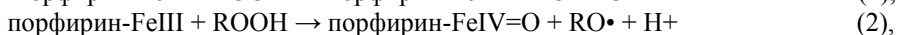
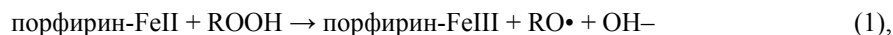


Рисунок 3. Спектры ЭПР HbNO при добавлении гипохлорита (суспензия эритроцитов, $[\text{NaNO}_2] = 10 \text{ mM}$, $[\text{NaOCl}] = 0,1 \text{ mM}$ ($[\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2] \approx 70 \text{ mM}$))

Следовательно, связанные с гемоглобином ДНКЖ могут выступать в качестве перехватчиков активных метаболитов NO. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о взаимодействии различных ДНКЖ с супероксидным радикалом и пероксинитритом [2].

В системе, содержащей эритроциты человека было изучено влияние гипохлорита на образование нитрозилированного гема т.е. комплексов NO с гемовым железом (HbNO). По спектрам ЭПР (рис. 3) можно было судить о постепенном увеличении сигнала HbNO в течение 6 минут после добавления в систему гипохлорита натрия. Представляется вероятным, что в этом случае дитионит ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) восстанавливает нитрит до NO, тогда как гипохлорит вызывает лизис эритроцитов, тем самым облегчая нитрозилирование гемовой группы гемоглобина.

Важную роль в процессах окислительного стресса играют реакции гемопротеинов, в том числе гемоглобина, с различными гидропероксидами. Так, при взаимодействии железа гема с органическими гидропероксидами, например, липидными гидропероксидами, образуются алкоксильные ($\text{RO}\cdot$) и алкилпероксильные радикалы ($\text{ROO}\cdot$) [2,6]:



Другим продуктом этих реакций является такой сильный окислитель, как оксоферрильная форма гема (порфирин-FeIV=O). В условиях окислительного стресса реакции 1-5 приводят к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков и других биополимеров.

Для моделирования взаимодействия гемопротеидов с различными пероксидами в условиях окислительного стресса широко используется гидропероксид трет-бутила (t-BOOH) [10]. Динамика концентрации органических радикалов оценивалась по сигналам ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO (рисунок 4А). Нами было показано, что GS-ДНКЖ, статистически достоверно (значимость результата оценивалась по критерию Манна – Уитни, уровень значимости $P < 0,05$) снижают концентрацию органических радикалов, образующихся при взаимодействии этого гемопротеина с гидропероксидом трет-бутила (рисунок 5А). Следует отметить, что аналогичные результаты были получены ранее в модельной системе, содержащей метмиоглобин и t-BOOH [6]. Нельзя исключить, что обнаруженный антиоксидантный эффект GS-ДНКЖ связан с восстановленным глутатионом (GSH). Глутатион входит в состав GS-ДНКЖ, в виде тиолят аниона (GS^-). Кроме того, избыток глутатиона добавляли в реакционную среду для стабилизации мономерной парамагнитной формы GS-ДНКЖ.

Вместе с тем, Hb-ДНКЖ также эффективно перехватывают свободнорадикальные интермедиаты реакций 1-5 (рис. 4Б и 5Б).

Следовательно, и в системе, моделирующей свободнорадикальное перекисное окисление антиоксидантный эффект ДНКЖ в значительной степени определяется NO-лигандами этих комплексов.

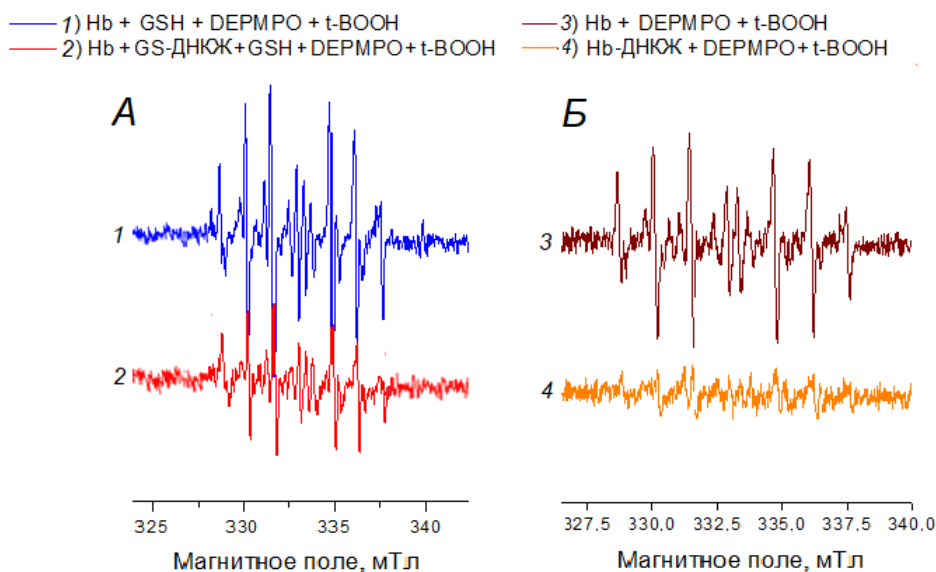


Рисунок 4. Спектры ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO. Панель А: 1) $[Hb] \approx 0,25$ мМ, $[GSH] \approx 2$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,05$ М, $[t-BOOH] \approx 4$ мМ, 2) $[Hb] \approx 0,25$ мМ, $[ДНКЖ-GS] \approx 0,75$ мМ, $[GSH] \approx 2$ мМ, $[DEPMPO] = 0,05$ М, $[t-BOOH] \approx 4$ мМ; панель Б: 3) $[Hb] \approx 0,3$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,07$ М, $[t-BOOH] \approx 1$ мМ, 4) $[Hb-ДНКЖ] \approx 0,3$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,07$ М, $[t-BOOH] \approx 1$ мМ

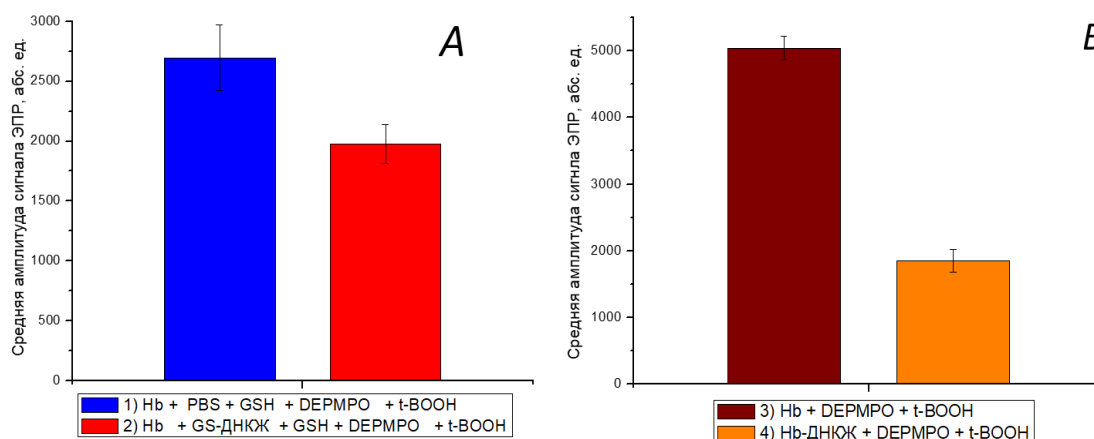


Рисунок 5. Антиоксидантное действие GS-ДНКЖ в присутствии глутатиона (Панель А) и Hb-ДНКЖ (Панель Б) 1) $[Hb] \approx 0,25$ мМ, $[GSH] \approx 2$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,05$ М, $[t-BOOH] \approx 4$ мМ 2) $[Hb] \approx 0,25$, $[GS-ДНКЖ] \approx 0,75$ мМ, $[GSH] \approx 2$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,05$ М, $[t-BOOH] \approx 4$ мМ; 3) $[Hb] \approx 0,3$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,07$ М, $[t-BOOH] \approx 1$ мМ, 4) $[Hb-ДНКЖ] \approx 0,3$ мМ, $[DEPMPO] \approx 0,07$ М, $[t-BOOH] \approx 1$ мМ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашей работе было показано разрушение Hb-ДНКЖ под действием сильных окислителей: гипохлорита и нитрилхлорида, а также антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ при взаимодействии с органическими свободными радикалами. С другой стороны, наблюдалось увеличение продукции HbNO при лизисе эритроцитов при помощи гипохлорита.

Можно предположить, что разрушение ДНКЖ при окислительном и нитрозативном стрессе может быть важным элементом регуляции метаболизма NO, а также влиять на сигнальную функцию этой молекулы. Кроме того, ДНКЖ, вероятно, могут предотвращать модификацию гемоглобина, перехватывая активные формы азота и галогенов. Представляется достаточно перспективной разработка терапевтических подходов для использования различных ДНКЖ, либо соединений, способствующих их образованию *in vivo*, в качестве фармакологических агентов, направленных на удаление или снижение уровня активных форм кислорода и азота в различных органах и тканях организма.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 19-015-00444.

Список литературы / References:

1. Dei Zotti F., Lobysheva I.I., Balligand J.-L. Nitrosyl-hemoglobin Formation in Rodent and Human Venous Erythrocytes Reflects NO Formation From the Vasculature in Vivo. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 7. doi: 10.1371/journal.pone.0200352
2. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl Iron Complexes Bind With Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress. *Methods in Enzymology*, 2008, vol. 436. doi: 10.1016/S0076-6879(08)36025-X
3. Панасенко О.М., Торховская Т.И., Горудко И.В., Соколов А.В. Роль галогенирующего стресса в атерогенной модификации липопротеинов низкой плотности. *Успехи биологической химии*, 2020, т. 60, с. 75-122. [Panashenko O.M., Torkhovskaya T.I., Gorudko I.V., Sokolov A.V. The role of halogenated stress in atherogenic modification of low density lipoproteins. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2020, vol. 60, pp. 75-122. (In Russ.)]
4. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 2007, vol. 87, no. 1, pp. 315-424.
5. Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Squadrito G.L., Davies K.J.A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, vol. 291, pp. 491-511.
6. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. *Биохимия*, 2004, т. 69, № 5, с. 699-705. [Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. Interaction of oxoferrylmyoglobin and dinitrosyl iron complexes. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, vol. 69, no. 5, pp. 699-705. (In Russ.)]
7. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a "working forms" of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, 2016, vol. 54, pp. 15-29.
8. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2019, pp. 1-12. DOI: 10.1155/2019/2798154
9. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion. *European Journal of Physiology*, 2019, vol. 471, pp. 583-593.
10. Karoui H., Chalier F., Finet J.P., Tordo P. DEPMPO: an efficient tool for the coupled ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water. *Organic & biomolecular chemistry*, 2011, vol. 9, no. 7, pp. 2473-2480. doi: 10.1039/c0ob00876a

INTERACTION OF VARIOUS NITROSYL COMPLEXES OF HEMOGLOBIN WITH REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES

Grachev D.I.^{1,2}, Shumaev K.B.^{2,3}, Medvedeva V.A.^{1,2}, Fefler A.S.¹, Kosmachevskaya O.V.³, Ruuge E.K.^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: di.grachev@physics.msu.ru

² National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul., 15a, Moscow, 121552, Russia

³ Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 33/2, Moscow, Russia

Abstract. In this work, we studied the effect of reactive oxygen and nitrogen forms on the complexes of NO with hemoglobin under conditions simulating various physiological and pathophysiological conditions. It is well known that reactive oxygen species, reactive halogen species (hypochlorite), reactive nitrogen species (peroxynitrite and nitryl chloride) and other free radicals are involved in inflammatory reactions and in the pathogenesis of various diseases of the most important systems of the human and animal body. Stabilized forms of nitric oxide (NO) bound to hemoglobin: complexes of NO with heme iron (HbNO) and dinitrosyl iron complexes (DNIC) formed on thiol groups of cysteine residues of hemoglobin (Hb-DNIC) are important physiological forms of nitric oxide. Of particular interest for research is the participation of such NO complexes in processes associated with oxidative stress. We showed that peroxynitrite and hypochlorite quantitatively destroy Hb-DNIC, and in the case of hypochlorite, nitrosylation of the hemoglobin heme group does not occur. In addition, the antioxidant effect of Hb-DNIC was shown when interacting with alkoxyl and alkyl peroxide radicals obtained by adding tert-butyl hydroperoxide to a methemoglobin solution, which simulates peroxidation that occurs during oxidative stress. The data obtained make it possible to improve understanding of the role of complexes of nitric oxide with hemoglobin in the balance between antioxidant and prooxidant systems in the body.

Key words: reactive oxygen and nitrogen species, hemoglobin, EPR spectroscopy.

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОЗОНА

Кулагина Т.П.¹, Гапеев А.Б.^{1,2}, Ариповский А.В.³, Жукова Е.С.⁴, Щербатюк Т.Г.^{2,4,5}

¹ Институт биофизики клетки РАН

г. Пущино Московской области, 142290, РФ; e-mail: tpkulagina@rambler.ru

² Московский государственный областной университет

г. Мытищи Московской области, 141014, РФ

³ Научно-производственная компания «А-БИО»

142290, г. Пущино Московской области, РФ

⁴ Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора
ул. Семашко, 20, г. Нижний Новгород, 603005, РФ

⁵ Пущинский государственный естественно-научный институт

142290, г. Пущино Московской области, Россия

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. Исследовано влияние озонированного физиологического раствора (ОФР) с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л, вводимого внутривентрально крысам-самцам стока Sprague Dawley, на жирнокислотный состав плазмы крови, печени и солидной карциномы печени PC-1. Обнаружено, в плазме крови опухоленосителей увеличивалось количество докозагексаеновой кислоты, сопровождавшееся снижением количества пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот. После воздействия на опухоленосителей ОФР количество докозагексаеновой кислоты снижалось до уровня интактных животных. Изменений количества жирных кислот в печени и опухолевой ткани не происходило ни в одном варианте исследования. Наличие опухоли у животных приводило к снижению активности каталазы в печени. Воздействие ОФР приводило к еще большему снижению активности каталазы в печени интактных животных и опухоленосителей. Предполагается, что воздействие ОФР, как и развитие опухоли, запускают стресс-индуцированные тканеспецифичные свободнорадикальные реакции в организме крыс, которые зависят от типа опухоли и стадии опухолевого роста. Полученные данные указывают на необходимость корректной дозировки ОФР для управления интенсивностью и направленностью окислительных процессов при опухолевом росте.

Ключевые слова: карцинома печени, озон, озонированный физиологический раствор, жирные кислоты, супероксиддисмутаза, каталаза.

Поиск новых методов лечения онкологических заболеваний остается важнейшей проблемой биомедицины. Трансформированные опухолевые клетки с различной степенью злокачественности имеют различающиеся липидные профили и различную чувствительность к окислительному стрессу. Они могут изменять содержание жирных кислот, чтобы модулировать чувствительность к перекисному окислению липидов (ПОЛ) [1]. Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в качестве сигнальных и регуляторных молекул на физиологическом уровне, в зависимости от их концентрации в тканях [2]. Чувствительность опухолевых клеток к повышенному содержанию АФК может быть использована для нарушения клеточных механизмов самоадаптации и индукции гибели опухоли [3].

В связи с обнадеживающими результатами озонотерапии и терапии монооксидом азота в лечении пациентов с COVID-19 [4] возрастает мотивация к широкому использованию медицинских газов и интерес к изучению механизмов их действия. Ранее было показано, что озонированный физиологический раствор (ОФР) избирательно влияет на организм и опухоль в зависимости от сроков роста опухоли и концентрации озона в озono-кислородной смеси [5]. Эти результаты требуют всестороннего исследования механизмов озонотерапии.

Целью работы является определение жирнокислотного состава, активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутаза и каталазы в органах и тканях животных при опухолевом росте и при воздействии на животных-опухоленосителей озона в виде ОФР.

В исследованиях использовали аутбредных крыс-самцов стока Sprague Dawley в возрасте 3-8 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным освещением, получали полнорационный комбикорм («Лабораторкорм», г. Москва) и без ограничений питьевую водопроводную воду. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, рекомендованным Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза, а также Приказом Минздрава России от 01.04.2016 №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Для создания репрезентативных групп подопытных животных оценивали девиантное поведение в тесте «открытое поле» [6]. Регистрировали горизонтальную двигательную активность, вертикальную двигательную активность, уровни эмоциональности и тревожности. В эксперименте использовали крыс со средним уровнем поведенческой активности. Животные были разделены на 4 группы ($n \geq 7$): интактные, интактные + ОФР, опухоленосители, опухоленосители + ОФР. В качестве модели неоплазии использовали

холангиоцеллюлярный рак РС-1 (коллекция ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва). Опухоль для инокуляции брали на 14 сут развития. Перевивку проводили 25% взвесью клеток опухоли в растворе Хенкса, прививочная доза составила 100 мг на крысу. Инокулом карциномы РС-1 вводили в мышцы голени крысы так, чтобы опухолевые узлы развивались в бассейне кровоснабжения бедренной артерии [7]. После перевивки наблюдали за ростом опухоли, в опыт отбирали крыс с развившимися опухолями, достигшими среднего объема 3-5 см³.

Действие озона осуществляли введением ОФР в течение 10 сут (5 воздействий через сутки) интактным животным или начиная с 10-х суток после перевивки опухолевого штамма [8]. Внутривенно вводили по 0,5 мл ОФР с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л. Инъекции ОФР животным осуществляли сразу после барботирования изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия озono-кислородной смесью. Озоно-кислородную смесь получали из медицинского сверхчистого кислорода на озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров, Россия) [9].

Забор образцов крови, тканей тимуса, печени и опухолевого узла для исследования проводили, как описано ранее [10]. Контролем служили аналогичные образцы тканей интактных животных. Образцы тканей промывали в охлажденном во льду фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, гомогенизировали в этом же буфере, отбирали образцы для определения жирнокислотного состава. В качестве антикоагулянта при заборе крови (~5 мл) использовали 200 мкл 10%-ного раствора ЭДТА. Плазму получали осаждением форменных элементов крови при 600 g. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы определяли в эритроцитах, ткани печени и опухоли. Об активности СОД судили по реакции восстановления нитросинего тетразолия, каталазы - на основе изменения оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [11]. Активность ферментов выражали в единицах активности на 1 г гемоглобина (Hb) или ткани. Содержание гемоглобина в эритроцитах определяли гемиглобинцианидным методом Драмбкина [12] с помощью диагностического набора ГЕМОГЛОБИН АГАТ (ООО «Агат-Мед», Москва).

Жирнокислотный состав образцов определяли методом газовой хроматографии на аналитическом газовом хроматографе GC 3900 («Varian», США), как описано ранее [10]. Концентрацию индивидуальных жирных кислот в образцах определяли по методу внутреннего стандарта (с предварительным вычислением соответствующих калибровочных коэффициентов из хроматограмм смеси определяемых жирных кислот с маргариновой кислотой C17:0).

Все эксперименты выполнены по протоколу "слепого контроля", когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента-Ньюмена-Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова-Смирнова. Для парного сравнения групп данных использовали *t*-критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

Таблица 1. Содержание жирных кислот в плазме крови у животных различных экспериментальных групп

Жирные кислоты (в мкг/мл)	Интактные	Интактные + ОФР	Опухоло-носители	Опухоло-носители + ОФР
Пальмитиновая (C16:0)	4.72 ± 0.20	4.54 ± 0.36	3.97 ± 0.15*	3.52 ± 0.29*#
Стеариновая (C18:0)	2.33 ± 0.33	2.27 ± 0.34	2.42 ± 0.23	2.42 ± 0.37
Пальмитолеиновая (C16:1, n-7)	0.56 ± 0.10	0.45 ± 0.07	0.26 ± 0.03*	0.30 ± 0.08*
Олеиновая (C18:1, n-9)	3.62 ± 0.49	3.43 ± 0.38	3.23 ± 0.28	2.88 ± 0.24
Линолевая (C18:2, n-6)	4.70 ± 0.37	4.44 ± 0.49	4.55 ± 0.19	4.32 ± 0.37
Арахидоновая (C20:4, n-6)	5.25 ± 0.42	6.57 ± 0.44	5.10 ± 0.52	4.65 ± 0.41#
Докозагексаеновая (C22:6, n-3)	0.137 ± 0.008	0.167 ± 0.020	0.218 ± 0.026*	0.139 ± 0.026^
НЖК	7.05 ± 0.31	6.81 ± 0.72	6.38 ± 0.22	5.93 ± 0.53
МНЖК	4.18 ± 0.69	3.88 ± 0.41	3.49 ± 0.26	3.18 ± 0.32
ПНЖК	10.09 ± 0.29	11.17 ± 0.91	9.45 ± 0.57	8.41 ± 0.76
Сумма	21.32 ± 0.60	21.86 ± 0.80	19.78 ± 0.74	17.52 ± 1.38

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок. * $p < 0.03$ - достоверные отличия по сравнению с интактными крысами, ^ $p < 0.03$ по сравнению с группой опухоленосителей, # $p < 0.03$ по сравнению с группой «Интактные + ОФР» по критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса ($n \geq 7$).

В плазме крови интактных животных и после воздействия на интактных животных ОФР не обнаружено достоверных изменений количества жирных кислот (табл. 2). Однако в плазме крови опухоленосителей и после воздействия на них ОФР происходило снижение содержания пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот, а также увеличение количества докозагексаеновой кислоты (табл. 1).

В таблице 2 представлены данные по жирнокислотному составу ткани печени интактных животных и опухолевой ткани животных-опухоленосителей. В печени крыс не обнаружено изменений жирнокислотного состава при опухолевом росте. При воздействии ОФР на интактных животных и опухоленосителей количество жирных кислот также не изменялось (данные не представлены). ОФР не влиял на количество жирных кислот в опухолевой ткани, где суммарное количество НЖК и МНЖК, устойчивых к перекисному окислению, практически в два раза превышало суммарное количество ПНЖК (табл. 2).

Определение активности СОД в эритроцитах, печени и опухолевом узле не выявило изменений ее активности ни в одной из групп животных (табл. 3). Однако происходило достоверное снижение активности каталазы в печени животных и в опухолевой ткани после воздействия ОФР (табл. 3).

Полагают, что каждая опухоль имеет свой собственный набор жирных кислот в плазме крови [13]. Обнаруженное в наших экспериментах увеличение количества докозагексаеновой кислоты, обладающей противоопухолевыми свойствами [14], возможно, обусловлено защитной реакцией организма опухоленосителей на рост опухоли. Снижение количества докозагексаеновой кислоты до уровня интактных животных при воздействии на опухоленосителей ОФР (табл. 1), вероятно, объясняется защитной реакцией опухоленосителей от повреждающего воздействия избыточного перекисного окисления докозагексаеновой кислоты, содержащей шесть двойных связей [15].

Отсутствие изменений количества жирных кислот и активности СОД в печени на данной стадии роста опухоли и под влиянием ОФР (табл. 3) свидетельствуют об отсутствии нарушений регуляции синтеза жирных кислот в этот период. Полагают, что активность СОД в клетках определяется общим состоянием всей окислительно-восстановительной системы, как в норме, так и при опухолевом росте [16]. Снижение активности каталазы в печени животных-опухоленосителей, обнаруженное в наших экспериментах (табл. 3), совпадает с

Таблица 2. Содержание жирных кислот в ткани печени интактных животных и в опухолевой ткани у животных-опухоленосителей

Жирные кислоты (в мкг/мг ткани)	Печень	Опухолевая ткань
Пальмитиновая (C16:0)	4,84 ± 0,35	0,43 ± 0,06
Стеариновая (C18:0)	4,60 ± 0,39	0,32 ± 0,05
Пальмитолеиновая (C16:1, n-7)	0,26 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Олеиновая (C18:1, n-9)	2,10 ± 0,38	0,30 ± 0,05
Вакценовая (C18:1, n-7)	0,52 ± 0,03	0,21 ± 0,03
Линолевая (C18:2, n-6)	4,49 ± 0,53	0,29 ± 0,05
α-Линоленовая (C18:3, n-3)	0,08 ± 0,01	Следовые количества
Эйкозодиеновая (C20:2, n-6)	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Дигомо-γ-линоленовая (C20:3, n-6)	0,13 ± 0,04	0,03 ± 0,01
Арахидоновая (C20:4, n-6)	5,68 ± 0,34	0,24 ± 0,03
Докозапентаеновая (C22:5, n-3)	0,032 ± 0,013	Следовые количества
Докозагексаеновая (C22:6, n-3)	0,22 ± 0,04	0,10 ± 0,02
НЖК	9,44 ± 0,70	0,75 ± 0,1
МНЖК	2,82 ± 0,35	0,55 ± 0,08
ПНЖК	10,72 ± 0,76	0,71 ± 0,12
Сумма	22,98 ± 1,73	2,01 ± 0,30

Примечание. Представлены средние значения и величины стандартных ошибок ($n \geq 7$).

Таблица 3. Активность СОД и каталазы в тканях и органах интактных животных и животных-опухоленосителей при воздействии ОФР

Ткань, орган	Интактные		Интактные + ОФР		Опухоленосители		Опухоленосители + ОФР	
	СОД	Каталаза	СОД	Каталаза	СОД	Каталаза	СОД	Каталаза
Эритроциты (ед. акт./г Hb)	307,1 ± 36,2	23,2 ± 3,3	243,3 ± 51,4	17,0 ± 3,7	258,7 ± 47,7	25,0 ± 1,8	256,5 ± 39,2	26,8 ± 3,7
Печень (в ед. акт./г)	17,0 ± 2,9	0,98 ± 0,11	14,0 ± 1,7	0,33 ± 0,04*	16,5 ± 2,7	0,50 ± 0,06*	18,0 ± 4,1	0,29 ± 0,04*^
Опухоль (в ед. акт./г)	-	-	-	-	11,0 ± 1,4	2,5 ± 0,3	13,2 ± 2,6	1,5 ± 0,2^

Примечание. * $p < 0.01$ - отличия достоверны по сравнению с интактными крысами, ^ $p < 0.03$ - отличия достоверны по сравнению с опухоленосителями по критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса ($n \geq 7$).

ранее полученными литературными данными [17]. Авторы показали, что экспрессия гена каталазы снижалась в зависимости от размера опухоли. Снижение экспрессии генов также наблюдалось независимо от тканевого или видового происхождения трансплантированных опухолей. Удаление имплантированной опухоли приводило к восстановлению сниженной экспрессии гена каталазы до нормального уровня. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение активности каталазы в печени у опухоленосителей может быть связано с пониженной экспрессией гена каталазы, индуцируемой в печени определенным гуморальным фактором (факторами) трансплантированной опухоли. Однако в наших экспериментах снижение активности каталазы было более выраженным при воздействии ОФР как на интактных животных, так и на опухоленосителей (табл. 3). Более выраженное снижение активности каталазы в печени интактных животных и животных с опухолью после воздействия ОФР может быть обусловлено снижением пула молекул фермента в связи с нейтрализацией большого количества АФК. Уменьшение количества МДА в печени опухоленосителей после действия ОФР свидетельствует о снижении ПОЛ. Вероятно, активность ферментов антиоксидантной системы клеток печени способна справляться с окислительным стрессом на данной стадии роста опухоли.

Специфичность повреждения опухолевых клеток, вероятно, достигается за счет их локального окислительно-восстановительного состояния. Возможно, для данного типа опухоли и стадии ее роста доза ОФР оказалась недостаточной для нарушения клеточных механизмов самоадаптации и индукции гибели опухолевых клеток под действием АФК.

Таким образом, обнаружено, что воздействие ОФР на интактных зрелых крыс и животных-опухоленосителей приводит к достоверному изменению содержания жирных кислот и активности антиоксидантных ферментов в различных органах и тканях. Полученные результаты свидетельствуют об активации защитных эффектов НЖК и МНЖК при окислительном стрессе, а также об активации иммунных реакций при опухолевом росте, которые могут зависеть от типа опухоли и стадии опухолевого роста. Воздействие ОФР, как и развитие опухоли, запускают универсальные стресс-индуцированные тканеспецифичные реакции в организме крыс. Полученные данные указывают на необходимость корректной дозировки ОФР для управления интенсивностью и направленностью окислительных процессов при опухолевом росте.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта 19-02-00667.

Список литературы / References:

1. Rodrigues C., Milkovic L., Bujak I.T., Tomljanovic M., Soveral G., Cipak Gasparovic A. Lipid profile and aquaporin expression under oxidative stress in breast cancer cells of different malignancies. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2019, vol. 11, p. 2061830. doi: 10.1155/2019/2061830
2. Yan L.J. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.*, 2014, vol. 2C, pp. 165-169.
3. Liu C., Cao Y., Cheng Y., Wang D., Xu T., Su L., Zhang X., Dong H. An open source and reduce expenditure ROS generation strategy for chemodynamic/photodynamic synergistic therapy. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, p. 1735. doi: 10.1038/s41467-020-15591-4
4. Alvarez R.A., Berra L., Gladwin M.T. Home nitric oxide therapy for COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2020, vol. 202, pp. 16-20. doi: 10.1164/rccm.202005-1906ED
5. Щербатюк Т.Г. Озонотерапия злокачественных новообразований: за и против. *Нижегородский медицинский журнал*, 2003, т. 1, с. 52-56. [Shcherbatyuk T.G. Ozone therapy for malignant neoplasms: pros and cons. *Nizhny Novgorod Medical Journal*, 2003, vol. 1, pp. 52-56. (In Russ.)]
6. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. *Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. Высшая школа, М., 1991. [Buresh J., Bureshova O., Houston D.P. *Methods and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior*. Higher School, Moscow, 1991. (In Russ.)]
7. Андропова Н.В., Волконский М.В., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Методика внутриартериальной инфузии крысам с внутримышечно трансплантированной опухолью. *Российский биотерапевтический журнал*, 2012, т. 11, с. 19-21. [Andronova N.V., Volkonsky M.V., Kalishyan M.S., Treshchalina E.M. Intra-arterial infusion technique in rats with intramuscularly transplanted tumor. *Russian Biotherapeutic Journal*, 2012, vol. 11, pp. 19-21. (In Russ.)]
8. Щербатюк Т.Г., Жукова (Плеханова) Е.С., Никитина Ю.В., Гапеев А.Б. Окислительная модификация белков в тканях крыс при опухолевом росте в условиях озono-фотодинамического воздействия. *Биофизика*, 2020, vol. 65, pp. 367-375. [Shcherbatyuk T.G., Zhukova (Plekhanova) E.S., Nikitina Yu.V., Gapeev A.B. Oxidative modification of proteins in rat tissues during tumor growth under conditions of ozone-photodynamic exposure. *Biophysics*, 2020, vol. 65, pp. 367-375. (In Russ.)]
9. Буранов С.Н., Горохов В.В., Карелин В.И., Селемир В.Д. *Устройство для озонотерапии*, Патент РФ на изобретение №2249445/10.04.053, Бюл. № 10, 2003. [Buranov S.N., Gorokhov V.V., Karelin V.I., Selemir V.D. *Device for ozone therapy*, RF patent for invention №2249445 / 10.04.053, Bul. no. 10, 2003. (In Russ.)]
10. Кулагина Т.П., Ариповский А.В., Гапеев А.Б. Изменение жирнокислотного состава клеток тимуса, печени, плазмы крови и мышечной ткани у мышей с солидной формой карциномы Эрлиха. *Биохимия*, 2012, т. 77, с. 231-239. [Kulagina T.P., Aripovsky A.V., Gapeev A.B. Changes in the fatty acid composition of thymus cells, liver,

blood plasma and muscle tissue in mice with solid Ehrlich carcinoma. *Biochemistry*, 2012, vol. 77, pp. 231-239. (In Russ.)]

11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма*, ИКФ «Фолиант», СПб, 2000. [Harutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybinina N.N. *Methods for assessing free radical oxidation and the antioxidant system of the body*, IKF "Foliant", St. Petersburg, 2000. (In Russ.)]

12. Drabkin, D. The standardization of hemoglobin measurement. *Am. J. Med. Sci.*, 1949, vol. 217, p. 710.

13. Qiu J.F., Zhang K.L., Zhang X.J., Hu Y.J., Li P., Shang C.Z., Wan J.B. Abnormalities in plasma phospholipid fatty acid profiles of patients with hepatocellular carcinoma. *Lipids*, 2015, vol. 50, pp. 977-985. doi: 10.1007/s11745-015-4060-6

14. Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M., Sahu K.K., Kostrzewa T., Wozniak M., Tuszyński J. Docosahexaenoic acid inhibits PTP1B phosphatase and the viability of MCF-7 breast cancer cells. *Nutrients*, 2019, vol. 11, p. E2554. doi: 10.3390/nu1112554

15. Song E.A., Kim H. Docosahexaenoic acid induces oxidative DNA damage and apoptosis, and enhances the chemosensitivity of cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, p. E1257.

16. Che M., Wang R., Li X., Wang H.Y., Zheng X.F.S. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov. Today*, 2016, vol. 21, pp. 143-149. doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.001

17. Yamaguchi Y., Sato K., Endo H. Depression of catalase gene expression in the liver of tumor bearing nude mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, vol. 89, pp. 1084-1089.

FATTY ACID COMPOSITION AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN RAT TISSUES DURING TUMOR GROWTH UNDER OZONE EXPOSURE

Kulagina T.P.¹, Gapeyev A.B.^{1,2}, Aripovsky A.V.³, Zhukova E.S.⁴, Shcherbatyuk T.G.^{2,4}

¹ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: tpkulagina@rambler.ru

² Moscow State Regional University

st. Vera Voloshina, 24, Mytishchi, 141014, Russia

³ Research and production company "A-Bio"

Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

⁴ Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology

st. Semashko, 20, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

Abstract. The effect of ozonized saline solution (OSS) with an ozone concentration in an ozone-oxygen mixture of 400 µg/L, administered intraperitoneally to male Sprague Dawley rats, on the fatty acid composition of the blood plasma, liver, and solid PC-1 liver carcinoma were studied. It was found that in the blood plasma of tumor-bearing rats, the amount of docosahexaenoic acid increased, accompanied by a decrease in the amount of palmitic and palmitoleic acids. After exposure of tumor-bearing rats to OSS, the amount of docosahexaenoic acid decreased to the level of intact animals. There were no changes in the amount of FAs in the liver and tumor tissue in any variant of the study. The tumor decreased an activity of catalase in the liver of animals. Exposure to OSS led to an even greater decrease in catalase activity in the liver of intact animals and tumor carriers. It is assumed that the exposure to OSS, as well as the tumor growth, trigger stress-induced tissue-specific free radical reactions in the body of rats, which depend on the type of tumor and the stage of tumor growth. The data obtained indicate the need for the correct dosage of OSS to control the intensity and direction of oxidative processes during tumor growth.

Key words: liver carcinoma, ozone, ozonized saline solution, fatty acids, superoxide dismutase, catalase.

АНАЛИЗ СЕНСОМОТОРНОГО МЮ-РИТМА ПАЦИЕНТОВ С ЭПИЛЕПСИЕЙ МЕТОДОМ НЕЗАВИСИМЫХ КОМПОНЕНТ

Каримова Е.Д.^{1,2}, Катермин Н.С.¹, Буркитбаев С.Е.^{1,2}

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

г. Москва, РФ

² Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева

ул. Бутлерова, 5А, г. Москва, 117485, РФ; e-mail: nkatermin@yandex.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. В связи с увеличением интереса нейрофизиологов к теме нейро-компьютерных интерфейсов и задачам на восприятие и представление моторных актов чрезвычайно актуальной стала проблема исследования и выделения сенсомоторного мю-ритма. В данной работе у пациентов с эпилепсией (19 чел.) и здоровых испытуемых (21 чел.) выделялся сенсомоторный ритм электроэнцефалограммы с помощью метода независимых компонент. В рамках исследования зеркальной системы мозга (ЗСМ) ставилась задача выявить компоненты, соответствующие сенсомоторному ритму из зарегистрированного ЭЭГ сигнала, а также проанализировать характеристики этих компонент при наблюдении и выполнении двигательных актов у пациентов с фокальной симптоматической эпилепсией по сравнению с контрольной группой здоровых испытуемых. Для вычисления независимых компонент использовался алгоритм infomax, отбор компонент, соответствующих сенсомоторному ритму, осуществлялся по совокупности признаков: локализация в области сенсомоторной коры, частотный диапазон 8-13 Гц, снижение мощности при выполнении движения по сравнению с фоновой пробой. Далее оценивалась реактивность компонент мю-ритма в пробах с выполнением и наблюдением движений, отражающая активацию ЗСМ. Был проведен анализ характерных особенностей динамики сенсомоторного ритма двух групп. Также реактивность сенсомоторного мю-ритма оценивалась с помощью анализа сигнала отведений С3, С4, Cz электроэнцефалограммы методом быстрого преобразования Фурье (БПФ). Результаты, полученные двумя методами, сопоставлялись для определения более точного способа выделения мю-ритма. Также была проверена гипотеза о наличии статистических различий уровня десинхронизации сенсомоторного ритма у пациентов с эпилепсией и контрольной группы.

Ключевые слова: ЭЭГ, анализ независимых компонент, сенсомоторный ритм, эпилепсия, зеркальная система мозга.

На сегодняшний день электроэнцефалография является единственным прямым неинвазивным методом регистрации суммарной электрической активности головного мозга, обеспечивающим миллисекундное разрешение, что делает его крайне важным для исследования изменений функционального состояния человека. Традиционно выводы о состоянии пациента (например, о наличии эпилептоформной активности) делаются на основании качественного анализа паттернов электроэнцефалограммы. Необходимость более точного количественного анализа при решении различных медицинских и исследовательских задач делает актуальным внедрение новых математических методов обработки сигнала.

Для физиологов особый интерес представляют паттерны активности, представляющие собой последовательность квазистационарных колебаний с определенными амплитудно-частотными характеристиками. Обнаружение связи какой-либо паттерна с физиологическими или патофизиологическими механизмами позволяет неким образом данный паттерн интерпретировать. Например, альфа-ритм – это активность с частотой 8-13 Гц и амплитудой до 100 мкВ, которая реагирует десинхронизацией (снижением амплитуды) при активации зрительной коры мозга (при открытии глаз или зрительном внимании), и синхронизацией (повышением амплитуды) при закрывании глаз, снижении внимания и расслаблении [1].

В последние тридцать лет внимание исследователей привлёк так называемый мю-ритм, он же сенсомоторный ритм, он же роландический. Источники данного ритма локализованы в сенсомоторной коре в районе роландовой борозды (отсюда и название), а десинхронизация данного ритма наблюдается при выполнении или представлении движений. Интерес к данному ритму обусловлен двумя факторами: был найден способ использовать сенсомоторный ритм для создания интерфейсов мозг-компьютер [2], а также была обнаружена связь данного ритма с зеркальной системой мозга (ЗСМ) [3]. Первая тема выходит за рамки данной статьи, а о второй как раз пойдёт речь в данной работе. В конце 1990-х Д. Ризоллатти и его команда обнаружили зеркальные свойства у нейронов моторной коры макака [4] – данные клетки активизировались не только при самостоятельном выполнении животным определенного действия, но при наблюдении выполнения данного движения. Позже такие клетки были обнаружены у людей в инвазивном исследовании Р. Мукамеля 2010 года [5], реализованного на пациентах с фармакорезистентной эпилепсией. Electrodes имплантировались по медицинским показаниям перед операцией по удалению эпилептического очага. Данные импланты давали медикам возможность точнее отследить локализацию патологического участка мозга, а ученые получили уникальную возможность зарегистрировать сигналы непосредственно от коры. Несмотря на многообещающие результаты, полученные в

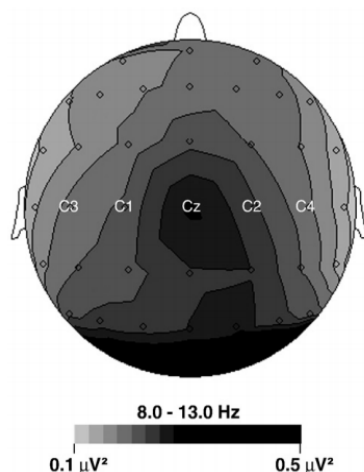


Рисунок 1. Топограмма снижения мощности сигнала в диапазоне альфа-ритма (8–13 Гц). На шкале отображена разница мощности сигнала при наблюдении движения и фоновой пробы. Видны две области с наибольшей мощностью: центральная и затылочная. Первая соответствует мю-ритму, вторая – альфа-ритму

исследованиях с пациентами, важно учитывать, что эпилепсия является серьёзной неврологической патологией. Важно узнать, насколько эти данные применимы по отношению к здоровым людям. Данное исследование посвящено этому вопросу.

Сенсомоторный мю-ритм и зрительный альфа-ритм имеют общий частотный диапазон (8–13 Гц), но разную локализацию на скальпе (рис. 1) [6]. Поэтому разделить их с помощью спектрального анализа затруднительно, необходим более эффективный метод разделения двух этих ритмов. С конца 1990-тых в обработку сигнала ЭЭГ вводят анализ независимых компонент (Independent Components Analysis, ICA) [7]. Изначально он использовался для удаления артефактов – сигналов, не связанных с активностью мозга. Тем не менее, разделение мю- и альфа-ритма с помощью данного метода также возможно. В данном методе предполагается, что сигнал, регистрируемый датчиками, представляется как линейная комбинация статистически независимых источников. Задача разделения состоит в нахождении несмешивающей матрицы W . Существует несколько алгоритмов нахождения данной матрицы; в данном исследовании используется “*infomax*”. Данный алгоритм подбирает источники таким образом, чтобы их взаимная информация была минимальной (а общая энтропия – максимальной). Дополнительное преимущество данного метода состоит в том, что смешивающая матрица содержит в себе информацию о локализации источников на скальпе.

МЕТОДИКА

Для проведения серии экспериментов были отобраны две группы испытуемых. Первая группа состояла из пациентов, проходящих лечение в НПЦ им. З.П. Соловьева, с диагностированной фокальной симптоматической эпилепсией (19 человек). Вторую контрольную группу составляли добровольцы без диагностированных нарушений ЦНС (21 человек). Критерии включения для обеих групп: возраст от 18 до 40 лет, отсутствие злокачественных образований, отсутствие ДЦП, отсутствие тяжелой депрессии, отсутствие моторных

Наблюдаемые значения: $X = (x_1, \dots, x_N)^T$

Независимые компоненты: $u = (u_1, \dots, u_N)^T$

Где: W^{-1} – смешивающая матрица, W – несмешивающая матрица

Разложение сигнала: $u = WX$

Рекомпиляция сигнала: $X = W^{-1}u$

а)

б)

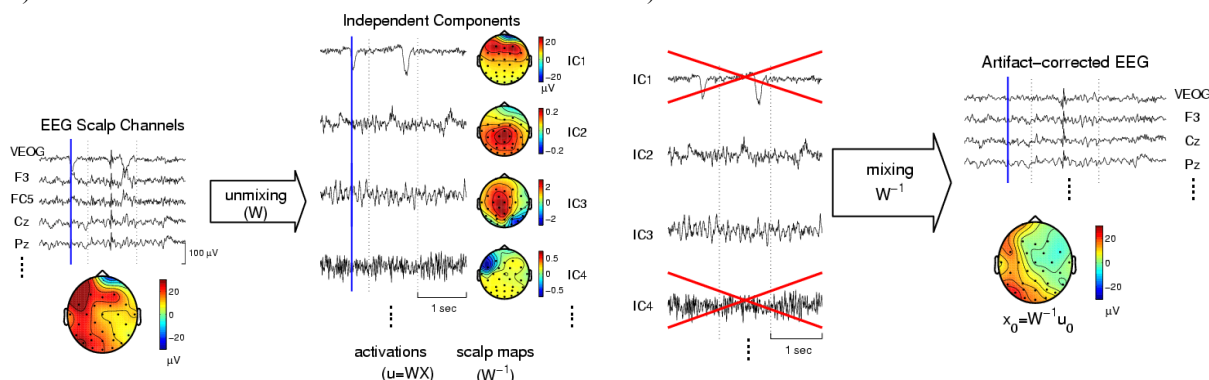


Рисунок 2. Разложение сигнала ЭЭГ на независимые компоненты (а), и рекомпиляция сигнала ЭЭГ после удаления компонент, соответствующих артефактам (б)

нарушений, когнитивная сохранность, наличие подтвержденного эпилептического очага (для пациентов). Пациенты на момент исследования находились на лечении в стационаре НПЦ им. З.П. Соловьева, где их наблюдали квалифицированные врачи эпилептологи.

Работа выполнена в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (1964 г. с измен. 2013 г.), с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований, включающих людей в качестве испытуемых. Все испытуемые подписывали информированное согласие. Используемые методики были одобрены локальным этическим комитетом ИВНД и НФ РАН.

В рамках исследования ЗСМ ставилась задача выявить компоненты, соответствующие сенсомоторному ритму из зарегистрированного ЭЭГ сигнала, а также проанализировать характеристики этих компонент при наблюдении и выполнении двигательных актов у пациентов по сравнению с контрольной группой. Дополнительно ставилась задача сравнить метод независимых компонент с более простым методом оценки десинхронизации мио-ритма – анализом отведений С3, С4, Сз энцефалографа.

Регистрация сигнала происходила с помощью элетроэнцефалографа-анализатора ЭЭГА-21/26 «ЭНЦЕФАЛАН 131-03» от 19 отведений монополярно относительно объединённых ушных электродов Az. Электроды располагались по стандартной международной системе 10-20, сопротивление под каждым электродом было менее 20 кОм, полоса пропускания 1–45 Гц, частота дискретизации сигнала составляла 256 Гц. Для каждого испытуемого регистрация ЭЭГ производилась для последовательности физиологических проб:

- спокойное бодрствование, глаза закрыты;
- спокойное бодрствование, глаза открыты;
- наблюдение видеоролика с движением руки (сжатие кисти);
- самостоятельное выполнение этого же движения.

Зарегистрированные фрагменты ЭЭГ обрабатывались с помощью бесплатного пакетного ПО MNE-Python (<https://mne.tools/stable/index.html>). Из записанной электроэнцефалограммы вырезались участки длительностью 3–5 секунд без артефактов в каждой пробе. Затем данные участки «сшивались» в один массив данных для решения задачи слепого поиска источников. Данная процедура необходима, так как независимые компоненты определяются в случайном порядке, и, будучи найденными для различных проб, не могут быть сопоставлены между собой.

Предварительно исходный сигнал ЭЭГ фильтровался в диапазоне 4–40 Гц. Выбор данного частотного диапазона обусловлен тем, что алгоритмы вычисления независимых компонент чувствительны к низкочастотным колебаниям, а частоты больше 40 Гц выходят за пределы интерпретируемой на ЭЭГ физиологической активности. На рисунке 3 представлены исходная запись ЭЭГ с 19 каналов (а) одного из испытуемых и разложение этих сигналов по 19 компонентам методом ICA (б).

Независимые компоненты сигнала вычислялись с помощью алгоритма “*infomax*”, по коэффициентам демикширующей матрицы рассчитывались топограммы для каждой компоненты (рис. 4), затем рассчитывались значения спектральной мощности каждой компоненты по четырём пробам в диапазоне мио-ритма 8–13 Гц.

Таким образом, для каждого испытуемого был получен массив значений мощности сигнала. В каждой строке (для каждой компоненты) значения мощности в пробах делились на мощность фоновой пробы. Таким образом определяется десинхронизация активности в мио-диапазоне в каждой пробе. Полученные значения логарифмировались и итоговые относительные значения анализировались в дБ. Для удобства работы для данных каждого испытуемого строилась тепловая карта. Для экспертного определения компоненты, соответствующей мио-ритму выполнялся следующий алгоритм:

- 1) определялись 3-5 компонент с максимальными значениями мощности в диапазоне 8-13 Гц в пробе «глаза открыты»;
- 2) мощность данных компонент при закрытых глазах не должна была быть максимальной (что соответствует компонентам зрительного альфа-ритма);

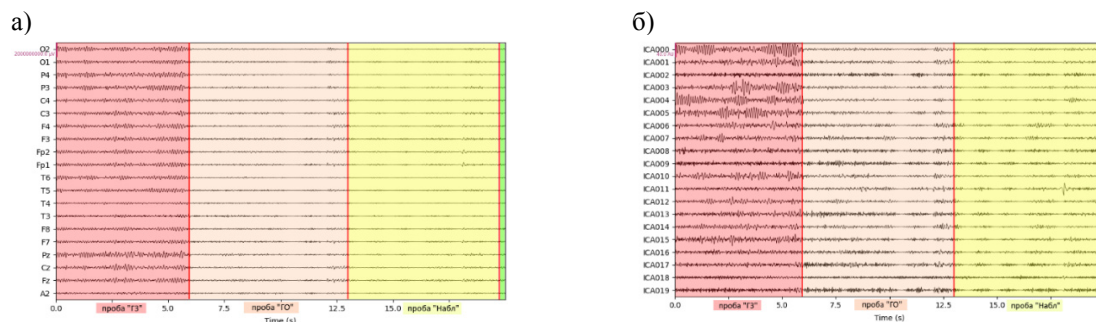


Рисунок 3. Исходные сигналы ЭЭГ одного из испытуемых (а), выявленные для одного из испытуемых независимые компоненты (б). Альфа-ритм, распределенный в исходном сигнале практически по всем отведениям, после применения ICA был выделен в компоненты ICA000, ICA003, ICA004, ICA005

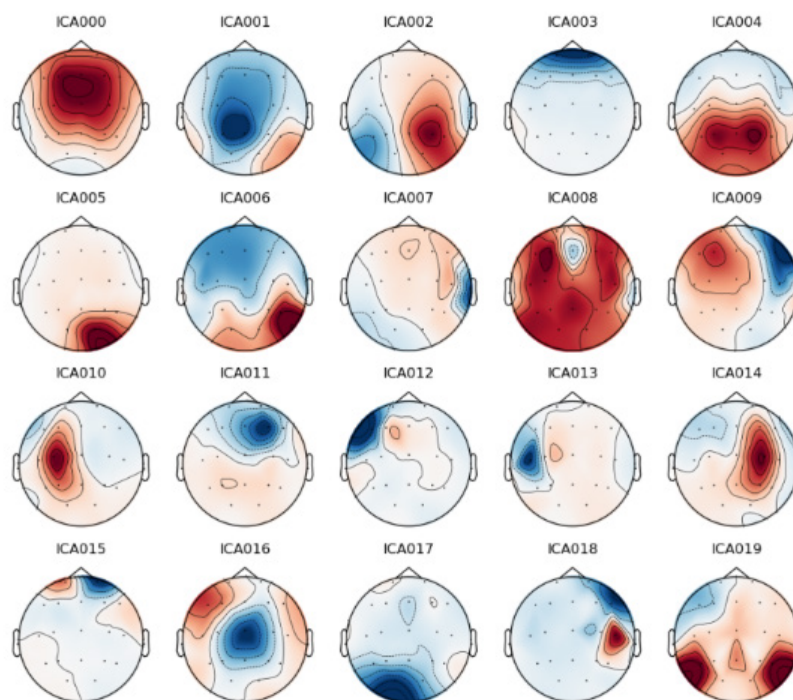


Рисунок 4. Топограммы независимых компонент одного из испытуемых

3) среди них верифицировались компоненты, для которых наблюдалось снижение спектральной мощности при выполнении движения рукой;

4) далее верификация происходила по топограммам данных компонент: локализация компонент мю-ритма должна быть над центральной бороздой.

5) Если среди компонент было две с локализацией в правом и левом полушарии, выбирали компоненту мю-ритма в левом полушарии.

Оценка активации зеркальной системы мозга проводилась по степени десинхронизации сенсомоторного ритма: по различиям спектральной плотности мощности в пробах с открытыми глазами и наблюдением действия. Статистический анализ проводился по значениям относительной мощности выбранных компонент мю-ритма, при этом сравнивались значения в группе пациентов и здоровых добровольцев по пробам «наблюдение» и «выполнение» с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По описанной выше методике были выявлены независимые компоненты сигнала ЭЭГ, соответствующие сенсомоторному мю-ритму для каждого испытуемого из двух групп. Для каждой из выделенных компонент сенсомоторного ритма была рассчитана локализация. Были рассчитаны относительные логарифмированные

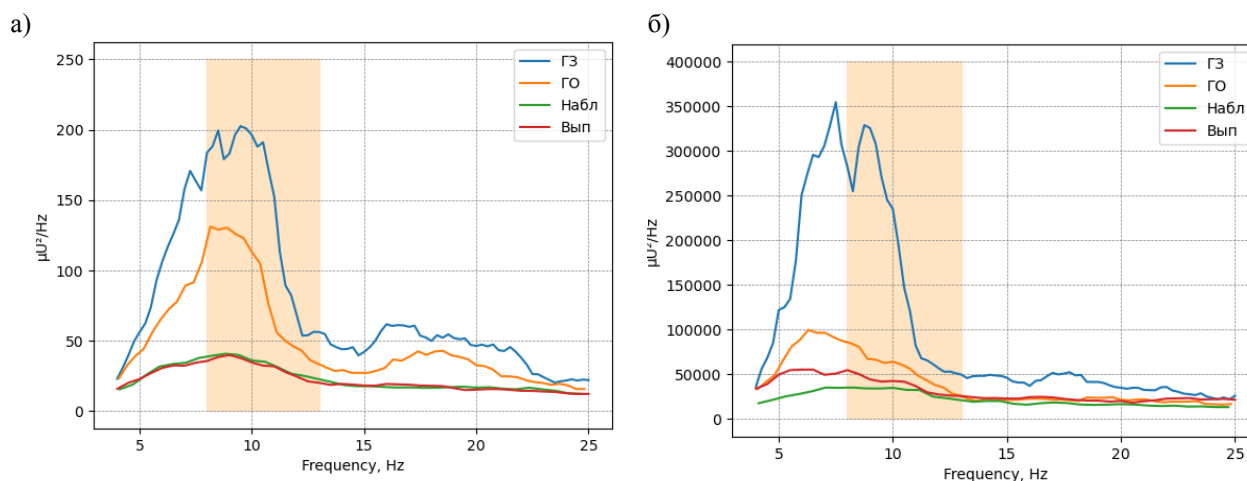


Рисунок 5. Графики усредненных спектров компонент мю-ритма группы пациентов, полученные методом независимых компонент (а) и с помощью спектрального анализа отведения Cz (б) для проб с закрытыми глазами (ГЗ), открытыми глазами (ГО), с наблюдением движения (Набл) и выполнением движения (Вып). Оранжевым выделен частотный диапазон сенсомоторного ритма 8-13 Гц.

значения мощности (в Дб) в диапазоне 8–13 Гц для каждой выявленной компоненты в пробах наблюдение. Для сравнения двух методик выделения мю-ритма также рассчитывались относительные значения спектральной мощности в отдельных отведениях, расположенных над центральной бороздой – C3, C4 и Cz.

Первым результатом данной статьи является сравнение двух методов оценки реактивности сенсомоторного ритма. На рисунке 5 представлены графики усредненной спектральной плотности мощности сигналов. Максимальное значение в случае анализа отведений Cz, C3, C4 (б) значительно превышает соответствующее значение для выделенной компоненты (а). Это позволяет сделать вывод о преимущественной доле альфа-ритма в сигналах, регистрируемых в центральных отведениях. Таким образом, оценка реактивности мю-ритма с помощью метода независимых компонент является более корректной.

Также были проанализированные характерные особенности спектров мю-компонент группы пациентов и их отличия от группы контроля. Для обеих групп были получены графики усредненных спектров компонент мю-ритма в различных пробах: при закрытых глазах (ГЗ), открытых глазах (ГО), наблюдении движения (Набл) и выполнении движения (Вып). По графикам (рис. 6) видно, что у группы пациентов пик и кривая мощности мю-ритма сдвинута в сторону более низких частот по сравнению с контрольной группой, у которых кривая мощности попадает ровно в диапазон 8–13 Гц. Также следует отметить, что у пациентов с эпилепсией уровень десинхронизации мю-ритма в пробе с наблюдением движения и в пробе с выполнением движения не различается. В отличие от этого, в контрольной группе мощность мю-ритма в пробе «наблюдение» была выше, чем при выполнении. Аналогичные графики для группы контроля и пациентов (рис. 5) были получены для отведений C3, C4 и Cz электроэнцефалограммы в рамках сравнения двух методов.

Для уровня десинхронизации выбранных компонент мю-ритма в двух пробах – наблюдение и выполнение сжимания кисти – были рассчитаны медианные значения (рис. 7). Несмотря на достаточно серьёзный неврологический диагноз у пациентов не наблюдается значимых отличий в уровне снижения мю-ритма при реализации моторных проб. Для данных проб были рассчитаны значения *t* критерия Стьюдента (табл. 1), по которым не было выявлено статистически значимых различий между уровнем десинхронизации сенсомоторного ритма контрольной группы и группы с диагностированной эпилепсией. Естественно, данную гипотезу нужно проверить более тщательным образом. Одним из возможных вариантов является расчёт мощности сигнала не в стандартном диапазоне 8–13 Гц, а в индивидуально подобранном [8].

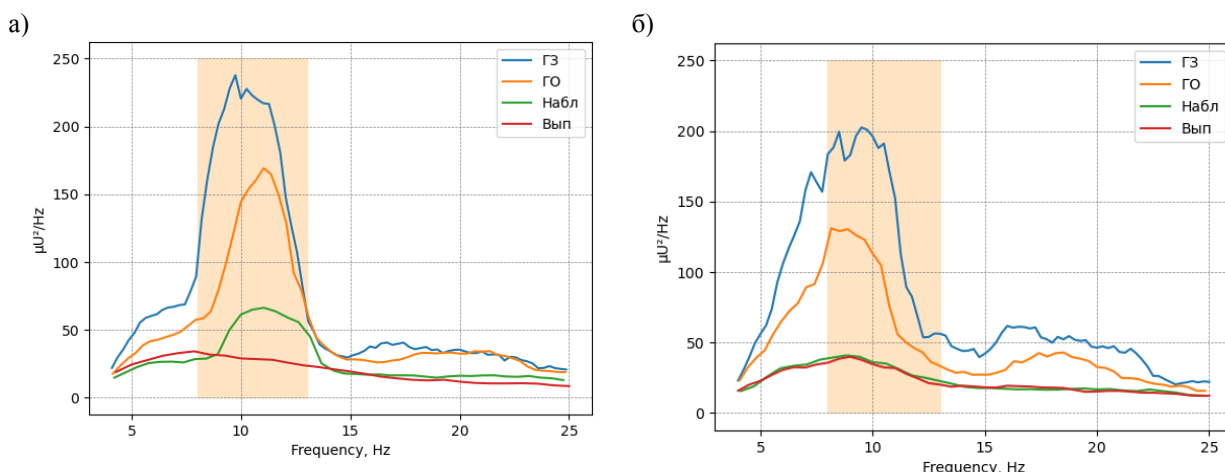


Рисунок 6. Графики усредненных спектров компонент мю-ритма контрольной группы (а) и пациентов с эпилепсией (б) для проб с закрытыми глазами (ГЗ), открытыми глазами (ГО), с наблюдением движения (Набл) и выполнением движения (Вып). Оранжевым выделен частотный диапазон сенсомоторного ритма 8-13 Гц

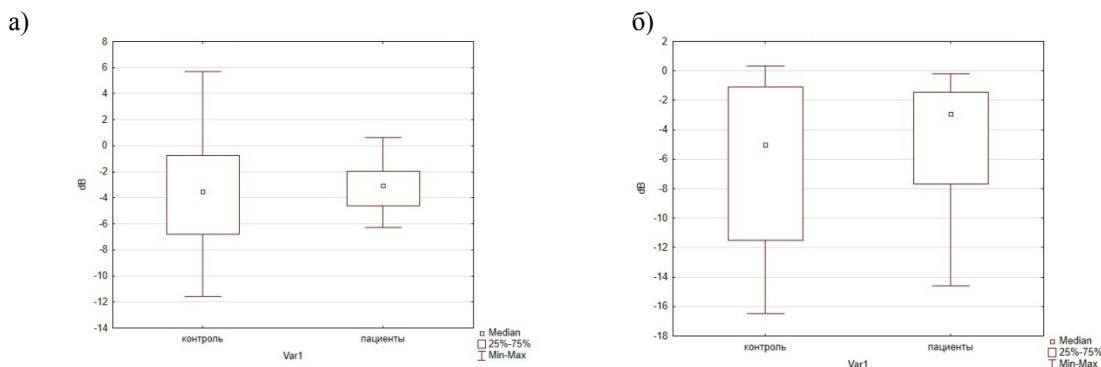


Рисунок 7. Медианные значения и разброс степени десинхронизации компонент мю-ритма у контрольной группы и пациентов в пробах наблюдение (а) и выполнение (б)

Таблица 1. Результаты расчётов критерия Стьюдента для уменьшения мощности сигнала ЭЭГ в пробе «наблюдение» для контрольной группы и группы пациентов

	mu	C4	C3	Cz
t	-0,44955	0,763321	0,458671	0,024652
p	0,655587	0,449985	0,649083	0,980462

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было продемонстрировано, что выделение сенсомоторного мю-ритма и последующий анализ его динамики наиболее корректно проводить с использованием метода независимых компонент, который лучше дифференцирует мю-ритм от зрительного альфа-ритма по сравнению с анализом сигнала центральных отведений с помощью БПФ. Для спектров сигналов центральных отведений наблюдается значительное различие максимальных значений в пробах с закрытыми и открытыми глазами. В спектрах выделенной компоненты мю-ритма столь значительного перепада не было выявлено. Это позволяет сделать вывод о том, что функционально в центральных отведениях регистрируется преимущественно альфа-, а не мю-ритм.

Был проведен анализ различий характеристик сенсомоторного ритма у испытуемых двух групп, который показал, что пик спектральной плотности мощности у пациентов смещен в сторону нижних частот по сравнению со здоровыми испытуемыми. Также пациенты отличаются меньшей амплитудой максимального значения и большей шириной спектра. На данном этапе исследования статистическая достоверность данных различий не подтвердилась, но намечены направления дальнейшей работы с данной гипотезой.

Список литературы / References:

1. Зенков Л.Р. *Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии). Руководство для врачей.* 3-е изд. Москва: МЕДпрессинформ, 2004, 368 с. [Zenkov L.R. *Clinical electroencephalography with elements of epileptology. Guidance for clinicians.* 3-rd edition. Moscow/ MEDpressinform, 2004, 368 p. (In Russ.)]
2. Zhang K., Xu G., Zheng X., Li H., Zhang S., Yu Y., Liang R. Application of Transfer Learning in EEG Decoding Based on Brain-Computer Interfaces: A Review. *Sensors*, 2020, vol. 20, pp. 6321-6339. doi: 10.3390/s20216321
3. Bimbil M., Festante F., Coudé G., Vanderwert R. E., Fox N. A. Simultaneous scalp recorded EEG and local field potentials from monkey ventral premotor cortex during action observation and execution reveals the contribution of mirror and motor neurons to the mu-rhythm. *Neuroimage*, 2018, vol. 175, no. 22, pp. 22-31. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.03.037
4. Rizzolatti G., Fadiga L., Gallese V., Fogassi L. Premotor cortex and the recognition of motor actions. *Cogn. Brain Res*, 1996, vol. 3, no. 2, pp. 131-141. doi: 10.1016/0926-6410(95)00038-0
5. Mukamel R., Ekstrom A. D., Kaplan J., Lacoboni M., Fried I. Single-Neuron Responses in Humans during Execution and Observation of Actions. *Curr Biol*. 2010, vol. 20, no. 8, pp. 750-756. doi: 10.1016/j.cub.2010.02.045
6. Perry A., Bentin S. Mirror activity in the human brain while observing hand movements: a comparison between EEG desynchronization in the mu-range and previous fMRI results. *Brain Res*, 2009, vol. 1282, pp. 126-132. doi: 10.1016/j.brainres.2009.05.059.
7. Makeig S., Bell A.J., Jung T.P., Sejnowski T.J. Independent component analysis of Electroencephalographic data. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 1996, vol. 8, pp. 145-151.
8. Базанова О.М. Вариабельность и воспроизводимость индивидуальной частоты альфа-ритма ЭЭГ в зависимости от экспериментальных условий. *Журнал высшей нервной деятельности*, 2011, т. 61, № 1, с. 102-111. [Bazanova. O.M. Individual Alpha Peak Frequency Variability and Reproducibility in Dependence on the Experimental Conditions. *Journal of Higher Nervous Activity*, 2011, vol. 61, no. 1, pp. 102-111. (In Russ.)]

ANALYSIS OF SENSORIMOTOR MU RHYTHM EPILEPSY USING ICA

Karimova E.D.^{1,2}, Katermin¹ N.S., Burkitbaev^{1,2} S.E.¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS (IHNA&NPh RAS)

Moscow, Russia

² Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department

5A Butlerova St., Moscow 117485, Russia; e-mail: nkatermin@yandex.ru

Abstract. Due to the increasing interest of neurophysiologists in the topic of neurocomputer interfaces and tasks for the perception and presentation of motor acts, the problem of studying and isolating sensorimotor mu-rhythm has become extremely urgent. In this paper the sensorimotor rhythm of the electroencephalogram was distinguished using the method of independent components in patients with epilepsy (19 people) and healthy subjects (21 people). As part of the study of the mirror neuron system (MNS), the task was to identify components corresponding to the sensorimotor rhythm from the recorded EEG signal, as well as analyze the characteristics of these components when observing and performing motor acts in patients with focal symptomatic epilepsy compared to the control group of healthy subjects. To calculate independent components, the infomax algorithm was used, the selection of components corresponding to the sensorimotor rhythm was carried out according to a set of signs: localization in the region of the sensorimotor cortex, the frequency ranges of 8-13 Hz, a decrease in power when performing movement compared to a background sample. Next, the reactivity of the mu-rhythm components in the samples with performing and observing movements, reflecting the activation of MNS, was evaluated. An analysis of the characteristic features of the dynamics of the sensorimotor rhythm of the two groups was carried out. Also, the reactivity of the sensorimotor mu-rhythm was estimated by analyzing the output signal of the C3, C4, Cz electroencephalogram by the fast Fourier transform (FFT) method. The results obtained by the two methods were compared to determine a more precise method of isolating mu-rhythm. The hypothesis that there were statistical differences in the level of sensorimotor rhythm desynchronization in epilepsy patients and controls was also tested.

Key words: EEG, independent components analysis (ICA), sensorimotor rhythm, epilepsy, mirror neuron system.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА НА НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ ГЛИКИРОВАНИЕ БИОМОЛЕКУЛ

Шумаев К.Б.^{1,2}, Космачевская О.В.¹, Топунов А.Ф.¹, Насыбуллина Э.И.¹,
Мартусевич А.К.⁴, Рууге Э.К.^{2,3}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»
Ленинский пр., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: tomorov@mail.ru

² Национальный исследовательский центр кардиологии Минздрава России,
3-я Черепковская ул., 15а, г. Москва, 121552, РФ

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/2, г. Москва, 119991, РФ

⁴ Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России
пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603005, РФ

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. Процессы модификации биомолекул при окислительном и карбонильном стрессе взаимосвязаны и во многом определяются генерацией свободных радикалов. Активные карбонильные соединения, например, метилглиоксаль реагируют с аминокетонами белков и аминокислот с образованием оснований Шиффа, в том числе диалкилиминов. Эти реакции являются первой стадией неферментативного гликирования, в ходе которого также возникают свободнорадикальные интермедиаты. Вместе с тем известно, что оксид азота взаимодействует с конечными продуктами гликирования. Нами установлено, что доноры оксида азота (РАРА/NO, S-нитрозотиолы) усиливают продукцию органических свободных радикалов в реакции неферментативного гликирования L-лизина и N α -ацетиллизина под действием метилглиоксаля. Напротив, такие метаболиты оксида азота (NO) как глутатион-содержащие динитрозильные комплексы железа и нитроксил снижают уровень этих радикалов. Выдвинуто предположение, что эффект оксида азота и S-нитрозотиолов связан с образованием редокс-активных соединений, которые в свою очередь являются медиаторами продукции свободных радикалов. С другой стороны, нитроксил и динитрозильные комплексы железа выступают в качестве антиоксидантов и антигликирующих агентов. Мы полагаем, что двойственное действие NO и его физиологических производных играет важную роль при модификации биомолекул в ходе диабетической гипергликемии.

Ключевые слова: неферментативное гликирование, метилглиоксаль, свободные радикалы, оксид азота, S-нитрозотиолы, спектроскопия ЭПР.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что неферментативное гликирование биомолекул приводит к их модификации и инактивации [1-6]. У человека эти процессы лежат в основе карбонильного стресса и наблюдается в условиях диабетической гипергликемии. Следует также отметить, что при карбонильном стрессе накапливаются активные карбонильные соединения, в частности продукт метаболизма глюкозы альфа-кетальдегид метилглиоксаль. Ранее было показано, что в ходе неферментативного гликирования в реакциях аминокислот или белков с метилглиоксалем образуются различные свободные радикалы [1,3]. Показано, что при взаимодействии метилглиоксаля с аминокетонами аминокислот и белков образуются основания Шиффа, в том числе диалкилимины. В результате одноэлектронного окисления диалкилимина метилглиоксалем образуется анион радикал последнего и катион-радикал основания Шиффа:



В присутствии кислорода метилглиоксаль⁻ окисляется с образованием супероксидного анион-радикала [1,3]. Считается также, что дисфункция эндотелия при карбонильном стрессе связана с изменением уровня оксида азота (NO) [7,8]. В культуре клеток гладких мышц аорты метилглиоксаль стимулирует образование оксида азота индуцибельной NO-синтазой [7]. Кроме того, в этих условиях возрастает концентрация супероксидного радикала, при взаимодействии которого с NO формируется такой сильный окислитель как пероксинитрит. Вместе с тем, ассоциированная с сахарным диабетом артериальная гипертензия может быть следствием как вызванного метилглиоксалем окислительного стресса, так и ингибирования этим активным карбонильным соединением фосфорилирования эндотелиальной NO-синтазы [8]. С другой стороны, в литературе имеются данные о взаимодействии NO с продуктами неферментативного гликирования биологически важных молекул [2,4,5]. Так показано, что различные доноры NO ингибируют образование продуктов конечного гликирования (пентозидинов) [2]. Ранее нами было выяснено, что при неферментативном гликировании гемоглобина метилглиоксалем S-нитрозоглутатион участвует в модификации гемовой группы [5]. Из сказанного выше

следует, что существуют различные механизмы взаимного влияния NO и метилглиоксала при карбонильном стрессе, однако далеко не все они изучены.

В данной работе исследовали влияние метаболитов NO (S-нитрозотиолы, динитрозильные комплексы железа, нитроксил) и синтетического донора оксида азота (PAPA/NONO) на формирование органических свободных радикалов при неферментативном гликировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали метилглиоксаль, L-лизин, N α -ацетиллизин и восстановленный глутатион (GSH) производства фирмы «Sigma» США. PAPA/NONO (3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин) и соль Ангели были получены от фирмы «Cauman Chemical Europa» Эстония.

S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) синтезировались как описано в работах [4,5]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами получали, смешивая растворы FeSO₄ и GSH в молярном соотношении 1:2 в сосуде Тунберга в атмосфере NO. S-Нитрозоглутатион (GSNO) и S-нитрозоцистеин получали, смешивая эквимольные концентрации NaNO₂ и тиолов в кислой среде. Синтезированные препараты ДНКЖ и S-нитрозотиолов хранили при температуре жидкого азота (–196°C). Спектры поглощения GSNO и S-нитрозоцистеина записывали на спектрофотометре Beckman Coulter Δ 650 (США). Концентрацию S-нитрозотиолов определяли по величине оптического поглощения при 335 нм ($\epsilon_{335} = 920 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (~25°C) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США). Условия регистрации: СВЧ мощность 20 мВт, СВ частота 9,15 ГГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0,2 мТл. Запись спектров начинали через 1 мин после смешивания реакционных компонентов. Реакционную смесь (120 мкл) вводили в газопроницаемые тефлоновые капилляры PTFE 22 («Zeus Industrial Products», США). Капилляры помещали в кварцевую трубку, через которую в ходе измерения постоянно продували азот. Это позволяло поддерживать в реакционной среде условия гипоксии и регистрировать органические свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии аминокислот и метилглиоксала. Статистический анализ результатов проводился с использованием t-критерия и теста ANOVA при помощи программы Origin 8. Различия между экспериментальными данными считались значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для моделирования неферментативного гликирования при карбонильном стрессе использовали реакцию метилглиоксала с L-лизином и N α -ацетиллизином. Последний использовался как аналог остатка лизина в белках. При продувке реакционной среды азотом с помощью спектроскопии ЭПР обнаружено образование анион-радикала метилглиоксала и катион-радикала диалкилиммина (основания Шиффа) (рис. 1А). Установлено, что продукцию этих свободных радикалов существенно стимулирует PAPA/NONO и такие физиологические доноры оксида азота как S-нитрозоцистеин и S-нитрозоглутатион, причём последние были более эффективны (рис. 1 и 2).

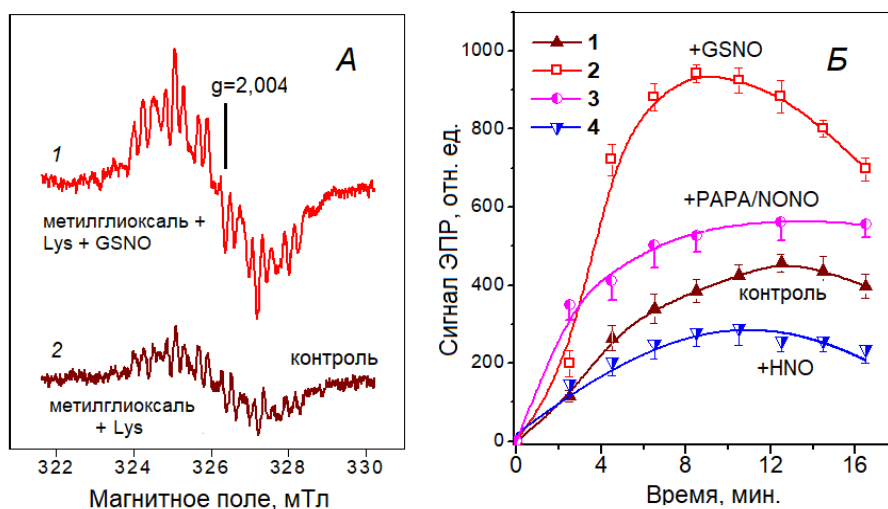


Рисунок 1. Влияние доноров и метаболитов NO на образование органических свободных радикалов в реакции L-лизина с метилглиоксалем. А: (1) – спектры ЭПР зарегистрированные в реакционной среде содержащей 100 мМ L-лизина, 100 мМ метилглиоксала в 0,2 М K₂Na-фосфатном буфере, pH 8,5; (2) – (1) + 4 мМ S-нитрозоглутатиона (GSNO). Спектры регистрировались после 6,5 мин инкубации при продувке азотом. Б: Кинетики образования свободных радикалов. (1) – контроль; (2) – (1) + 4 мМ GSNO; (3) – (1) + 4,8 мМ PAPA/NONO; (4) – (1) + 4 мМ соли Ангели (донор HNO)

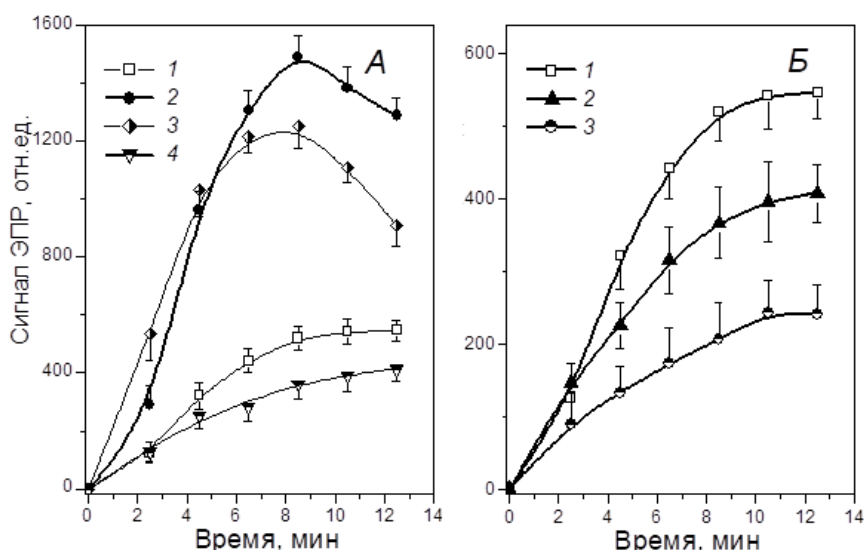


Рисунок 2. Влияние S-нитрозотиолов и GS-ДНКЖ (А), HNO и GSH (Б) на кинетику образования анион-радикала метилглиоксала и катион радикала диалкилимина в реакции N α -ацетиллизина и метилглиоксала. Панель А - состав среды: 160 мМ N α -ацетиллизина, 160 мМ метилглиоксала, 1 мМ ДТПА, а также 4 мМ GS-NO (2) или 4 мМ S-нитрозоцистеина (3) или 1 мМ GS-ДНКЖ. Состав среды (Б) тот же, что и (А), но вместо S-нитрозотиолов добавлены 4 мМ соли Ангели (2) или 4 мМ восстановленного глутатиона (3). Кривые (1) на обеих панелях отражают кинетику образования свободнорадикальных интермедиатов без добавок

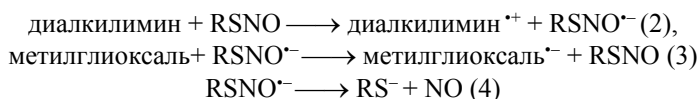
В то же время, продукт одноэлектронного восстановления NO - нитроксил (HNO) снижал уровень свободнорадикальных интермедиатов неферментативного гликирования (рис. 1Б, кривая 4 и рис. 2Б, кривая 2). Аналогичный эффект наблюдался при введении в реакционную среду содержащих глутатион динитрозильных комплексов железа (GS-ДНКЖ) (рис. 2А, кривая 4).

Нельзя исключить, что в свободнорадикальных реакциях, возникающих в ходе неферментативного гликирования участвуют ионы примесного железа. Тем не менее, добавление в реакционную среду хелатора железа ДТПА (диэтиленetriаминпентауксусной кислоты) практически не влияло на наблюдаемые эффекты.

Вместе с тем, продукт одноэлектронного восстановления NO - нитроксил (HNO) снижал уровень свободнорадикальных интермедиатов неферментативного гликирования (рис. 1Б, кривая 4 и рис. 2Б, кривая 2). Аналогичный эффект наблюдался при введении в реакционную среду содержащих глутатион динитрозильных комплексов железа (GS-ДНКЖ) (рис. 2А, кривая 4).

Нельзя исключить, что в свободнорадикальных реакциях, возникающих в ходе неферментативного гликирования участвуют ионы примесного железа. Тем не менее, добавление в реакционную среду хелатора железа ДТПА (диэтиленetriаминпентауксусной кислоты) практически не влияло на наблюдаемые эффекты.

Продукция свободнорадикальных интермедиатов может стимулироваться как S-нитрозотиолами (RSNO), так и образующимся при их декомпозиции NO. Действительно, в реакционной среде содержащей метилглиоксаль и L-лизин происходит быстрое разрушение S-нитрозоглутатиона. Декомпозиция RSNO может проходить в следующих реакциях:



Мы полагаем, что медиатором одноэлектронного окисления диалкилимина метилглиоксальем (реакции 1) являются редокс-активные производные S-нитрозотиолов и NO. В качестве таких медиаторов могут функционировать анион-радикалы RSNO $^{\bullet-}$ и соединения, возникающие в результате нитрозилирования продуктов реакции неферментативного гликирования. В отличие от S-нитрозотиолов, которые в реакции 2 являются окислителем, нитроксил, по-видимому, выступает в качестве восстановителя свободных радикалов. GS-ДНКЖ также могут восстанавливать свободные радикалы, образующиеся в реакции 1, поскольку в их состав входит глутатион. Лигандами GS-ДНКЖ является восстановленный глутатион (GSH) в анионной форме {формула этих комплексов: (GS $^-$) $_2$ Fe $^{+}$ (NO $^+$) $_2$ }. Кроме того, GSH реагирует с метилглиоксальем с образованием тиогемацетала. Так ранее нами было показано, что тиол-содержащие ДНКЖ могут модифицироваться метилглиоксальем [4]. Действительно, в наших экспериментах GSH снижает уровень регистрируемых свободных радикалов (рис 2Б, кривая 3). По всей видимости, в условиях карбонильного стресса ДНКЖ и нитроксил действуют как антиоксиданты и антигликирующие агенты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, свободный NO и его метаболиты могут оказывать разнонаправленное действие на образование органических свободных радикалов в реакции метилглиоксали с аминокислотами. Эти данные согласуются с тем, что NO обладает дихотомическим действием при окислительном и карбонильном стрессе. Такой «Янус эффект» оксида азота, вероятно, определяется различными редокс-свойствами физиологических производных NO и может играть важную роль при развитии патологических процессов, связанных с диабетом.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 19-015-00444.

Список литературы/References:

1. Lee C., Yim M.B., Chock P. B., Yim H.S., Kang S.O. Oxidation-Reduction Properties of Methylglyoxal-modified Protein in Relation to Free Radical Generation. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, no. 39, pp. 25272-25278. doi: 10.1074/jbc.273.39.25272
2. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. *Kidney Int.*, 2000, vol. 58, no. 4, pp. 1780-1787. doi: 10.1111/j.1523-1755.2000.00340.x
3. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Э.К., Ланкин В.З. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями. *Биохимия*, 2009, т. 74, № 4, с. 568-574. [Shumaev K.B., Gubkina S.A., Kumsikova E.M., Shepelkova G.S., Ruuge E. K., Lankin V.Z. Superoxide Formation as a Result of Interaction of L-Lysine with Dicarboxyl Compounds and Its Possible Mechanism. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, vol. 74, no. 4, pp. 461-466. (In Russ.)]
4. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Бурбаев Д.Ш., Мох В.П., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Образование нового типа динитрозильных комплексов железа, связанных с цистеином, модифицированным метилглиоксалем. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 2, с. 239-245. [Shumaev K.B., Gubkina S.A., Vanin A.F., Burbaev D.Sh., Mokh V.P., Topunov A.F., Ruuge E.K. Formation of a new type of dinitrosyl iron complexes bound to cysteine modified with methylglyoxal. *Biofizika*, 2013, vol. 58, no 2, pp. 239-245. (In Russ.)]
5. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of Nitri- and Nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 2014, vol. 52, no. 1, pp. 161-168. doi: 10.1515/ccbm-2012-0792
6. Ланкин В.З., Шумаев К.Б., Тихазе А.К., Курганов Б.И. Влияние дикарбониллов на кинетические характеристики глутатионпероксидазы. *Доклады академии наук*, 2017, т. 475, № 6, с. 706-709. doi: 10.7868/S0869565217240227 [Lankin V.Z., Shumaev K.B., Tikhaze A.K., Kurganov B.I. Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 475, no. 1, pp. 287-290. doi: 10.1134/S1607672917040123 (In Russ.)]
7. Chang T., Wang R., Wu L. Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 2005, vol. 38, no. 2, pp. 286-293. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.034
8. Turkseven S., Ertuna E., Yetik-Anacak G., Yasa M. Methylglyoxal causes endothelial dysfunction: the role of endothelial nitric oxide synthase and AMP-activated protein kinase α . *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2014, vol. 25, no. 1, pp. 109-115. DOI: 10.1515/jbcpp-2013-0095

INFLUENCE OF VARIOUS NITRIC OXIDE DONORS ON NON-ENZYMATIC GLYCATION OF BIOMOLECULES

Shumaev K.B.^{1,2}, Kosmachevskaya O.V.¹, Topunov A.F.¹, Nasybullina E.I.¹, Martusevich A.K.⁴, Ruuge E.K.^{2,3}¹ Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences»*Leninsky prospect, 33, build. 2, Moscow, 19071, Russia; e-mail: tomorov@mail.ru*² National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of Russian Federation,*3-ya Cherepkovskaya str., 15a, Moscow, 121552, Russia*³ Lomonosov Moscow State University*Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991, Russia*⁴ Privolzhsky Research Medical University*Nizhny Novgorod, 603005, Russia*

Abstract. It is known that the modification of biomolecules under conditions of oxidative and carbonyl stress is associated with the generation of free radicals. Active carbonyl compounds, for example, methylglyoxal react with amino groups of proteins and amino acids to form Schiff bases, including dialkylimines. During these reactions of non-enzymatic glycation, free radical intermediates are also formed. At the same time, it is known that nitric oxide (NO) interacts with the advanced glycation end-products. Our study reveals that donors of nitric oxide (PAPA/NONO, S-nitrosothiols) stimulate the production of organic free radicals in the reaction of non-enzymatic glycation of amino acids under methylglyoxal. In contrast, NO metabolites such as glutathione-containing dinitrosyl iron complexes and nitroxyl (HNO) reduce the level of these radicals. It is suggested that the effect of nitric oxide and S-nitrosothiols is associated with the formation of redox-active compounds, which in turn are mediators of free radical production. On the other hand, HNO and dinitrosyl iron complexes act as antioxidants and antiglycating agents. We believe that the dual action of NO and its derivatives plays a critical role in modifying biomolecules during diabetic mellitus.

Key words: non-enzymatic glycation, methylglyoxal, free radicals, nitric oxide, S-nitrosothiols, EPR spectroscopy.

АНАЛИЗ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Самцов М.П.¹, Тарасов Д.С.¹, Малюшкова Е.В.², Хлудеев И.И.³,
Луговский А.П.¹, Семак И.В.²

¹ Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко Белорусского государственного университета
г. Минск, Беларусь

² Белорусский государственный университет
г. Минск, Беларусь

³ Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
ул. П. Бровки, 6, г. Минск, 220013, Беларусь; e-mail: ivan2khl@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.07.2021

Аннотация. В статье представлены результаты исследований комплексообразования трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Основная полоса поглощения исследуемых красителей находится в ближней ИК-области, что затрудняет их визуальное обнаружение на электрофореграмме. В связи с этим определение локализации красителей осуществлялось по их флуоресценции с помощью лазерного флуоресцентного спектрометра. Для сканирования гелей с координатной привязкой использовалось устройство, представляющее собой платформу, перемещаемую микрометрическими винтами, на которой перпендикулярно плоскости измерения закреплялся держатель оптоволоконного спектрометра. Сканирование гелей проводили до стадии окрашивания и визуализации белков, во время которой обнаруживалась необратимая деструкция трикарбоцианиновых красителей. Координаты фиксировались относительно границ гелей, что позволяло совместить на электрофореграмме распределение белков и индотрикарбоцианиновых красителей. Белки в комплексах с красителями идентифицировали по их молекулярной массе. На примере исследования с использованием гель-электрофореза растворов сыворотки крови человека и бычьего сывороточного альбумина, окрашенных трикарбоцианиновыми красителями, показана возможность обнаружения и идентификации комплексов красителей с белками сыворотки крови. В результате было обнаружено, что трикарбоцианиновые красители с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком способны образовывать ковалентные комплексы с альбумином и аполипопротеином А-I, основным структурным элементом липопротеинов высокой плотности. Было показано, что полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да на концевых группах красителей не влияют на это свойство.

Ключевые слова: трикарбоцианиновые красители, комплексообразование, белки плазмы крови, гель-электрофорез, лазерно-индуцированная флуоресцентная спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых материалов и методов в области медицины и биотехнологий является общемировым трендом в направлениях развития научных исследований. Полиметиновые красители (ПК) благодаря широким возможностям структурной модификации стали важным объектом исследований для различных медико-биологических приложений. В НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ целенаправленно ведется разработка фотосенсибилизаторов (ФС) на основе трикарбоцианиновых красителей для тераностики злокачественных новообразований. По результатам комплексных исследований фотофизических свойств ряда индотрикарбоцианиновых красителей в модельных средах и опухолевых моделях на экспериментальных животных *in vivo* выделен краситель с оптимальными свойствами [1]. Отличительными особенностями его структуры являются наличие хлорзамещенного ортофениленового мостика в цепи сопряжения и двух цепочек полиэтиленгликолей (ПЭГ) с молекулярной массой 300 Да, которые ковалентно связаны с концевыми группами. Структурная модификация с помощью полиэтиленгликолей обеспечила новому фотосенсибилизатору высокую растворимость в воде и биосовместимость.

Эффективность ФС во многом зависит от избирательности его накопления в опухолевых тканях. Большое количество исследований посвящено разработкам новых способов адресной доставки препаратов. Один из путей решения этого вопроса – использование комплексов молекул ФС с носителями, которые обеспечивают эффективное накопление в опухолевых клетках. В этом плане отдельного внимания в качестве эндогенных переносчиков заслуживают компоненты плазмы крови – белки и липопротеины. В работе [2] с помощью методов спектрофотометрии и эксклюзионной хроматографии показано образование комплексов трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови. Однако, использованные в работе методы не позволяли точно определить с какими именно белковыми структурами образуются комплексы, а также установить характер связи в них.

Электрофоретический метод разделения белков стандартно используется для идентификации белков по их молекулярной массе [3]. Можно ожидать, что комплексы трикарбоцианиновых красителей, ковалентно связанные с белками плазмы крови, будут обнаруживаться на электрофореграмме в полосах соответствующих

белков. В частности, такой подход используется в исследованиях с помощью гель-электрофореза протеинов, окрашенных коммерческими флуоресцентными маркерами на основе полиметиновых красителей Су3 и Су5 [4]. Данная работа посвящена исследованию окрашивания трикарбоцианиновыми красителями белков сыворотки крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

МЕТОДИКА

Основным объектом исследования выступал разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель ПК220, который по многим параметрам перспективен для использования в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии (ФДТ) [1], а также два близких по структуре красителя – ПК154 и ПК222. У первого по сравнению с ПК220 отсутствуют полиэтиленгликоли на концевых группах, а у второго – хлорзамещенный ортофениленовый мостик.

В качестве модельных сред использовали 5 % раствор сыворотки крови человека (СКЧ), а также раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА, концентрация белка 2 г/л). Сыворотку крови получали путем свертывания крови и осаждения клеточного сгустка центрифугированием. Альбумин является основным транспортным белком сыворотки крови [5,6], что обуславливает важность исследований взаимодействия красителей с ним. С другой стороны, это хорошая модель с одним типом белка для отработки методики анализа окрашенных красителями белковых растворов.

Растворы готовили в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с pH=7,4 (ФСБ). Концентрация белков в анализируемых на электрофорезе образцах составляла порядка 30 мкМ, что обеспечило эффективное обнаружение различных белковых фракций. Стоковые растворы красителей готовили в ФСБ. Краситель ПК154 обладает низкой растворимостью в воде, поэтому стоковый раствор для него готовили с добавлением 5% этанола. Исследования проводили для двух концентраций красителей – 30 мкМ и 10 мкМ.

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Solar PV1251. Люминесцентные характеристики изучали с помощью спектрофлуорометра Fluorolog. В отдельных экспериментах использовали лазерный флуоресцентный спектрометр с длиной волны возбуждающего лазера 684 нм [7], в котором подвод возбуждающего излучения к исследуемому образцу и отвод свечения флуоресценции в полихроматор осуществлялся с помощью оптоволоконка.

Анализ связывания красителей с белками в растворах СКЧ и БСА выполняли с помощью электрофореза белков по методу Лэмли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE). Электрофоретическое разделение белков проводили в 15% полиакриламидном геле в диссоциирующих условиях. Визуальное обнаружение локализации исследованных красителей на электрофореграмме затруднительно в связи с тем, что основная полоса поглощения исследуемых красителей располагается в области 700-800 нм. Поэтому, для регистрации расположения молекул красителей в белковых фракциях в результате гель-электрофореза использовано устройство, состоящее из перемещаемой микрометрическими винтами платформы, над которой перпендикулярно плоскости измерения закреплен держатель световода лазерного флуоресцентного спектрометра. Координаты локализации молекул красителей в составе белков определяли по устойчивому превышению сигнала флуоресценции красителей по сравнению с фоновым, который регистрировался вне области расположения гелевой пластины с белковыми полосами относительно световода. В связи с тем, что на стадии окрашивания используются агрессивные среды, которые приводят к необратимой деструкции индотрикарбоцианиновых красителей, места локализации красителей на электрофореграмме определяли до начала обработки гелевой пластины 30% раствором трихлоруксусной кислоты и процедуры окрашивания и визуализации полос белков раствором Кумасси. В обоих случаях координаты фиксировались относительно границ геля, что позволило совместить в последствии расположение белковых полос и индотрикарбоцианиновых красителей на электрофореграмме. Отсутствие деструкции красителей на стадии электрофоретического разделения белков подтверждено спектральными измерениями при моделировании соответствующих условий в кювете.

После детектирования красителя осуществляли осаждение белков в геле с помощью 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Далее проводили окрашивание раствором Кумасси. После окрашивания, гель отмывали 7% уксусной кислотой до полного обесцвечивания фона. Имеющееся в распоряжении оборудование позволяет исследовать на одной электрофореграмме до 9 образцов. Для определения молекулярной массы белков в одну из лунок вносили набор белков-стандартов с известными молекулярными массами – от 10 кДа до 200 кДа. Полученные визуализированные электрофореграммы исследуемых образцов фиксировали с помощью фотокамеры, и на снимки переносили координаты обнаружения красителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные характеристики красителей в фосфатно-солевом буфере определяются процессом агрегации молекул в водном окружении. В водном окружении гидрофобный краситель ПК154 без ПЭГ склонен к сильной агрегации по Н- и J-типу в зависимости от концентрации красителя, pH раствора и температуры [8]. В спектрах поглощения его растворов в ФСБ обнаруживаются полосы, соответствующие мономерам, Н- и J-агрегатам (рис. 1). Максимум полосы поглощения мономеров располагается вблизи 707 нм. Краситель ПК220

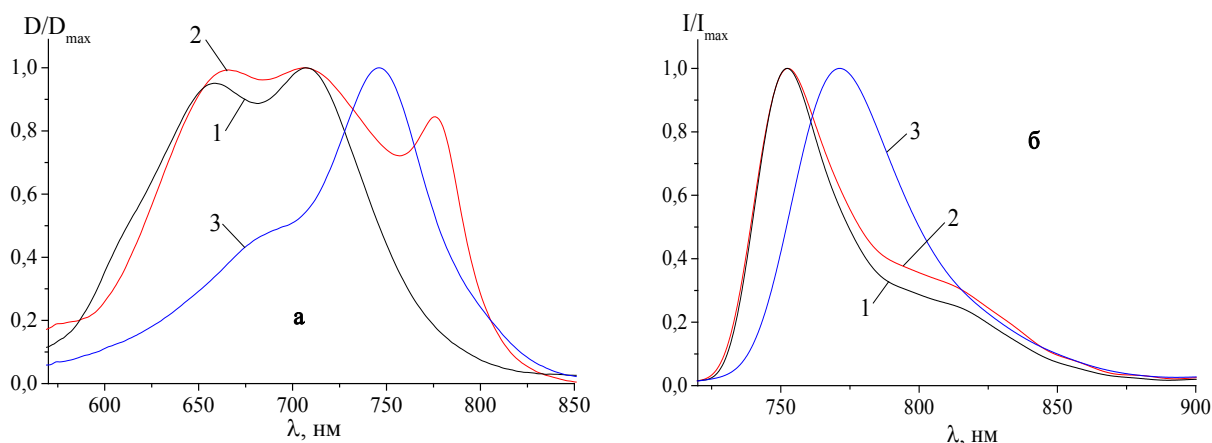


Рисунок 1. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм растворов трикарбоцианиновых красителей (10 мкМ) в фосфатно-солевом буфере Дюльбекко (0,14М, рН 7,4): 1 – ПК220, 2 – ПК154, 3 – ПК222

гидрофильный [9], его растворы в ФСБ представляют собой равновесную смесь мономеров и димеров Н-типа. Максимум поглощения мономеров располагается на длине волны 708 нм. Следует отметить, что при одинаковой концентрации краситель ПК220 в ФСБ агрегирован в меньшей степени по сравнению с его прекурсором без ПЭГ – ПК154. Анализ спектрально-люминесцентных свойств ПК222 в растворах в ФСБ позволяет утверждать, что его молекулы находятся преимущественно в форме мономеров (максимум поглощения – 746 нм).

Спектральные параметры растворов ПК220 и ПК154 в присутствии белковых молекул сыворотки крови (рис. 2) существенно отличаются от таковых в ФСБ: наблюдается смещение максимума поглощения (ПК220 – 723 нм, ПК154 – 730 нм) и флуоресценции (ПК220 – 757 нм, ПК154 – 757 нм) в длинноволновую область, уменьшается поглощение в полосе агрегатов, возрастает квантовый выход и время жизни флуоресценции.

Подобное батохромное смещение положения спектров для данных красителей наблюдается при переходе от полярных растворителей к малополярным. Следовательно, в растворах с сывороткой крови молекулы красителей находятся в микроокружении с более низкой полярностью вследствие образования комплексов с белковыми молекулами. При эквимоллярной концентрации белков и красителей (30 мкМ) в основной полосе поглощения наряду с интенсивной полосой мономеров наблюдается и полоса ассоциатов красителя. В растворах с пониженной концентрацией красителей (10 мкМ) при сохранении концентрации белков ~30 мкМ уменьшается поглощение в полосе ассоциатов (коротковолновый край основной полосы), точное определение степени ассоциации красителей требует более детальных исследований. Для анализа окрашенных красителями растворов СКЧ с помощью электрофореза важно учитывать, что связывание молекул красителей происходит в мономерной и агрегированной формах. Не обнаружено влияние белков сыворотки крови на спектрально-люминесцентные свойства ПК222, у которого отсутствует хлорзамещенный ортофениленовый мостик на полиметиновой цепи сопряжения.

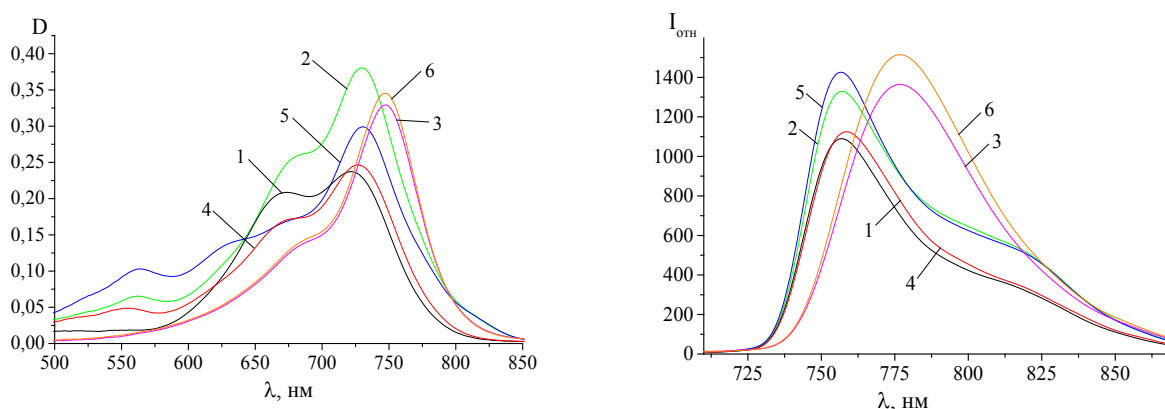


Рисунок 2. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) при возбуждении излучением с длиной волны 684 нм растворов трикарбоцианиновых красителей (30 мкМ) в СКЧ для денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле: 1 – ПК220, 22 °С; 2 – ПК154, 22 °С; 3 – ПК222, 22 °С; 4 – ПК220, 37 °С; 5 – ПК154, 37 °С; 6 – ПК222, 37 °С

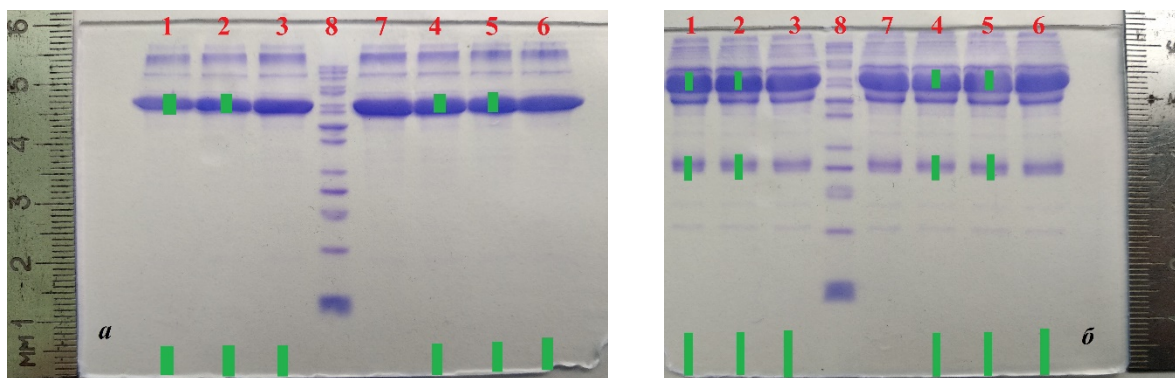


Рисунок 3. Электрофореграммы окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов БСА (а) и СКЧ (б): 1 – ПК220, 22 °С; 2 – ПК154, 22 °С; 3 – ПК222, 22 °С; 4 – ПК220, 37 °С; 5 – ПК154, 37 °С; 6 – ПК222, 37 °С; 7 – раствор без красителей; 8 – набор белков стандартов с известными молекулярными массами

Характерное время образования комплексов красителей ПК220 и ПК154 с белками в растворах СКЧ и БСА удалось оценить путем измерения спектров флуоресценции с помощью лазерного флуоресцентного спектрометра. При добавлении СКЧ или БСА в ФСБ происходит смещение в длинноволновую область спектра флуоресценции данных красителей в пределах времени регистрации сигнала спектрометром (200–500 мс). С течением времени после введения наблюдается медленная деформация спектров поглощения и флуоресценции – смещение в длинноволновую область, которая наиболее выражена у ПК220. Скорость данного процесса зависит от температуры, при комнатной температуре (~ 20 °С) выход на квазистационарное состояние занимает ~ 24 часов, при 37 °С ~ 100 –140 минут [2]. В связи с этим исследования на электрофорезе проводились для двух серий образцов, которые инкубировали при комнатной температуре (22 °С) или в течение 120 минут при 37 °С.

В результате сканирования лазерным флуоресцентным спектрометром гель-электрофореграммы обнаружено несколько позиций с выраженным сигналом, близким по спектральному составу с сигналом флуоресценции исследованных красителей. На фотографиях гелей после окрашивания эти позиции отмечены метками (рис. 3). В пределах полос, соответствующих положению белков, не окрашенных красителями, никакого свечения при возбуждении лазером с длиной волны 684 нм не наблюдали.

Прежде всего, следует обратить внимание на сигнал флуоресценции вблизи полосы белков с молекулярной массой (72 ± 4) кДа в образцах, окрашенных красителями ПК220 и ПК154 растворов БСА. Сигнал флуоресценции наблюдали для двух серий: без и с инкубацией при 37 °С в течение 2 часов. Молекулярная масса бычьего сывороточного альбумина – 69 кДа, учитывая пространственное разрешение сканирующей системы, можно утверждать, что флуоресценция в данной области соответствует ковалентным комплексам ПК220 и ПК154 с альбумином.

Выраженный сигнал флуоресценции ПК220 и ПК154 вблизи полосы альбумина человека (66,5 кДа) также обнаружен на электрофореграмме образцов в растворах СКЧ – (68 ± 4) кДа. В работах [10–12] отмечали способность к образованию ковалентного комплекса с альбумином красителей, имеющих в своей структуре хлор в мезо-положении. Наиболее вероятный путь – это взаимодействие с единственным свободным остатком Cys34 в молекуле САЧ с замещением мезо-Cl в молекуле красителя [12].

Интенсивность флуоресценции ПК в пределах полосы альбумина для образцов, которые инкубировались при 37 °С в течение 2 часов, приблизительно в 4 раза больше по сравнению с образцами без инкубации. Это подтверждает растянутый во времени процесс образования вторичных комплексов.

Для всех красителей обнаружен интенсивный сигнал флуоресценции на нижнем краю геля. Согласно экстраполяции стандарта, эта область соответствует приблизительно 1,5–6,0 кДа. При этом после окрашивания геля здесь не обнаруживаются визуальное присутствие каких-либо белков. Молекулярная масса исследованных красителей: ПК154 – 740 г/моль, ПК220 – 1270 г/моль, ПК222 – 1117 г/моль. Учитывая точность определения координаты, справедливо утверждать, что в данной области обнаруживаются несвязанные с белками красители.

В пределах полос разделения образцов ПК220 и ПК154 в СКЧ обнаружен также сигнал флуоресценции красителя вблизи полосы белков с молекулярной массой (25 ± 3) кДа, где располагается полоса аполипротеина А-1 (АроА-1, 24,7 кДа). Данный белок является основным структурным элементом липопротеинов высокой плотности (ЛВП) [13]. В работе [14] показано, что при гель-электрофорезе в полиакриламидном геле данный белок наблюдается для ЛВП всех типов и в следовых количествах у липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Основным структурным элементом ЛНП является аполипротеин В (АроВ). В человеческой плазме он существует в двух основных изоморфных формах АроВ-100 (550 кДа) и АроВ-48 (264 кДа) и в условиях денатурирующего гель-электрофореза аполипротеины В наблюдаются в соответствующих белковых полосах [15]. Однако в настоящей работе использовался электрофорез с параметрами разделяющего раствора для диапазона молекулярных масс 10–200 кДа.

Постоянство спектральных параметров ПК222 в растворах с белками сыворотки крови, а также то обстоятельство, что при электрофоретическом разделении окрашенных данным красителем растворов СКЧ и БСА достоверный сигнал флуоресценции обнаружен только в области несвязанного с белками красителя,

позволяют утверждать, что ковалентное связывание трикарбоцианиновых красителей с альбумином и липопротеинами высокой плотности сыворотки крови происходит с участием хлорзамещенного ортофениленового мостика. Полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да не влияют на эффективность образования трикарбоцианиновыми красителями ковалентных комплексов с альбумином и липопротеинами высокой плотности.

Таким образом, проведенное исследование с помощью гель-электрофореза окрашенных трикарбоцианиновыми красителями растворов сыворотки крови человека и бычьего сывороточного альбумина показало возможность обнаружения и идентификации комплексов ПК с белками сыворотки крови. Установлено, что трикарбоцианиновые красители с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком способны образовывать ковалентные комплексы с альбумином и липопротеинами высокой плотности. Показано, что полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да на концевых группах не препятствуют процессу комплексообразования.

Список литературы/References:

1. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevsky K.N. et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2016, vol. 316, pp. 31-36.
2. Белько Н.В., Хлудеев И.И., Зорин В.П. и др. Влияние комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики трикарбоцианиновых красителей. *Весті БДПУ. Серія 3. Фізика. Математика. Інфарматика. Біологія. Географія*, 2018, т. 1, с. 14-20. [Belko N.V., Khludeev I.I., Zorin V.P. et al. Effect of complexation with blood plasma proteins on the spectral characteristics of tricarbocyanine dyes. *Vesci BDPU. Gray 3. Physics. Matematika. Infarmatika. Bialogia. Geography*, 2018, vol. 1, pp. 14-20. (In Russ.)]
3. Hames B.D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford, OUP, 1998, vol. 197.
4. Hamada A., Sharma R., Du Plessis S.S. et al. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis-based proteomics of male gametes in relation to oxidative stress. *Fertility and sterility*, 2013, vol. 99, no. 5, pp. 1216-1226.
5. Tillement J.P., Houin G., Zini R. et al. The binding of drugs to blood plasma macromolecules: Recent advances and therapeutic significance. *Adv. Drug Res.*, 1984, vol. 13, pp. 59-94.
6. Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 2005, vol. 41, no. 6, pp. 1211-1219.
7. Ермалицкий Ф.А., Радко А.Е., Каплевский К.Н. и др. Спектрометрический комплекс для фотохимиотерапии с мощным светодиодом. *Лазерная и оптико-электронная техника*, 2008, с. 254-263. [Ermalitsky F.A., Radko A.E., Kaplevsky K.N. et al. Spectrometric complex for photochemotherapy with a powerful light-emitting diode. *Laser and optoelectronic engineering*, 2008, pp. 254-263. (In Russ.)]
8. Белько Н.В., Самцов М.П., Луговский А.П. Управление Н*- и J-агрегацией индотрикарбоцианинового красителя в водных растворах неорганических солей. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика*, 2020, vol. 2, pp. 19-27. [Belko N.V., Samtsov M.P., Lugovsky A.P. Control of H* - and J-aggregation of indotricarbocyanine dye in aqueous solutions of inorganic salts. *Journal of the Belarusian State University. Physics*, 2020, vol. 2, pp. 19-27. (In Russ.)]
9. Тарасов Д.С., Каплевский К.Н., Самцов М.П. и др. Анализ спектральных свойств многокомпонентных растворов нового индотрикарбоцианинового красителя. *Вестник БГУ*, 2015, сер. 1, № 2, с. 8-12. [Tarasov D.S., Kaplevsky K.N., Samtsov M.P. and other Analysis of the spectral properties of multicomponent solutions of a new indotricarbocyanine dye. *Bulletin of BSU*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 8-12. (In Russ.)]
10. Кузьмин В.А., Дурандин Н.А., Лисицына Е.С. и др. Спектрально-кинетические характеристики комплексообразования между индотрикарбоцианином и альбумином. *Докл. РАН*, 2015, т. 462, № 2, с. 182-184. [Kuzmin V.A., Durandin N.A., Lisitsyna E.S. et al. Spectral and kinetic characteristics of complexation between indotricarbocyanine and albumin. *Dokl. RAS*, 2015, vol. 462, no. 2, pp. 182-184. (In Russ.)]
11. Awasthi K., Nishimura G. Modification of near-infrared cyanine dyes by serum albumin protein. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 461-463.
12. Usama S.M., Lin C-M., Burgess K. On the Mechanisms of Uptake of Tumor-Seeking Cyanine Dyes. *Bioconjugate Chem.*, 2018, vol. 29, no. 11, pp. 3886-3895.
13. van der Vorst E.P.C. High-density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. *Springer, Cham.*, 2020, vol. 94, pp. 399-420.
14. Cameron S.J., Morrell C.N., Bao C. A novel anti-inflammatory effect for high density lipoprotein. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 12, e0144372.
15. Kim J.Y., Kim S.M., Kim S.J. et al. Consumption of policosanols enhances HDL functionality via CETP inhibition and reduces blood pressure and visceral fat in young and middle-aged subjects. *International journal of molecular medicine*, 2017, vol. 39, no. 4, pp. 889-899.

ANALYSIS OF THE PROPERTIES OF POLYMETHINE DYES COMPLEXES WITH BLOOD SERUM PROTEINS BY GEL ELECTROPHORESIS

Samtsov M.P.¹, Tarasov D.S.^{1,2}, Maliushkova E.V.², Khludeyev I.I.³, Lugovski A.A.¹, Semak I.V.²¹ Institute of Applied Physical Problems named after A.N. Sevchenko Belarusian State University
Minsk, Belarus² Belarusian State University
Minsk, Belarus³ Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics
st. P. Brovka, 6, Minsk, 220013, Belarus; e-mail: ivan2khl@mail.ru

Abstract. The paper presents the results of studies of the complexation of tricarboyanine dyes with blood plasma proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. The main absorption band of the dyes under study is located in the near-IR region, which complicates their visual detection on an electrophoregram. In this regard, the detection of localization of dyes was carried out by their fluorescence using a laser fluorescence spectrometer. For scanning gels with a coordinate binding, a device was used, which consisted of a platform movable by micrometric screws, on which the spectrometer fiber holder was fixed perpendicular to the measurement plane. Scanning of the gels was performed until the stage of staining and visualization of proteins, at which irreversible destruction of tricarboyanine dyes was detected. The coordinates were fixed relative to the boundaries of the gels, which made it possible to combine the distribution of proteins and indotricarboyanine dyes on the electrophoregram. Proteins in complexes with dyes were identified by their molecular weight. On the example of a study using gel electrophoresis of solutions of human serum and bovine serum albumin stained with tricarboyanine dyes, the possibility of detecting and identifying complexes of dyes with blood serum proteins has been shown. As a result, it was found that tricarboyanine dyes with a chlorine-substituted orthophenylene bridge are able to form covalent complexes with albumin and Apolipoprotein A-I, the main structural element of high-density lipoproteins. It has been shown that polyethylene glycols with a molecular weight of 300 Da at the end groups of dyes do not affect this property.

Key words: tricarboyanine dyes, complexation, blood plasma proteins, gel-electrophoresis, laser-induced fluorescence spectroscopy.

АЦИДОЗ И ЭФФЕКТ ВЕРИГО-БОРА ПРИ РАЗВИТИИ COVID-19

Лавриненко И.А.¹, Семёнов Д.А.², Лагуткин Д.А.³, Зайцева А.Ю.⁴, Генералов Е.А.⁵,
Матвеева О.В.⁶, Егоров Е.Е.⁷, Нечипуренко Ю.Д.⁷

¹ Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

² Институт биофизики СО РАН

Академгородок ул., 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: dasem@mail.ru

³ Московский физико-технический институт

Институтский пер., 9, г. Долгопрудный, 141701, Московская обл., РФ; e-mail: lagutkin.da@phystech.edu

⁴ Институт аналитического приборостроения РАН

Ивана Черных ул., 31-33, г. Санкт-Петербург, 198095, РФ; e-mail: anna@da-24.ru

⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, ГСП-1, РФ; e-mail: generals1179@gmail.com

⁶ Сендай Виралитикс

Актон, Массачусетс, 01720, США; e-mail: olga.matveeva@gmail.com

⁷ Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН

Вавилова ул. 32, г. Москва, 119991, Россия; e-mail: yegorov58@gmail.com, nech99@mail.ru

Поступила в редакцию: 17.07.2021

Аннотация. Тяжелое течение болезни, вызванной коронавирусной инфекцией COVID-19 имеет свои особенности, выделяющие данный тип вируса среди многих инфекций. В работе развита и обоснована гипотеза о том, что одной из особенностей патогенеза тяжелых случаев COVID-19 является респираторный и метаболический ацидоз. Рассмотрено влияние гипоксии и ацидоза на развитие тяжелого течения COVID-19, описан ряд механизмов, связывающих поражающие факторы COVID-19 с ацидозом. Эти механизмы имеют триггерный, ступенчатый характер действия с выраженными положительными обратными связями. Падение сатурации крови кислородом при понижении рН крови в соответствии с известным эффектом Вериги-Бора, является характерной особенностью тяжелого течения COVID-19 и приводит к истощению компенсаторных возможностей организма по регуляции ацидоза. В условиях гипоксии и ацидоза происходит перенастройка иммунной системы, которая препятствует завершению болезни, вызывая разнонаправленные активности по стимуляции воспаления и его завершению. При этом часто происходит утяжеление болезни вместо выздоровления.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, ацидоз, сатурация, эффект Вериги-Бора, положительная обратная связь, триггерные явления.

Одним из важнейших условий адаптации и выживания организма является поддержание кислотно-щелочного равновесия внутренней среды. В процессах метаболизма постоянно образуется избыток кислот, которые могут быть удалены из организма при помощи лёгких (удаление углекислого газа с дыханием) и почек (экскреция протонов в мочу). Изменения рН крови сглаживаются за счет нескольких буферных систем: гемоглобиновой, бикарбонатной, фосфатной и белков плазмы крови. Буферные системы обладают емкостью, которая позволяет создать определенный «запас прочности», при котором рН остается постоянным.

В последнее время в ряде работ приведены свидетельства того, что при тяжелом течении COVID-19 у пациентов часто встречается ацидоз и описаны причины его возникновения, связанные со спецификой поражения организма вирусом SARS-CoV-2 [1-3].

Группа риска тяжелого течения пневмонии при COVID-19 объединяет людей старше 65 лет, пациентов с диабетом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением, деменцией, онкологическими заболеваниями, хронической обструктивной болезнью лёгких, хронической болезнью почек и беременностью [4-7]. При всех этих состояниях, в том числе в силу побочных эффектов принимаемых препаратов, организм часто даже в покое испытывает гипоксию и метаболический ацидоз. В целом метаболический ацидоз проявляется в форме лактацидоза, кетоацидоза, и реже связан с потерей оснований [8, 9]. Чаще всего основным метаболитом, характеризующим степень метаболического ацидоза, является лактат [10].

Целью данной работы стало рассмотрение механизмов и последствий возникновения ацидоза при COVID-19, которые могут приводить к отягощению течения болезни и системное описание пороговых изменений, ухудшающих состояние пациентов скачкообразно, благодаря наличию положительных обратных связей.

Любое развившееся воспаление способствует росту ацидоза, особенно локального.

Во-первых, при повреждении мелких сосудов возникает гипоксия и возрастает метаболическая активность инфильтрирующих лейкоцитов, в которых в результате этого происходит сдвиг в сторону гликолитического метаболизма, ведущий к накоплению лактата [11].

Во-вторых, в процессе окислительного взрыва происходит массовая продукция протонов нейтрофилами и рост закисления [12].

Можно выделить по меньшей мере три причины нарушения газообмена при COVID-19.

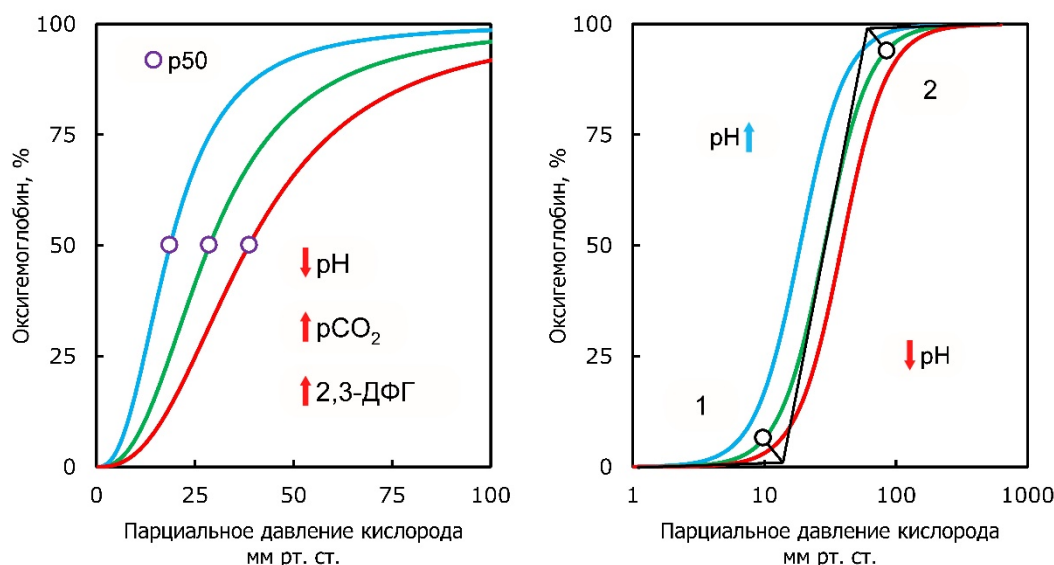


Рисунок 1. Различные факторы, влияющие на насыщение гемоглобина кислородом, и, как следствие, на сатурацию. Концентрация 2,3-дифосфоглицерата существенно влияет на насыщение гемоглобина кислородом, наряду с давлением CO₂. Обозначения: pH – кислотность раствора, pCO₂ – парциальное давление углекислого газа, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат, p50 – величина полунасыщения гемоглобина кислородом

1. Воздействие вируса приводит к гибели альвеолоцитов 2 типа, что нарушает структуру альвеол, в результате чего альвеолы могут коллапсировать и выключаться из газообмена. Этому способствует уменьшение продукции сурфактанта альвеолоцитами, что ведет к изменению поверхностного натяжения. В следствии этого изменения давления воздуха в легких не приводят к сжатию и растяжению альвеолярных пузырьков, возрастает «мертвый» объем и, таким образом, снижается газообмен.

2. Тромбирование легочных капилляров приводит к нарушению трофики легкого и ограничивает диффузию кислорода в эритроциты.

3. Интенсивный выход внеклеточного матрикса, богатого гиалуроновой кислотой призван «заклеивать» области обширного повреждения легких, чтобы не допустить их общего коллапса.

Следует отметить пороговый характер этих явлений: образование гидрогеля гиалуроновой кислоты и снижение продукции сурфактанта качественно меняют газообмен в легких. Локально в некотором участке легкого развивается гипоксия и респираторный ацидоз. Для восстановления повреждений в лёгких организму требуется длительное время и значительные ресурсы.

Локальная концентрация кислорода, необходимая для поддержания нормального метаболизма клеток периферических тканей, связана со значением pH в этих тканях. Кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет S-образный вид. По мере роста парциального давления кислорода в крови его связывание вначале практически не меняется до некоторого граничного значения (1-ая точка перегиба), потом резко возрастает – и выходит на плато по насыщению (2-ая точка перегиба) [13] (рис. 1).

Интенсивный обмен веществ приводит к снижению pH, и гемоглобин легче отдает O₂, связывая при этом избыток протонов. В целом, так обеспечивается транспорт кислорода от лёгких к тканям, а углекислоты (в основном, в форме гидрокарбоната) – в обратном направлении. Эта система регуляции метаболизма с отрицательной обратной связью основана на кооперативном pH-зависимом изменении конформации гемоглобина и более 100 лет известна как эффект Вериги-Бора (именуемый в англоязычной литературе как «эффект Бора») [14-17].

Даже незначительное отклонение кислотности крови от физиологической нормы способно существенным образом изменить способность гемоглобина связывать кислород. Следует подчеркнуть, что эффект Вериги-Бора является ключевым элементом регуляции газообмена. Понижение pH в плазме крови в лёгких с 7,4 до 7,2 приводит примерно к двукратному сокращению количества O₂, которое способна связать кровь (при парциальном давлении кислорода в тканевой жидкости 20–40 мм рт. ст.). Поэтому при оксигенации организму критически важно поддерживать оптимальное значение pH в плазме крови альвеолярных капилляров.

В случае дальнейшего нарастания дефицита кислорода происходит восстановление пирувата в лактат, что приводит организм к отмеченному ранее лактат-ацидозу [18-21]. Таким образом, при длительном состоянии гипоксии пониженное значение pH-крови может приводить к тому, что гемоглобин будет «терять» по пути к тканям часть «запасенного» кислорода, тем самым приводя клетки периферических тканей к еще большему кислородному голоданию (гипоксии) с образовавшейся положительной обратной связью.

Образование лактата сопровождается накоплением 2,3-ДФГ (шунт Раппопорта) с миграцией последнего в эритроцитарные клетки. 2,3-ДФГ встраивается в центральную полость гемоглобина путем образования солевого

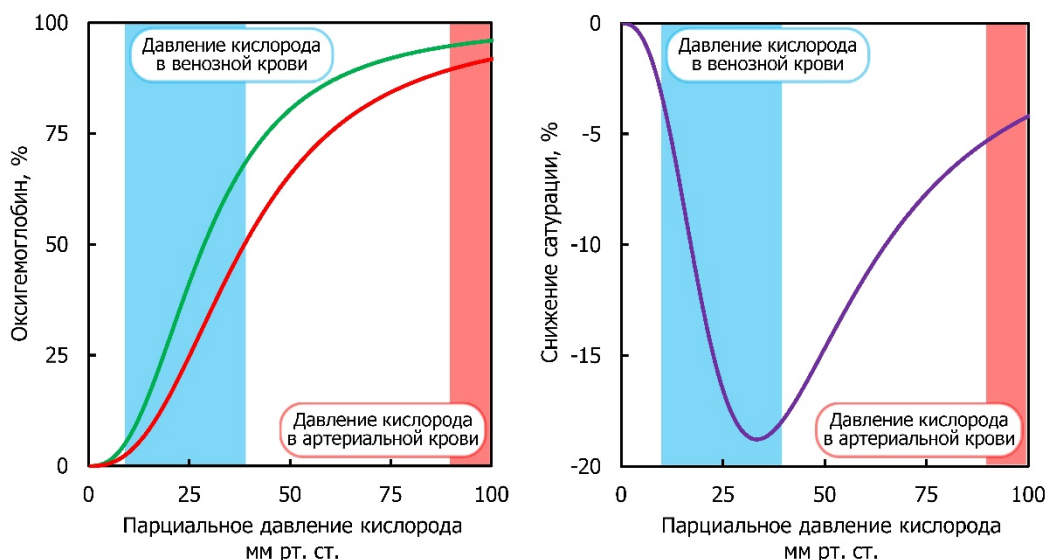


Рисунок 2. Роль 2,3-дифосфоглицерата в обеспечении тканей кислородом в условиях гипоксии. Накопление 2,3-ДФГ приводит к росту значения p_{50} , т.е., к смещению кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (левая секция рисунка), что, в целом, дает выигрыш в обеспечении тканей кислородом (правая секция рисунка)

мостика между β -субъединицами гетеротетрамера, препятствуя обратному связыванию кислорода. В отличие от pH-регуляции сродство гемоглобина к кислороду в легких в этом случае не изменяется. С позиции физиологии достигается следующий эффект: степень «несвязывания» кислорода гемоглобином в легких меньше, чем его отдача в тканях, что легко прослеживается по S-образной КДО, рисунок 2 [22]. В конечном итоге, это дает выигрыш в аварийном (из-за гипоксии) режиме поддержания максимально возможного, но может быть и дефицитного уровня кислорода в тканях, в условиях, когда, вероятно, компенсаторные механизмы, которые используют эффект Бора уже истощены [23,24].

Метаболический ацидоз вызывает учащенное дыхание и снижение концентрации углекислого газа в лёгких (гипокапнию). Когда химические раздражения, соответствующие гипоксии и гиперкапнии, распознаются хеморецепторами, в дыхательном центре головного мозга повышается поток импульсов к респираторным мотонейронам, что вызывает повышение вентиляции. Артериальная гипокапния, наоборот вызывает уменьшение вентиляции [25]. При заражении лёгких вирусом SARS-CoV-2 нарушение в выведении CO_2 через выдыхаемый воздух, связанное с поражением лёгких приводят к стимуляции гипервентиляции и попытке снизить концентрацию CO_2 . Если альвеолярная вентиляция недостаточна для элиминации CO_2 , продуцируемой в организме, происходит гиперкапнический сдвиг, давление двуокиси углерода повышается [25,26]. Если снижение сатурации уже произошло, то это означает, что компенсаторные возможности организма по регуляции ацидоза истощены [27]. Видимо, зачастую это и происходит при инфекции SARS-CoV-2, поскольку падение сатурации является характерной особенностью тяжелого течения COVID-19.

Для пациентов с COVID-19 повышение концентрации лактата выше 2 ммоль/л связано с увеличением вероятности летального исхода. Истощив углеводные депо, организм может пойти по пути синтеза углеводов из аминокислот, что приведет к необходимости нейтрализации и удаления продуктов азотного обмена (аммиака и мочевины), увеличит нагрузку на почки.

Необходимо обратить внимание на наличие двух порогов: при концентрации лактата выше 2 ммоль/л отключается липолиз, при 4 ммоль/л организм не в состоянии длительное время поддерживать в равновесии синтез и утилизацию лактата [28,29].

Хотя перечисленные триггеры, приближающие наступление ацидоза, могут быть значимы и при других заболеваниях, но их сочетание в одном заболевании выглядит уникальным явлением. Необходимо подчеркнуть, что гипоксия и ацидоз позволяют привести вклад всех указанных механизмов к одному «общему знаменателю». В конечном счёте, ацидоз с одной стороны, является следствием падения сатурации, а с другой стороны, является её причиной и способствует дыхательной недостаточности.

На рисунке 3 показана система прямых и обратных связей, возникающая в организме при тяжелом течении болезни и развитии ацидоза.

Наиболее распространенный вариант тяжелого течения COVID-19 наблюдается, когда после повреждения альвеол, начинается повреждение эндотелия легких, что ведет к развитию гипоксии, которая приводит к ацидозу посредством двух основных механизмов: во-первых, концентрации лактата нарастает из-за интенсификации анаэробного гликолиза и во-вторых, выведение углекислого газа из организма затрудняется вследствие повреждения легких. Развивается ацидоз, который влияет на многие базовые процессы (в том числе систему свертывания крови). Локальные изменения не совпадают с общими и происходит дерегуляция свертывающей системы. Противостоять ацидозу могут почки (посредством удаления нелетучих кислот и прямой

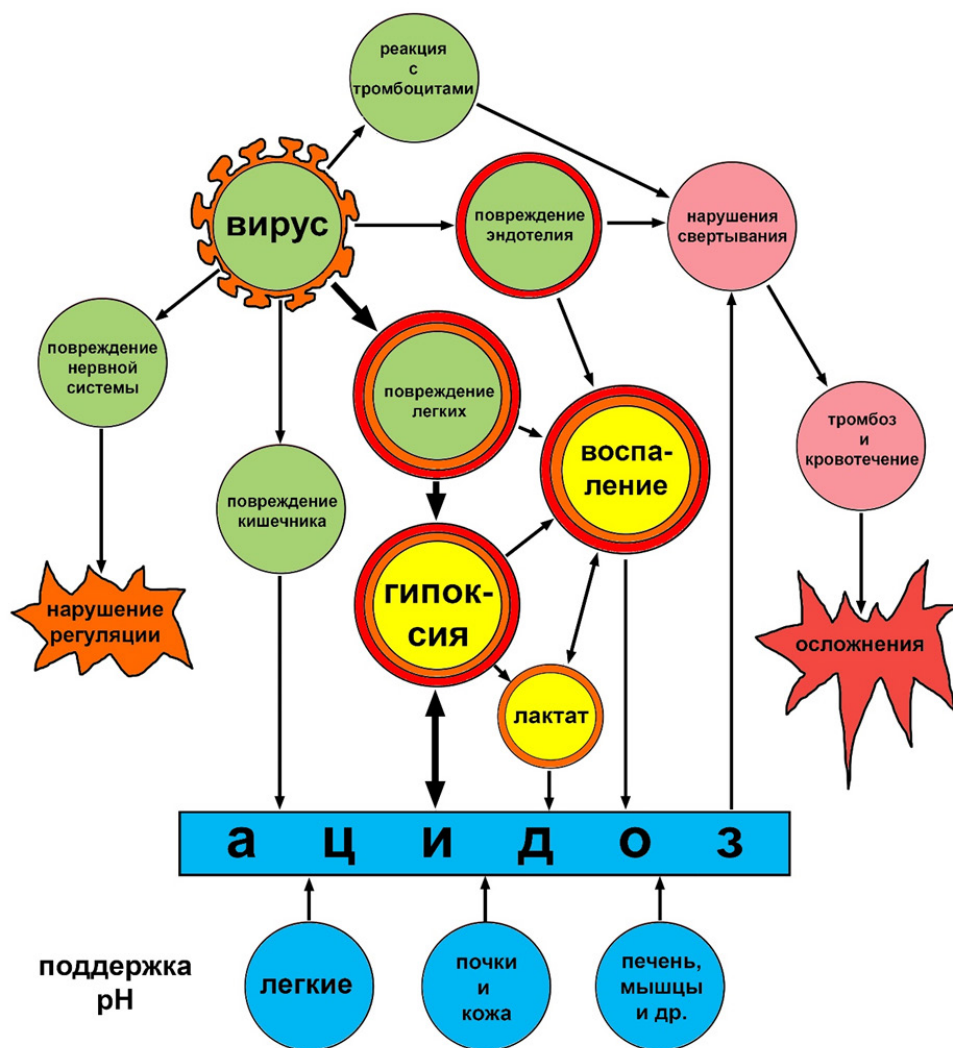


Рисунок 3. Схема, иллюстрирующая систему прямых и обратных связей в патогенезе COVID-19

экскреция протонов). Сопутствующие нарушения почек резко утяжеляют процесс. При наличии достаточного снабжения кислородом, ряд органов (печень, мышцы и почки) способны противостоять ацидозу за счет изъятия лактата из циркуляции. При этом могут происходить два процесса: глюконеогенез (включение цикла Кори), либо окислительный метаболизм лактата, состоящий в митохондриальном превращении в пируват и далее в оксалоацетат и в цикл Кребса. Однако, повреждение легких тормозит эти процессы.

Мы рассмотрели несколько механизмов влияния гипоксии и ацидоза на развитие тяжелого течения COVID-19. Эти механизмы имеют триггерный, ступенчатый характер действия с выраженными положительными обратными связями. Падение сатурации крови кислородом вследствие понижения pH крови в соответствии с эффектом Вериге-Бора, является характерной особенностью тяжелого течения болезни, вызванной SARS-CoV-2. Такое падение является следствием истощения компенсаторных возможностей организма по регуляции ацидоза. Болезнь COVID-19 имеет системный характер поражения органов и тканей. Эта болезнь приводит к множеству разнообразных осложнений, она как бы проверяет организм на наличие «слабых мест» и контуров регуляции, которые имеют малую устойчивость.

Мы полагаем, что для предотвращения тяжелых случаев COVID-19 следует уделять повышенное внимание диагностике и возможному купированию ацидоза. Данная работа является частью более полного исследования, в котором рассматриваются различные аспекты системного поражения организма при COVID-19, связанные с ацидозом [30].

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые в системе рассмотрены поражающие факторы болезни COVID-19, связанные с ацидозом. Показано, что стабилизирующие систему поддержания уровня pH в организме отрицательные обратные связи, охватывающие различные уровни структурной и функциональной организации при COVID-19 могут дать сбой. В частности, регуляция по типу отрицательной обратной связи, обусловленная эффектом Вериге-Бора, может претерпеть изменения и привести к разрегулированию по типу положительной обратной связи, когда «точкой разгрузки» гемоглобина кислородом становится не «конечная точка пути» – периферические ткани, а промежуточный участок транспортировки кислорода от лёгких к тканям (возможно, даже поражённые участки лёгких, где протекает воспалительный процесс).

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук России на 2013–2020 годы (темы №01201363818 и № 01201363820).

Список литературы / References:

1. Chhetri S., Khamis F., Pandak N., Al Khalili H., Said E., Petersen E. A fatal case of COVID-19 due to metabolic acidosis following dysregulate inflammatory response (cytokine storm). *IDCases*, 2020, vol. 21, p. e00829.
2. Shevel E. Conditions Favoring Increased COVID-19 Morbidity and Mortality: Their Common Denominator and Treatment. *Isr Med Assoc J.*, 2020, vol. 11, no. 22, p. 680.
3. Лодягин А.Н., Бытоцыренов Б.В., Шикалова И.А., Вознюк И.А. Ацидоз и токсический гемолиз – цели патогенетического лечения полиорганной патологии при COVID-19. *Вестник восстановительной медицины*, 2020, № 3, с. 25-30. [Lodyagin A.N., Bytotsyrenov B.V., Shikalova I.A., Voznyuk I.A. Acidosis and toxic hemolysis are the goals of the pathogenetic treatment of multiple organ pathology in COVID-19. *Herald of restorative medicine*, 2020, no. 3, p. 25-30. (In Russ.)]
4. Andersen L.W., Mackenhauer J., Roberts J.C., Berg K.M., Cocchi M.N., Donnino M.W. Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels. *Mayo Clin Proc.*, 2013, vol. 88, no. 10, pp. 1127-1140.
5. Newington J.T., Harris R.A., Cumming R.C. Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model. *J Neurodegener Dis.*, 2013, vol. 2013, pp. 234572.
6. Kraut J.A., Madias N.E. Lactic acidosis. *N Engl J Med.*, 2014, vol. 371, no. 24, pp. 2309-2319.
7. Ma L.N., Huang X.B., Muyayalo K.P., Mor G., Liao A.H. Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule in Early Pregnancy? *Front Immunol.*, 2020, vol. 11, pp. 279.
8. Chycki J., Kurylas A., Maszczyk A., Golas A., Zajac A. Alkaline water improves exercise-induced metabolic acidosis and enhances anaerobic exercise performance in combat sport athletes. *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 11, p. e0205708.
9. Pillai S., Davies G., Lawrence M., Whitley J., Stephens J., Williams P.R., Morris K., Evans P. A. The effect of diabetic ketoacidosis (DKA) and its treatment on clot microstructure: Are they thrombogenic? *Clin Hemorheol Microcirc.*, 2021, vol. 77, no. 2, pp. 183-194.
10. Kraut J.A., Madias N.E. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. *Nat Rev Nephrol.*, 2010, vol. 6, no. 5, pp. 274-285.
11. Lunt S.Y., Vander Heiden M. G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2011, vol. 27, pp. 441-464.
12. Borregaard N., Schwartz J. H., Tauber A.I. Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst. *J Clin Invest.*, 1984, vol. 74, no. 2, pp. 455-459.
13. Popel A.S. Theory of oxygen transport to tissue. *Crit Rev Biomed Eng.*, 1989, vol. 17, no. 3, pp. 257-321.
14. Ahmed M.H., Ghatge M.S., Safo M.K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem.*, 2020, vol. 94, pp. 345-382.
15. Gell D.A. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis.*, 2018, vol. 70, pp. 13-42.
16. Werigo B. Zur Frage über die Wirkung des Sauerstoffs auf die Kohlensäureausscheidung in den Lungen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 1892, vol. 51, no. 6, pp. 321-361.
17. Bohr C., Hasselbalch K., Krogh A. Concerning a biologically important relationship—the influence of the carbon dioxide content of blood on its oxygen binding. *Skand. Arch. Physiol.*, 1904, vol. 16, pp. 401-412.
18. Kamel K.S., Oh M.S., Halperin M.L. L-lactic acidosis: pathophysiology, classification, and causes; emphasis on biochemical and metabolic basis. *Kidney Int.*, 2020, vol. 97, no. 1, pp. 75-88.
19. Matyukhin I., Patschan S., Ritter O., Patschan D. Etiology and Management of Acute Metabolic Acidosis: An Update. *Kidney Blood Press Res.*, 2020, vol. 45, no. 4, pp. 523-531.
20. Foucher C.D., Tubben R.E. *Lactic Acidosis*. StatPearls, Treasure Island (FL), 2021.
21. Quade B.N., Parker M.D., Occhipinti R. The therapeutic importance of acid-base balance. *Biochem Pharmacol.*, 2021, vol. 183, p. 114278.
22. Toffaletti J.G., Rackley C.R. Monitoring Oxygen Status. *Adv Clin Chem.*, 2016, vol. 77, pp. 103-124.
23. Srinivasan A.J., Morkane C., Martin D.S., Welsby I.J. Should modulation of p50 be a therapeutic target in the critically ill? *Expert Rev Hematol.*, 2017, vol. 10, no. 5, pp. 449-458.
24. Stewart T., Lambourne J., Thorp-Jones D., Thomas D.W. Implementation of early management of iron deficiency in pregnancy during the SARS-CoV-2 pandemic. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2021, vol. 258, pp. 60-62.
25. Кисляков Ю.Я., Бреслав И.С. Дыхание, динамика газов и работоспособность при гипербарии. АН СССР, Ин-т физиологии им. И.П. Павлова. Л.: Наука, 1988, 237 с. [Kislyakov Yu.Ya., Breslav I.S. Respiration, gas dynamics and performance in hyperbaria. Academy of Sciences of the USSR, Institute of Physiology. I.P. Pavlova. L.: Science, 1988, 237 p. (In Russ.)]
26. Кисляков Ю.Я. Механизмы транспорта O₂ в системе микроциркуляции. *Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова*, 1987, № 5, с. 569. [Kislyakov Yu.Ya. O₂ transport mechanisms in the microcirculation system. *Physiological journal of the USSR. THEM. Sechenov*, 1987, no. 5, p. 569. (In Russ.)]
27. Зайцева А.Ю., Кисляков Ю.Я., Мазинг М.С., Давыдов В.В. Применение неинвазивной оптической обучаемой диагностической системы и математических методов анализа многомерных данных для оценки

кислородного статуса тканей человека. *Научное приборостроение*, 2020, т. 30, № 4, с. 113-118. [Zaitseva A.Yu., Kislyakov Yu.Ya., Masing M.S., Davydov V.V. Application of a non-invasive optical learning diagnostic system and mathematical methods for analyzing multidimensional data to assess the oxygen status of human tissues. *Scientific Instrumentation*, 2020, vol. 30, no. 4, pp. 113-118. (In Russ.)]

28. Hogan M.C. What Wasserman wrought: a celebratory review of 50 years of research arising from the concept of an 'anaerobic threshold'. *J Physiol.*, 2021, vol. 599, no. 4, p. 1005.

29. Poole D.C., Rossiter H.B., Brooks G.A., Gladden L.B. The anaerobic threshold: 50+ years of controversy. *J. Physiol.*, 2021, vol. 599, no. 3, pp. 737-767.

30. Nechipurenko Yu.D. et al. The role of acidosis in the pathogenesis of severe forms of COVID-19. *Biology*, 2021.

ACIDOSIS AND BOHR EFFECT IN COVID-19 PROGRESSION

Lavrinenko I.A.¹, Semyonov D.A.², Lagutkin D.A.³, Zaitseva A.Y.⁴, Generalov E.A.⁵, Matveeva O.V.⁶, Yegorov Y.E.⁷, Nechipurenko Y.D.⁷

¹Voronezh State University

Universitetskaya sq. 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

²Institute of Biophysics Siberian Branch RAS

Akademgorodok str. 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: dasem@mail.ru

³Moscow Institute of Physics and Technology

Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701, Moscow Region, Russia; e-mail: lagutkin.da@phystech.edu

⁴Institute for Analytical Instrumentation RAS

Ivana Chernykh str. 31-33, St. Petersburg, 198095, Russia; e-mail: anna@da-24.ru

⁵Lomonosov Moscow State University

Leninskiye Gory, 1-2, Moscow, 119991, GSP-1, Russia; e-mail: generals1179@gmail.com

⁶Sendai Viralytics LLC

Acton, MA, 01720, USA; e-mail: olga.matveeva@gmail.com

⁷Engelhardt Institute Molecular Biology RAS

Vavilova str. 32, Moscow, 119991, Russia; e-mail: yegorov58@gmail.com, nech99@mail.ru

Abstract. The severe course of the disease caused by the coronavirus infection COVID-19 has its own characteristics that distinguish this type of virus among many infections. The paper developed and substantiated the hypothesis that respiratory and metabolic acidosis is one of the features of the pathogenesis of severe cases of COVID-19. Several mechanisms have been described that link the damaging factors of COVID-19 with acidosis, which have a trigger, stepwise nature of action with pronounced positive feedbacks. A drop in blood oxygen saturation with a decrease in blood pH in accordance with the well-known Verigo-Bohr effect is a characteristic feature of the severe course of COVID-19 and leads to depletion of the body's compensatory capabilities to regulate acidosis. Under conditions of hypoxia and acidosis, a readjustment of the immune system occurs, which prevents the completion of the disease, causing multidirectional activities to stimulate inflammation and its completion. In this case, the disease is often aggravated instead of recovery.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, acidosis, saturation, Bohr effect, positive feedback, trigger phenomena.

СПЕКТРОМЕТРИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТВОРЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННОЙ ВОДЫ

Погорелов А.Г.¹, Ипатова Л.Г.¹, Панаит А.И.¹, Погорелова М.А.¹, Гулин А.А.²,
Погорелова В.Н.¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ

² ФИЦ Химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию: 19.07.2021

Аннотация. Используя UV-vis спектрометрию, изучали изменение свойств полисахаридов в растворе под действием электрохимической активации воды (ЭХАВ). Показано, что исследуемые водные растворы полисахаридов растительного происхождения (агар, модифицированный крахмал, пищевой крахмал) подвержены модификации, направленность которой обусловлена используемой фракцией ЭХАВ (католит или анолит). Выявленные особенности могут быть востребованы при разработке новых способов управления свойствами биологического сырья в технологии производства пищевых продуктов. Отметим, технология ЭХАВ, которую относят к разряду «зеленых», может быть воспроизведена в промышленных масштабах.

Ключевые слова: электрохимически активированная вода, агар, крахмал, полисахарид, олигосахар, UV-vis спектрометрия, масс-спектрометрия вторичных ионов (ToF-SIMS).

Исходным сырьем для пищевых технологий является биологическая матрица, основу которой составляют органические молекулы, включая полисахариды растительного происхождения. В производственном цикле данный класс макронутриентов, в зависимости от амфифильности, используют в виде раствора (модифицированный крахмал, агар) или суспензии (крахмал). При обработке сырья, а также в процессе получения полуфабрикатов и конечного продукта, вещество преобразуют так, чтобы улучшить его реологические свойства, ускорить или оптимизировать технологические процессы, улучшить органолептические характеристики готовой продукции. Для безреагентного управления свойствами пищевых систем применяют фракции электрохимически активированного водного раствора. Отметим, подходы, разработанные на основе ЭХАВ, относят к «зеленым» технологиям, так как воздействие остается экологически безопасным и не несет техногенной нагрузки.

Принцип получения ЭХАВ состоит в накоплении метастабильной фракции воды в области, прилегающей к аноду или катоду электролизера, анолита или католита, соответственно [1]. В интервале релаксации длительностью до нескольких дней эти фракции обладают характерными свойствами [2,3]. После катодной обработки водный раствор приобретает щелочную реакцию, а его ОВП может снизиться до отрицательных значений, в нем уменьшается содержание растворенного кислорода, но возрастает уровень молекулярного водорода. Наоборот, в результате анодной обработки возрастает до аномально высокого значения ОВП раствора, увеличивается его кислотность, а также содержание растворенного кислорода.

Фракции ЭХАВ показали себя в качестве перспективных экстрагирующих и гидролизующих агентов. Например, в области переработки растительного сырья разработан метод экстрактивного получения красителя из кожуры лука в среде католита [3]. Извлечение виннокислых соединений из виноградной выжимки в непрерывном потоке анолита повышает выход виннокислых соединений, сокращает длительность процесса и снижает потребление энергии [5]. Похожий метод использован для обработки бурых водорослей, что делает более эффективным производство альгиновой кислоты и альгината натрия, улучшает санитарно-гигиенические условия и экологическую безопасность, а также упрощает технологические процессы [6]. Сравнительные исследования показали, что эффективность экстракции белка из абрикоса или муки рапса у электролизной воды выше, по сравнению с водой [7,8].

Схожие процессы описаны для такой сложной физико-химической системы, как тесто. Показано, что использование католита ускоряет набухание крахмальных зерен, способствуя формированию однородной структуры конечного продукта, увеличению выхода клейковины и количества адсорбированной влаги [9]. В цитируемой работе установлено влияние католита на удельный объем и пространственную структуру готового продукта. Описанные закономерности наблюдали и в других исследованиях, где для опытных образцов отмечали изменение цвета, удельного объема, текстуры, степени желатинизации и твердости [10-12]. Показано, что применение ЭХАВ способствует интенсификации получения суслу за счет более глубокого гидролиза полисахаридов [13,14]. При этом обработка сырья анолитом увеличивает амилолитический эффект за счет активизации фермента амилазы [13,15].

Таким образом, в области пищевых производств накоплен значительный опыт практического использования ЭХАВ, который носит, как правило, эмпирический характер. Фундаментальные механизмы и эффекты действия фракций электрохимически активированной воды на биологические молекулярные мишени остаются мало изученными. Поэтому целью данного исследования было экспериментальное исследование *in vitro*

взаимодействия католита и анолита с важным классом макронутриентов – полисахаридами растительного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов. Для экспериментов брали артезианскую воду (pH 7,2, ОВП +360 мВ) из городского водопровода (г. Пушкино). На установке «Стел» (Делфин Аква, Россия), рекомендованной для бытового использования, получали фракции ЭХАВ: католит (pH 8,2, ОВП -800 мВ) или анолит (pH 2,2, ОВП +800 мВ). Исследование проводили на трех образцах полисахаридов растительного происхождения: растворимый в воде модифицированный крахмал или агар марки Gelagar (B&V S.R.L., Италия), а также не растворимый в воде пищевой крахмал. Из растворимых препаратов готовили маточный водный раствор, который в пропорции 1:4 разводили водой или одной из фракций ЭХАВ. Для агара, учитывая его низкую растворимость, в маточном растворе весовая концентрация составляла 0,3%, для модифицированного крахмала – 2,5%. Полученные растворы изучали посредством UV спектрометрии.

UV-vis спектрометрия. Наличие эффекта действия ЭХАВ оценивали посредством спектрометрии водных растворов полисахаридов (агар, крахмал). Для этого регистрировали оптическую плотность в спектре поглощения образца на длине волны 225 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Япония). Растворы крахмала дополнительно окрашивали иодитным методом, что позволило получить в видимой области специфические спектры поглощения олигосахаров. Данную реакцию проводили в среде с избытком йода, чему соответствует наличие характерного пика на длине волны 355 нм в спектре поглощения анализируемого раствора.

Времяпролетная масс-спектрометрия вторичных ионов (TOF-SIMS). Образцы для масс-спектрометрии получали следующим образом. Капли препарата, объемом 2 мкл наносили на чистую стеклянную подложку, поверхность которой покрыта токопроводящей пленкой. После высушивания в струе инертного газа образец переносили в камеру масс-спектрометра вторичных ионов TOF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Германия). Препарат ионизировали пучком первичных ионов Bi_3^+ с энергией 30 кэВ, диаметром 200 нм. После воздействия длительностью 70 нс и последующей регистрации вторичных ионов (~80 мкс) пучок перемещался в следующую точку поверхности. Плотность дозы облучения первичными ионами не превышала 5×10^{12} ионов/см². Для оценки различий между полученными масс-спектрами применили метод PCA (principal component analysis) [16,17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрометрия водных растворов агара и модифицированного крахмала. Изучали полисахариды растительного происхождения со свойствами гидроколлоидов, которые в воде образуют вязкие растворы. Гидроколлоиды применяют в пищевых технологиях в качестве добавок с функциями загустителей, стабилизаторов и гелеобразователей. Спектры поглощения водных растворов полисахарида (агар, модифицированный крахмал) показаны на рисунке 1.

По сравнению с раствором в воде, качественное изменение спектра поглощения обоих полисахаридов наблюдается только в среде анолита (рис. 1а, б), что характеризует пик в области 225 нм. Отметим, для агара в растворе католита также наблюдается тенденция к трансформации спектра (рис. 1а), который соответствует промежуточному состоянию между контролем и раствором в анолите. Возможно, завершение перехода требует более длительного воздействия восстановленной фракцией ЭХАВ.

Растворы модифицированного крахмала дополнительно окрашивали иодитным методом, что позволило получить специфические спектры поглощения в видимой области (рис. 1в). Данную цветную реакцию проводят на олигосахарах с пиком в характерной области 520 нм при условии насыщения раствора йодом (пик 355 нм). Значимое снижение интенсивности характерного спектра наблюдается только для раствора крахмала в католите

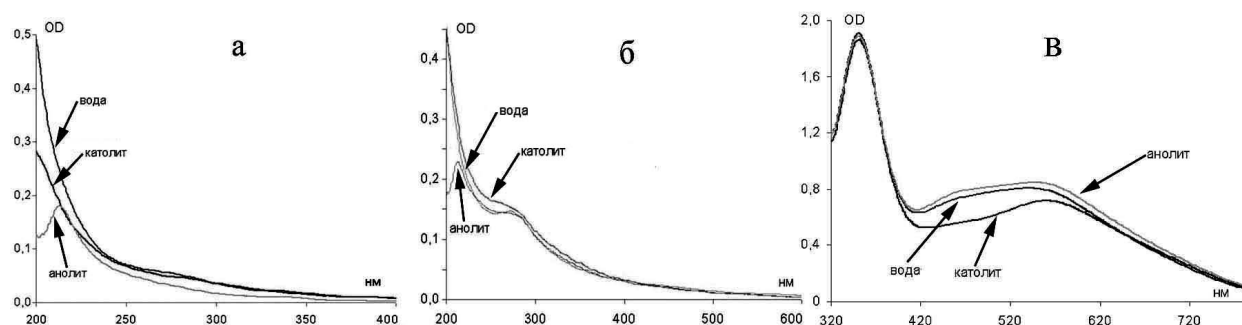


Рисунок 1. Спектры поглощения растворов полисахарида растительного происхождения в воде (контроль) или фракциях ЭХАВ (анолит, католит): (а) не специфические UV спектры агара, (б) не специфические UV спектры модифицированного крахмала, (в) характерные спектры раствора модифицированного крахмала после окраски олигосахаров посредством иодитной реакции

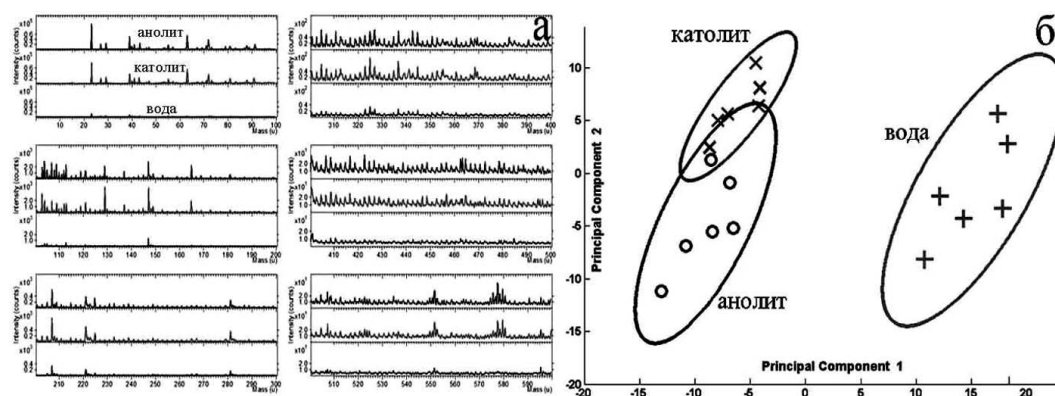


Рисунок 2. Результаты ToF-SIMS анализа образцов агара, приготовленных из раствора полисахарида в воде (контроль) или фракциях ЭХАР (анолит, католит): (а) диапазоны молекулярных масс, где везде нижний масс-спектр соответствует контролю (вода), средний – после обработки католитом, верхний – после обработки анолитом; (б) эллипсами обозначены 95% доверительные интервалы для групп из 6 измерений в каждой. Сравнение различий между масс-спектрами образцов проведено методом PCA

(рис. 1в). Учитывая то, что во всех вариантах исходный маточный раствор модифицированного крахмала разбавляли одинаковым способом, уменьшение содержания олигосахаров можно объяснить наличием амилолитической активности у католита. Дело в том, что модифицированный крахмал представляет собой смесь олигосахаров, фрагментация которых α -амилазой или, например, католитом приводит к образованию моносахаров и, следовательно, к уменьшению интенсивности цветной окраски.

Характерные масс-спектры молекулярного состава раствора агара в воде, анолите и католите приведены на рисунке 2а. Для указанных вариантов с помощью метода PCA проведен сравнительный анализ данных молекулярного анализа (рис. 2б).

Полученные данные (рис. 2б) свидетельствуют о значимом отличии масс-спектра агара в водном растворе (контроль) от масс-спектров полисахарида, обработанного фракциями ЭХАВ. Масс-спектры агара в анолите и католите между собой достоверно не различаются, что соответствует тенденции на сближение, отмеченной для UV спектров (рис. 1а). Характерные масс-спектры молекулярного состава раствора модифицированного крахмала в воде, анолите и католите приведены на рисунке 3а. Для указанных вариантов с помощью метода PCA проведен сравнительный анализ данных молекулярного анализа (рис. 3б).

Ситуация для образцов модифицированного крахмала (рис. 3) отличается от той, что наблюдается для агара (рис. 2). Отметим значимое различие в молекулярном составе между фракциями ЭХАВ (рис. 3б), что соответствует данным UV-vis спектрометрии (рис. 1б). Однако различие между масс-спектрами для образца крахмала в воде и католите более выражено, по сравнению с тем, что регистрируется на UV спектрах. Возможно, в указанном диапазоне изменение в молекулярном составе, обусловленное обработкой католитом, существенно не повлияло на спектральные характеристики раствора модифицированного крахмала.

Завершая обсуждение результатов, можно прийти к следующему заключению. Полисахариды растительного происхождения (агар, крахмал) подвержены действию фракций ЭХАВ. Анализ проб агара показывает идентичность эффекта обработки полисахарида обеими фракциями ЭХАВ. Для модифицированного крахмала

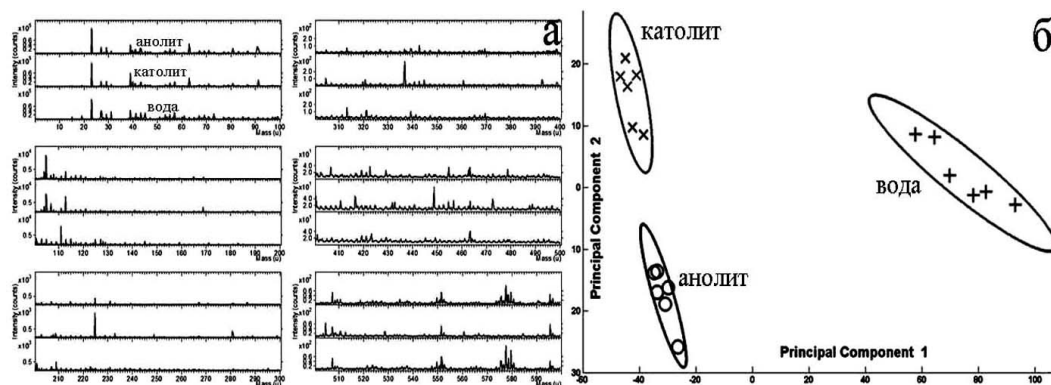


Рисунок 3. Результаты ToF-SIMS анализа образцов модифицированного крахмала, приготовленных из раствора полисахарида в воде (контроль) или фракциях ЭХАР (анолит, католит): (а) диапазоны молекулярных масс, где везде нижний масс-спектр соответствует контролю, средний – после обработки католитом, верхний – после обработки анолитом; (б) эллипсами обозначены 95% доверительные интервалы для групп из 6 измерений в каждой. Сравнение различий между масс-спектрами образцов проведено методом PCA

методом ToF-SIMS показано статистически значимое различие молекулярного состава олигосахаров в зависимости от фракции ЭХАВ. Используя специфическую цветную реакцию йодом, показано амилолитическое действие католита на раствор модифицированного крахмала, что обусловлено снижением содержания олигосахаров. Учитывая широкое применение гидроколлоидов полисахаридной природы в качестве загустителей и гелеобразователей, использование ЭХАВ можно рассматривать как перспективное технологическое решение для производства пищевых продуктов.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00019).

Список литературы/References:

1. Bakhir V.M., Pogorelov A.G., Universal electrochemical technology for environmental protection. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, 2018, vol. 7, pp. 41-57.
2. Chyer K., Yen-Con H., Brackett R.E. Roles of Oxidation–Reduction Potential in Electrolyzed Oxidizing and Chemically Modified Water for the Inactivation of Food-Related Pathogens. *J. Food Protection*, 2000, vol. 63, pp. 19-24.
3. Takenouchi T., Wakabayashi Si. Rinsing effect of alkaline electrolyzed water on nickel surfaces., Shinichi. *J. Appl. Electrochemistry*, 2006, vol. 36, pp. 1127-1132.
4. Способ производства красителя из шелухи лука. Патент RU 2130472, 1999. [*Method for the production of dye from onion husks*. Patent RU 2130472, 1999. (In Russ.)]
5. Способ извлечения виннокислых соединений из виноградных выжимок. Патент RU 2372399, 2009. [*Method for extracting tartaric acid compounds from grape pomace*. Patent RU 2372399, 2009. (In Russ.)]
6. Способ получения альгиновой кислоты и альгината натрия из бурых водорослей. Патент RU 2197840, 2003. [*A method of obtaining alginic acid and sodium alginate from brown algae*. Patent RU 2197840, 2003. (In Russ.)]
7. Gerzhova A., Benali M., Mondor M., Aider M. A comparative study between the electro-activation technique and conventional extraction method on the extractability, composition and physicochemical properties of canola protein concentrates and isolates. *Food Bioscience*, 2015, vol. 11, pp. 56-63.
8. Li Z.-H., Zhou B., Li X.T., Li S.-G. Effect of alkaline electrolyzed water on physicochemical and structural properties of apricot protein isolate. *Food science and biotechnology*, 2018, vol. 28, pp. 15-23.
9. Науменко Н.В. Влияние активированной воды на формирование качества и сохраняемость хлеба из пшеничной муки. Диссертация ... канд. техн. наук, 2007, 112 с. [Naumenko N.V. *Influence of activated water on the formation of quality and preservation of bread from wheat flour*. Dissertation ... Cand. tech. nauk, 2007, 112 p. (In Russ.)]
10. Kobayashi K., Tosa N., Hara Y., Horie S. An examination of cooked rice with electrolyzed water. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaisha*, 1996, vol. 43, pp. 930-938.
11. Onishi R., Hara Y., Arai E. Effect of Weak Electrolysed Water on the Properties of Bread. *Food Sci. Technol. Res.*, 1999, vol. 5, pp. 388-392.
12. Patent US 6326048. *Date of Patent*, 2001.
13. Храпенков С.Н., Гернет М.В., Свиридов Д.А. Электрохимическая активация при получении пивного сусле. *Пиво и напитки*, 2003, № 4, с. 18-19. [Khrapenkov S.N., Gernet M.V., Sviridov D.A. Electrochemical activation during the production of beer wort. *Beer and drinks*, 2003, no. 4, pp. 18-19. (In Russ.)]
14. Кругликов Б.В., Гернет М.В., Козлов И.В. ЭХА-растворы в технологии пива, полученные на установках нового поколения. *Пиво и напитки*, 2008, № 5, с. 36-37. [Kruglikov B.V., Gernet M.V., Kozlov I.V. ECA solutions in beer technology obtained on new generation installations. *Beer and drinks*, 2008, no. 5, pp. 36-37. (In Russ.)]
15. Храпенков С.Н., Гернет М.В., Бахир В.М. Воздействие электрохимически активированных систем на ферменты солода. *Пиво и напитки*, 2002, № 5, с. 20-21. [Khrapenkov S.N., Gernet M.V., Bakhir V.M. Effect of electrochemically activated systems on malt enzymes. *Beer and Drinks*, 2002, no. 5, pp. 20-21. (In Russ.)]
16. Graham D.J., Wagner M.S., Castner D.G. Information from complexity: Challenges of TOF-SIMS data interpretation. *Appl. Surf. Sci.*, 2006, vol. 252, pp. 6860-6868.
17. Graham D.J., Castner D.G. Multivariate Analysis of ToF-SIMS Data from Multicomponent Systems: The Why, When, and How. *Biointerphases*, 2012, vol. 7, pp. 49-61.

SPECTROMETRY OF PLANT POLYSACCHARIDES IN ELECTROCHEMICALLY ACTIVATED WATER

Pogorelov A.G.¹, Ipatova L.G.¹, Panait A.I.¹, Pogorelova M.A.¹, Gulin A.A.², Pogorelova V.N.¹¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS*Istitutskay, 3, 142290, Pushchino, Russia*² N.N. Semenov` Institute of Chemical Physics RAS*ul. Kosygina, 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: agpogorelov@rambler.ru*

Abstract. Using UV-vis spectrometry, time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and scanning electron microscopy, the changes of polysaccharide features in aqueous environment were examined. The impact of electrochemically activated water solution (EAWS) on plant polysaccharides (agar, modified starch, food starch) was explored. It was shown that the studied plant samples were modified in EAWS and its action specificity was dependent on EAWS fraction (catholite or anolite). Our findings will be able to allow the promising tool in designing the novel approaches for food industry. Furthermore, EAWS is a suitable green chemical process that can be translated to industrial level. This work was supported by Russian Science Foundation grant № 20-16-00019.

Key words: *electrochemically activated water; agar; starch; polysaccharide; oligosugar; UV-vis spectrometry; time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS).*

SIGNIFICANCE TEST TO A DATA MATRIX OF NANORESERVOIRES OF TANNINS EXTRACTED FROM TENUIFLORA MIMOSA (TEPEZCOHUITE) ENCAPSULATED IN TiO₂ ANORESEROIRS

González F.M., Moreno A., Cervantes T.A.M., Italo J., Hernandez-Apam M.A., Lima R.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Av. San Claudio y 18 Sur C.U. Col. San Manuel, C. P. 72570 Puebla, Pue., México

Received: 20.07.2021

Abstract. The action of the active principles of tepezcohuite (condensed tannins) was used to value the healing capacity in aseptic surgical wounds of 1 centimeter diameter in New Zealand rabbits, a sample of 6 rabbits was taken, to which 3 healing treatments and isotonic saline solution were applied, the objective is to demonstrate which treatment is the best healing. We applied the Hotelling test, comparing the samples 2 by 2, to know if there are significant differences between the methods. The treatments used were nanoreservoirs of Tan/TiO₂-150 in weight of tannins in 60% and condensed tannins, TiO₂ and the isotonic saline solution (I. S.S.).

Key words: *Nanoreservoirs of Tannins, Mimosa, Tenuiflora, Test Hotelling, TiO₂, Tepezcohuite, Isotonic Saline Solution (I.S.S.).*

For years, alternative methods of application have been developed to improve the evolution of burn wounds such as the application of hydroactive gel, hydrocolloid occlusive dressings, hydrofiber dressings with ionic silver, stretch bandages, among others, however, most of them are inappropriate because they present a very slow healing activity or because of their high economic cost, translating into a great burden for the health services and for the patient [1-5]. In the Mexican Republic there are numerous species of plants and trees that are used for therapeutic purposes, among them the tepezcohuite tree, the name of the roots of the Nahuatl language that comes from the word tepezcuahuitl, which means "tree of the hill that bleeds". This was used by the Mayan Civilization as a cure for skin diseases, such as wounds, burns, dermatosis, acne [6, 7].

Nanoreservoirs of TiO₂ were synthesized by encapsulating active substances such as condensed tannins extracted from tenuiflora mimosa (Tepezcohuite). The nanoreservoirs obtained were applied to shallow non-chronic surgical wounds on the back of New Zealand rabbits. Preliminary results show a 90% closure evolution in wounds with Tan/TiO₂-150 nanoreservoirs compared to isotonic saline, tannins and TiO₂.

EXPERIMENTAL REPORT

Two nano-reservoir syntheses were made independently by the sun-gel technique. The nano-reservoir of TiO₂ and the nano-reservoir of TiO₂ with 150 mg of condensed tannins, which are labeled as Tan/TiO₂-150. The synthesis was carried out with the help of a reflux system with constant agitation at 70°C reaction temperature. All nano-reservoirs were synthesized under the same conditions separately, the only variable being the mass concentration of condensed tannins in mg. The TiO₂ and Tan/TiO₂-150 nano-reservoirs are characterized by Varian UV-VIS spectrophotometer model Cary 100, which has a diffuse reflectance coupled integration sphere coated with MgO as Labsphere certified reflectance standard with 100% reflectivity and an IR spectrophotometer with Fourier transform (Varian model Scalibur Digilab). The rabbits were classified in treatments A, B and C, and isotonic saline, as shown in table 1.

Aseptic surgical wounds 1cm in diameter were made to 6 New Zealand rabbits, clinically healthy with an average weight of 2 to 3 Kg, on the back of these, anesthetized intravenously in the marginal vein of the ear with sodium pentobarbital, 1 mL/2.5 kg weight. The determination of the closure area of the aseptic surgical wounds was made with the help of a cellophane paper and marker. The edges of the wounds are delimited with intervals of two days; the cellophane paper is placed on millimetric paper in order to quantify how many squares each circle occupies measured in mm [1-3]. The procedure of the physical injury in the back of the rabbits is approximately 2 cm in diameter; it consists of shaving the dorsal part to each rabbit and 6 surgical wounds were made in the back; 3 in the left part and 3 in the right part. [3]. Surgical injuries caused to each group were verified from the beginning of treatment until 15 days after the first application of the treatment. See Table 2. The wounds located on the left side of the back of each group are given 0.5 ml of isotonic saline solution (I. S. S.) as a control. The wounds on the right side of the back, corresponding to each group, were applied 30 mg as follows: condensed tannins (group A), tan-con/TiO₂-150-70 nanomaterial (group B) and TiO₂-70

Table 1. Description of the treatments carried out on New Zealand rabbits

Treatment "A"	Treatment "B"	Treatment "C"
Rabbits 1, 2	Rabbits 3, 4	Rabbits 6, 7
nanoreservoir Tannins y S.S.I.	nanoreservoir Tan/TiO ₂ -150 y S.S.I.	TiO ₂ y S.S.I.

Table 2. Comparative table of the healing process of six rabbits, measured in mm²

	Rabbit 1		Rabbit 2		Rabbit 3	
Day	S.S.I	Tan	S.S.I	Tan	S.S.I	Tan/TiO ₂
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
0	25	25.2	26.7	26.3	28.7	26.7
1	24.5	24.7	25.3	24.1	27.1	24.1
2	21.8	22	22.3	19.7	24.6	19.7
3	15.7	16	17.8	15.3	21	15.3
4	14.5	14.6	16.1	13.7	17.2	13.7
5	12.3	12.8	14.6	11.4	13.8	11.4
6	11	10.8	12.4	8.7	11.7	8.7
7	9.7	8.3	8.9	6.8	9.5	6.8
8	8	7.4	6.1	4.1	8	4.1
9	6.7	6.1	4.8	2.7	5.8	2.7
10	5.6	5	3.5	0.6	3.5	0.6
11	4.9	4.5	2.7	0	2.4	0.2
13	1.9	1.5	1.3	0	1.3	0
14	0.4	0.8	0.4	0	0.4	0
15	0	0	0	0	0	0

	Rabbit 4		Rabbit 5		Rabbit 6	
Day	S.S.I	Tan/TiO ₂	S.S.I	TiO ₂	S.S.I	TiO ₂
	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂
0	26.3	25.7	24.3	25	21	23.7
1	24.6	23.2	22.7	23.7	19.6	22.1
2	22.4	19.8	19.6	19.9	16.5	19.8
3	16	13.7	16.7	17.3	13.3	15
4	15.2	12.1	15.1	15.0	12.5	13.7
5	14.6	9.9	14.7	13.4	10.4	11.1
6	13.7	8.3	13.3	12.4	8.3	10.7
7	10.3	5.7	12.6	11.7	6.7	8.8
8	8	3.7	11	10.8	5.7	7.3
9	5.9	1.5	9.5	8.7	4.9	5.8
10	3.6	0.8	7.3	6.4	3.1	3.5
11	2	0	5.1	4	2.8	2.5
13	1.5	0	3	2	1.5	1.7
14	0.6	0	2.5	1.2	0.3	0.9
15	0	0	1.1	0	0	0.3

nanomaterial (group C) and I. S. S. The results of the tissue regeneration activity show that, on the tenth day after the first application of the treatment, the tan-con/TiO₂-150-70 nanomaterial presents total tissue regeneration, i.e. 100% healing and cell regeneration of surgical wounds corresponding to the application of condensed tannins (group A) and the TiO₂-70 nanomaterial (group C) and the isotonic saline solution (I. S. S.). The great potential for tissue regeneration of the tan-con/TiO₂-150-70 nanomaterial in a short period of time may be due to the synergism of the condensed tannins presented in the mesh of the TiO₂-70 nanomaterial. Treatment with condensed tannins applied in surgical wounds to rabbits, an area of closure (granulation) is observed on the fourteenth day of 94%.

Significance test corresponding to the average values for 3 treatments applied to 6 rabbits of the New Zealand breed.

It is a question of demonstrating, through their stocking vectors, if there are significant differences in the samples, in order to conclude which healing treatment worked best, for which we will use:

The statistic T^2 :

$$T^2 = n_1 n_2 (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^T C^{-1} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / (n_1 + n_2) \quad (1)$$

$$F = (n_1 + n_2 - p - 1) T^2 / \{ (n_1 + n_2 - 2) p \} \quad [8]. \quad (2)$$

Where n_1, n_2 are the sample sizes, $(\bar{x}_1, \bar{x}_2)$ are the mean vectors of each sample, p the number of variables and C the grouped matrix. These statistics are used to compare the samples 2 by 2 and be able to determine significant changes in these samples, we will do this by comparing the samples of rabbit 1 with rabbit 2, rabbit 3 with rabbit 4 and rabbit 5 with rabbit 6 and the other combinations and results are shown in table 3.

For the 2-in-2 test, it is necessary to know the mean vectors and covariance matrices. T and F statistics were programmed using MATLAB. The results are as follows:

For rabbit 1 and rabbit 2 samples, their mean vectors were calculated:

$$x = \begin{bmatrix} 10.8000 \\ 10.6467 \end{bmatrix} \quad y = \begin{bmatrix} 10.8600 \\ 8.8933 \end{bmatrix}$$

their covariance matrices:

$$\text{covariance } x = \begin{bmatrix} 67.2886 & 68.7807 \\ 68.7807 & 70.5355 \end{bmatrix}$$

$$\text{covariance } y = \begin{bmatrix} 84.6426 & 83.5961 \\ 83.5961 & 83.7392 \end{bmatrix}$$

and its covariance matrix with clustered sample:

$$c = \begin{bmatrix} 75.9656 & 76.1884 \\ 76.1884 & 77.1374 \end{bmatrix}$$

its inverse matrix:

$$c^{-1} = \begin{bmatrix} 1.3997 & -1.3825 \\ -1.3825 & 1.3785 \end{bmatrix}.$$

And the results obtained when applying formulas (1) and (2) are:

$$T=34.0019 \quad \text{and} \quad F=16.3938.$$

Which are clearly high values and as F is greater than 1 and T is a large value, a significant difference is evident in the samples, although the same healing method has been applied to rabbits 1 and 2.

When comparing rabbit 3 and rabbit 4 samples, the following results were obtained: averages vectors:

$$x = \begin{bmatrix} 11.6667 \\ 8.9333 \end{bmatrix} \quad y = \begin{bmatrix} 10.9800 \\ 8.2933 \end{bmatrix}$$

covariances:

$$\begin{aligned} \text{covariance } x &= \begin{bmatrix} 99.5367 & 90.8840 \\ 90.8840 & 84.4924 \end{bmatrix} \\ \text{covariance } y &= \begin{bmatrix} 78.7596 & 77.5463 \\ 77.5463 & 79.2250 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

the covariance matrix of the grouped simple is:

$$c = \begin{bmatrix} 89.1456 & 84.2152 \\ 84.2152 & 81.8587 \end{bmatrix}$$

its inverse is:

$$c^{-1} = \begin{bmatrix} 0.3990 & -0.4105 \\ -0.4105 & 0.4345 \end{bmatrix}.$$

Then using formulas (1) and (2) we have to:

$$T=0.0399 \quad \text{and} \quad F=0.0192.$$

That they are very small values for both T and for F which is less than 1, therefore, we can conclude that when comparing rabbit samples 3 and rabbit 4 with the same treatment, there is no significant difference between one sample and the other, for rabbits 3 and 4.

When comparing rabbit 5 and rabbit 6 samples, the following results were obtained: media vector:

$$x = \begin{bmatrix} 11.9000 \\ 11.4333 \end{bmatrix} \quad y = \begin{bmatrix} 8.4400 \\ 9.7933 \end{bmatrix}$$

their covariances:

$$\begin{aligned} \text{covariance } x &= \begin{bmatrix} 52.2457 & 56.9271 \\ 56.9271 & 62.2224 \end{bmatrix} \\ \text{covariance } y &= \begin{bmatrix} 47.1626 & 53.0274 \\ 53.0274 & 60.0392 \end{bmatrix} \end{aligned}$$

the covariance matrix with the grouped sample is:

$$c = \begin{bmatrix} 49.7041 & 54.9773 \\ 54.9773 & 61.1308 \end{bmatrix}$$

Table 3. Results of 2-in-2 sample comparisons

	rabbit 1 vs rabbit 2	rabbit 1 vs rabbit 3	rabbit 1 vs rabbit 4
T	34.0019	43.8290	30.5817
F	16.3938	21.1318	14.7447
	rabbit 1 vs rabbit 5	rabbit 1 vs rabbit 6	
T	3.8373	44.7703	
F	1.8501	21.5857	
	rabbit 2 vs rabbit 3	rabbit 2 vs rabbit 4	rabbit 2 vs rabbit 5
T	2.7290	1.9174	19.1709
F	1.3158	0.9232	9.2431
	rabbit 2 vs rabbit 6		
T	81.3324		
F	39.2138		
	rabbit 3 vs rabbit 4	rabbit 3 vs rabbit 5	rabbit 3 vs rabbit 6
T	0.0399	27.9687	73.5107
F	0.0192	13.4849	35.4427
	rabbit 4 vs rabbit 5	rabbit 4 vs rabbit 6	
T	21.3105	67.1489	
F	10.2747	32.3754	
	rabbit 5 vs rabbit 6		
T	113.5830		
F	54.7632		

its inverse is:

$$c^{-1} = \begin{bmatrix} 3.8320 & -3.4463 \\ -3.4463 & 3.1150 \end{bmatrix}.$$

And using formulas (1) and (2) you have to:

$$T=113.5830 \quad \text{and} \quad F=54.7632.$$

Which denotes a clear difference in its vector of stockings, which means that although it is the same treatment that is applied to rabbit 5 and rabbit 6, there are differences in the evolution of the healing process. The other comparisons are summarized in Table 3.

RESULTS

It can be observed in the results table that when comparing all rabbits by pairs, rabbits 3 and 4, the ones to whom the Tepezcohuite treatment was applied to, did not show significant differences, which can be interpreted that the scars disappeared, that is to say, when having a faster healing process, the wounds closed and therefore the differences disappeared. We can therefore conclude that the treatments used do show differences, but the Tepezcohuite treatment can be considered to have healed better, as seen in the photos, and that it statistically coincided with the application of the Hotelling test.

CONCLUSIONS

The nano reservoirs of Tan/TiO₂-150, show faster closure in surgical wounds caused intentionally on the back of the rabbits, the evolution of healing (closure) of these presented 11 days after having caused the wounds. The tannins extracted from the Tepezcohuite bark show a better healing speed. The reference nano reservoir TiO₂ presented an activity similar to tannins. While the isotonic saline solution presented scarring at 13 days, where scarring is partial. Therefore, according to the results the efficiency of the nano reservoirs in the speed of healing (closure) is established the following scheme: Tan/TiO₂-150 > condensed tannins ≥ TiO₂ > I.S.S.

When conducting an experiment, where it is a question of demonstrating the effectiveness of one treatment with respect to another, it is important to know if the data provided by the experiment has significant differences. It was possible to prove that out of the 12 samples of size 15, when comparing them to 2 in 2, it was only found that the samples of rabbits 3 and 4 did not have significant differences, because the evolution of cicatrization was evolving favorably in these rabbits and was much better than the other treatments, the other comparisons, if they demonstrated significant differences.

In conclusion, the Hotelling's significance test indicated that there are significant differences in the closure process in treatments A, C and S.S.I., but that in terms of the one that healed his wounds the fastest, it was rabbits 3 and 4 to which the nano tannin reservoir treatment was applied/TiO₂-150, which is the B treatment.

References:

1. Cancio L.C., Lundy J.B., Sheridan R.L. Evolving changes in the management of burns and environmental injuries. *Surg Clin N Am*, 2012, vol. 92, pp. 959-86.
2. Cianci P., Slade J.B., Sato R.M., Faulkner J. Adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the treatment of thermal burns. *Undersea Hyper Med*, 2013, vol. 40, pp. 89-108.
3. Jadue A.N., Rojas P.H., Lineas de Langer en cirugia dermatologica. *Revista Chilena de Dermatologia*, 2016, vol. 31, no. 2, pp. 194-197,
4. Aguilar-De-Leyva A., Campinez M.D., Casas M., Caraballo I., Critical Points and Phase Transitions in Polymeric Matrices for Controlled Drug Release. *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies. Structure and Chemistry*, Wiley, 2015, vol. 1, 101-142.
5. Carrillo-Mora P., Gonzalez-Villalba A., Macias-Hernandez S.I., Pineda Villasenor C. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versatil de la medicina regenerativa? *Cir Cir*, 2013, vol. 81, pp. 74-82.
6. Sarmiento O.F., Garcia C.O., Plantas utiles multipropósitos en una comunidad del area de influencia de las reservas de la biosfera La Sepultura y El Ocote, Chiapas, Mexico. *LACANDONIA*, 2015, vol. 9, no. 1, pp. 37-44.
7. Cadena-Iniguez P., Cruz-Morales F.D.C., Ballinas-Albores E. Tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* L (Willd), el árbol de la piel tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* L (Willd)), the skin tree, agro productividad, 2014, vol. 7, no. 6.
8. Meyers L.S., Gamst G., Guarino A.J. Applied Multivariate Research, first Edition. *Edit. Sage Publication*, Inc, Hotelling's, 2006, vol. 2, pp. 365-405.

ГИПОТЕЗА КОНТАМИНАЦИИ МЕМБРАН ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

Нечипуренко Ю.Д.¹, Касерес Х.Л.²¹ Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта РАН
ул. Вавилова, 32, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: nech99@mail.ru² Cuban Neurosciences Center

Street. 190 e / 25 and 27. Cubanacan. Playa. Havana. CP 11600

Поступила в редакцию: 20.07.2021

Аннотация. Приводятся данные в пользу гипотезы Альтрупа о контаминации мембраны, связывающей пароксизмальную деполяризацию, наблюдаемую при эпилептической активности, с пейсмекерным потенциалом. Предложена связь между физико-химическими характеристиками мембраны, текучестью и контаминациями, и способностью проводить импульс и перезаряжаться. Обсуждаются предложенные ранее способы лечения эпилепсии, основанные на кетогенной диете и их возможные механизмы в свете гипотезы Альтрупа. Среди возможных механизмов действия кетогенной диеты подчеркивается противозепилептическое действие кетонных тел, роль повышенного синтеза глутатиона и эффект полиненасыщенных жирных кислот и холестерина, включенных в состав диеты. Эти три механизма, среди других эффектов, приводят к регуляции текучести и других биофизических свойств липидного бислоя, а также к очищению мембраны от амфифильных примесей.

Ключевые слова: эпилептическая активность, пароксизмальная деполяризация, пейсмекерный потенциал, гипотеза Альтрупа, контаминация мембран, латеральное давление мембран, кетогенная диета, глутатион.

Для большинства типов эпилептической активности общим электрофизиологическим следом является пароксизмальная деполяризация (ПД). Во время эпилептической активности некоторые нейроны проявляют длительную деполяризацию большой амплитуды, это и есть пароксизмальная деполяризация мембранного потенциала (см. [1] и рис. 1).

Наши знания о нейрофизиологических основах эпилепсии далеко неполны, но некоторые исследователи ожидают, что, понимая биофизические основы ПД можно приблизиться к патофизиологии эпилепсии и очертить рациональные способы её лечения. В рамках доминирующей идеи о том, что эпилепсия является результатом дисбаланса между возбуждением и торможением в нервной ткани [2], было высказано предположение, что ПД являются гигантскими возбуждающими постсинаптическими потенциалами [3].

Ряд исследователей изучает возникновение и распространение эпилептической активности в буккальных ганглиях наземной улитки *Helix pomatia* [4-6]. Нервная система у *Helix* довольно проста, что позволяет использовать улитку как удобную модель для проведения биофизических экспериментов [7]. В частности, каждый из обоих буккальных ганглиев *Helix* имеет четыре гигантских нейрона с каждой стороны, и из них только нейрон БЗ способен систематически развивать ПД в присутствии таких проконвульсивных средств, как пентилентетразол (ПТЗ).

Эта простая модель позволяет подойти к пониманию развития эпилепсии у человека, несмотря на большое филогенетическое расстояние между человеком и улиткой [4].

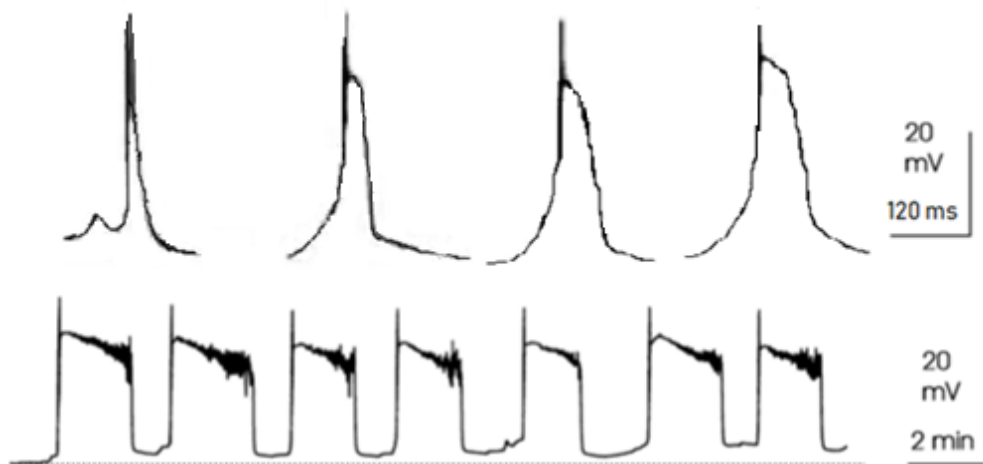


Рисунок 1. Пароксизмальные деполяризации, регистрируемые внутриклеточно в нейронах коры кошки при местном применении пентилентетразола (верхняя панель, адаптировано из [1]), и в нейроне *Helix* БЗ после применения 40 мМ ПТЗ (нижняя панель, неопубликованные данные авторов)

Возможность генерации ПД в нейронах, полностью изолированных как у беспозвоночных [4] так и у позвоночных [5], и тот факт, что ПД сопровождаются увеличением импеданса нейронов [3] не согласуется с идеей, что ПД имеют синаптическую природу. С другой стороны, в нейроне БЗ было отмечено, что с увеличением дозы проконвульсантов пейсмерные потенциалы превращаются в ПД [10]. На основе математической модели Кононенко для пейсмерного потенциала нейронов виноградной улитки [9, 11], Гарсия теоретически показал возможность перехода от пейсмерного потенциала к ПД [12].

Гипотеза контаминации мембраны.

Ульрих Альтруп выдвинул гипотезу мембранной контаминации более двадцати лет назад. Он полагал, что если вещества, так резко отличающиеся по механизму действия, как гептанол, пентилентетразол, этомидат, и даже низкая концентрация магния, способны индуцировать ПД, то основной механизм эпилептогенеза должен быть довольно неспецифическим. Разнообразные процессы, связанные с каналами утечки, калиевыми каналами, большим набором лиганд-зависимых каналов и др. подвержены влиянию в одном и том же диапазоне концентраций ПТЗ (а также этомидата). Эти наблюдения указывают на существование неспецифического механизма эпилептогенеза. Альтруп и его соавторы обнаружили при помощи весов Вильгельми, что эпилептогенные вещества ПТЗ и этомидат вызывают, в одном и том же диапазоне эпилептогенных концентраций, постепенное повышение латерального давления липидных монослоев [3].

Наконец, совокупность экспериментальных данных привела Альтрупа к гипотезе, что эпилептогенные амфифильные вещества проникают в липидный бислой мембраны нервной клетки, и что это включение увеличивает латеральное давление в бислое, вызывая ПД в нейронах, способных генерировать пейсмерные потенциалы. Повышенное латеральное давление снижает текучесть мембраны, влияя на подвижность мембранного белка и вызывая переход от жидко-конденсированного состояния к конденсированному твердому состоянию.

Белково-липидные взаимодействия и возбудимость нейронов.

Белково-липидные взаимодействия и их связь с возбудимостью обсуждались в течение нескольких десятилетий в биофизических исследованиях. Так, в лаборатории Твердислова было показано [13], что агенты, изменяющие биофизические свойства мембран (такие, как алкоголи гомологического ряда и ацетон) способны изменять сродство Na,K-АТФазы к моновалентным катионам. Классическая модель Ходжкина и Хаксли [14] уделяет мало внимания белково-липидным взаимодействиям. Тасаки предположил, что распространение нервного импульса сопровождается волной механического возбуждения, которая движется вдоль аксона [15]. В последнее время появились свидетельства того, что распространение потенциала действия сопровождается стабильным солитоном механической деформации клеточной мембраны [16]. В работах [16-19] было высказано предположение, что открытие ионных каналов, участвующих в генерации нервного возбуждения, требует механических изменений в двойном липидном слое. В пользу этого предположения приводится аргумент, что во время активации ионных каналов происходит деформация мембраны [16-17]. С другой стороны, измерения энтальпии во время распространения потенциала действия не соответствуют предсказаниям Ходжкина и Хаксли, но свидетельствуют в пользу модели распространяющегося механического импульса [18-19].

Можно также ожидать, что изменение состава и свойств мембранных амфифильных веществ повлияет и на пейсмерные потенциалы, вызывая аномальные изменения, которые приводят к эпилептогенезу, в соответствии с гипотезой контаминации мембран.

Механизм кетогенной диеты в свете гипотезы контаминации мембран.

С начала XX века известно, что кетогенная диета (КД) способна улучшить состояние пациентов с тяжелой эпилепсией. Типичная кетогенная диета очень богата жирами и бедна углеводами (обычно пропорция жиров к нежирам равна четыре к одному). В последние 30 лет КД вновь привлекла внимание специалистов. Около 50-60% пациентов, резистентных к нескольким противосудорожным лекарствам, уменьшают по крайней мере на 50% частоту припадков, и примерно 20% достигают полного подавления судорог.

Многие из эффектов КД могут получить объяснение в свете гипотезы о мембранной контаминации, предложенной Альтрупом. Мы выделяем следующие три аспекты КД:

- 1) противосудорожный эффект кетоновых тел,
- 2) связь глутатиона с противоэпилептическими эффектами КД и
- 3) значение полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и холестерина в действии КД.

Противосудорожное действие кетоновых тел.

Довольно давно была предложена гипотеза о том, что кетоновые тела могут действовать непосредственно как фармакологические агенты. Так, Кейт (1933) сообщил, что приступы, вызванные туйоном у кроликов, были купированы предварительной обработкой ацетоацетатом [20]. Позже это было подтверждено на модели мышей, чувствительных к аудиогенным припадкам [21]. Также есть сообщение о противосудорожном действии ацетона [22]. Лиходий и др. в 2003 г. [23] сообщили о дозозависимом подавлении судорожных приступов внутрибрюшинным введением ацетона в четырех отдельных моделях припадков и эпилепсии на животных. В поддержку идеи о том, что эффект ацетона является одним из основных механизмов действия КД, является тот факт, что пациенты с эпилепсией, которые положительно реагировали на КД, демонстрировали высокие уровни ацетона в головном мозге (выше 1 мМ) [24]. Этот результат привел к тому, что Лиходий и др. выдвинули идею, что ацетон является причинным фактором противосудорожных эффектов КД [23].

В то же время кетоновые тела, по видимому, не изменяют синаптическую передачу на уровне гиппокампа, что находится в полном соответствии с вышесказанным и наблюдениями Альтрупа [3]. Так, Тио и др. [25],

используя методы клеточной электрофизиологии обнаружили, что миллимолярные концентрации бета-гидроксипиривата и ацетоацетата не влияют на: *i*) возбуждающие постсинаптические потенциалы и всплески популяции в пирамидных нейронах CA1 после стимуляции коллатералов Шаффера; *ii*) спонтанную эпилептиформную активность в модели приступа гиппокампа-энторинальной коры; и *iii*) ионные токи, вызываемые глутаматом, каинатом и гамма-аминомасляной кислотой в нейронах гиппокампа.

Также было показано, что ацетон способен увеличивать текучесть липидной мембраны [26], что объясняет его противозэпилептический эффект в контексте гипотезы Альтрупа. В целом следует подытожить, что среди множества возможных механизмов противосудорожного действия кетоновых тел, их влияние на вязкость мембраны и соответствующая стабилизация липидного бислоя может иметь фундаментальное значение.

Глутатион и механизм действия кетогенной диеты.

Снижение потребления глюкозы в мозге в конечном итоге может привести повышению уровня глутатиона (GSH), который участвует в окислительно-восстановительных реакциях и защищает клетку от активных форм кислорода (АФК) [27], а также путем прямой конъюгации выводит токсины и многие чужеродные и токсические соединения, этим стабилизируя структуру мембраны [28].

Роль глутатиона при эпилепсии хорошо известна. При помощи модели пилокарпиновых судорог на крысах обнаружено, что концентрация GSH уменьшилась на 54 и 58%, в стриатуме и лобной коре, соответственно [29]. При этом ожидается, что глутатион способствует снижению уровня контаминации мембраны, приводящий к развитию эпилепсии.

Полиненасыщенные жирные кислоты и кетогенная диета.

Кетогенная диета усиливает мобилизацию полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) из жировой ткани в печень и мозг [30]. В частности, КД обогащенная среднецепочечными триглицеридами является основным методом лечения лекарственно-резистентной эпилепсии. Разветвленные производные октановой кислоты, жира со средней длиной цепи, входят в состав рациона при новых методах лечения лекарственно-устойчивой эпилепсии, но структурная основа этой функциональности пока не определена. Было обнаружено, что на модели ПТЗ судорог в срезах гиппокампа крыс выявляется специфичная для точки ветвления активность, которая сравнима с противозэпилептическим эффектом вальпроовой кислоты. Это показывает, что жирные кислоты, присутствующие в КД, могут прямым образом оказывать противосудорожное действие.

Другой механизм противозэпилептического эффекта кетогенной диеты может быть обусловлен воздействием холестерина, который регулирует текучесть мембран. Холестерин, содержащийся в плазматических мембранах эукариот, модулирует текучесть мембран, делая мембрану менее жидкой при более высоких температурах (например, температуре тела 37 °C) за счет ограничения движения фосфолипидов и более жидкой при более низких температурах за счет предотвращения плотной упаковки фосфолипидов [31].

Обсуждение.

Противозэпилептическое действие КД пока не нашло объяснения. Мы полагаем, что на основе гипотезы Альтрупа о контаминации бислоя, можно объяснить известные факты о КД: она приводит к уменьшению контаминации мембран. Так, роль кетоновых тел в стабилизации бислоя может быть связана с влиянием на такие физические свойства бислоя, как текучесть, а также с их действием в качестве антиоксидантов.

Увеличенная активность глутатиона способствует деконтаминации мембран и препятствует действию окислительных агентов. ПНЖК, присутствующие в КД, играют важную роль в стабилизации поврежденных мембран в эпилептической мозговой ткани.

Заметим, что более подробно мы пишем о связи контаминации мембран и эпилепсии и обосновываем эти представления в работе [32].

Заключение.

Совокупность собственных и литературных данных предоставляет новые факты, которые поддерживают и уточняют гипотезу контаминации мембраны, предложенную Ульрихом Альтрупом. Кетогенная диета может изменить свойства двойного липидного слоя мембраны нейрона посредством различных механизмов: во-первых, возможно прямое действия ацетона и других кетоновых тел, во-вторых, усиление синтеза холестерина, стабилизирующего текучесть мембраны и обладающего противозэпилептическим действием. Также при КД может происходить повышение уровня глутатиона, который уменьшает уровень АФК и захватывает эпилептогенные амфифильные вещества. И, наконец, ПНЖК могут стабилизировать поврежденные мембраны.

Благодарности. Авторы благодарят Дениса Семенова, Рональдо Гарсия Рейес, Ольгу Остроумову, Леонида Яковенко и Юрия Ермакова за полезные обсуждения. Работа выполнена при поддержке Кубинского Научного Фонда (FONCI), Проект Нефармакологической Антиэпилептической Терапии, координируемый Кубинским Центром Нейронаук а также финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук России на 2013–2020 годы (темы №01201363818 и № 01201363820).

Список литературы / References:

1. Walden J., Straub H., Speckmann E.J. Epileptogenesis: contributions of calcium ions and antiepileptic calcium antagonists. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 1992, vol. 140, pp. 41-46.
2. Engelborghs S., D'Hooge R., De Deyn P.P. Pathophysiology of epilepsy. *Acta Neurol. Belg.*, 2000, vol. 100, pp. 201-213.

3. Altrup U., Hader M., Hernandez Caceres J.L., Malcharek S., Meyer M., Galla H.-J. Epileptogenic drugs in a model nervous system: Electrophysiological effects and incorporation into a phospholipid layer. *Brain Research*, 2006, vol. 1122, pp. 65-77.
4. Wiemann M., Wittkowski W., Altrup U., Speckmann E.-J., Alterations of neuronal fibers after epileptic activity induced by pentylenetetrazol: fine structure investigated by calcium cytochemistry and neurobiotin labeling (buccal ganglia, *Helix pomatia*). *Cell Tissue Res*, vol. 996, no. 286, pp. 43-53;
5. Speckmann E.-J., Caspers H. Paroxysmal depolarization induced by pentylenetetrazol in isolated neurons of *Helix pomatia*. *Epilepsia*, 1973, vol. 14, pp. 397-408.
6. Segal M. Epileptiform activity in microcultures containing one hippocampal neuron. *J. Neurophysiol*, 1991, vol. 65, pp. 761-770.
7. Никитин Е.С., Балабан П.М. Структурно-функциональная организация сети серотонинэргических нейронов наземной улитки. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова*, 2011, vol. 61, no. 6, pp. 750-762. [Nikitin E.S., Balaban P.M. Structural and functional organization of the network of serotonergic neurons of the land snail. *Journal of Higher Nervous Activity named after I. P. Pavlov*, 2011, vol. 61, no. 6, pp. 750-762. (In Russ.)]
8. Fiest K.M., Sauro K.M., Wiebe S., Patten S.B., Kwon, C.S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D.L., Jette N. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 2017, vol. 88, pp. 296-303.
9. Kramer R.H., Zucker R.S. Calcium-dependent inward current in *Aplysia* bursting pace-maker neurones. *The Journal of Physiology*, 1985, vol. 362, no. 1, pp. 107-130.
10. Altrup U., Hader M., Storz U. Endogenous pacemaker potentials develop into paroxysmal. depolarization shifts (PDSs) with application of an epileptogenic drug. *Brain Research*, 2003, vol. 975, pp. 73-84.
11. Kononenko N.I. Dissection of a model for membrane potential oscillations in bursting neuron of snail, *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol*, 1994, vol. 107A, pp. 323-332.
12. Garcia Reyes R.C. Study of the dynamics of paroxysmal depolarization shifts in stochastic neuronal models. *B.Sc. Thesis, Faculty of Mathematics, Havana University*, 2020.
13. Rezaeva M.N., Khenchel M., Hernandez J.L., Tverdislov V.A. Effect of a number of homologous monoatomic alcohols on the activity of Na, K-ATPase and its reaction with potassium ions. *Biofizika*, 1980, vol. 25, no. 1, pp. 41-43.
14. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol*, 1952, vol. 117, pp. 500-544.
15. Тасаки И. *Нервное возбуждение. Макромолекулярный подход*. Москва, Мир, 1971, 224 с. [Tasaki I. *Nervous excitement. Macromolecular approach*. Moscow, Mir, 1971, 224 p. (In Russ.)]
16. Tasaki I., Iwasa K. Rapid pressure changes and surface displacements in the squid giant axon associated with production of action potentials. *The Japanese journal of physiology*, 1982, vol. 32, no. 1, pp. 69-81.
17. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. *Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб, пособие*. Воронеж: Издательство Воронежского государственного университета, 2000, 296 с. [Artyukhov V.G., Nakvasina M.A. *Biological membranes: structural organization, functions, modification by physico-chemical agents: Textbook, manual*. Voronezh: Voronezh State University Publishing House, 2000, 296 p. (In Russ.)]
18. Godfrey J.R., Diaz M.P., Pincus M., Kovacs-Balint Z., Feczko E., Earl E., Miranda-Dominguez O., Fair D., Sanchez M.M., Wilson M.E., Michopoulos V. Diet matters: Glucocorticoid-related neuroadaptations associated with calorie intake in female rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, vol. 91, pp. 169-178.
19. Abbott B.C., Hill A.V. Howarth J.V. The positive and negative heat production associated with a nerve impulse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 1958, vol. 148, no. 931, pp. 149-187.
20. Keith H.M. Factors influencing experimentally produced convulsions. *Arch. Neurol. Psych.*, 1933, vol. 29, pp. 148-154
21. Bough K.J., Rho J.M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia*, 2007, vol. 48, pp. 43-58.
22. Keith H.M. The effect of various factors on experimentally produced convulsions. *American Journal of Diseases of Children*, 1931, vol. 41, no. 3, pp. 532-543.
23. Likhodii S.S., Serbanescu I., Cortez M.A., Murphy P., Snead III O.C., Burnham W. M. Anticonvulsant properties of acetone, a brain ketone elevated by the ketogenic diet. *Annals of neurology*, 2003, vol. 54, no. 2, pp. 219-226.
24. Seymour K.J., Bluml S., Sutherling J., Sutherling W., Ross B.D. Identification of cerebral acetone by ¹H-MRS in patients with epilepsy controlled by ketogenic diet. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 1999, vol. 8, no. 1, pp. 33-42.
25. Thio L.L., Wong M., Yamada K.A. Ketone bodies do not directly alter excitatory or inhibitory hippocampal synaptic transmission. *Neurology*, 2000, vol. 54, no. 2, pp. 325-325.
26. Dyrda G., Boniewska-Bernacka E., Man D., Barchiewicz K., Slota, R. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Molecular biology reports*, 2019, vol. 46, no. 3, pp. 3225-3232.
27. Stovbun S.V., Yakovenko L.V., The Physicochemical Basis of the Biological Activity and Pharmacological Properties of the Antiviral Agent Panavir. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Fizika*, 2014, no. 6, pp. 101-106.
28. Franks N.P., Lieb W.R. Volatile general anaesthetics activate a novel neuronal K⁺ current. *Nature*, 1988, vol. 333, pp. 662-664.

29. Junior H.V.N., Fonteles M.M.D.F., Mendes de Freitas R. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptive pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2009, vol. 2, no. 3, pp. 130-137.
30. Harayama T., Shimizu, T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *Journal of Lipid Research*, 2020, vol. 61, no. 8, pp. 1150-1160.
31. Martinez-Seara M.H., Rog T., Karttunen M., Vattulainen I., Reigada Kim D.Y., van Brederode H., Sullivan P.G., Spain W.J., Rho J.M., Ketone bodies protect neocortical neurons against acute oxidative stress. *Epilepsia*, 2004, vol. 45, suppl. 7, p. 199.
32. Нечипуренко Ю.Д., Гарсия Рейес Р.С., Эрнандес Касерес Х.Л. Гипотеза контаминации мембран нейронов при эпилепсии и механизм анти-конвульсивного эффекта кетогенной диеты. *Биофизика*, в печати. [Nechipurenko Yu.D., Garcia Reyes R.S., Hernandez Caceres H.L. The hypothesis of contamination of neuronal membranes in epilepsy and the mechanism of the anti-convulsive effect of the ketogenic diet. *Biophysics*, in press (In Russ.)]

MEMBRANE CONTAMINATION HYPOTHESIS FOR EPILEPTIC ACTIVITY

Nechipurenko Yu. D.¹, Hernandez Caceres J. L.²

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences

32 Vavilov str., Moscow, 119991, Russia; e-mail: nech99@mail.ru

² Cuban Center for Neurosciences

Avenida 25 esquina a 198, Playa, La Habana, Cuba; e-mail: jose.caceres@cneuro.edu.cu

Abstract. Evidences are provided supporting Altrup's membrane pollution hypothesis that links paroxysmal depolarization shifts observed during epileptic activity, and pacemaker potentials. It is proposed a connection between membrane's physic-chemical characteristics, fluidity and pollution with neuron's ability to conduct impulses during excitation. There are discussed previously used means of epilepsy treatment based on the ketogenic diet, as well as their possible mechanisms on the light of Altrup's hypothesis. Among possible mechanisms for ketogenic diet, we underline ketone bodies antiepileptic action the role of increased synthesis of glutathione as well as the role played by polyunsaturated fatty acids (PUFA) and cholesterol as components included into the ketogenic diet. These three mechanisms, among others, lead to a regulation of fluidity and other biophysical properties of the membrane bilayer as well as to a cleansing of the membrane from amphiphilic pollutants, in accordance with Altrup's hypothesis.

Key words: Epileptic activity, paroxysmal depolarization shifts, pacemaker potential, Altrup's hypothesis, membrane pollution, lateral pressure, ketogenic diet, glutathione.

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ДЕЦИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ОБЩЕГО БЕЛКА И ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ У КРЫС, ОБЛУЧЕННЫХ В ПРЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Кулиева А.Т.

Институт физиологии им. академика Абдуллы Караева НАН Азербайджана
ул. Шарифзаде, 78, г. Баку, AZ1100, Азербайджан; e-mail: aqulieva@icloud.com
Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Цель настоящей работы - изучение концентрации общего белка и уровня гемоглобина в крови у потомства крыс после действия электромагнитного облучения на них во время внутриутробного развития. Беременные крысы облучались ЭМИ 460 МГц на аппарате «Волна-2» в металлической цилиндрической камере. Облучение проводилось ежедневно в течение 20 мин в зародышевый, предплодный и плодный периоды пренатального развития (соответственно, 1-7, 8-16, 17-21 дни беременности) при плотности потока мощности излучения 30 мкВт/см². Исследования показали, что у 20-дневных крысят от матерей, подвергшихся облучению в каждом из трех периодов пренатального развития, уровень гемоглобина и общего белка ниже, чем в контрольной группе. Наибольшее снижение наблюдается у крысят, облученных в зародышевый период. У 30-дневных крысят эти показатели обнаруживают характерные различия для трех периодов внутриутробного облучения. Содержание гемоглобина и общего белка повышено для крысят, облученных во время зародышевого и плодного периодов; наибольший рост наблюдается у крысят после облучения в плодном периоде. В постнатальном развитии изменения концентрации гемоглобина и общего белка имеют разнонаправленный характер: концентрация общего белка имеет тенденцию к повышению, а концентрация гемоглобина до 20 дней снижается, а после, во всяком случае, к 30-дневному возрасту превышает уровень для контрольной, не облучаемой группы. Таким образом, влияние электромагнитного излучения на показатели периферической крови, которые являются косвенными признаками нарушений физиологически протекающих в организме процессов, замедления окислительно-восстановительных реакций, снижения и ослабления иммунного ответа и реактивности, что не может не отразиться на жизнедеятельности и продолжительности жизни организма, в целом.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, общий белок, гемоглобин, пренатальное развитие

С каждым годом растут контингенты людей, подвергающихся воздействию электромагнитных излучений (ЭМИ), которые вызывают в организме различные нарушения, в том числе и в пренатальном периоде развития. В настоящее время уже достоверно выяснено, что электромагнитное поле даже низкой интенсивности и малой частоты способно оказывать неблагоприятное воздействие на беременную женщину. Длительное использование сотового телефона беременной женщиной может быть причиной преждевременных родов и патологии беременности, которая затем негативно отразится на самом ребенке [1,2]. Электромагнитные излучения широко используются в медицине. Используются они, как для диагностических целей при применении различных излучающих аппаратов, рентгенологических исследований, спектрального анализа, а также для лечения больных с онкологией при рентгеновском и гамма-облучении, для физиотерапевтических процедур с использованием ЭМИ в УВЧ, СВЧ и КВЧ диапазонах. Установлено, что нервная, эндокринная и сердечно-сосудистая системы первыми реагируют на действие электромагнитного излучения. Исходя из этого, необходимо тщательное и всестороннее изучение всех изменений, которые происходят в организме при этих воздействиях [3]. В особенности, это относится к системам поддержания гомеостаза, в том числе, и системе крови. Кровь объединяет работу многих физиологических систем организма, а именно, обеспечивает его гомеостатический потенциал и способность противостоять экстремальным воздействиям.

В связи с этим проблема изучения реакций организма человека и животных на регулярно изменяющийся электромагнитный фон окружающей среды остается актуальной.

Цель настоящей работы – изучение таких показателей крови, как концентрация общего белка и уровень гемоглобина в крови у потомства крыс после действия электромагнитного облучения на них во время внутриутробного развития.

Исследования проводились на белых крысах линии Вистар, содержащихся в обычных условиях вивария. Беременные крысы облучались ЭМИ 460 МГц на аппарате «Волна-2» в металлической цилиндрической камере. Облучение проводилось ежедневно в течение 20 мин, в зародышевый, предплодный и плодный периоды пренатального развития (соответственно, 1-7, 8-16, 17-21 дни беременности) при плотности потока мощности излучения 30 мкВт/см², что в пересчете на усредненную удельную поглощенную мощность в теле животных соответствует 15 мВт/кг. После получения потомства исследования проводились на 20- и 30-дневных крысках. Гемоглобин определяли цианометгемоглобиновым методом. Уровень общего белка определяли по методу Бредфорда (Ю.Б. Филиппович и др. 1982).

Исследования показали, что у 20-дневных крысят, взятых от матерей, подвергшихся облучению в каждом из трех этапов пренатального развития, уровень гемоглобина ниже, чем в контрольной группе (рис. 1).

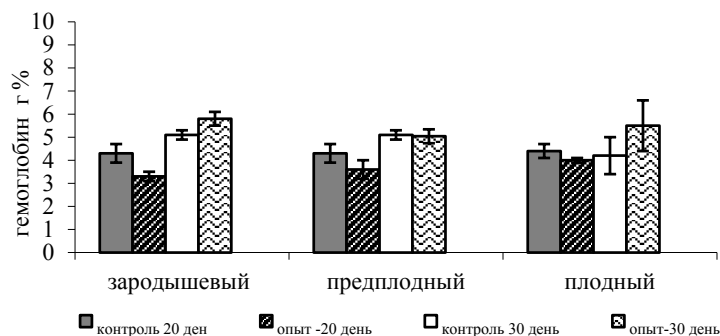


Рисунок 1. Уровень гемоглобина в крови у 20- и 30-дневных крыс из потомства, подвергшихся облучению в период пренатального развития (ЭМИ 460 МГц, плотность потока мощности 30 мкВт/см²)

Наибольшее снижение наблюдается у крысят, полученных от матерей, облученных в зародышевый период. Если у контрольных 20-дневных крысят уровень гемоглобина составляет $4,30 \pm 0,40$ г%, то у опытных это - $3,34 \pm 0,20$ г%, т.е. на 22,3% меньше ($p < 0,05$).

У 30-дневных опытных крысят уровень гемоглобина в крови варьирует в зависимости от того на какой этап пренатального развития приходится облучение. Так, если в случаях облучения в зародышевом и предплодном периодах не приводит к какому-либо достоверному росту уровня гемоглобина по отношению к контрольным животным, то во время плодного периода облучение обуславливает достоверное повышение уровня гемоглобина в крови 30-дневных крыс на 13,7% ($p < 0,05$).

Исследования показали, что у 20-дневных опытных крысят, взятых от матерей, подвергшихся облучению в каждом из трех периодов пренатального развития, уровень общего белка ниже, чем в контрольной группе (рис. 2). Наибольшее снижение наблюдается у крысят, облученных в зародышевый период. У контрольных крыс уровень общего белка составляет $4,2 \pm 0,5$ мг%, тогда как у опытных - $2,2 \pm 0,1$ мг%.

У 30-дневных крысят эти показатели обнаруживают характерные различия для трех периодов внутриутробного облучения. Содержание общего белка повышено для крысят, облученных во время зародышевого и плодного периодов. Наибольший рост наблюдается у крысят после облучения в плодном периоде: уровень общего белка у контрольных крысят - $4,1 \pm 0,6$ мг%, а у опытных - $5,7 \pm 1,0$ мг %).

Разные авторы исследовали кровь животных под действием электромагнитных излучений от разных источников, в том числе и от мобильных телефонов. Колбасин П.Н. и соавт. изучили влияние ЭМИ устройств мобильной связи на седиментацию эритроцитов, в ходе их работы было выявлено снижение скорости оседания эритроцитов при воздействии на эритромассу ЭМП с частотой 1800 МГц, мощностью 1 Вт/см² [4]. Установлено, что воздействие ЭМИ РЧ на кровеносную систему вызывает снижение уровня гемоглобина, количества эритроцитов в периферической крови, увеличение количества ЯСК, изменение клеточного метаболизма лейкоцитов, снижение коэффициента полихроматофильных и нормохроматофильных эритроцитов, увеличение доли делящихся клеток.

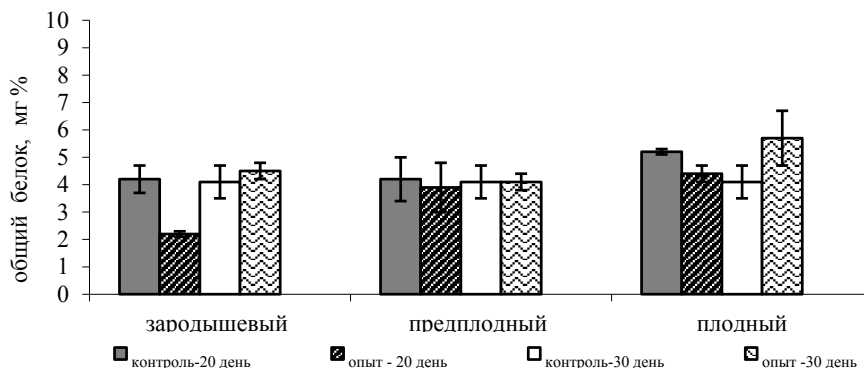


Рисунок 2. Концентрация общего белка в крови у 20- и 30-дневных крыс из потомства, подвергшихся облучению в период пренатального развития (ЭМИ 460 МГц, плотность потока мощности 30 мкВт/см²)

Необходимо отметить и результаты экспериментальных исследований, свидетельствующие о том, что хроническое ЭМИ с низкими нетемпературными уровнями оказывает неблагоприятное действие на течение беременности и развитие эмбриона, особенно при воздействии на ранних стадиях эмбриогенеза [5].

Также электромагнитное излучение влияет на систему крови. Изменения, произошедшие в крови, могут проявляться в виде значительного повышения интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах эритроцитов, подавлении активности низкомолекулярных неферментативных водорастворимых антиоксидантов крови, активации процессов ПОЛ в плазме крови, появлении сдвигов в активности Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов эритроцитов в гиперполяризации мембран эритроцитов [1,6]. В этом аспекте важны данные, полученные нами ранее по изучению общей оксидантной (ООА) и антиоксидантной активности (ОАА) у не половозрелых крыс в связи с влиянием пренатального облучения. Эти исследования показали, что у 20-дневных крысят, родившихся у самок, подвергнутых электромагнитному облучению в период эмбриогенеза, общая оксидантная и общая антиоксидантная активность в эритроцитах повышены, соответственно, на 9,5% и 3,4% по отношению к контрольным животным. Однако общая антиоксидантная активность в плазме снижается на 17,6% по сравнению с контролем. У крысят в возрасте 30 дней все три показателя (ООА – 15,2%, ОАА – 61,1% в плазме и ОАА в эритроцитах – 61,2%) увеличиваются по сравнению с контролем. Согласно результатам, наблюдается нарушение оксидант-антиоксидантного баланса крови развивающегося организма, подвергнутого воздействию неионизирующего электромагнитного излучения во время внутриутробного развития, что позволяет говорить о низкой антиоксидантной активности крови в раннем постнатальном онтогенезе (20-дневный возраст) и превышающей норму – в относительно старшем возрасте (30-дневный возраст).

Настоящее исследование показало, что крысята, рожденные от матерей, подвергшихся облучению на разных этапах пренатального онтогенеза, имеют более низкие уровни, как гемоглобина, так и общего белка в 20-дневном возрасте. Анализ динамики показателей крови пренатально облученных крыс в постнатальном онтогенезе выявляет некоторую гетерохронию в изменении отдельных показателей. Так, в раннем постнатальном онтогенезе изменения концентрации гемоглобина и общего белка имеют разнонаправленный характер: концентрация общего белка к 20-дневному возрасту повышена по отношению к контрольным животным, а концентрация гемоглобина первоначально снижается и лишь после 20 дней жизни начинает увеличиваться. Таким образом, наблюдается развитие так называемой ранней постнатальной «анемии».

Отставленное влияние электромагнитного излучения на показатели периферической крови, которые являются косвенными признаками нарушений физиологически протекающих в организме процессов, замедления окислительно-восстановительных реакций, гипоксических проявлений, снижения и ослабления иммунного ответа и реактивности, что не может не отразиться на жизнедеятельности и продолжительности жизни организма в целом.

Таким образом, электромагнитное облучение крыс во время беременности способно изменить характер развития биохимии потомства в пренатальном и постнатальном онтогенезе. Общая направленность этих изменений указывает на преобладание процессов торможения развития.

Список литературы/References:

1. Шилкова Т.В. Особенности действия электромагнитного поля дециметрового диапазона на систему крови экспериментальных животных в период беременности. *Вестник ЧГПУ*, 2011, № 7. с. 335-342. [Shilkova T.V. Osobennosti deystviya elektromagnitnogo polya desimetrovogo diapazona na sistemu krovi eksperimentalnix zhivotnix v period beremennosti. *Vestnik ChGPU*, 2011, no. 7, pp. 335-342. (In Russ.)]
2. Hanci H. Can prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field affect the morphology of the spleen and thymus, and alter biomarkers of oxidative damage in 21-day-old male rats. *Biotech Histochem.*, 2015.
3. Шибкова Д.З., Овчинникова А.В. Эффекты воздействия электромагнитных излучений на разных уровнях организации биологических систем. *Успехи современного естествознания*, 2015, № 5, с. 156-159. [Shibkova D.Z. Ovchinnikova A.V. Effekti vozdeystviya elektromagnitnykh izlucheniy na raznix urovnyakh organizatsii biologicheskikh sistem. *Uspexi sovremennoy estestvoznaniya*, 2015, no. 5, pp. 156-159. (In Russ.)]
4. Колбасин Н.П. Влияние электромагнитного излучения средств мобильной связи на морфологическую структуру эритроцитов человека. *Таврический медико-биологический вестник*, 2013, т. 16, № 1, ч. 2, с. 82-84. [Kolbasin N.P. Vliyanie elektromagnitnogo izlucheniya sredstv mobilnoy svyazi na morfologicheskuyu strukturu eritrositov cheloveka. *Tavricheskiy metod-biologicheskii vestnik*, 2013, vol. 16, no. 1, iss. 2, pp. 82-84. (In Russ.)]
5. Хадарцев А.А., Яшин А.А., Субботина Т.И., Терешкина О.В. Исследование репродукции мышей линии c57/bl6 и рандомбредных мышей в экспериментах с воздействием неионизирующих высокочастотных излучений. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2006, no. 4, pp. 429-432. [Khadartsev A.A., Yashin A.A., Subbotina T.I., Tereshkina O.V. Investigation of the reproduction of c57 / bl6 mice and randombred mice in experiments with exposure to non-ionizing high-frequency radiation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, no. 4, pp. 429-432. (In Russ.)]
6. Тряпицина Г.А. Влияние электромагнитного излучения радиочастотного диапазона на состояние кровеносной системы у мышей. *Вестник Челябинского государственного университета*, 2008, № 4, с. 88-90. [Tryapitsina G.A. Vliyanie izlucheniya radiochastotnogo diapazona na sostoyanie krovenostnoy sistemi u myishey. *Vestnik Celyabinskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2008, no. 4, pp. 88-90. (In Russ.)]

INFLUENCE OF THE ELECTROMAGNETIC FIELD OF THE DECIMETER RANGE ON THE CONCENTRATION OF TOTAL PROTEIN AND HEMOGLOBIN IN BLOOD OF RAT OFFSPRING IRRADIATED IN THE PRENATAL PERIOD

Kulieva A.T.

Academician Abdulla Garayev Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Azerbaijan
Baku, Azerbaijan; e-mail: aqulieva@icloud.com

Abstract. The aim of this work is to study the concentration of total protein and the level of hemoglobin in the blood of rat offspring after exposure to electromagnetic radiation during intrauterine development. Pregnant rats were irradiated with EMR 460 MHz on the "Volna-2" apparatus in a metal cylindrical chamber. Irradiation was carried out daily for 20 minutes, during the embryonic, pre-fetal and fetal periods of prenatal development (1-7, 8-16, 17-21 days of pregnancy) at a radiation power flux density of $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Studies have shown that 20-day-old rat pups taken from mothers exposed to radiation in each of the three periods of prenatal development have lower hemoglobin and total protein levels than the control group. The greatest decrease is observed in pups irradiated during the embryonic period. In 30-day-old rat pups, these parameters show characteristic differences for three periods of intrauterine irradiation. The content of hemoglobin and total protein is increased for rat pups irradiated during the embryonic and fetal periods; the greatest growth is observed in rat pups after irradiation in the embryonic period. In general, after birth, changes in the concentration of hemoglobin and total protein have a multidirectional nature: the concentration of total protein tends only to increase, and the concentration of hemoglobin initially decreases and begins to increase only after 20 days of life. Thus, the influence of electromagnetic radiation on the peripheral blood parameters, which are indirect signs of disturbances in physiological processes in the body, slowing down of redox reactions, a decrease and weakening of the immune response and reactivity, which cannot but affect the vital activity and life expectancy of the rat as a whole.

Key words: *electromagnetic radiation, total protein, hemoglobin, prenatal development.*

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЕЦИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА АКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У КРЫС

Аббасова М.Т.

Институт физиологии им. академика Абдуллы Караева НАН Азербайджана
ул. Шарифзаде, 78, г. Баку, AZ1100, Азербайджан; e-mail: biokimya_65@mail.ru

Поступила в редакцию: 15.07.2021

Аннотация. Электромагнитное излучение относится к экзогенным физическим факторам среды воздействия, которое может вызывать значительные изменения в организме человека как позитивного, так и негативного характера. Целью наших экспериментальных исследований было изучение влияния неионизирующим электромагнитным излучением дециметрового диапазона на уровень активности церулоплазмينا в крови. В задачу работы входило изучение содержания церулоплазмينا, сывороточного железа и малонового диальдегида. Результаты исследования показали, что достоверные различия концентрации церулоплазмينا по сравнению с показателями контрольной группы выявлены у облученных в течение 1 и 4 недель. По сравнению с контрольной группой у животных, облученных в течение 1 недели, концентрация церулоплазмينا была больше на 67,2% ($p < 0,01$), чем у животных облученных в течение 4 недель – на 28,7% ($p < 0,05$). При этом концентрация церулоплазмينا было значительно ниже при облучении в течение 4 недель, чем у 1 недельной группы. Сывороточное железо у опытных животных увеличивается на 46,8 % ($p < 0,05$) и 28,3 % по сравнению с контрольной группой ($23,3 \pm 0,8$ мкмоль/л) только после 1 и 3 недельного облучения ($34,2 \pm 5,3$ и $29,9 \pm 2,7$ мкмоль/л). В целом количество железа увеличивается относительно контроля. Однако на 2–4 неделях значительного увеличения не наблюдается. Содержание малонового диальдегида в крови у облученных крыс было повышено по сравнению с контрольными животными. Это повышение было наиболее выражено после 3–4 недельного облучения. В последующие сроки облучения концентрация малонового диальдегида была в среднем на 18% выше контрольных значений. Таким образом, в условиях интенсивной генерации свободных радикалов предварительное введение церулоплазмينا недостаточно эффективно. Более того, существует опасность, что церулоплазмин, как металл-связывающий белок, при окислительном стрессе, снижении pH крови и окислительной деструкции может быть источником активных форм металлов переменной валентности, провоцирующих свободнорадикальное окисление.

Ключевые слова: электромагнитное излучение, церулоплазмин, сывороточное железо, кровь, малондиальдегид.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день электромагнитное загрязнение окружающей среды представляется одним из наименее изученных факторов. Известно, что электромагнитное излучение способно ускорять свободнорадикальное перекисное окисление липидов [1]. Это было показано нами в предыдущих исследованиях [2]. Свободные радикалы обладают высоким окислительным потенциалом и вызывают повреждения биологических макромолекул (нуклеиновые кислоты, белки т.д.). В литературе также показано что, воздействие электромагнитного излучения уменьшает содержание в сыворотке крови таких элементов, как магний, железо и медь [3]. Но защиту клеток от повреждающего действия свободных радикалов обеспечивают антиоксидантные системы и некоторые существующие в природе железосодержащие соединения, такие как трансферин, ферритин, лактоферрин, церулоплазмин и др. Исследование регуляции этих плазматических белков является чрезвычайно важным для понимания работы в целом защитной системы против свободных радикалов и перекисидации жиров. Из них церулоплазмин (ЦП) играет важную роль в метаболизме меди и железа, а также в механизмах прооксидантных/антиоксидантных реакций. Основная физиологическая роль церулоплазмينا - участие в окислительно-восстановительных реакциях. В этих реакциях церулоплазмин может действовать как прооксидант, выступая катализатором окисления липопротеидов низкой плотности в присутствии супероксид радикала.

Церулоплазмин обладает также антиоксидантными свойствами, поскольку способен разрушать супероксидные радикалы кислорода, предотвращая таким образом, активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ). Церулоплазмин активно участвует в защите от свободных радикалов, которые могут генерироваться в присутствии ионов железа (от участия Fe^{2+} в реакции Фентона). Нарушение функции церулоплазмينا необходимо при выявлении различных патологий и действии неблагоприятных факторов среды, как для диагностических целей, так и определения областей применения его как препарата. При нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, ацерулоплазминемия) была обнаружена связь между снижением концентрации церулоплазмينا в сыворотке и накоплением ионов Fe^{2+} в органах. В результате увеличения накопления Fe^{2+} происходит повреждение клеток свободными радикалами и их апоптоз (смерть).

Таким образом, основные функции церулоплазмينا в организме человека: повышение стабильности клеточных мембран; участие в иммунологических реакциях (в формировании защитных сил организма), ионном обмене; оказание антиоксидантного (препятствующего окислению липидов клеточных мембран) действия; стимулирование гемопоэза (крововетворения). Целью наших экспериментальных исследований было изучение влияния неионизирующим электромагнитным излучением дециметрового диапазона на уровень активности церулоплазмينا в крови. В связи с этим в данное исследованное входило изучение содержания церулоплазмينا (ЦП), малонового диальдегида (МДА) и сывороточного железа в крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведено на крысах линии Вистар массой 250-300 г, содержащихся в обычных условиях вивария. Животные были разделены на экспериментальную и контрольную группы. Экспериментальная группа животных облучалась ЭМИ 460 МГц на аппарате «Волна-2» (Россия) в металлической цилиндрической камере с диаметром и высотой 15 см. Облучение проводилось ежедневно в течение 20 мин до 4 недель при плотности прямого потока мощности 10 мкВт/см² (соответствует выходной мощности 20 Вт). Сывороточное железо (СЖ) определяли с помощью набора реагентов IRON Liquicolor фирмы «Human» (Германия). В соответствии с инструкцией к набору концентрация железа при определении СЖ измерялась непосредственно в сыворотке. Содержание малонового диальдегида (МДА) исследовали по методу Л.И.Андреевой и соавтр. [4] Содержание церулоплазмينا определяли по методу Ревина Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии церулоплазмينا [5].

Опыты на животных проводились в соответствии с этическими нормами, изложенными в Женевской конвенции «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva., 1990 г.), протокол эксперимента был одобрен местным комитетом по этике экспериментов на животных (28.11.2012, протокол №18).

Нормальность распределения выборок проверялась с помощью теста Шапиро-Уилка, уровень достоверности различий показателей в экспериментальной и контрольной группах оценивался по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Церулоплазмин является одним из основных антиоксидантов крови. Он обеспечивает защиту липопротеидов плазмы и липидов клеточных мембран от перекисидации и воздействия гидроксильных радикалов.

Результаты исследований, показатели - церулоплазмينا, железа и перекисного окисления липидов в крови у крыс в экспериментальной и контрольной группах, приведены в таблице. Достоверные различия концентрации церулоплазмينا по сравнению с показателями контрольной группы (332,2 ± 56,7 мг/л) обнаружены в облученных в течение 1 и 4 недель (555,4 ± 96,0 и 427,6 ± 46,4 мг/л соответственно). По сравнению с контрольной группой у животных, облученных в течении 1 недели, концентрация ЦП была больше на 67,2% (p<0,01), у животных облученных в течение 4 недель – на 28,7% (p<0,05), при этом концентрация ЦП было значительно ниже при облучении в течение 4 недель, чем 1 недели. Сывороточное железо у животных экспериментальной группе увеличивается на 46,8 % (p<0,05) и 28,3 % по сравнению с контрольной группой (23,3 ± 0,8 мкмоль/л) только после 1 и 3 недельного облучения (34,2 ± 5,3 и 29,9 ± 2,7 мкмоль/л). В целом количество железа увеличивается относительно контроля. Однако на 2–4 неделях значительного увеличения не наблюдается.

Основная физиологическая роль церулоплазмينا определяется его участием в окислительно-восстановительных реакциях. Действуя как ферроксидаса, церулоплазмин выполняет важнейшую роль в регуляции ионного состояния железа – окисление Fe^{2+} в Fe^{3+} . Это делает возможным включение железа в трансферрин без образования токсических продуктов железа. Поддержание нормального транспорта и метаболизма железа – жизненная функция церулоплазмينا.

Компенсаторное увеличение активности церулоплазмينا в первую неделю облучения, сменяется на спад активности, вызванный окислительным повреждением металлофермента под влиянием ЭМИ на организм, что

Таблица 1. Влияние электромагнитный излучение дециметровым диапазоне на содержание церулоплазмينا, сывороточного железа и малондеальдегида. (М ± п)

Показатели	Контрольная группа	Экспериментальная группа			
		1 нед. облучения	2 нед. облучения	3 нед. облучения	4 нед. облучения
Церулоплазмин мг/л	332,2 ± 56,7	555,4 ± 96,0	202,1 ± 16,0	289,7 ± 15,3	427,6 ± 14,6
Сывороточное железо мкмоль/л	23,3 ± 0,82	34,2 ± 5,3	24,5 ± 0,98	29,9 ± 2,7	24,8 ± 1,5
МДА мкмоль/л	7,95 ± 1,02	7,8 ± 0,83	7,2 ± 1,2	9,1 ± 1,1	9,4 ± 1,7

может быть следствием изменения отношения активных и неактивных форм церулоплазмينا. С другой стороны, пониженный уровень церулоплазмينا или присутствие его неактивной формы связано со сниженной ферментативной и антиоксидантной активностью. Его пониженная активность как ферроксидазы ограничивает связывание железа трансферрином. Здесь стоит упомянуть, что трансферрин обладает только способностью связывать ионы Fe^{3+} .

Ryszard Krzyminiewski et al. [6] показали, что у пациентов с раком молочной железы получавших лучевую терапию, наблюдалось уменьшение количества ионов Cu^{2+} в церулоплазмине после облучения, что приводило к снижению функции белка. Этот эффект может свидетельствовать о чрезмерном напряжении организма и постепенном истощении его защитных возможностей. С другой стороны, он также может отражать реакцию организма на терапию, направленную на устранение опухоли.

Снижение содержания церулоплазмينا в сыворотке крови является, возможно ответной реакцией на уменьшение уровня свободнорадикального окисления при адаптации организма к электромагнитному излучению.

Имея ввиду, существенную роль ионов железа в образовании активных форм кислорода и возникновении окислительного стресса в клетках с их участием, мы параллельно исследовали содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови у облученных крыс в тех же условиях и сроках. Как показано в таблице, содержание малонового диальдегида в крови у облученных крыс было повышено по сравнению с контрольными животными. Это повышение было наиболее выражено после 3-4 недели облучения. В последующие сроки облучения концентрация малонового диальдегида была в среднем на 18% выше контрольных значений.

Повышенный уровень ПОЛ (малоновый диальдегид) в крови у крыс, облученных ЭМИ дециметрового диапазона, свидетельствует об окислительном действии данного вида неионизирующего излучения. С другой, стороны повышение концентраций продуктов перекисного окисления липидов может быть обусловлено как усилением окислительной дегградации мембран эритроцитов, так и поступлением этих продуктов из других органов с повышенной скоростью образования активных форм кислорода при участии ионов железа.

Н.И.Рябенко и др. [7] показали, что повышение содержания перекисных окислительных эквивалентов и концентрации ионов железа в сыворотке крови облученных крыс создают условия для протекания реакции Фентона, приводящей к повышению концентрации гидроксильного радикала, способного к индуцированию дополнительных повреждений ядерных и мембранных структур облученных клеток.

И.Уакumenko и соавт. [8] приводят многочисленные данные *in vitro* и *in vivo* экспериментов о том, что низкоинтенсивное излучение радиочастотного диапазона, в частности в диапазоне частот, генерируемых мобильными телефонами, вызывает окислительный стресс в различных органах и тканях, в том числе в крови. Увеличение содержания сывороточного железа может быть результатом гемолиза эритроцитов вследствие окислительного стресса, вызванного облучением. M.Lewicka et al [9] показали в работе повышение содержания малонового диальдегида и активности каталазы в плазме и форменных элементах крови под действием излучения мобильного телефона и физиотерапевтического аппарата.

Таким образом, в условиях интенсивной генерации свободных радикалов предварительное введение церулоплазмينا не достаточно эффективно. Более того, существует опасность, что церулоплазмин, как металлсвязывающий белок, при окислительном стрессе, снижении pH крови и окислительной деструкции может быть источником активных форм металлов переменной валентности, провоцирующих свободнорадикальное окисление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены экспериментальные данные, подтверждают способность неионизирующего электромагнитного излучения дециметрового диапазона к окислительному действию на организм в условиях тотального хронического облучения. По изменению содержания церулоплазмينا и других параметров (сывороточный железо и МДА) в сыворотке крови можно судить о степени воздействия неионизирующего ЭМИ на организм, а также функциональное состояние системы гомеостаза железа.

Список литературы / References:

1. Александрова Э.Б. Динамика антиоксидантной системы организма под действием сверхвысокочастотного излучения. *Вестник Челябинского государственного университета*, 2014, № 13, с. 324. [Aleksandrova E.B. Dinamika antioksidantnoi sistemi organizma pod deistviem sverhvisokochastotnogo izlucheniya. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2014, no. 13, p. 324. (In Russ.)]
2. Abbasova M.T., Gadzhiev A.M. Study of changes of protein carbonyl content and lipid peroxidation product in blood of rats exposed to desimeter electromagnetic radiation (460 MHz). *Journal of Medical and Biological sciences*, USA, 2014, vol. 1, pp. 89-92.
3. Burchard J.F., Nguyen D.H., Black E. Macro- and utrace element concentrations blood plazma and cerebrospinal fluid of dairy cows exposed to electric and agnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 1999, vol. 20, pp. 358-364.
4. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.Л. Модификации метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело*, 1988, no. 11, pp. 41-44. [Andreeva L.I., Kojemyakin L.A.,

- Kishkun A.L. Modifikacii metoda opredeleniya perekisei lipidov v teste s tiobarbiturovoi kislotoi. *Laboratornoe delo*, 1988, no. 11, pp. 41-44. (In Russ.)]
5. Камышников В. *Методы клинических лабораторных исследований*. Минск, 2016, с. 716. [Kamishnikov V. *Metodi klinicheskikh laboratornih issledovaniy*. Minsk, 2016, p. 716. (In Russ.)]
6. Krzymiński R., Dobosz B., Kubiak T. The influence of radiotherapy on ceruloplasmin and transferrin in whole blood of breast cancer patients. *Radiat Environ Biophys*, 2017, vol. 56, pp.345-352.
7. Рябченко Н.И., Иванник Б.П., Рябченко В.И., Дзиковская Л.А. Влияние ионизирующего излучения, введения ионов железа и их хелатных комплексов на окислительный статус сыворотки крови крыс. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2011, vol. 51, no. 2, pp. 229-232. [Ryabchenko N.I., Ivannik B.P., Ryabchenko V.I., Dzikovskaya L.A. Vliyanie ioniziruyushchego izlucheniya_ vvedeniya ionov zheleza i ih helatnih kompleksov na oksidantnii status sivorotki krovi kris. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2011, vol. 51, no. 2, pp. 229-32. (In Russ.)]
8. Yakymenko I., Tsybulin O., Sidorik E., Henshel D., Kyrylenko O., Kyrylenko S. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation. *Electromagn. Biol. Med.*, 2016, vol. 35, no. 2, pp. 186-202.
9. Lewicka M., Henrykowska G., Pacholski K., Szczepny A., Dziedziczak-Buczynska M., Buczyński A. The Impact of Electromagnetic Radiation of Different Parameters on Platelet Oxygen Metabolism – In Vitro Studies. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2015, vol. 24, pp. 31-35.

EFFECT OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION OF THE DECIMETER RANGE ON THE ACTIVITY OF CERULOPLASMIN AND LIPID PEROXIDATION IN BLOOD SERUM IN RATS

Abbasova M.T.

Institute of Physiology named after academician Abdulla Karaev of the National Academy of Sciences of Azerbaijan

Baku, Azerbaijan; e-mail: biokimya_65@mail.ru

Abstract. Electromagnetic radiation refers to exogenous physical factors of the impact environment, which can cause significant changes in the human body, both positive and negative. The aim of our experimental studies was to investigate the effect of non-ionizing electromagnetic radiation of the decimeter range on the level of ceruloplasmin activity in the blood. The tasks of the work were to identify the content of ceruloplasmin, serum iron and malondialdehyde. The results of the study showed significant differences in the concentration of ceruloplasmin in comparison with the indicators of the control group were found in those irradiated for 1 and 4 weeks. Compared with the control group, in animals irradiated for 1 week, the concentration of ceruloplasmin was higher by 67.2% ($p < 0.01$), in animals irradiated for 4 weeks, by 28.7% ($p < 0.05$). At the same time, the concentration of ceruloplasmin was significantly lower after irradiation for 4 weeks than in the 1-week group. Serum iron in experimental animals increases by 46.8% ($p < 0.05$) and 28.3% compared to the control group (23.3 ± 0.8 mkmol / l) only after 1 and 3 weeks of irradiation (34.2 ± 5.3 and 29.9 ± 2.7 mkmol / l). In general, the amount of iron increases relative to control. However, no significant increase is observed at 2–4 weeks. The content of malondialdehyde in the blood of the irradiated rats was increased in comparison with the control animals. This increase was most pronounced after 3–4 weeks of exposure. In the subsequent periods of irradiation, the concentration of malondialdehyde was, on average, 18% higher than the control values. Thus, under conditions of intensive generation of free radicals, the preliminary introduction of ceruloplasmin is not effective enough. Moreover, there is a danger that ceruloplasmin, as a metal-binding protein, under oxidative stress, a decrease in blood pH and oxidative destruction can be a source of active forms of variable valence metals that provoke free radical oxidation.

Key words: electromagnetic radiation, ceruloplasmin, serum iron, blood, malondealdehyde.