

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 6, № 4
2021**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 6, № 4
2021**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 6, No. 4, 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, № 4, 2021

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

В.С. Ключкова, А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз, А.В. Ширяев, А.С. Бучельников, Е.В. ШуповаИзменение спектра оптической плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) Platensis*.....543**С.Н. Железнова, В.С. Ключкова, Р.Г. Геворгиз**Оценка плотности культуры *Porphyridium Purpureum (Bory) Drew et Ross* по рассеянию света суспензией клеток..... 548**Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова, И.П. Уваров**Гидрокарбонат натрия как источник углерода для интенсивного культивирования *Porphyridium Purpureum (Bory) Drew et Ross*. В промышленных масштабах 554**Р.Г. Геворгиз, И.П. Уваров, А.П. Репков, С.Н. Железнова**

Вихревое перемешивание культур микроводорослей 559

В.А. Кальпа, А.В. Гаджи, А.О. ЛантушенкоВлияние наночастиц на механические свойства мембран эритроцитов *Scorpena Porcus* 564**Р.А. Меджитов, Е.В. Шупова, В.А. Бучельникова, А.С. Бучельников**Агрегация растительного алкалоида берберина с кофеином и фуллереном C₆₀ в водном растворе 570

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

Р.Г. Геворгиз, А.С. Лелеков

Пути фиксации неорганического углерода у цианобактерий 576

А.В. Брильков, Ю.Ю. Логинов, Е.В. Брилькова, В.В. Ганусов, И.В. Жабрун, А.Н. Шуваев

Математическое моделирование экспериментальной эволюции трансгенных бактерий (ГМО) в модельных и природных экосистемах 580

С.А. Судоргин

Электротранспортные свойства однослойного германена в квазиклассическом приближении 586

А.А. Чекушкин, А.С. ЛелековПродуктивность культуры *Phaeodactylum Tricornutum* в условиях естественного освещения 591

- G. Lima Navarro, J.A. Arzola Flores, A. Maldonado García, G. Guarneros Bejarano, E. Vidal Robles, A.A. Hernandez Santiago**
Multilayer perceptron neural network to predict the surface plasmon resonance of gold nanospheres using their morphological characteristics 597

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- M.A. Rodriguez-Meza, M.A. Morales, A.M. Cervantes-Tavera, B. Zenteno-Mateo, A.A. Hernandez-Santiago**
Glioblastoma growth computational simulation: a minimal model of multiscale angiogenesis 602
- Н.А. Верлов, С.Б. Ланда, В.Л. Эмануэль**
Олигомеры уромодулина в растворах различной ионной силы и pH 607
- Ф.А. Сакибаев, М.Г. Холявка, И.С. Нехаев, В.Г. Артюхов**
In silico исследование аминокислотного состава участков связывания папаина с ингибиторами различной природы 612
- Е.И. Слобожанина, Г.П. Зубрицкая, А.С. Скоробогатова, Е.И. Белевич, Е.И. Венская, Л.М. Лукьяненко**
Механизмы действия лития на эритроциты человека 616
- Т.В. Сологуб, О.А. Мастерова, Ю.Л. Ермолаев, В.А. Овсянников**
Комплексная терапия вирусных заболеваний..... 624
- Г.И. Морозова, Г.В. Корнилаева, О.М. Гринкевич, К.З. Аскарова, О.А. Лопатина, Е.Л. Фирсова**
Трансмембранные потенциалы и митохондриальная активность онкоклеток культуры HeLa в процессе размораживания и при инфицировании аденовирусом 630
- S. Ramos Esparaza, J.A. Arzola Flores, A. Maldonado Garcia, G. Guarneros Bejarano, E. Vidal Robles, A.A. Hernandez Santiago**
Machine learning for predicting the surface plasmon resonance of silver nanospheres 636
- Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский**
Окислительный стресс в системе внутриклеточной цинковой сигнализации: *in vitro* исследование на эритроцитах человека..... 640
- Е.А. Богачева, М.В. Ажищева, А.А. Сыровец, А.О. Лантушенко**
Анализ противовоспалительных свойств зубного порошка при заболеваниях полости рта с использованием микроядерного теста 647
- А.В. Тамашевский, Ю.М. Гармаза, Н.А. Федуро, В.В. Пасюков**
Окислительно-восстановительный баланс в качестве критерия для персонализированного учета ответа на терапию клеток пациентов с острым лимфобластным лейкозом 651
- А.О. Лантушенко, Я.В. Мегер, В.Е. Шаповалова, И.В. Дегтяр, А.В. Синченко, А.Б. Боровков**
Молекулярно-генетический анализ микроводоросли *Dunaliella Salina*, штамм IBSS-2 660

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

**С.И. Барцев, А.Г. Дегерменджи, Н.Н. Дегерменджи, М.Ю. Салтыков,
А.Б. Сарангова**

Экологическая биофизика – возможные горизонты развития 665

А.А. Солдатов

Изменение диффузионных расстояний и химического состава скелетных мышц морских рыб на протяжении годового цикла 675

Е.Н. Скуратовская, А.Д. Сербин, Д.М. Полевой

Влияние полихлорированных бифенилов на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы гепатопанкреаса мидии *Mytilus Galloprovincialis* 680

И.С. Хавронюк, А.А. Мамонтов, В.А. Булков, Д.П. Воронин, А.В. Кузнецов

Присваивание функций опсином трихоплаксов *Trichoplax Adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2 686

В.А. Кальпа, Д.П. Воронин, А.О. Лантушенко

Влияние продуктов разложения пластика на механические свойства мембран гемоцитов *Mytilus Galloprovinci* 695

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2021 ГОД 699

CONTENTS

Volume 6, No. 4, 2021

GENERAL BIOPHYSICS

- V.S. Klochkova, A.S. Lelekov, A.V. Shiryaev, R.G. Gevorgiz, A.S. Buchelnikov, E.V. Shupova**
Change in the optical density spectrum of the batch culture *Arthrospira (Spirulina) Platensis* ...543
- S.N. Zheleznova, V.S. Klochkova, R.G. Gevorgiz**
Determination of culture *Porphyridium Purpureum* (Bory) Drew et ross density by light scattering by cell suspension 548
- R.G. Gevorgiz, I.P. Uvarov, S.N. Zheleznova**
Sodium bicarbonate as a carbon source for intensive cultivation of *Porphyridium Purpureum* (Bory) Drew et ross. On an industrial scale 554
- R.G. Gevorgiz, I.P. Uvarov, S.N. Zheleznova**
Vortex mixing of microalgae cultures 559
- V.A. Kalpa, A.V. Gadzhi, A.O. Lantushenko**
Influence of nanoparticles on the mechanical properties of *Scorpena Porcus* erythrocyte membranes.....564
- R.A. Medzhitov, E.V. Shupova, V.A. Buchelnikova, A.S. Buchelnikov**
Aggregation of plant alkaloid berberine with caffeine and C₆₀ fullerene in aqueous solution 570

MODELLING IN BIOPHYSICS

- R.G. Gevorgiz, A.S. Lelekov**
Pathways of inorganic carbon metabolism in cyanobacteria 576
- A.V. Brilkov, Yu.Yu. Loginov, E.V. Brilkova, V.V. Ganusov, I.V. Jabrun, A.N. Shuvaev**
Mathematical modelling of transgenic bacteria experimental evolution (GMO) in model and natural ecosystems..... 580
- S.A. Sudorin**
Electric transport properties of single-layer germanene in the semiclassical approximation 586
- A.A. Chekushkin, A.S. Lelekov**
Productivity of *Phaeodactylum Tricornutum* culture in natural light conditions..... 591
- G. Lima Navarro, J.A. Arzola Flores, A. Maldonado García, G. Guarneros Bejarano, E. Vidal Robles, A.A. Hernandez Santiago**
Multilayer perceptron neural network to predict the surface plasmon resonance of gold nanospheres using their morphological characteristics.....597

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- M.A. Rodriguez-Meza, M.A. Morales, A.M. Cervantes-Tavera, B. Zenteno-Mateo, A.A. Hernandez-Santiago**
Glioblastoma growth computational simulation: a minimal model of multiscale angiogenesis 602
- N.A. Verlov, S.B. Landa, V.L. Emanuel**
Oligomers of uromodulin in solutions of different ionic strength and pH 607
- F.A. Sakibaev, M.G. Holyavka, I.S. Nekhaev, V.G. Artyukhov**
In silico study of amino acid composition of papaine binding sites with different natural inhibitors 612
- E.I. Slobozhanina, G.P. Zubritskaya, A.S. Skarabahatava, E.I. Belevich, E.I. Venskaya, L.M. Lukyanenko**
Mechanisms of lithium action on human erythrocytes 616
- T.V. Sologub, O.A. Masterova, Yu.L. Ermolaev, V.A. Ovsyannikov**
Complex therapy for viral diseases 624
- G.I. Morozova, G.V. Kornilaeva, O.M. Grinkevich, K.Z. Askarova, O.A. Lopatina, E.L. Firsova**
Transmembrane potentials and mitochondria energy activity in HeLa cancer cells during its defrosting and after infected with adenovirus 630
- S. Ramos Esparaza, J.A. Arzola Flores, A. Maldonado Garcia, G. Guarneros Bejarano, E. Vidal Robles, A.A. Hernandez Santiago**
Machine learning for predicting the surface plasmon resonance of silver nanospheres 636
- Y.M. Harmaza, A.V. Tamashevski**
Oxidative stress in the intracellular zinc signaling system: *in vitro* investigation on human erythrocytes 640
- E.A. Bogacheva, M.V. Azhishcheva, A.A. Syrovets, A.O. Lantushenko**
Analysis of the anti-inflammatory properties of tooth powder in diseases of the oral cavity using a micronucleus test 647
- A.V. Tamashevski, Y.M. Harmaza, N.A. Feduro, V.V. Pasiukov**
Redox balance as a criterion for response to personalized cell therapy for patients with acute lymphoblastic leukemia 651
- A.O. Lantushenko, Ya.V. Meger, V.E. Shapovalova, I.V. Degtyar, A.V. Sinchenko, A.B. Borovkov**
Molecular genetic analysis of *Dunaliella Salina*, strain IBSS-2 660

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

- S.I. Bartsev, A.G. Degermendzhi, N.N. Degermendzhi, Saltykov M.Yu., A.B. Sarangova**
Ecological biophysics - possible horizons of development 665
- A.A. Soldatov**
Diffusion distances and chemical composition of skeletal muscles of marine fish during the annual cycle 675

E.N. Skuratovskaya, A.D. Serbin, D.M. Polevoy

The impact of polychlorinated biphenyls on prooxidant-antioxidant system parameters in hepatopancreas of mussel *Mytilus* 680

I.S. Khavronyuk, A.A. Mamontov, V.A. Bulkov, D.P. Voronin, A.V. Kuznetsov

Assignment of functions to opsins of *Trichoplax Adhaerens* and *Trichoplax* sp. H2 686

V.A. Kalpa, D.P. Voronin, A.O. Lantushenko

The effect of plastic decomposition products on the mechanical properties of hemocyte membranes of *Mytilus Galloprovinci* 695

INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2021 699

ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Клочкова В.С.¹, Лелеков А.С.², Геворгиз Р.Г.², Ширяев А.В.², Бучельников А.С.¹, Шупова Е.В.¹

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

² ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 28.07.2021

Аннотация. Исследовано изменение истинного спектра ослабления в накопительной культуре *Arthrospira (Spirulina) platensis*. В работе использовался двухлучевой спектрофотометр Lambda 365 Double Beam UV-Visible, который оснащён интегрирующей сферой (ИС). Особенность конструкции ИС заключается в том, что она собирает только прошедший свет и основную часть света, рассеянного в прямом направлении. Измерив спектры поглощения образца вблизи и на расстоянии 1 см от интегрирующей сферы, рассчитан спектр поглощения, скомпенсированный на рассеяние. При стандартном расположении кюветы (близко к ИС) оптическая плотность в диапазоне 750–800 нм не принимает нулевые значения. Оптическая плотность монотонно растёт с увеличением расстояния между кюветой и ИС. Это связано с селективным (у пигментов) и неселективным (у клеток микроводоросли) рассеяниями. Определён поправочный коэффициент ослабления света как среднее значение всех L в диапазоне 750–800 нм, который составил 1,61. На основании полученных истинных спектров поглощения показано, что в процессе роста накопительной культуры, при отсутствии лимитирования биогенными элементами, соотношения между пигментами не изменялись: $chl\ a/kar = 1,36$ и $chl\ a/C-ФЦ = 1,06$.

Ключевые слова: спирулина, спектры ослабления, интегрирующая сфера, коэффициент ослабления света, истинный спектр поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Распространение световых волн в водной среде определяет оптические свойства фитопланктона. В природных водах растворённые органические и неорганические соединения, микроводорослей, зоопланктон могут подвергаться различным изменениям за счёт процессов поляризации, рассеяния и поглощения света [1]. Свет становится частично поляризованным и теряет интенсивность в основном на красных, желтых и фиолетовых длинах волн при распространении в воде [2]. Доступное количество световой энергии для фотосинтеза определяется эффективностью поглощения света и его спектром. Поглощенная энергия электромагнитного излучения преобразуется в энергию углеводов в цикле Кальвина. В дальнейшем углеводы используются для биосинтеза, клеточного дыхания и других метаболических процессов [3]. Свет часто является лимитирующим фактором, который определяет скорость роста микроводорослей. Если интенсивность света слишком низкая, клеточное дыхание потребляет углеводы с большей скоростью, чем они синтезируются, при этом структурные компоненты биомассы не образуются. С другой стороны, если интенсивность света высокая, в фотосистеме II образуются свободные радикалы, которые являются причиной фотоокислительного повреждения пигментов и даже гибели клеток. В дополнение к свету существуют также другие абиотические факторы, влияющие на скорость роста микроводорослей: температура, солёность, концентрация биогенных веществ, CO_2 , O_2 , pH, а также токсичные химические вещества [4].

Процессы фотосинтеза, флюоресценции, рассеяния поглощённого света в виде тепла и др., протекающие в клетках микроводорослей, зависят от длины волны падающего света. Видимый свет охватывает длины волн примерно от 390 нм (фиолетовый) до 780 нм (красный) электромагнитного спектра, почти полностью совпадая с диапазоном фотосинтетически активного излучения (ФАР) (380–710 нм). Источники света, такие как солнце, светодиодные лампы или люминесцентные лампы, имеют различные распределение интенсивности (спектр излучения), зависящее от длины волны [1].

Снижение интенсивности светового потока происходит не только при поглощении света, но и в результате светорассеяния. Вследствие многократного отражения и рассеяния в образце (особенно в суспензиях клеток или других мутных средах) световой пучок отклоняется от своего первоначального направления. В результате при измерениях на фотоприёмник попадает не весь прошедший через объект свет, а измеряемая оптическая плотность, в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, повышается. Поэтому зависимость оптической плотности образца от длины волны корректнее называть спектром ослабления светового потока. Спектр, скомпенсированный на рассеяние или записанный на спектрофотометре, оснащённом системой сбора рассеянного света, является истинным спектром поглощения.

Простые прямые однолучевые и двухлучевые спектрофотометры являются стандартным лабораторным оборудованием, но их ограничения не дают достоверных измерений спектральных свойств пигментов живых клеток из-за смешивающих эффектов рассеяния света. Как правило, закон Бугера-Ламберта-Бера применим

только для прозрачных (оптическая плотность меньше 1) растворов вещества [5]. Спектрофотометры с прямым пучком имеют источник света, образец и детекторный диод на одной линии и поэтому не измеряют количественно рассеянный свет. Кроме того, фактическое количество рассеянного света очень сильно зависит от геометрии кюветы для образца и детектора в этом конкретном спектрофотометре и, следовательно, является приборным параметром. Если для измерения луча света, проходящего через суспензию микроводорослей, используется спектрометр прямого или двухлучевого излучения, то термин "оптическая плотность" часто используется вместо коэффициента поглощения, потому что измеренная оптическая плотность на данной длине волны будет представлять собой комбинацию рассеяния света клетками (турбидиметрия) и поглощения пигментами в клетках.

Один из способов устранения потерь рассеянного света – использование в спектрофотометрах интегрирующей сферы [5]. Образец помещается вовнутрь такой сферы, внутренняя поверхность которой хорошо отражает свет. Весь рассеянный свет попадает на фотодетектор, так что измеряемая оптическая плотность обусловлена только истинным поглощением образца. Помимо инструментальных способов учёта светорассеяния используют поправочные коэффициенты. Если регистрировать спектры поглощения образца на разном расстоянии от интегрирующей сферы [6,7], то можно изменять вклад светорассеяния: чем ближе образец к интегрирующей сфере, тем больше рассеянного света попадает на фотодетектор и оптическая плотность образца становится меньше. Измерив спектры поглощения образца вблизи и вдали от интегрирующей сферы, можно рассчитать спектр поглощения, скомпенсированный на рассеяние, и спектр рассеяния света [8].

Целью работы – исследование изменения истинного спектра ослабления в накопительной культуре *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе кафедры «Физика» СевГУ (г. Севастополь). Объектом исследования являлась спирулина *Arthrospira (Spirulina) platensis*, полученная из коллекции из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ. Выращивание проводилось в колбе объёмом 250 мл на среде Заррук [9] (для приготовления среды использовалась дистиллированная вода) методом накопительной культуры. В качестве источника освещения применялась световая решётка из люминесцентных ламп Philips Daylight 54-765. Средняя освещённость рабочей поверхности составляла 5 клк. Объём культуры составлял 200 мл. Барботаж: 0,5 л воздуха на литр культуры в минуту.

Отбор проб для определения оптической плотности и сухого веса проводили из разных областей, находящихся внутри колбы: отбирали по 5 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 30 мл. В средней пробе после перемешивания определяли коэффициент пропускания. Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, измерения проводили относительно дистиллированной воды, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. При пересчёте единиц оптической плотности на сухую биомассу (СВ) использовали рассчитанный коэффициент 1. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (если значение пропускания становилось меньше 30%), пробу разбавляли дистиллированной водой.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне от 400 до 800 нм с шагом 1 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO₄). Кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см располагали в стандартном положении и на расстоянии 1 см от входного окна ИС. Спектры записывались на первые сутки эксперимента (без разбавления пробы), на третьи (разбавление 1:2) и на пятые (1:3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе эксперимента получена накопительная кривая роста *A. platensis*, представленная на рисунке 1. Экспоненциальная фаза роста, которая представлена на рисунке с 0 по 2 сутки эксперимента, характеризуется постоянством удельной скорости роста ($\mu_m = \text{const}$), т. к. клетки не затеяют друг друга [4]. Аппроксимация этого участка позволила определить величину μ_m , которая составила 0,67 сут⁻¹:

$$B = 0,12 \cdot e^{0,67 \cdot t}.$$

Линейная фаза роста, представленная на рисунке с 2 по 4 сутки эксперимента, характеризуется постоянством максимальной продуктивности культуры P_m , которая в свою очередь определяется величиной светового потока на ключевой фермент [4]. Аппроксимация линейной фазы роста позволила определить величину P_m , которая составила 0,40 г СВ · л⁻¹ · сут⁻¹:

$$B = 0,49 + 0,40 \cdot (t - 2).$$

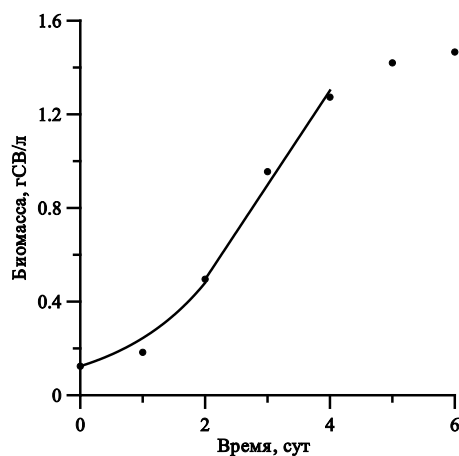


Рисунок 1. Накопительная кривая роста культуры *A. platensis*. Линия – аппроксимация экспоненциальной (0-2 сут) и линейной фаз (2-4 сут). Значения коэффициентов в тексте

На рисунке 2 показаны спектры поглощения плотной культуры *A. platensis*, записанные на спектрофотометре Lambda в кювете на разных расстояниях от ИС. Следует отметить, что при стандартном расположении кюветы (близко к ИС) оптическая плотность $D(\lambda; 0)$ в диапазоне 750–800 нм, где пигменты не способны к поглощению, не принимает нулевые значения. В этой области оптическая плотность монотонно растёт с увеличением расстояния между кюветой и ИС. Это связано с наличием неселективного рассеяния у клеток микроорганизмов, которое обусловлено резкими изменениями показателя преломления на межфазных границах. Вероятно, свой вклад вносит и селективное рассеяние, которое вызвано резкими изменениями показателя преломления пигментами, встроенными в тилакоидные мембраны, в области поглощения света [8].

Истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние, определялся по формуле [5]:

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; r) - L_{\text{осл-е}}(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (1)$$

где $D(\lambda; r)$ – оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ – поправочный коэффициент ослабления света; $D(\lambda; 0)$ – оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы.

Предполагается, что поправочный коэффициент ослабления света $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ не зависит от длины волны и его значение может быть определено, перейдя в область длин волн, в которой образец не поглощает (т. е. к области 750–800 нм видимого диапазона):

$$L_{\text{осл-е}}(r; 0) = \frac{D_{750-800}(\lambda; r)}{D_{750-800}(\lambda; r) - D_{750-800}(\lambda; 0)} \quad (2)$$

Рассмотрим расчёт истинного спектра поглощения на примере спектров, полученных на момент первых суток проведения эксперимента (рис. 2 А).

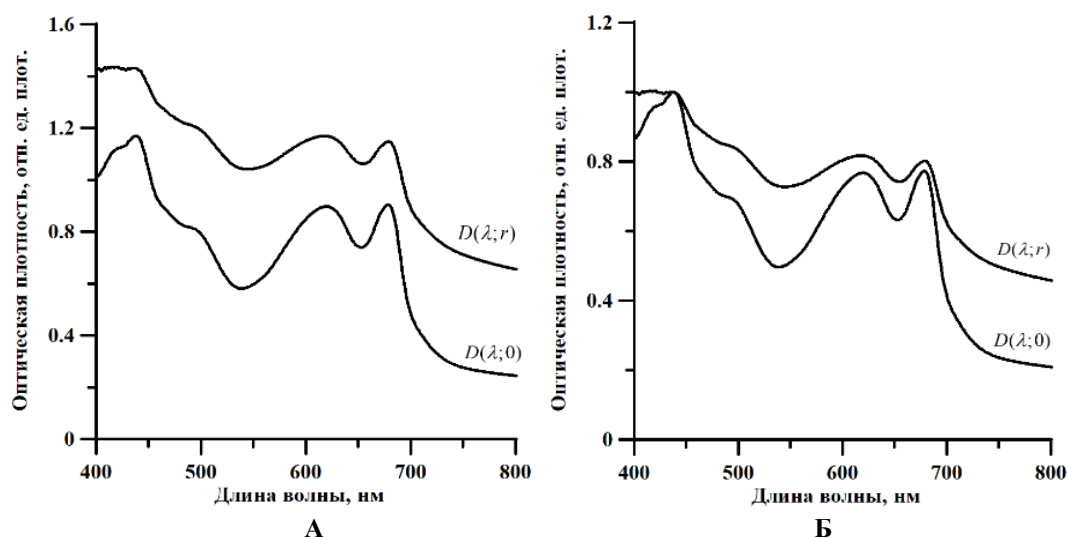


Рисунок 2. Спектры оптической плотности (А) и нормированные (на 440 нм) спектры (Б) культуры *A. platensis*, полученный при стандартном положении кюветы ($D(\lambda; 0)$) и на расстоянии ($D(\lambda; r)$) от входного окна ИС

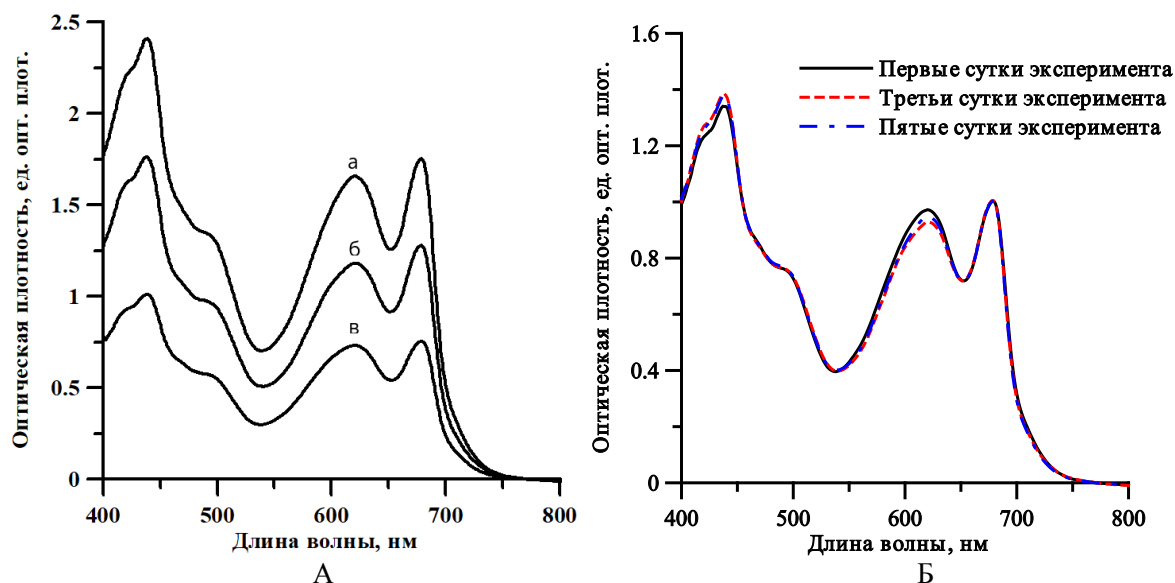


Рисунок 4. Истинные спектры поглощения (А) и нормированные на 680 нм спектры (Б) при различной плотности культуры *A. platensis*, на первые (а), третьи (б) и пятые (в) сутки эксперимента, при использовании выражения (1)

Первым делом необходимо определить значение поправочного коэффициента ослабления света $L_{осл-е}(r;0)$ в области 750–800 нм. Используя (2), проведём расчёт для некоторых значений λ :

$$L_{750} = \frac{D(750;r)}{D(750;r) - D(750;0)} = \frac{0,71}{0,71 - 0,28} = 1,65$$

$$L_{775} = \frac{D(775;r)}{D(775;r) - D(775;0)} = \frac{0,68}{0,68 - 0,26} = 1,62$$

$$L_{800} = \frac{D(800;r)}{D(800;r) - D(800;0)} = \frac{0,65}{0,65 - 0,24} = 1,58$$

Как видно из расчётов, поправочный коэффициент ослабления меняется с увеличением длины волны. На используемом спектрофотометре Lambda эта величина незначительно убывает. Поэтому для расчётов будем использовать длину волны 800 нм. Также, согласно некоторым методикам [6], можно использовать среднее значение L в области 750–800 нм. В работе использовался коэффициент $L_{осл-е}(r;0) = 1,61$.

Используя формулу (1), рассчитаем истинное значение оптической плотности для каждой длины волны:

$$\tilde{A}(400) = 1,43 - 1,61 \cdot [1,43 - 1,02] = 0,77$$

Проведя аналогичные расчёты для остальных спектров, полученных на момент третьих и пятых суток эксперимента, получим истинные спектры поглощения культуры *A. platensis*, компенсированные на рассеяние (рис. 4).

Истинные спектры поглощения, полученные с использованием выражения (1), характеризуются отсутствием поглощения в диапазоне 750–800 нм (рис. 4). Это свидетельствует о том, что в процессе роста накопительной культуры концентрация основных фотосинтетических пигментов спирулины, а именно хлорофилла а, каротиноидов и С-фикоцианина, увеличивалась пропорционально, соотношения между ними не изменяются. Результаты приведены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано изменение истинного спектра ослабления в накопительной культуре *A. platensis*. При снятии спектров использовался спектрофотометр Lambda, оснащённый интегрирующей сферой. Её особенность

Таблица 1. Соотношения пигментов при разной плотности культуры

Соотношения пигментов	λ , нм	А	Б	В
Хл а/кар	680/500	1,376	1,363	1,364
Хл а/С-ФЦ	680/620	1,028	1,078	1,056

заключается в том, что она собирает только прошедший свет и основную часть света, рассеянного в прямом направлении. Предложенный метод позволяет минимизировать неопределённость расчётов, связанных со светорассеянием. На основании полученных данных (истинных спектров поглощения) оценено изменение концентрации пигментов в процессе роста накопительной культуры спироулины, а также соотношения между ними. Применяв данную методику к кривым рассеяния, станет возможным определение дополнительной информации о свойствах клеток фотосинтезирующих микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ " № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Lehmuskero A., Skogen Chauton M., Boström T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 2018, vol. 168, pp. 43-56. doi: 10.1016/j.poc.2018.09.002
2. Беспрозванных В.Г., Первадчук В.П. *Нелинейная оптика: учеб. Пособие*. Пермь: Изд-во Перм. гос. техн. ун-та, 2011, 200 с. [Besprozvannykh V.G., Pervadchuk V.P. *Nonlinear optics: textbook. Manual*. Perm: Publishing house of the Perm State Technical University. un-ta, 2011, 200 p. (In Russ.)]
3. Холл Д., Рао К. *Фотосинтез*: Пер. с англ. М.: Мир, 1983, 134 с. [Hall D., Rao K. *Photosynthesis*: TRANS. from English. M.: Mir, 1983, 134 p. (In Russ.)]
4. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей*. Белгород: ООО «КОНСТАНТА», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth*. Belgorod: CONSTANTA LLC, 2017, 152 p. (In Russ.)]
5. Ritchie R.J., Sma-Air S. Using integrating sphere spectrophotometry in unicellular algal research. *J. Appl. Phycol.*, 2020, vol. 32, no. 5, pp. 2947-2958. doi: 10.1007/s10811-020-02232-y
6. Merzlyak M.N., Naqvi, K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2000, vol. 58, pp. 123-129. doi: 10.1016/S1011-1344(00)00114-7
7. Davies-Colley R.J., Pridmore R.D., Hewitt J.E. Optical properties of some freshwater phytoplanktonic algae. *Hydrobiologia*, 1986, vol. 133, pp. 165-178. doi: 10.1007/BF00031865
8. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей. *Физиология растений*, 2008, т. 55, № 3, с. 464-470. [Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Maslova I.P., Nakvi R.K., Solovchenko A.E., Klyachko-Gurvich G.L. Spectra of light absorption and scattering by cellular suspensions of some cyanobacteria and microalgae. *Plant Physiology*, 2008, vol. 55, no. 3, pp. 464-470. (In Russ.)]
9. Zarrouk C. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D these, Paris, 1966, 114 p.

CHANGE IN THE OPTICAL DENSITY SPECTRUM OF THE BATCH CULTURE *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Klochko V.S.¹, Lelekov A.S.², Shiryaev A.V.², Gevorgiz R.G.², Buchelnikov A.S.², Shupova E.V.²

¹ Sevastopol State University

33 Universitetskaya str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru

² FGBUN FRC Institute of Biology of the Southern Seas named after A.O. Kovalevsky RAS

Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Abstract. The change in the density spectrum of the batch culture *Arthrospira (Spirulina) platensis* was investigated. The two-beam spectrophotometer Lambda 365 Double Beam UV-Visible was used. The spectrophotometer was equipped with an integrating sphere (IS). The peculiarity of the IS design is that it collects only the past light and the main part of the light scattered in the straight direction. By measuring the absorption spectra of the sample near and at a distance of 1 cm from the integrating sphere, the absorption spectrum compensated for scattering is calculated. With the standard location of the cell (close to the IS), the optical density in the range of 750–800 nm was not take zero values. The optical density increased monotonously with increasing distance between the cell and the IS. This is due to selective (in pigments) and non-selective (in microalgae cells) scattering. The light attenuation coefficient is determined as the average value of all *L* in the range of 750–800 nm. In our case, this value was about 1.61. Based on the obtained true absorption spectra, it is shown that in the process of growth of the batch culture, the ratio between the pigments did not change. The ratios of chl *a*/car (1.36) and chl *a*/C-Phy (1.06) are considered.

Key words: *spirulina*, *attenuation spectra*, *integrating sphere*, *light attenuation coefficient*, *true absorption spectrum*.

ОЦЕНКА ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS ПО РАССЕЯНИЮ СВЕТА СУСПЕНЗИЕЙ КЛЕТОК

Железнова С.Н.¹, Ключкова В.С.², Геворгиз Р.Г.¹

¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского» РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

Поступила в редакцию: 30.07.2021

Аннотация. Экспериментально показано, что оптическая плотность (D_{750}) суспензии *Porphyridium purpureum* и абсолютно сухой вес связаны линейной зависимостью. Методом наименьших квадратов рассчитан коэффициент связи оптической плотностью D_{750} и сырой массы культуры, который равен 0,051 ($R^2=0,99$). Учитывая долю воды в сырой массе *P. purpureum* ($0,132\pm 0,01$, $n=5$), можно записать связь оптической плотности и сухой массы *P. purpureum*: $D_{750} = 0,395 \cdot B_{сух}$, где $B_{сух}$ – плотность культуры, выраженная в граммах сухой массы на литр. Данное выражение позволяет по оптической плотности *P. purpureum* определить сухую массу клеток в культуре. Отмечено, что оценка биомассы *P. purpureum* по оптической плотности культуры на КФК-3 зависит от положения кюветы в кюветодержателе и может изменять показания прибора в 1,9 раз, так как при использовании КФК-3 происходит измерение суммы величин оптической плотности и рассеяния света (ослабление). Таким образом, разработан экспресс метод оценки плотности биомассы *P. purpureum* по оптической плотности.

Ключевые слова: методы измерения плотности, оптическая плотность, красные микроводоросли.

Ключевым параметром во многих исследованиях микроводорослей является плотность культуры. В литературе приводятся разные методы измерения плотности культур микроводорослей: оптический и весовой методы, метод окисляемости биомассы, прямой подсчёт клеток и т.п. [1-4]. Оптические методы широко используются в биологии, так как требуют наименьших затрат по времени и ресурсам. Однако, мы сталкиваемся с целым рядом факторов, которые так или иначе приводят к значительным погрешностям. Например, агрегация клеток, интенсивное рассеяние светового потока и пр. Особые трудности возникают при работе с культурами красных микроводорослей. Это связано с тем, что красные микроводоросли синтезируют большое количество экзополисахаридов (особенно в стационарной фазе роста), которые обволакивают клетку и защищают ее от агрессивных внешних условий среды [5,6]. Экзопалисахариды, попадая в питательную среду, изменяют оптические характеристики суспензии клеток, а также повышают вязкость культуры, что затрудняет оценку плотности культуры как оптическим методом, так и прямым методом взвешивания.

В литературе встречаются попытки выявления взаимосвязи между оптической плотностью культуры и концентрацией клеток красных микроводорослей, но полученные результаты достаточно противоречивы [7]. Отсутствие полноценного исследования оценки плотности культуры разных микроводорослей оптическими методами не позволяет получать надежные данные о динамике биомассы как в накопительной, так и в проточной культуре *P. purpureum*. Проблема экспресс-оценки биомассы *P. purpureum* по оптической плотности культуры особенно остро стоит при культивировании микроводорослей в промышленных масштабах, т.к. ошибки при измерениях плотности в промышленных фотобиореакторах увеличиваются кратно.

Цель работы – разработать экспресс-метод, позволяющий оценить плотность культуры *P. purpureum* посредством измерения оптической плотности культуры с использованием фотоэлектрокалориметра КФК-3.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали культуру *Porphyridium purpureum*, полученную из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН. Альгологически чистую культуру во всех экспериментах выращивали на питательной среде Тренкеншу [8] методом накопительной культуры. Все лабораторные эксперименты проводили в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочей толщиной слоя суспензии 3 см и объемом 2 л в условиях круглосуточного освещения люминесцентными лампами. Интенсивность света в разных точках на рабочей поверхности фотобиореактора варьировала от 8 до 13 клк и в среднем составляла 10 клк. Равномерное перемешивание суспензии в фотобиореакторе осуществляли посредством барботирования воздуха с помощью компрессора (0,5 л воздуха в минуту на 1 л культуры). Эксперименты проводили при оптимальных значениях pH = 8-9.

Плотность культуры определяли двумя методами: 1) прямым взвешиванием сырой массы в полипропиленовых пробирках в четырех повторностях на аналитических весах с погрешностью 0,1 мг после осаждения клеток центрифугированием (1600 g) в течение 15 мин; 2) турбидиметрическим методом измеряли величину ослабления (оптической плотности) культуры на длине волны 750 нм с использованием фотоэлектрокалориметра КФК-3 (кювета 0,5 см) [9]. Кювету в кюветодержатель устанавливали в максимальной близости к фотоприемнику для снижения величины рассеяния света. Пробы, для которых показания прибора выходили за пределы рабочего диапазона прибора предварительно разбавляли морской водой, подбирая

коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-3 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2-0,6 единиц). При определении плотности культуры методом прямого взвешивания биомассы четыре сухие полипропиленовые пробирки предварительно взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,1 мг. Аликвоты суспензии *P. purpureum* объемом 10 мл отбирали из фотобиореактора в данные пробирки с помощью дозатора. Затем биомассу осаждали центрифугированием (3000 об/мин 15 мин) и удаляли надосадочную жидкость. Оставшуюся в пробирке биомассу *P. purpureum* промывали изотоническим раствором хлорида натрия (6‰) два-три раза для удаления экзополисахаридов. Оставшиеся капли влаги на стенках пробирок удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Пробирки с сырой биомассой взвешивали на аналитических весах. Учитывая объем аликвоты, по разнице весов пробирок с биомассой и без биомассы рассчитывали плотность культуры в фотобиореакторе, выраженную в граммах сырой биомассы на литр культуры.

Для определения доли воды в сырой биомассе после центрифугирования промытый осадок количественно переносили в предварительно взвешенные бюксы с точностью 0,0001 г. Бюксы помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 105°C в течение 24 часов. Затем остужали бюксы до температуры воздуха в эксикаторе с силикагелем. Бюксы с сухой биомассой взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г и по разнице весов до и после высушивания рассчитывали долю воды в сырой массе водорослей.

Для получения спектра культуры в диапазоне от 400 до 800 нм с учетом рассеяния света использовали двухлучевой спектрофотометр Lambda 365 Double Beam UV-Visible, который оснащён интегрирующей сферой диаметром 60 мм с покрытием BaSO₄. Спектры регистрировались относительно дистиллированной воды в кюветах в 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Оптически методы для оценки плотности культуры микроводорослей различных систематических групп используются достаточно давно [1,2,9-12]. Обычно для оценки плотности культуры используют связь оптической плотности культуры в области неспецифического поглощения (730–750 нм) и концентрации клеток в суспензии, выраженной в млн.клеток на мл или грамм сухой биомассы на литр. Чтобы получить такую связь проводят ряд параллельных измерений оптической плотности и сухой биомассы в суспензии. При этом зачастую используют приборы, не предназначенные для измерения мутных образцов. Т.е., по сути, при использовании таких приборов происходит измерение не оптической плотности культуры микроводорослей, а суммы величин оптической плотности и рассеяния света (ослабление). Причем рассеяние света зависит от положения кюветы в кюветодержателе. По нашим данным при измерении плотности культуры *P. purpureum* на КФК-3 различное положение кюветы в кюветодержателе может изменять показания прибора в 1,9 раз (рис.1). Аналогичная ситуация наблюдается и для других видов микроводорослей [2].

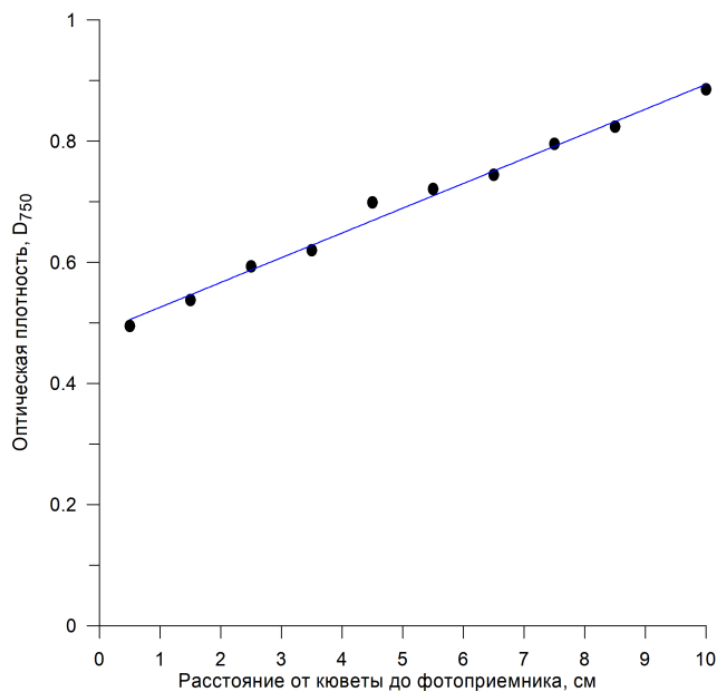


Рисунок 1. Зависимость показаний прибора КФК-3 от положения кюветы в кюветодержателе при измерении оптической плотности *Porphyridium purpureum* (кювета 0,5 см). Линия — аппроксимация экспериментальных данных выражением $D_{750} = 0,041 \cdot l + 0,49$, где l — расстояние от кюветы до фотоприемника

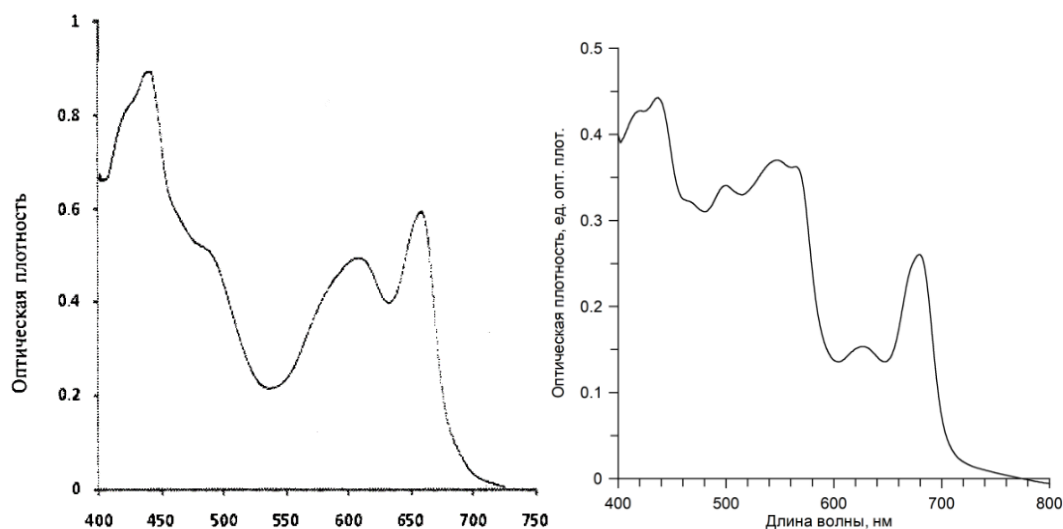


Рисунок 2. Оптический спектр нативной культуры спирулины, полученный в работе [10] на спектрофотометре СФ-14 (ЛОМО) с интегрирующей сферой (слева). Оптический спектр нативной культуры *Porphyridium purpureum*, полученный в данном исследовании на спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible с интегрирующей сферой (справа)

В клетках микроводорослей содержится достаточно большое количество активно поглощающих свет фотосинтетических пигментов. Концентрация пигментов может варьировать в широких пределах, что влечёт за собой изменение в широких пределах спектральных характеристик культур микроводорослей. Поскольку фотосинтетические пигменты характеризуются высокой поглощающей способностью, для оценки плотности культуры подбирают такой диапазон световых волн, который лежит за пределами спектра поглощения фотосинтетических пигментов. На практике обычно используют 730–800 нм. Следует отметить, что в этом диапазоне свет не поглощается, но рассеивается. Это наглядно демонстрируют измерение спектральных характеристик культур микроводорослей на спектрофотометре с интегрирующей сферой. Например, на рисунке 2 представлен спектр нативной культуры спирулины *Arthrospira (Spirulina) platensis* из работы [10], который получен на спектрофотометре СФ-14 (ЛОМО) с интегрирующей сферой. На спектре явно видно, что оптическая плотность в диапазоне 730–750 нм равна нулю.

Для нативной культуры *P. purpureum*, наблюдается практически такая же ситуация (рис. 2), но из-за несовершенства прибора Lambda 365 Double Beam UV-Visible часть рассеянного света не учитывается, поэтому в области 730–800 нм значения оптической плотности не равна нулю¹ и даже отрицательные.

На основе вышеприведённых спектров культур микроводорослей, полученных на различных спектрофотометрах с интегрирующей сферой, можно утверждать, что нативные культуры микроводорослей различных систематических групп в области >730 нм свет не поглощают, а при измерениях плотности культуры посредством спектрофотометров, не снабженных интегрирующей сферой, показания приборов указывает лишь на некоторую величину рассеянного света.

Из закона Бугера-Ламберта-Бера следует связь величины ослабления монохроматического пучка света и суммы показателей поглощения и рассеяния света:

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu_\lambda \cdot l} = I_0 \cdot e^{-(k_\lambda + d_\lambda) \cdot l}, \quad (1)$$

где I_0 – интенсивность плоской монохроматической световой волны, падающей на слой вещества; I – интенсивность плоской монохроматической световой волны на выходе из слоя вещества; μ_λ – показатель ослабления светового потока; k_λ – показатель поглощения света веществом; d_λ – показатель рассеяния света веществом; l – толщина слоя.

Для разбавленных растворов вещества в непоглощающем и нерассеивающем свет растворителе справедливы равенства:

$$k_\lambda = \chi_\lambda \cdot c \text{ и } d_\lambda = \xi_\lambda \cdot c, \quad (2)$$

где χ_λ и ξ_λ – некоторые постоянные величины, зависящие от свойств растворенного вещества и длины световой волны; c – концентрация растворенного вещества.

Объединяя (1) и (2), можно записать:

¹ В СФ-14 измерительная кювета помещается внутрь интегрирующей сферы, поэтому учитывается весь рассеивающийся образцом свет. В отличие от СФ-14 измерительная кювета у Lambda 365 Double Beam UV-Visible помещается за пределами интегрирующей сферы, поэтому учитывается только та часть рассеянного света, которая попадает внутрь интегрирующей сферы.

$$I = I_0 \cdot e^{-(\chi_\lambda + \xi_\lambda) \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-0,4343 \cdot (\chi_\lambda + \xi_\lambda) \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-D_\lambda}, \quad (3)$$

где χ_λ и ξ_λ – показатели поглощения и рассеяния света растворенным веществом единичной концентрации, ε_λ – коэффициент экстинкции, зависящий от свойств растворенного вещества и длины световой волны; D – оптическая плотность.

Если свет не поглощается веществом, а только рассеивается, т.е. показатель поглощения равен нулю, тогда из (1) и (3) следует:

$$I = I_0 \cdot e^{-d_\lambda \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-0,4343 \cdot \xi_\lambda \cdot c \cdot l} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l} \quad (4)$$

В таком случае коэффициент экстинкции ε_λ характеризует рассеивающую способность вещества при заданной длине световой волны, а величина ослабления светового потока (T) при постоянстве величин c и l , определяется только рассеиванием света:

$$\lg \frac{I}{I_0} = \lg T = -\varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l = -D_\lambda \quad (5)$$

Как было показано выше, в области неспецифического поглощения культуры микроводорослей из-за чрезвычайной гетерогенности суспензия клеток активно рассеивает свет, но не поглощают, поэтому при измерении оптических характеристик культур микроводорослей на приборах, не снабженных интегрирующей сферой по сути своей, дают оценку величине рассеянного клетками света. Следовательно, для оценки плотности культур микроводорослей вполне возможно использование выражения (5) без введения каких-либо поправок.

Для установления зависимости между оптической плотностью культуры и сухой биомассой *P. purpureum* провели ряд параллельных измерений сырой массы *P. purpureum* методом взвешивания после центрифугирования аликвоты в полипропиленовых пробирках и оптической плотности культуры на длине волны 750 нм. Полученная зависимость представлена на рисунке 3.

Заметим, на рисунке 3 представлены средние значения по четырем параллельным измерениям. Несмотря на то, что во всех параллельных измерениях коэффициент вариации был достаточно мал (не более 13%), на графиках наблюдается значительный разброс данных. Следовательно, у многих измерений наблюдалась систематическая погрешность. На наш взгляд, эта систематическая погрешность измерений возникала из-за полисахаридов, которые *P. purpureum* синтезирует в достаточно больших количествах [5,6]. При взвешивании сырой массы *P. purpureum* именно полисахариды были источником ошибок, т.к. полностью удалить их из биомассы после центрифугирования не представлялось возможным. При многократном промывании биомассы изотоническим раствором хлорида натрия часть полисахаридов оставалось в биомассе, что приводило к систематическим ошибкам измерения.

По нашим экспериментальным данным методом наименьших квадратов рассчитан коэффициент ($R^2=0,99$) связи оптической плотностью D_{750} и сырой массы водорослей в культуре (рис. 3)

$$D_{750} = 0,051 \cdot B_{сыр}, \quad (6)$$

где $B_{сыр}$ – плотность культуры, выраженная в граммах сырой массы на литр.

Учитывая долю воды в сырой массе *P. purpureum* ($0,132 \pm 0,01$, $n=5$), можно записать связь оптической плотности и сухой массы водорослей:

$$D_{750} = 0,395 \cdot B_{сух}, \quad (7)$$

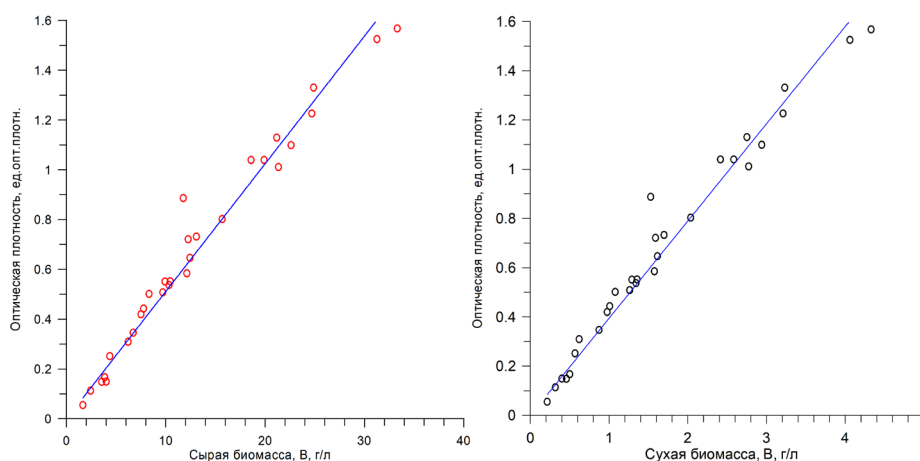


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности на длине волны 750 нм от биомассы в культуре *Porphyridium purpureum*, выраженной в единицах сырой массы (слева) и сухой массы (справа). Точки на графиках – средние значения из четырех параллельных измерений. Линия – аппроксимация по уравнению (5): $D_{750} = 0,051 \cdot B_{сыр}$ (слева, $R^2=0,99$) и $D_{750} = 0,395 \cdot B_{сух}$ (справа, $R^2=0,99$)

где $B_{\text{сyx}}$ – плотность культуры, выраженная в граммах сухой массы на литр.

Выражение (7) позволяет по оптической плотности *P. purpureum* определить сухую массу клеток в культуре:

$$B_{\text{сyx}} = 1/0,395 \cdot D_{750} = 2,53 \cdot D_{750}, \quad (8)$$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработан экспресс метод оценки плотности биомассы *P. purpureum* по оптической плотности. Используя выражение (8) по оптической плотности на длине волны 750 нм можно оценить плотность культуры *P. purpureum*. Отметим, поскольку все измерения оптической плотности в данном исследовании проведены на КФК-3 (кювета 0,5 см) при установке кюветы в максимальной близости к фотоприемнику (рис. 1), при использовании других кювет или местоположения кюветы в кюветодержателе для выражения (8) потребуются поправки. Например, если кювета установлена на расстоянии 6 см от фотоприемника, тогда для условия измерений, представленных на рисунке 1, коэффициент 0,395 в выражении (7) необходимо уменьшить в $0,51/0,736=0,69$ раза, т.е. использовать коэффициент равный $0,395/0,69 = 0,57$. Соответственно в выражении (8) вместо 2,53 необходимо использовать коэффициент $1 / 0,57 = 1,75$.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0

Список литературы / References:

1. Абдуллаев А.А., Семенов В.Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Teod и некоторые ее физиологические характеристики. *Физиология растений*, 1974, т. 21, вып. 6, с. 1145-1152. [Abdullaev A.A., Semenenko V.E. Intensive culture of *Dunaliella salina* Teod and some of its physiological characteristics. *Fiziologiya rasteniy*, 1974, vol. 21, iss. 6, pp. 1145-1152. (In Russ.)]
2. Геворгиз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl по оптической плотности культуры. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 96-106. [Gevorgiz R.G., Alisieva A.V., Shmatok M.G. Estimate of the biomass of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. by optical density of culture. *Ekologiya moray*, 2005, vol. 70, pp. 96-106. (In Russ.)]
3. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Никонова Л.Л., Бобко Н.И., Нехорошев М.В. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости. Севастополь, 2015, 31 с. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Nikonova L.L., Bobko N.I., Nekhoroshev M.V. Evaluation of the culture density of phototrophic microorganisms by the method of iodate oxidizability. Sevastopol, 2015, 31 p. (In Russ.)]
4. Wang S., Verma S.K., Said I.H., Thomsen L., Ullrich M.S., Kuhnert N. Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. *Microbial Cell Factories*, 2018, vol. 17, iss. 1, pp. 1-13. DOI: 10.1186/s12934-018-0957-0
5. Balti R., Le Balc'h R., Brodu N., Gilbert M., Le Gouic B., Le Gall S., Sinquin C., Masse A. Concentration and purification of *Porphyridium cruentum* exopolysaccharides by membrane filtration at various cross-flow velocities. *Process Biochemistry*, 2018, vol. 74, pp. 175-184. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.06.021
6. Li T., Xu J., Wu H., Jiang P., Chen Z., Xiang W. Growth and biochemical composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under different nitrogen concentrations. *Marine Drugs*, 2019, vol. 17, iss. 2, pp. 1-16.
7. Rodas-Zuluaga L.I., Castillo-Zacarias C., NunezGoitia G., Martinez-Prado M.A., Rodriguez-Rodriguez J., LopezPacheco I.Y., Sosa-Hernandez J.E., Iqbal H.M.N., Parra-Saldivar R. Implementation of kLa-Based strategy for Scaling Up *Porphyridium purpureum* (red marine microalga) to produce high-value phycoerythrin, fatty acids, and proteins. *Marine Drugs*, 2021, vol. 19, iss. 6, pp. 1-15. DOI: 10.3390/md19060290
8. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. Biological Science Series*, 1981, vol. 5, iss. 1, pp. 75-82. (In Russ.)]
9. Lu L., Yang G., Zhu B., Pan K. A comparative study on three quantitating methods of microalgal biomass. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2017, vol. 46, iss. 1, pp. 2265-2272.
10. Мельников С.С., Самович Т.В., Мананкина Е.Е., Будакова Е.А. Влияние чередования световых и темновых периодов на продуктивность *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler. *Альгология*, 2012, т. 22, № 2, с. 121-130. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/64212> [Melnikov S.S., Samovich T.V., Manankina E.E., Budakova E.A. Influence of light and dark periods alternation on production of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler. *Algologiya*, 2012, vol. 22, iss. 2, pp. 121-130. (In Russ.)]
11. Сидько Ф.Я., Ерошин Н.С. Определение концентрации пигментов и числа клеток во взвеси водорослей на фотоэлектроколориметре ФЭКН-57. *Управляемое культивирование микроводорослей*. М.: Наука, 1964, с. 38-42. [Sidko F.Ya., Eroshin N.S. Determination of the concentration of pigments and the number of cells in a suspension of algae using a FEKN-57 photoelectric colorimeter. *Guided microalgae cultivation*. Moscow: Nauka, 1964, pp. 38-42. (In Russ.)]
12. Сидько Ф.Я., Ерошин Н.С., Белянин В.Н. Датчик оптической плотности, изготовленный на базе фотоэлектроколориметра ФЭКМ. *Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов*. Москва: Наука, 1967, с. 31-33. [Sidko F.Ya., Eroshin N.S., Belyanin V.N. Optical density sensor based on the FEKM photoelectric colorimeter. *Continuous controlled cultivation of microorganisms*. Moscow: Nauka, 1967, pp. 31-33. (In Russ.)]

DETERMINATION OF CULTURE *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS DENSITY BY LIGHT SCATTERING BY CELL SUSPENSION**Zheleznova S.N.¹, Klochkova V.S.², Gevorgiz R.G.¹**¹ Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS
Sevastopol, Russia; e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru² Sevastopol State University

33 Universitetskaya str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru

Abstract. It is shown that the optical density (D_{750}) of a suspension of *Porphyridium purpureum* and absolutely dry weight are linearly related. Using the method of least squares, the coefficient of connection between the optical density D_{750} and the wet weight of the culture was calculated, which is 0.051. Knowing the proportion of water in the wet mass of *P. purpureum* (0.132), it is possible to determine the relationship between the optical density and dry weight of *P. purpureum*, where the coefficient of relationship between the optical density of culture and dry weight is 0.395. It is noted that the determination of *P. purpureum* biomass by optical density of the culture on KFK-3 depends on the position of the cuvette in the cuvette holder and can change the instrument values by 1.9 times. Since when using KFK-3, the sum of the values of optical density and light scattering (attenuation) is measured. Thus, an express method for assessing the density of *P. purpureum* biomass by optical density has been developed.

Key words: methods for measuring density, optical density, red microalgae.

ГИДРОКАРБОНАТ НАТРИЯ КАК ИСТОЧНИК УГЛЕРОДА ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS. В ПРОМЫШЛЕННЫХ МАСШТАБАХ

Геворгиз Р.Г.¹, Железнова С.Н.¹, Уваров И.П.²

¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» РАН,
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² ГБУ Новосибирской области «Управление ветеринарии города Новосибирска»
г. Новосибирск, РФ

Поступила в редакцию: 30.07.2021

Аннотация. В работе представлены экспериментальные доказательства использования бикарбоната натрия в качестве единственного источника углерода при интенсивном культивировании *Porphyridium purpureum*. Показано, что питательные среды для интенсивного культивирования *P. purpureum* на основе морской воды могут содержать до 20 г·л⁻¹ и более бикарбоната натрия в качестве источника углерода. При использовании питательной среды с бикарбонатом натрия максимальная плотность культуры достигала 3 г.с.б.·л⁻¹ и более. Максимальная продуктивность в лабораторных фотобиореакторах достигала 1,16 г·л⁻¹·сут⁻¹. При культивировании *P. purpureum* в промышленных масштабах при естественном освещении продуктивность культуры зависела от световых условий. В пасмурную погоду, когда максимальная освещенность в течение суток составляла 7–12 клк, продуктивность достигала 6,33 г.с.б.·м⁻²·сут⁻¹. В то время как в солнечную погоду (максимальная освещенность рабочей поверхности в течение дня 50 клк) продуктивность составила 17,7 г.с.б.·м⁻²·сут⁻¹. Отмечено, что при высокой облученности у накопительных кривых не наблюдалось стационарной фазы роста. При достижении максимальной плотности культура переходила в фазу отмирания. Сделано предположение о том, что это связано с высокими значениями pH, при которых многие биогенные элементы становятся недоступными для клеток в связи с малой растворимостью некоторых солей в щелочной среде, а также переходу всех форм неорганического углерода в карбонатную форму.

Ключевые слова: низшие фототрофы, питательная среда, красные микроводоросли, углерод-концентрирующий механизм, пищевая сода.

Традиционно при культивировании *Porphyridium purpureum* как в лабораторных, так и в промышленных масштабах в качестве единственного источника углерода используют угольную кислоту из баллона [1]. В исключительных случаях также используют органические источники углерода [2], но они не получили широкого распространения для промышленных масштабов из-за возникающих проблем обильного развития сопутствующих микроорганизмов.

Известно, что красные микроводоросли являются результатом первичного эндосимбиоза цианобактерий и гетеротрофных организмов, поэтому они унаследовали многие свойства своих прародителей [3–5]. Одним из таких свойств является способность поглощения неорганического углерода как в форме угольной кислоты, так и в форме бикарбонат-иона [6,7]. Поэтому *P. purpureum* растет как в слабокислой, так и в щелочной среде. Именно такая особенность углеродного метаболизма позволяет *P. purpureum* расти и вегетировать в водоёмах с широким диапазоном pH.

Способность поглощать гидрокарбонат-ионы клетками микроводорослей позволяет в качестве источника углерода при интенсивном культивировании использовать гидрокарбонат натрия (пищевая сода). По справочным данным растворимость пищевой соды достаточно высока и составляет более 90 г·л⁻¹, поэтому гидрокарбонат натрия используют в питательных средах для интенсивного культивирования многих видов микроводорослей. Примером такой среды является питательная среда Заррук для спирулины. Важно также отметить, что наличие гидрокарбонат-ионов в питательной среде повышает буферность питательного раствора, что приводит к исключению резких изменений pH среды.

P. purpureum является представителем морских видов красных водорослей. Поэтому все питательные среды для его интенсивного культивирования готовят на основе морской воды, например, питательная среда Тренкеншу [8]. Отметим, что в состав питательных сред для *P. purpureum* источник углерода обычно не входит, поскольку предполагается, что в процессе культивирования в суспензию будет подаваться угольная кислота. Можно упомянуть лишь отдельные исследования, в которых использовался гидрокарбонат натрия в небольших количествах с целью увеличения буферности среды [6,7,9]. При выращивании *P. purpureum* в промышленных масштабах в качестве источника углерода практически всегда используется CO₂. Однако при интенсивном культивировании микроводорослей в промышленных масштабах не всегда целесообразно использовать угольную кислоту для обеспечения клеток углеродом. Например, при выращивании водорослей в фотобиореакторах типа бассейн с глубиной 8–10 см растворение CO₂ из баллона в суспензии сопровождается немалыми техническими трудностями. Более удобным с технологической точки зрения является гидрокарбонат натрия.

В данной работе была поставлена цель получения интенсивной культуры *Porphyridium purpureum* в промышленных масштабах, у которой в качестве источника углерода используется гидрокарбонат натрия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследовалась культура *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, полученная из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН. Альгологически чистую культуру выращивали на модифицированной питательной среде Тренкеншу [8]. Модификация среды заключалась в добавлении различных порций гидрокарбоната натрия и уменьшения навески фосфата калия до $0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Для приготовления питательных сред использовалась фильтрованная черноморская вода. Культуру адаптировали к условиям интенсивного культивирования на люминистате при 5 клк, используя накопительный метод культивирования. После адаптации часть объема культуры использовали для лабораторных экспериментов, а часть для выращивания в промышленном фотобиореакторе.

Лабораторные исследования проводили осенью 2018 г в фотобиореакторах плоскопараллельного типа объемом 1 л с рабочей толщиной в 2 см. Культуру перемешивали посредством барботаж воздуха без дополнительной подачи CO_2 из баллона. В качестве источника освещения использовали люминесцентные лампы. Освещенность рабочей поверхности для лабораторного фотобиореакторов составляла 7-10 клк. Для наращивания *P. purpureum* в полупромышленных масштабах использовали фотобиореактор типа бассейн объемом 70 л освещением лампой ДРЛ-700, которая на рабочей поверхности фотобиореактора в среднем давала 10 клк (рис. 1). Для перемешивания культуры использовали аквариумную погружную помпу. По достижении стационарной фазы роста суспензию клеток использовали в качестве инокулята для культивирования в промышленных фотобиореакторах при естественном освещении.

Промышленный фотобиореактор типа бассейн, расположенный в тепличном комплексе на территории лабораторного корпуса ИнБЮМ (г. Севастополь), использовали для проведения исследований при естественном освещении. Рабочий объем фотобиореактора составлял 254 л, освещаемая поверхность – $2,54 \text{ м}^2$, рабочий слой (глубина) – 10 см. Суспензия микроводорослей в фотобиореакторах перемешивалась посредством механической мешалки, скорость вращения которой была неизменной в течение всего эксперимента и составляла $20 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Для поддержания оптимальной температуры суспензии использовали систему термостабилизации, при этом на протяжении всего времени культивирования отклонение от оптимальной температуры составляло не более 3°C .

Изменение плотности культуры в фотобиореакторе осуществляли двумя методами: 1. Путём измерения оптической плотности суспензии в кювете 0,5 см на длине волны 750 нм; 2. Путём взвешивания сырого осадка (биомассы водорослей) на аналитических весах после центрифугирования суспензии в полипропиленовых пробирках при 1600 g в течение 15 мин. Перед взвешиванием сырую биомассу промывали изотоническим раствором хлористого натрия ($6 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) для удаления экзополисахаридов. По результатам 30 параллельных измерений по методу наименьших квадратов была найдена линейная зависимость оптической плотности от сухой биомассы *P. purpureum* ($R^2=0.99$):

$$D_{750} = 0,395 \cdot B_{\text{сух}}, \text{ или } B_{\text{сух}} = 1/0,395 \cdot D_{750} = 2,53 \cdot D_{750} \quad 1)$$

где D_{750} – оптическая плотность культуры *P. purpureum* на длине волны 750 нм в кювете 0,5 см; $B_{\text{сух}}$ – плотность культуры в фотобиореакторе, г.с.б.·л⁻¹. При измерении оптической плотности кювету устанавливали в максимальной близости к фотоприемнику.

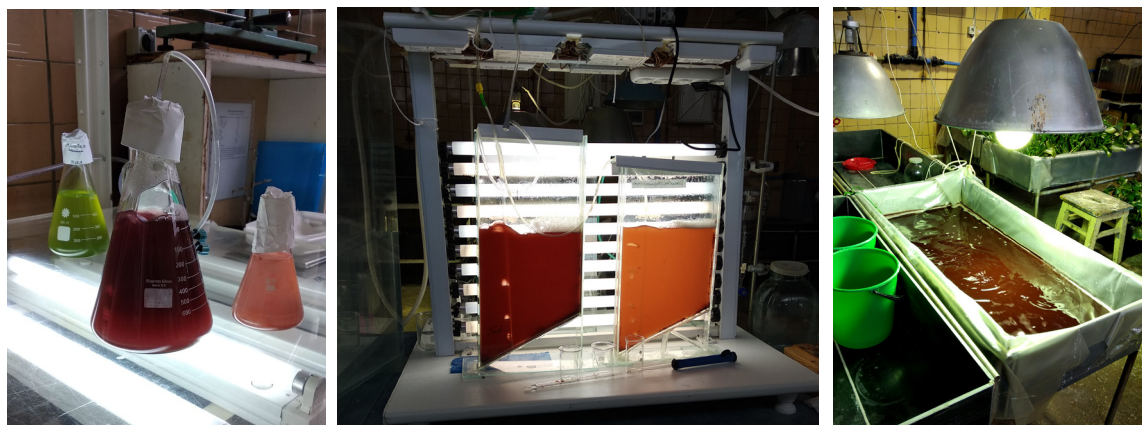


Рисунок 1. Интенсивная культура *Porphyridium purpureum*, выращенная на модифицированной питательной среде Тренкеншу [8] с высоким содержанием гидрокарбоната натрия, без дополнительной подачи CO_2 из баллона

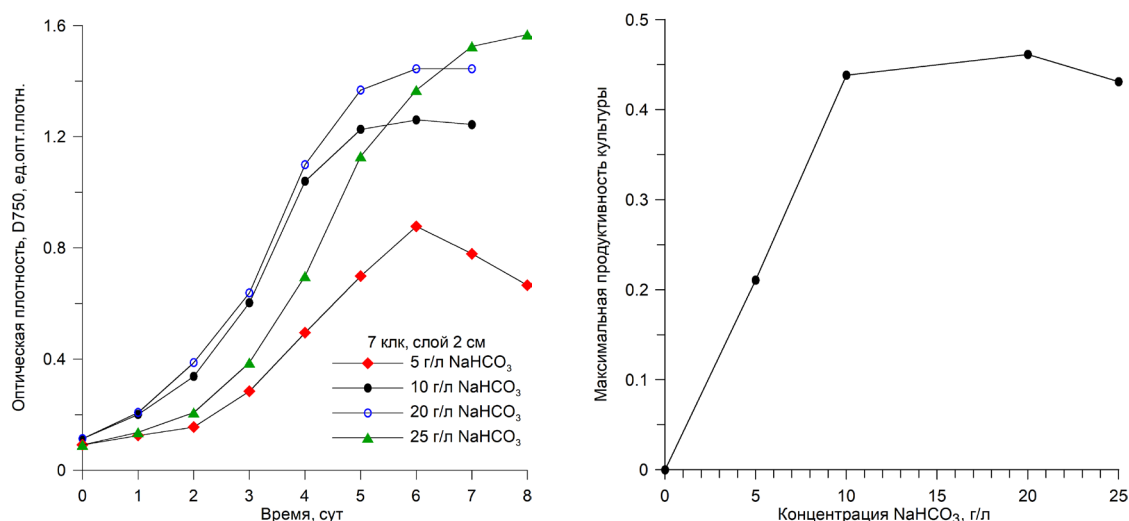


Рисунок 2. Динамика плотности культуры *P. purpureum* в лабораторном фотобиореакторе при различной концентрации гидрокарбоната натрия в питательной среде (слева). Зависимость максимальной продуктивности культуры *P. purpureum* от концентрации лимитирующего субстрата (NaHCO₃) в питательной среде (справа)

Красные микроводоросли в теплице выращивали в осенне-зимний период в 2019-2020 г. Культуру адаптировали к условиям естественного освещения в течение двух суток. Для этой цели инокулят, полученный в лаборатории разбавляли свежей питательной средой в соотношении 1:3 и помещали в промышленный культиватор. Чтобы увеличить рабочий слой суспензии (глубину) и уменьшить освещаемую поверхность на время адаптации один край культиватора приподнимали на 5 см таким образом, чтобы вся суспензия стекала к противоположному краю культиватора. Для исключения гибели неадаптированной культуры от высокого освещения суспензию затенили тканью таким образом, чтобы освещённость рабочей поверхности составляла 7–12 клк. После адаптации культуры выращивали в интенсивном режиме без затенения рабочей поверхности фотобиореактора. По мере нарастания плотности культуры добавляли питательную среду. Адаптированную таким образом суспензию использовали в качестве инокулята для исследования накопительной культуры *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе при естественном освещении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для выполнения поставленной цели были определены оптимальные концентрации источника углерода. После чего модифицирована питательная среда Тренкеншу путем добавления оптимального количества пищевой соды (20 г·л⁻¹). Известно, что растворимость NaHCO₃ в дистиллированной воде при температуре 20°C достигает 95,9 г·л⁻¹. В черноморской воде из-за высокой солёности NaHCO₃ менее растворим. По нашим данным, при той же температуре растворимость достигает 65 г·л⁻¹. Растворение такого количества гидрокарбоната натрия в питательной среде заведомо покрывает потребность в углероде для любых видов водорослей. В случае с *P. purpureum* уже при растворении более 20 г·л⁻¹ NaHCO₃ в питательной среде наблюдалось замедление роста культуры (рис. 2). Кроме того, в присутствии 20 г·л⁻¹ гидрокарбоната натрия в среде растворимость фосфатов уменьшается, поэтому была уменьшена концентрация однозамещённого фосфата натрия до 0,2 г·л⁻¹. При растворении 20 г·л⁻¹ соды в морской воде NaH₂PO₄ · 2H₂O более 0,2 г·л⁻¹ не растворялось.

Модифицированную питательную среду Тренкеншу с высоким содержанием гидрокарбоната натрия использовали для интенсивного культивирования *P. purpureum* как в лабораторном, так и в промышленном фотобиореакторе при искусственном и естественном освещении.

На рисунке 2 представлены накопительные кривые полученные в лабораторном фотобиореакторе и зависимость максимальной продуктивности культуры *P. purpureum* от концентрации гидрокарбоната натрия в питательной среде, из которой видно, что насыщение наступает уже при 10 г·л⁻¹. Однако для достижения максимальной плотности культуры в стационарной фазе роста и максимального увеличения буферности питательного раствора в питательную среду для всех экспериментов была добавлена навеска в два раза больше.

Динамика плотности культуры *P. purpureum* в полупромышленном фотобиореакторе при искусственном и естественном освещении представлена на рисунке 3. В лабораторном фотобиореакторе культура в стационарной фазе роста достигала максимальной плотности $2,53 \cdot 1,44 = 3,64$ г.с.б.·л⁻¹, при этом максимальная продуктивность составила $2,53 \cdot 0,46 = 1,16$ г·л⁻¹·сут⁻¹. В промышленном фотобиореакторе (70 л) продуктивность была ниже и составляла в среднем за весь период культивирования $2,53 \cdot 0,12 = 0,3$ г·л⁻¹·сут⁻¹. Следует отметить, что как и в первом, так и во втором случае культура достигала достаточно большой плотности (3 г·л⁻¹ и более). Причем в стационарной фазе роста величина pH среды достигала 9,4 единиц. При таких значениях pH в среде углерод

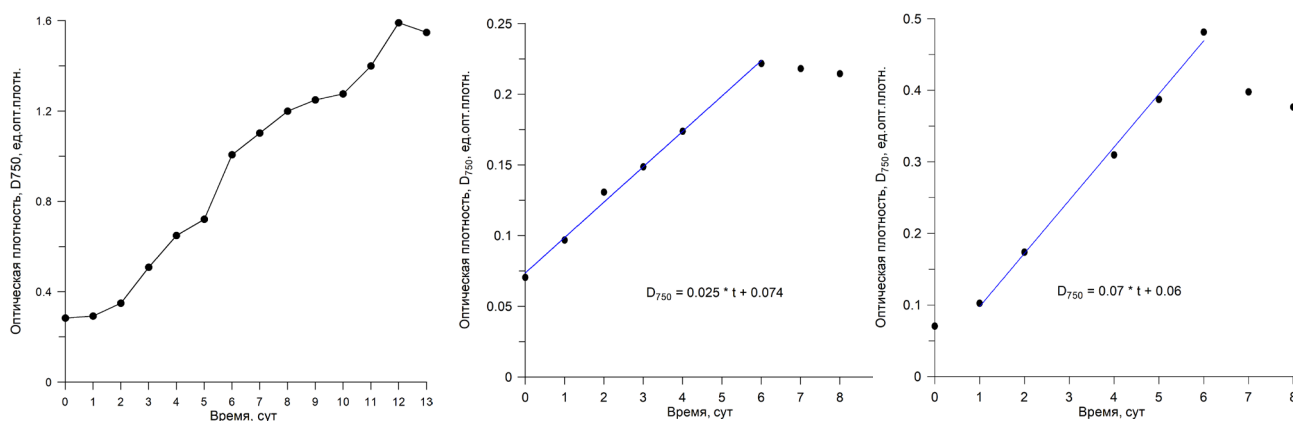


Рисунок 3. Динамика *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе (70 л) при искусственном освещении (слева). Динамика *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе (объём 254 л, глубина 10 см) при естественном освещении в пасмурную погоду с максимальной освещённостью рабочей поверхности в течение дня 7-12 клк (в центре) и в солнечную погоду с максимальной освещённостью рабочей поверхности в течение дня 50 клк (справа)

присутствует только в форме гидрокарбонат-ионов и карбонат-ионов. При дальнейшем увеличении pH, когда в среде преобладают только карбонат-ионы культура *P. purpureum* погибает. Следовательно, культура *P. purpureum* действительно способна поглощать гидрокарбонат-ионы в качестве единственного источника углерода в условиях интенсивного культивирования.

На рисунке 3 представлены накопительные кривые *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе (объём 254 л, глубина 10 см) для условий естественного освещения. В пасмурную погоду (максимальная освещённость рабочей поверхности в течение дня 7-12 клк) продуктивность составила $6,33 \text{ г.с.б.} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. В то время как в солнечную погоду (максимальная освещённость рабочей поверхности в течение дня 50 клк) продуктивность составила $17,7 \text{ г.с.б.} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. Отметим, при высокой облучённости у накопительных кривых не наблюдалось стационарной фазы роста. При достижении максимальной плотности культура переходила в фазу отмирания. Возможно, это связано с высокими значениями pH, при которых многие биогенные элементы становятся недоступными для клеток в связи с малой растворимостью некоторых солей в щелочной среде, а также переходу всех форм неорганического углерода в карбонатную форму.

Таким образом, экспериментально показано, что для интенсивного культивирования *P. purpureum*, как в лабораторных, так и в промышленных масштабах в качестве источника углерода может быть использован гидрокарбонат натрия в концентрациях до $20 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и более.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Richmond A., Hu Q. *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*. Second Edition, New Delhi, 201, 726 p.
2. Jiao K., Xiao W., Xu Y., Zeng X., Ho S-H., Laws E.A., Lu Y., Ling X., Shi T., Sun Y., Tang X., Lin L. Using a trait-based approach to optimize mixotrophic growth of the red microalga *Porphyridium purpureum* towards fatty acid production. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, vol. 11, iss. 1, pp. 1-11. doi: 10.1186/s13068-018-1277-7
3. Solymosi K. Plastid structure, diversification and interconversions I. *Algae. Current Chemical Biology*, 2012, vol. 6, iss. 3, pp. 167-186. doi: 10.2174/2212796811206030002
4. Kroth P.G. The biodiversity of carbon assimilation. *Journal of Plant Physiology*, 2015, vol. 172, pp. 76-81. doi: 10.1016/j.jplph.2014.07.021
5. Obornik M. Endosymbiotic evolution of algae, secondary heterotrophy and parasitism. *Biomolecules*, 2019, vol. 9, iss. 7, pp. 1-10. doi: 10.3390/biom9070266
6. Velea S., Ilie L., Filipescu L. Optimization of porphyridium purpureum culture growth using two variables experimental design: Light and sodium bicarbonate. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 2011, vol. 73, iss. 4, pp. 81-94.
7. Gagnard C., Gargouch N., Dubessay P., Delattre C., Pierre G., Laroche C., Fendri I., Abdelkafi S., Michaud P. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 2019, vol. 37, iss. 1, pp. 193-222. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.014
8. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов микроэлементного питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. *Биология моря*, 1979, № 51, с. 41-46. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. Influence of elements of microelement nutrition on the productivity of *Platymonas viridis* Rouch algae. *Biology of the Sea*, 1979, no. 51, pp. 41-46. (In Russ.)]

9. Li H., Wu Y., Zhao L. Effects of carbon anhydrase on utilization of bicarbonate in microalgae: a case study in Lake Hongfeng. *Acta Geochimica*, 2018, vol. 37, iss. 4, pp. 519-525. doi: 10.1007/s11631-018-0277-4

SODIUM BICARBONATE AS A CARBON SOURCE FOR INTENSIVE CULTIVATION OF *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS. ON AN INDUSTRIAL SCALE

Gevorgiz R.G.¹, Uvarov I.P.², Zheleznova S.N.¹

¹ Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS,
Sevastopol, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² Department of Veterinary Medicine of the city of Novosibirsk
Novosibirsk, Russia

Abstract. The paper presents experimental evidence for the use of sodium bicarbonate as the only carbon source during intensive cultivation of *Porphyridium purpureum*. It has been shown that culture media for intensive cultivation of *P. purpureum* based on sea water can contain up to 21 g / l of sodium bicarbonate as a carbon source. When using a nutrient medium with sodium bicarbonate, the maximum density of the culture reached 3 g.b./l and more. The maximum productivity in laboratory photobioreactors reached 1.16 g / (l · day). When *P. purpureum* was cultivated on an industrial scale under natural light, the productivity of the culture depended on light conditions. In cloudy weather, when the maximum illumination during the day was 7-12 klx, the productivity reached 6.33 g.d.b./ (m² day). While in sunny weather (the maximum illumination of the working surface during the day is 50 klx), the productivity was 17.7 g.b./ (m² day). It was noted that at high irradiation, the accumulation curves did not show a stationary growth phase. Upon reaching the maximum density, the culture passed into the phase of withering away. It has been suggested that this is due to high pH values, at which many biogenic elements become inaccessible to cells due to the low solubility of some salts in an alkaline medium, as well as the transition of all forms of inorganic carbon to the carbonate form.

Key words: lower phototrophs, nutrient medium, red microalgae, carbon-concentrating mechanism, baking soda.

ВИХРЕВОЕ ПЕРЕМЕШИВАНИЕ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**Геворгиз Р.Г.¹, Уваров И.П.², Репков А.П.², Железнова С.Н.¹**¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² ГБУ Новосибирской области «Управление ветеринарии города Новосибирска»

г. Новосибирск, РФ

Поступила в редакцию: 30.07.2021

Аннотация. В работе рассматриваются различные способы перемешивания культур низших фототрофов в фотобиореакторах для интенсивного культивирования. Представлены преимущества и недостатки различных способов перемешивания суспензии клеток. Отмечены преимущества вихревого способа перемешивания, как наиболее перспективного способа перемешивания культур микроводорослей. Принципиальной особенностью современных газовых вихревых аппаратов является создание закрученных потоков воздуха над суспензией клеток. Воздушный вихрь над суспензией за счет трения воздуха о поверхность раздела фаз и разницы давления между периферией и центром газоздушного вихря вовлекает в вихревое движение саму суспензию клеток, благодаря чему происходит достаточно мягкое воздействие на клетки при перемешивании. Именно такое перемешивание суспензии закрученным потоком позволяет исключить высокотурбулентные и застойные зоны, гидроудары и эффект кавитации, а также образование как напряжения среза, так и зоны локальных перегревов, губительно сказывающихся на жизнеспособности чувствительных к механическому воздействию культур клеток. Таким образом, в вихревых аппаратах удовлетворяются практически все требования, предъявляемые к перемешиванию клеток для широкого класса микробиологических объектов. К культурам микроводорослей при перемешивании предъявляются гораздо меньшие требования. Поэтому для интенсивного культивирования микроводорослей достаточно использование вихря только в самой суспензии, что в значительной мере упрощает конструкцию вихревого аппарата. Одним из простейших способов создания вихря внутри суспензии является вращение погруженного на определённый уровень плоского кольца (диафрагмы) посредством механического привода или тангенциального ввода воздушного потока в фотобиореактор. Изготовление такого кольца возможно из любого прозрачного материала, например, из листового поликарбоната, что позволяет сделать кольцо любого диаметра, а процесс интенсивного культивирования микроводорослей легко масштабировать до заданного уровня.

Ключевые слова: низшие фототрофы, торнадо, фотобиореактор.

Одним из важнейших параметров условий культивирования низших фототрофов является перемешивание суспензии клеток. Экспериментально показано, что интенсивность перемешивания культуры микроводорослей многократно увеличивает её продуктивность, увеличивает скорость практически всех субстратзависимых процессов, а также биосинтез ценных биологически активных веществ и пр. Это связано с тем, что перемешивание культуры в значительной мере изменяет условия культивирования: 1. Активное перемешивание суспензии клеток повышает вероятность встречи лимитирующего биогенного элемента с клеткой, что увеличивает скорость реакции в узком месте метаболизма. 2. Исключает образования концентрационных ям во всем объёме фотобиореактора. 3. Для фототрофов активное перемешивание снижает время нахождения клеток в области облучённости ниже компенсационного пункта фотосинтеза. 4. Активное перемешивание культуры удаляет продукты жизнедеятельности клеток из околочелочной среды. 5. Активное перемешивание культур низших фототрофов позволяет удалить из суспензии избыток растворенного кислорода, ингибирующего рост клеток. 6. Активное перемешивание культуры снижает проявление процессов адгезии, что способствует замедлению или исключению обрастания поверхностей фотобиореактора. 7. Активное перемешивание, как правило, препятствует агглютинации микроводорослей, что обеспечивает равные условия культивирования для всех клеток. 8. Кроме того, при использовании сжатого воздуха для перемешивания (барботаж культуры воздухом) в суспензию проникает атмосферный CO₂, что увеличивает скорость темновых процессов фотосинтеза.

Для перемешивания культур микроводорослей используют различные методы. Как правило, в лабораторных исследованиях применяется пневматическое перемешивание посредством барботажа воздухом (в специальных исследованиях вместо воздуха используют другие газы). Обусловлено это дешевизной и доступностью аквариумных компрессоров. Также в лаборатории применяют специальное оборудование, например, встряхиватели, вибраторы, магнитные мешалки и пр. При увеличении объёма суспензии кроме барботажа воздухом зачастую используют механический способ перемешивания: насосы различной конструкции и механические мешалки. Для промышленных фотобиореакторов большая часть устройств, перемешивающих суспензию клеток заимствована из химической промышленности. Однако в связи с биологическими особенностями различных видов микроводорослей разнообразие конструкций весьма ограничено, поскольку на перемешивание суспензии налагается ряд ограничений. Например, при перемешивании не должны разрушаться клеточные оболочки, трихомы, жгутики и пр., при перемешивании не должны возникать локальные повышения температуры, локальные перепады давлений. В различных частях рабочего объёма фотобиореактора должны

быть одинаковые световые условия и т. д.

Из всех известных способов перемешивания суспензии клеток наиболее эффективным можно считать перемешивание за счёт создания над суспензией воздушного вихря (управляемого торнадо) [1, 2]. Вихрь над поверхностью культуры клеток создает вихревые потоки внутри суспензии, благодаря которым происходит достаточно «мягкое» перемешивание, не травмирующее культивируемые клетки. Газовихревое перемешивание суспензии клеток позволяет получать в промышленных масштабах биомассу практически любых типов клеток: микроводорослей, бактерий, грибов, животных клеток, клеток человека и даже вирусов.

Существенным недостатком фотобиореакторов с газовихревым перемешиванием является уникальность и дороговизна некоторых частей оборудования. При изменении масштабов фотобиореактора, при внесении каких-либо конструктивных дополнений всегда требуются новые расчёты для устройства, создающего управляемое торнадо. Всё это ограничивает распространение и применимость газовихревого перемешивания суспензии клеток как для лабораторных, так и для промышленных масштабов. Однако нами показано, что для перемешивания культур микроводорослей нет необходимости создания вихря над суспензией, достаточно создание вихря внутри суспензии. Это обстоятельство в значительной мере упрощает конструкцию фотобиореактора и перемешивающего устройства.

Цель данной работы заключалась в анализе современных вихревых биореакторов и разработке механической мешалки, обеспечивающей создание вихревого перемешиванием культур низших фототрофов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Закрученные потоки жидкости и газа широко распространены в природе. Учёных давно привлекают такие явления как торнадо, смерчи, циклоны, водовороты и т. п. [2,3], поэтому проблемы теоретического представления вихревого движения ставились ещё со времён А. Пуанкаре в 19 веке [4]. При исследовании закрученных потоков были обнаружены такие необычные особенности вихревого движения как противоток и энергоразделение (эффект Ранка). На сегодняшний день теория вихрей разработана достаточно подробно [1,5,6], что позволяет вихревое движение широко использовать в технике. Разработано большое количество различных аппаратов с различными характеристиками вихревого потока, которые используются в промышленности для разделения химических элементов, изотопов (например, урана), для утилизации тепла, очистки сточных вод и газов и т.д. [7,8].

Явление вихревого движения используется и в биологии, в частности в биотехнологии управляемого культивирования микроорганизмов [9-11]. Однако примеры такого использования немногочисленны. Отчасти это связано с тем, что специалисты в области вихревых потоков в микробиологии встречаются редко. Наибольших успехов в применении вихрей для суспензионного культивирования различных типов клеток были достигнуты сотрудниками ВНИИ молекулярной биологии НПО «Вектор» (г. Новосибирск). Под руководством В.И. Кислых был разработан ряд лабораторных и промышленных аппаратов для микробиологического синтеза с вихревым перемешиванием [12,13], которые успешно применяются в различных исследовательских и образовательных учреждениях, а также на предприятиях РФ для производства ценных биологически активных соединений, вакцин и т. п.

В практике биотехнологии микроводорослей применения вихревых потоков также достаточно редки. Практически единственным опытом применения газовихревых аппаратов было использование газовихревых микробиологических аппаратов, адаптированных под особенности выращивания микроводорослей для получения кормов для животных и фукоксантина из диатомовых водорослей с целью создания лечебно-профилактических препаратов [14-16]. Но, по сути, используемые газовихревые аппараты являли собой продолжение развития идей, заложенных при разработке аппаратов группой В.И. Кислых.

Принципиальной особенностью современных газовихревых аппаратов является создание закрученных потоков воздуха над суспензией клеток. Воздушный вихрь над суспензией за счет трения воздуха о поверхность раздела фаз и разницы давления между периферией и центром газовой воздушного вихря вовлекает в вихревое движение саму суспензию клеток, благодаря чему происходит достаточно мягкое воздействие на клетки при перемешивании (рис. 1). Именно такое перемешивание суспензии закрученным потоком позволяет исключить высокотурбулентные и застойные зоны, гидроудары и эффект кавитации, а также образование как напряжения среза, так и зоны локальных перегревов, губительно сказывающихся на жизнеспособности чувствительных к механическому воздействию культур клеток. Таким образом, в вихревых аппаратах удовлетворяются практически все требования, предъявляемые к перемешиванию клеток для широкого класса микробиологических объектов.

К культурам микроводорослей при перемешивании предъявляются гораздо меньшие требования, поскольку оболочка низших фототрофов адаптирована к условиям различных потоков, встречающихся в естественной среде обитания (морские течения, бурные потоки рек и т. п.). Например, для клеток микроводорослей такие параметры как напряжения среза и зоны локальных перегревов несут незначительный вред, т. к. микроводоросли обычно культивируют в водных растворах с вязкостью близкой к единице (кинематическая вязкость воды равна $1,004 \cdot 10^{-6}$ мм²/с при температуре 20°C). Клетки многих видов микроводорослей легко переносят высокотурбулентные течения, способны выдерживать гидроудары и достаточно высокие перепады давлений. Поэтому при культивировании многих видов водорослей перемешивание путем барботирования воздуха, использования циркуляционных

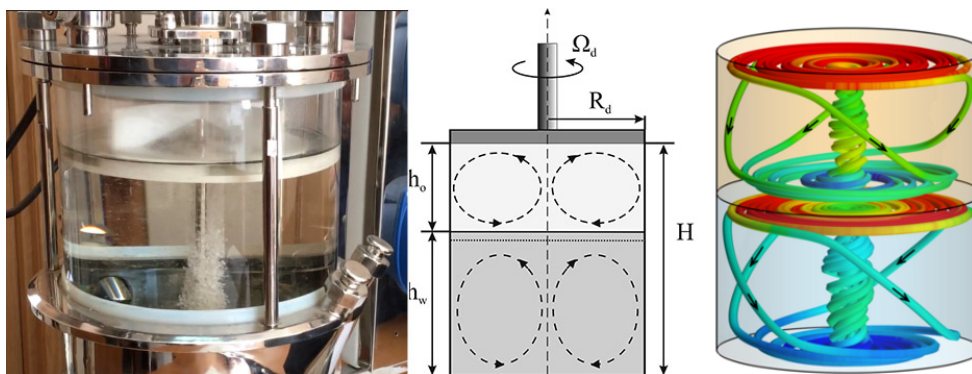


Рисунок 1. Демонстрация образующегося вихревого потока в газовихревом фотобиореакторе (слева) и схема потоков над суспензией и внутри суспензии клеток (в центр и справа) [3,14]

насосов, механических мешалок и пр. вполне допустимо. Однако некоторые виды микроводорослей из-за своих биологических особенностей выращивать в интенсивном режиме, используя традиционные способы перемешивания, практически невозможно. Например, бентосные виды микроводорослей характеризуются удельной плотностью больше единицы, поэтому они всегда оседают в «мертвой» зоне рабочего объема, у крупных динофлагеллят достаточно мягкая оболочка, поэтому она разрушается при активном перемешивании и т. п. Для таких типов водорослей требования, предъявляемые к перемешиванию клеток в современных фотобиореакторах можно считать неудовлетворительными.

Учитывая опыт перемешивания суспензии клеток в вихревых аппаратах, можно с уверенностью сказать, что вихревое перемешивание пригодно не только для бактерий, но и для любых видов микроводорослей, включая прикрепленные формы. Более того, из-за меньшей требовательности к условиям перемешивания для интенсивного культивирования микроводорослей достаточно использование вихря только в самой суспензии. Это обстоятельство в значительной мере упрощает конструкцию вихревого аппарата и позволяет использовать фотобиореакторы вихревого типа как для лабораторных, так и для промышленных масштабов.

Одним из простейших способов создания вихря внутри суспензии является вращение погруженного на определённый уровень плоского кольца (диафрагмы) посредством механического привода или тангенциального ввода воздушного потока в фотобиореактор. Изготовление такого кольца возможно из любого прозрачного материала, например, из листового поликарбоната, что позволяет сделать кольцо любого диаметра, а процесс интенсивного культивирования микроводорослей легко масштабировать до заданного уровня.

Описание конструкции. Фотобиореактор представляет собой цилиндр круглой формы с погруженным в суспензию на глубину 3-5 см плоским кольцом (рис. 2). При вращении кольца за счёт центробежных сил суспензия напирет на стенки цилиндра, в результате чего уровень суспензии у стенок повышается, а у оси цилиндра понижается. Если выделить произвольную область вблизи стенок цилиндра, тогда разность уровней над этой областью создаёт силу, направленную к оси цилиндра. Именно эта сила определяет движение по окружности. В результате чего образуется вихревое движение с осью, совпадающей с осью цилиндра.

У дна цилиндра из-за силы трения скорость движения будет существенно ниже, поэтому будет наблюдаться движение не по окружности, а по спирали. Эти потоки достигают оси цилиндра и поднимаются вверх до поверхности суспензии в приосевой области сквозь отверстие кольца. У поверхности в результате действия центробежных сил они движутся к периферии, затем у стенок вниз к дну цилиндра. Образуется вторичный вихрь, наложенный на основное вихревое движение в цилиндре (рис. 2).

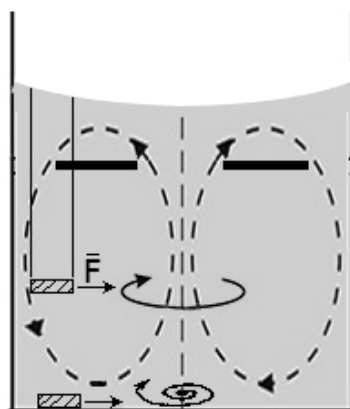


Рисунок 2. Схема вихревых потоков в суспензии микроводорослей

По истечению некоторого времени наступает установившийся процесс, при котором поверхность раздела фаз практически выравнивается благодаря восходящему потоку приосевой области. Именно наличие вращающегося кольца внутри суспензии способствует образованию мощного восходящего потока и гасит процессы автоколебаний в фотобиореакторе.

Механическая мешалка представляет собой плоское кольцо из прозрачного материала, снабженного поплавками. На поплавки устанавливаются крепления для механического привода или «паруса» для тангенциального ввода воздушного потока. При вращении кольца поток суспензии, выходящий из отверстия кольца, равномерно распределяется от оси цилиндра к периферии во всех направлениях.

Световая энергия вводится в фотобиореактора через боковую поверхность, либо через поверхность раздела фаз. Если поток световой энергии направлен сквозь боковую поверхность, тогда предпочтительным источником излучения являются светодиоды. При освещении фотобиореактора сверху допускается использование любых источников излучения, включая естественное освещение.

Для обеспечения клеток микроводорослей углеродом в фотобиореактор у дна через диспергатор вводится углекислота. Также в конструкции фотобиореактора предусмотрено введение питательных сред и отбор суспензии микроводорослей на урожай. Подача питательных сред с малой скоростью позволяет получить равномерное распределение всех биогенных элементов во всем объеме фотобиореактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование плоского кольца, погруженного в суспензию клеток, в качестве перемешивающего устройства для интенсивных культур микроводорослей расширяет возможности в создании фотобиореактора со всеми преимуществами вихревого перемешивания. При этом не требуется разработка и изготовление уникального оборудования для создания вихревых потоков над суспензиями микроводорослей. Вращение кольца возможно как посредством механического привода, так и за счет тангенциального введения воздушных потоков.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0

Список литературы / References:

1. Алексеенко С.В., Куйбин П.А., Окулов В.Л. *Введение в теорию концентрированных вихрей*. Новосибирск, Институт компьютерных исследований, 2003, 504 с. [Alekseenko S.V., Kuibin P.A., Okulov V.L. *Introduction to the theory of concentrated vortices*. Novosibirsk, Institut komp'yuternykh issledovaniy, 2003, 504 p. (In Russ.)]
2. Вараксин А.Ю., Ромаш М.Э., Копейцев В.Н. *Торнадо*. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011, 344 с. [Varaksin A.Yu., Romash M.E., Kopeytshev V.N. *Tornado*. Moscow: FIZMATLIT, 2011, 344 p. (In Russ.)]
3. Наумов И.В. Штерн В.Н. Двухэтажное торнадо. *Природа*, 2021, № 4, с. 12-19. [Naumov I.V. Shtern V.N. Two-story tornado. *Priroda*, 2021, no. 4, pp. 12-19. (In Russ.)] DOI: 10.7868/S0032874X21040025
4. Пуанкаре А. *Теория вихрей*. Ижевск, 2000, 160 с. [Poincaré A. *Theory of vortices*. Izhevsk, 2000, 160 p. (In Russ.)]
5. Козлов В.В. *Общая теория вихрей*. Ижевск, 1998, 238 с. [Kozlov V.V. *General theory of vortices*. Izhevsk, 1998, 238 p. (In Russ.)]
6. Сэффмэн Ф. Дж. *Динамика вихрей*. М.: Научный мир, 2000, 376 с. [Saffman F.J. *Dynamics of vortices*. Moscow: Nauchnyy mir, 2000, 376 p. (In Russ.)]
7. Ляндзберг А.Р., Латкин А.С. *Вихревые теплообменники и конденсация в закрученном потоке*. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2004, 149 с. [Lyandzberg A.R., Latkin A.S. *Vortex heat exchangers and swirling condensation*. Petropavlovsk-Kamchatsky: KamchatGTU, 2004, 149 p. (In Russ.)]
8. Суслов А.Д., Иванов С.В., Мурашкин А.В., Чижигов Ю.В. *Вихревые аппараты*. М., Машиностроение, 1985, 256 с. [Suslov A.D., Ivanov S.V., Murashkin A.V., Chizhikov Yu.V. *Vortex devices*. Moscow, Mashinostroyeniye, 1985, 256 p. (In Russ.)]
9. Воробьев И.Д., Кислых В. И., Харченко В.А. Массообмен в клеточном культиваторе "Биоколь". *Гидродинамика и процессы переноса в биореакторах*. Новосибирск, Ин-т теплофизики, 1989, с. 35-40. [Vorobiev I.D., Kislykh V.I., Kharchenko V.A. Mass transfer in the cell cultivator "Biokol". *Hydrodynamics and transfer processes in bioreactors*. Novosibirsk, Institut teplofiziki, 1989, pp. 35-40. (In Russ.)]
10. Кислых В.И., Рамазанов Ю.А., Майстренко В.Ф., Мертвцов Н.П. Вихревой биореактор «Биок» 1. Опыт культивирования штамма *E. coli* BL 21 (DE 3) pZZSA, продуцирующего рекомбинантный антиогенин человека. *Биотехнология*, 2000, № 4, с. 72-79. [Kislykh V.I., Ramazanov Yu.A., Maistrenko V.F., Mertvetsov N.P. Vortex bioreactor "Biok" 1. Experience of cultivation of *E. coli* BL 21 (DE 3) pZZSA strain, producing recombinant human antiogenin. *Biotechnology*, 2000, no. 4, pp. 72-79. (In Russ.)]
11. Мертвцов Н.П., Рамазанов Ю.А., Репков А.П., Дударев А.Н., Кислых В.И. *Газовихревые биореакторы «Биок». Использование в современной биотехнологии*. Новосибирск: Наука, 2002, 118 с. [Mertvetsov N.P., Ramazanov Yu.A., Repkov A.P., Dudarev A.N., Kislykh V.I. *«Biok» gas vortex bioreactors. Use in modern biotechnology*. Novosibirsk: Nauka, 2002, 118 p. (In Russ.)]

12. Бадаев Б.Н., Воробьев И.Д., Кислых В.И., Харченко В.А., Репков А.П. *Аппарат для культивирования клеток тканей или микроорганизмов*. Пат. SU 1779690 (51) МПК C12M 1/04 (1990.01). Заявка: № 89 4700908, заявл. 06.06.1989, опубл. 07.12.1992, бюл. № 34. [Badaev B.N., Vorobiev I.D., Kislykh V.I., Kharchenko V.A., Repkov A.P. *Apparatus for the cultivation of tissue cells or microorganisms*. Pat. SU 1779690 (51) MPK C12M 1/04 (1990.01). Application: No. 89 4700908, app. 06.06.1989, publ. 07.12.1992, bul. no. 34. (In Russ.)]

13. Кислых В.И., Рамазанов Ю.А., Репков А.П., Воробьев И.Д. *Аппарат для суспензионного культивирования клеток тканей и микроорганизмов*. Пат. RU 2125579 C1, МПК C12M 1/14,3/00. № 98117375/13, заявл. 22.09.1998, опубл. 27.08.1999, бюл. № 34. [Kislykh V.I., Ramazanov Yu.A., Repkov A.P., Vorobiev I.D. *Apparatus for suspension cultivation of tissue cells and microorganisms*. Pat. RU 2125579 C1, MPK C12M 1 / 14.3 / 00. No. 98117375/13, app. 09/22/1998, publ. 27.08.1999, bul. no. 34. (In Russ.)]

14. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Репков А.П., Лелеков А.С. Промышленная технология производства биомассы морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin с использованием газовихревого фотобиореактора. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технической конференции*, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т., Севастополь, 2016, т. 1, с. 73-77. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Zozulya Yu.V., Uvarov I.P., Repkov A.P., Lelekov A.S. Industrial technology for the production of biomass of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin using a gas vortex photobioreactor. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry. Materials of the XI International Scientific and Technical Conference, Sevastopol, April 25-29, 2016: in 2 volumes, Sevastopol, 2016, vol. 1, pp. 73-77. (In Russ.)]*

15. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Нехорошев М.В., Бобко Н.И., Зозуля Ю.В., Уваров И.П. Промышленная технология получения фукоксантина - морского противоопухолевого каротиноида. *Российский биотерапевтический журнал*, 2017, т. 16, № 51, с. 22. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Nekhoroshev M.V., Bobko N.I., Zozulya Yu.V., Uvarov I.P. Industrial technology for producing fucoxanthin, a marine antitumor carotenoid. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*, 2017, vol. 16, iss. 51, p. 22. (In Russ.)]

16. Зозуля Ю.В., Рожков О.А., Уваров И.П., Геворгиз Р.Г. *Кормовая комплексная биологически активная добавка для животных и птиц*. Пат. RU 2708161 C1, МПК A23K 10/16 (2019.08); A23K 10/30 (2019.08); A23K 20/28 (2019.08). № 2019111587, заявл. 16.04.2019, опубл. 05.12.2019, бюл. № 34. [Zozulya Yu.V., Rozhkov O.A., Uvarov I.P., Gevorgiz R.G. *Forage complex biologically active additive for animals and birds*. Pat. RU 2708161 C1, MPK A23K 10/16 (2019.08); A23K 10/30 (2019.08); A23K 20/28 (2019.08). No. 2019111587, app. 04/16/2019, publ. 05.12.2019, bul. no. 34. (In Russ.)]

VORTEX MIXING OF MICROALGAE CULTURES

Gevorgiz R.G.¹, Uvarov I.P.², Zheleznova S.N.¹

¹ Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS
Sevastopol, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² Department of Veterinary Medicine of the city of Novosibirsk”
Novosibirsk, Russia

Abstract. Various methods of mixing cultures of lower phototrophs in photobioreactors for intensive cultivation are considered. The advantages and disadvantages of various methods of mixing the cell suspension are presented. The advantages of the vortex mixing method as the most promising method for mixing microalgae cultures are noted. A fundamental feature of modern gas vortex devices is the creation of swirling air flows over the cell suspension. The air vortex above the suspension, due to the friction of the air against the interface and the pressure difference between the periphery and the center of the gas-air vortex, draws the cell suspension itself into the vortex movement, due to which a rather mild effect on the cells occurs during stirring. It is this mixing of the suspension with a swirling flow that makes it possible to exclude highly turbulent and stagnant zones, hydraulic shocks and the effect of cavitation, as well as the formation of both shear stress and local overheating zones, which have a detrimental effect on the viability of cell cultures sensitive to mechanical stress. Thus, in vortex apparatuses, practically all the requirements for mixing cells for a wide class of microbiological objects are satisfied. Much less requirements are imposed on cultures of microalgae during mixing. Therefore, for intensive cultivation of microalgae, it is sufficient to use a vortex only in the suspension itself, which greatly simplifies the design of the vortex apparatus. One of the simplest ways to create a vortex inside a suspension is to rotate a flat ring (diaphragm) submerged to a certain level by means of a mechanical drive or tangential introduction of an air flow into the photobioreactor. The production of such a ring is possible from any transparent material, for example, from sheet polycarbonate, which allows making a ring of any diameter, and the process of intensive cultivation of microalgae can be easily scaled to a predetermined level.

Key words: lower phototrophs, tornado, photobioreactor.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ *SCORPENA PORCUS*

Кальпа В.А.^{1,2}, Гаджи А.В.², Лантушенко А.О.²

¹ ФИЦ Морской гидрофизический институт РАН

ул. Капитанская, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: vel.kalpa@gmail.com

² Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию: 25.08.2021

Аннотация. Гидробионты в процессе жизнедеятельности постоянно находятся под воздействием биотических и абиотических факторов. Придонные организмы и обитатели приливных зон могут испытывать недостаток кислорода (гипоксию). Кроме того, гипоксические условия могут возникать при чрезмерном разрастании (цветении) фитопланктона и водорослей, активно поглощающих растворённый в воде кислород. Гидробионты, находящиеся в приливных зонах во время отлива, также испытывают гипоксию. На клеточном уровне гипоксия может индуцировать автоокисление дыхательных пигментов, угнетает обмен веществ, а также снижает иммунные функции гемоцитов в гемолимфе. В работе моделирование гипоксических условий в экспериментах *in vitro* было реализовано воздействием на эритроциты и гемоциты раствором пероксида водорода. Также исследовано воздействие фуллерена на индукцию окислительного стресса.

Ключевые слова: гидробионты, гемолимфа, окислительный стресс, фуллерен C₆₀.

Гидробионты в процессе жизнедеятельности постоянно находятся под воздействием биотических и абиотических факторов. Придонные организмы и обитатели приливных зон могут испытывать недостаток кислорода (гипоксию). Например, скорпены при угрозе со стороны хищников располагаются на дне и замирают, фактически прекращая дыхание и сердцебиение. Кроме того, гипоксические условия могут возникать при чрезмерном разрастании (цветении) фитопланктона и водорослей, активно поглощающих растворённый в воде кислород [1].

Гидробионты, находящиеся в приливных зонах, например мидии, во время отлива также испытывают гипоксию. Гипоксия вызывает целый комплекс нарушений в организме двусторчатых моллюсков. На клеточном уровне гипоксия может индуцировать автоокисление дыхательных пигментов, угнетает обмен веществ, а также снижает иммунные функции гемоцитов в гемолимфе.

Моделирование гипоксических условий в экспериментах *in vitro* можно реализовать воздействием на эритроциты и гемоциты раствором перекиси [2].

В ряде работ было показано, что воздействие фуллерена может снижать окислительный стресс [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры являются удобной модельной системой для исследования окислительного стресса *in vitro* при различных патологических процессах, поскольку их использование позволяет исключить многие неспецифические факторы, сопровождающие индукцию свободнорадикального окисления *in vivo*. При этом пероксид водорода (H₂O₂), применяемый в моделировании окислительного стресса, способен индуцировать апоптотическую гибель клеток.

Отбор проб для эксперимента происходил следующим образом:

Из хвостовой артерии скорпены *Scorpena porcus* Linnaeus была отобрана кровь. После чего её промывали и центрифугировали 3 раза, для выпадения эритроцитов в осадок и дальнейшей работы с ними.

Далее кровь смешивалась со средой (состав среды: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM HEPES, 2.2 mM glucose), для получения раствора, использовавшегося в эксперименте.

Окислительный стресс моделировался пероксидом водорода в различных концентрациях (1М и 0,3М): брали две пробирки со средой, в одну помещали 1М пероксида водорода, в другую 0,3М (на рис. 1 эти пробирки, с уже добавленными эритроцитами, помечены номерами 2.1 и 2.2 соответственно).

Также поступили с фуллереном C₆₀: к 100 мкл водорастворимого C₆₀ добавили 900 мкл среды (на рис. 1 пробирка под номером 3.1); к 10 мкл C₆₀ добавили 990 мкл среды (на рис. 1 пробирка под номером 3.2).

Далее, чтобы выявить наличие влияния фуллерена C₆₀ на оксидативный стресс, смешали часть раствора с низкой концентрацией фуллерена C₆₀ и часть раствора с высокой концентрацией пероксида водорода (пробирки 3.2 и 2.1).

Пробирка под номером 1 – контроль: смесь эритроцитов и среды, без добавления пероксида водорода и фуллерена C₆₀.

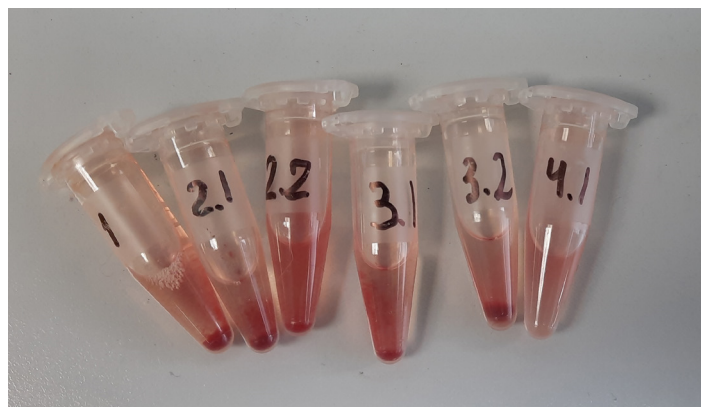


Рисунок 1. Основные пробы, задействованные в эксперименте

1 (Контроль) – смесь эритроцитов и среды;

2.1 – смесь высокой (1М) концентрации пероксида водорода со средой;

2.2 – смесь низкой (0,3 мМ) концентрации пероксида водорода со средой;

3.1 – смесь высокой концентрации фуллерена C_{60} со средой;

3.2 – смесь низкой концентрации фуллерена C_{60} со средой;

4.1 – смесь раствора с низкой концентрацией фуллерена C_{60} и раствора с высокой концентрацией пероксида водорода.

В кювету наливали 1 мл среды, после чего добавляли клетки, чтобы выйти на первую точку при светопропускании 50-60%. Далее добавляли в 4 раза меньше клеток и 250 мкл воды при, помимо этого, после каждого разбавления, происходил отбор проб объемом 100 мкл для осмотического теста.

При титровании концентрация клеток остаётся постоянной, а так как титрование осуществляется водой, меняется осмолярность среды и, соответственно, осмотическое давление клеток, приводящее к лизису.

Цельная кровь (суспензия эритроцитов в белковом растворе - плазме) является неньютоновской жидкостью вследствие агрегации эритроцитов.

Эритроцит в норме имеет форму двояковогнутого диска диаметром около 8 мкм. Он может существенно менять свою форму, например, при различной осмолярности среды (рис.2) [4].

В неподвижной крови эритроциты агрегируют, образуя так называемые «монетные столбики», состоящие из 6-8 эритроцитов. Электронно-микроскопическое исследование тончайших срезов монетных столбиков выявило параллельность поверхностей прилежащих эритроцитов и постоянное межэритроцитарное расстояние при агрегации (рис. 3).

На рисунке 3 показана (зарисовка) агрегация цельной крови во влажных мазках, которая представляет собой большие конгломераты, состоящие из многих монетных столбиков. При перемешивании крови агрегаты разрушаются, а после прекращения перемешивания вновь восстанавливаются [4].

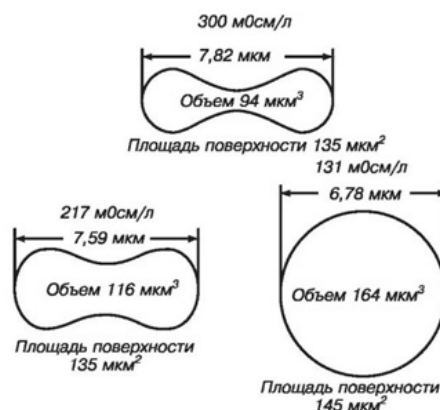


Рисунок 2. Вариации формы эритроцитов



Рисунок 3. Агрегация цельной крови во влажных мазках, «монетные столбики»

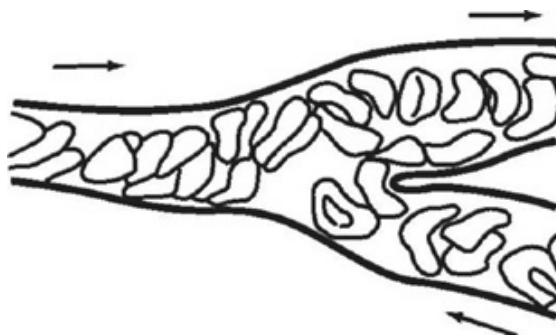


Рисунок 4. Течение крови в капиллярах

При протекании крови по капиллярам агрегаты эритроцитов распадаются и вязкость падает.

Вживление специальных прозрачных окошек в кожные складки позволило сфотографировать течение крови в капиллярах. На рисунке 4, выполненном по такой фотографии, отчетливо видна деформация кровяных клеток [4].

Деформируясь, эритроциты могут продвигаться один за другим в капиллярах диаметром всего 3 мкм. Именно в таких тонких капиллярных сосудах и происходит газообмен между кровью и тканями [4].

В ходе эксперимента было показано, что пероксид водорода влияет на мембраны эритроцитов, моделируя окислительный стресс, что приводит к апоптозу эритроцитов. Фуллерен C_{60} же, в свою очередь, компенсирует влияние пероксида водорода на мембраны эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБУЖДЕНИЕ

Эксперимент с эритроцитами проводился с помощью анализатора «Ласка-ТМ» и были получены следующие данные.

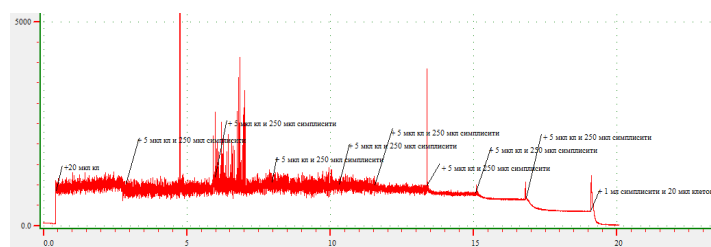


Рисунок 5. Светорассеяние суспензии эритроцитов контрольной группы при изменении осмолярности среды

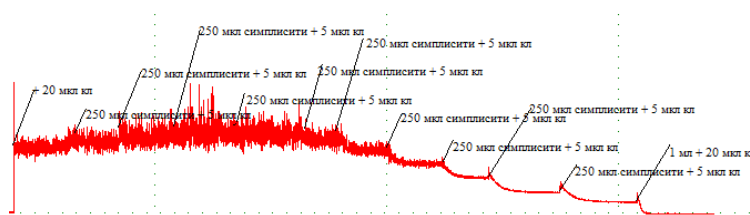


Рисунок 6. Данные по светорассеянию при взаимодействии низкой концентрации перекиси водорода с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

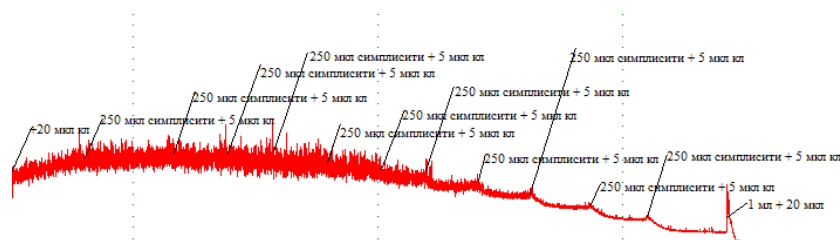


Рисунок 7. Данные по светорассеянию при взаимодействии высокой концентрации перекиси водорода с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

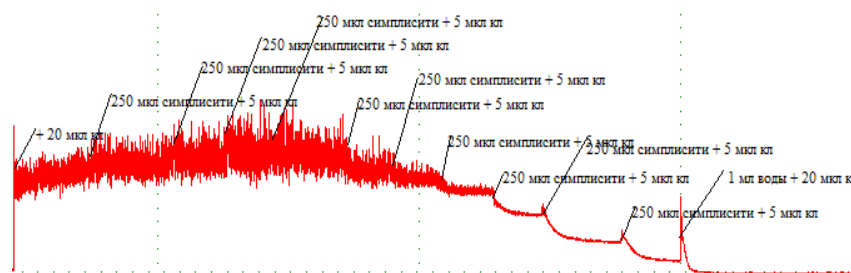


Рисунок 8. Данные по светорассеянию при взаимодействии высокой концентрации фуллерена C_{60} с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

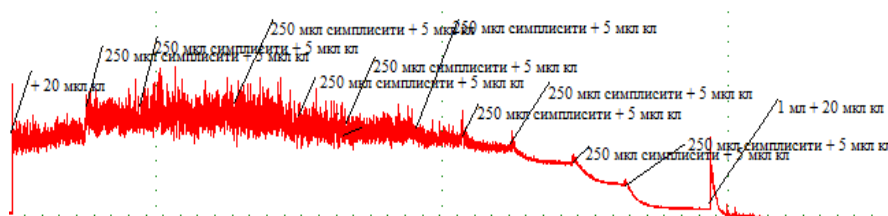


Рисунок 9. Данные по светорассеянию при взаимодействии низкой концентрации фуллерена C_{60} с эритроцитами *Scorpaena porcus Linnaeus*

По представленным на рисунках 5-9 данным можно определить начало лизиса эритроцитов *Scorpaena porcus Linnaeus*, а также построить кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при воздействии (или отсутствии воздействия) внешних раздражителей.

На рисунках 5-9 отмечены точки разбавления и отбора проб для осмотеста, началом лизиса можно назвать характерный резкий спад кривой, для рисунка 6, например, лизис начался на седьмой точке, а на рисунках 7 и 8 видно, что набухание клеток происходило гораздо активнее, несмотря на то, что их разрыв тоже произошел на после седьмых точек.

Кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при воздействии (или отсутствии воздействия) внешних раздражителей, приведены ниже.

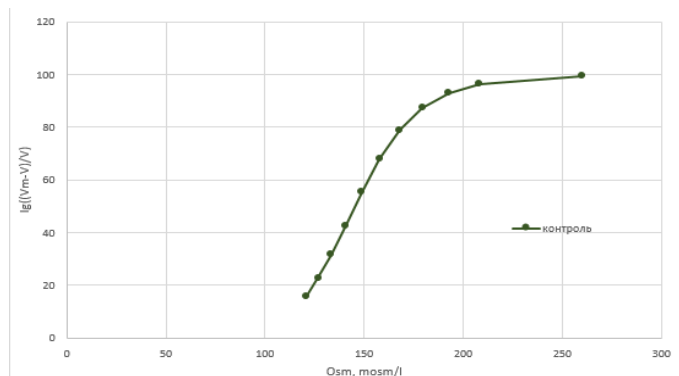


Рисунок 10. Кривая, визуализирующая осмотическую стойкость эритроцитов в отсутствии окислительного стресса

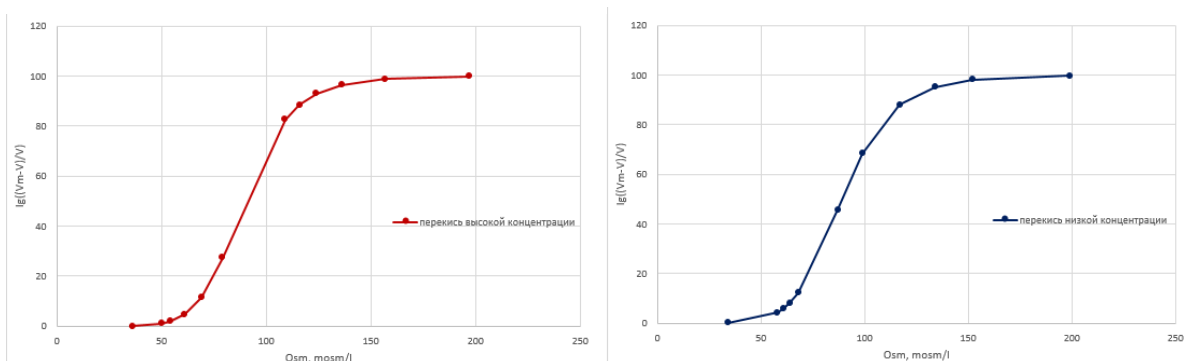


Рисунок 11. Кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при взаимодействии с высокой (левая кривая) и низкой (правая кривая) концентрацией пероксида водорода

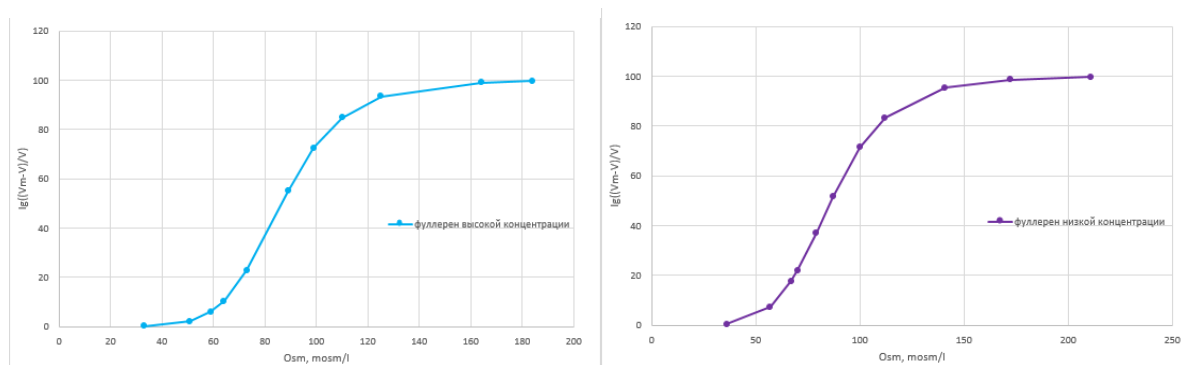


Рисунок 12. Кривые, визуализирующие осмотическую стойкость эритроцитов при взаимодействии с высокой (левая кривая) и низкой (правая кривая) концентрацией фуллерена C_{60}

По полученным экспериментальным данным были определены значения H_{50} – осмолярность, при которой лизирует 50 % от первоначального количества клеток (табл. 1).

Таблица 1. Значения осмолярности, при которых лизирует 50% клеток

№ пробирки	H_{50}
1	149
2.2	124
3.1	154
3.2	152
4.1	147

На рисунке 13 представлен результирующий график зависимости процента целых клеток от осмолярности среды, из которого видно, что кривые контроля и смеси фуллерена C_{60} с пероксидом водорода практически совпадают, из чего можно сделать вывод, что фуллерен C_{60} повлиял на окислительный стресс, частично компенсируя его воздействие. Также, из графика видно, что фуллерен C_{60} в любых концентрациях практически не повлиял на эритроциты, из чего можно сделать вывод, что он не действует губительно на клетки крови.

Из таблицы и графика видно, что значение H_{50} для клеток, обработанных перекисью, существенно меньше, чем у других образцов, т.е. в этом случае мембраны таких клеток становятся более жесткими. Повышение жесткости мембран может привести к ухудшению сосудистого кровотока, особенно при прохождении по капиллярам эритроциты будут не способны менять свой объем, что приведет к ухудшению газообмена в клетках.

Таким образом, в ходе эксперимента было показано, что пероксид водорода, моделируя окислительный стресс, влияет на мембраны эритроцитов, что приводит к увеличению их жесткости. Фуллерен C_{60} же, в свою очередь, компенсирует влияние пероксида водорода на мембраны эритроцитов.

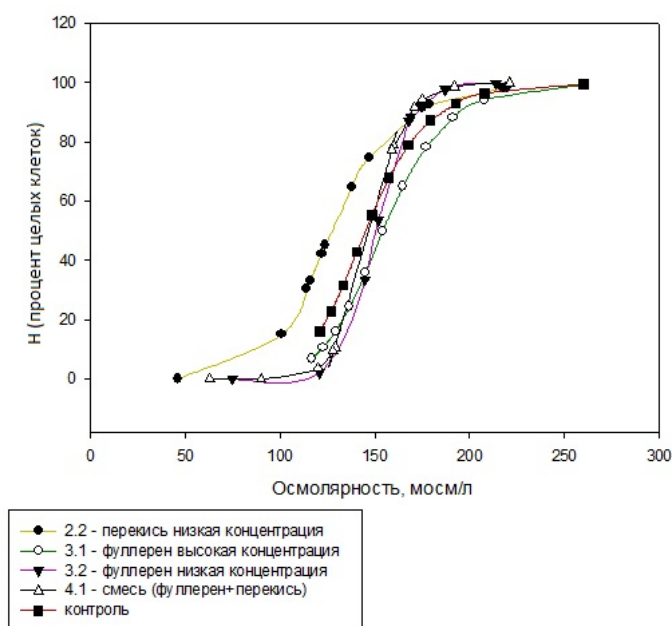


Рисунок 13. Результирующий график зависимости процента целых клеток от осмолярности среды

Список литературы / References:

1. Солдатов А.А. Функциональные аспекты существования морских организмов в зонах острой гипоксии. *Труды ИБВВ РАН*, 2019, вып. 88, № 91. [Soldatov A.A. Functional aspects of the existence of marine organisms in areas of acute hypoxia. *Proceedings of IBVV RAS*, 2019, vol. 88, no. 91. (In Russ.)]
2. Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л. Индукция пероксидом водорода окислительного стресса in vitro в эпителиальных клетках молочной железы для изучения апоптоза опухолевых клеток линии MCF-7. *Сибирский научный медицинский журнал*, 2015, т. 35, № 2. [Shakhristova E.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L. Induction of oxidative stress by hydrogen peroxide in vitro in mammary epithelial cells to study the apoptosis of MCF-7 tumor cells. *Siberian Scientific Medical Journal*, 2015, vol. 35, no. 2. (In Russ.)]
3. Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Свистунов А.А., Наполов Ю.К., Чехонин В.П., Фуллерены и оксидативный стресс. *Онкогематология*, 2012, вып. 4, с. 11-15. [Orlova M.A., Trofimova T.P., Orlov A.P., Shatalov O.A., Svistunov A.A., Napolov Yu.K., Chekhonin V.P. Fullerenes and oxidative stress. *Oncohematology*, 2012, iss. 4, pp. 11-15. (In Russ.)]
4. Федорова В.Н., Фаустов Е.В. *Медицинская и биологическая физика*. Курс лекций с задачами: учеб. Пособие, 2008, 592 с. [Fedorova V.N., Faustov E.V. *Medical and biological physics*. Course of lectures with tasks: textbook. Manual, 2008, 592 p. (In Russ.)]

INFLUENCE OF NANOPARTICLES ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF SCORPENA PORCUS ERYTHROCYTE MEMBRANES**Kalpa V.A.^{1,2}, Gadzhi A.V.², Lantushenko A.O.²**¹ Marine Hydrophysical Institute of RAS

st. Kapitan, 2, 299011, Sevastopol, Russia; e-mail: vel.kalpa@gmail.com

² Sevastopol State University

st. Universitetskaya, 33, 299053, Sevastopol, Russia

Abstract. In the process of vital activity, aquatic organisms are constantly under the influence of biotic and abiotic factors. Bottom organisms and inhabitants of intertidal zones may experience a lack of oxygen (hypoxia). In addition, hypoxic conditions can occur when phytoplankton and algae overgrow (bloom), actively absorbing oxygen dissolved in water. Aquatic organisms in intertidal zones at low tide also experience hypoxia. At the cellular level, hypoxia can induce autooxidation of respiratory pigments, inhibits metabolism, and also reduces the immune functions of hemocytes in the hemolymph. In this work, the modeling of hypoxic conditions in in vitro experiments was implemented by exposing erythrocytes and hemocytes to a solution of hydrogen peroxide. The effect of fullerene on the induction of oxidative stress was also investigated. It was also shown that the addition of phthalates at a concentration of 0.4 mg / L led to the death of most mollusks within 24 hours, and at a concentration of 10 times more, all mollusks participating in the experiment died.

Key words: hydrobionts, hemolymph, oxidative stress, fullerene C₆₀.

АГРЕГАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО АЛКАЛОИДА БЕРБЕРИНА С КОФЕИНОМ И ФУЛЛЕРЕНОМ C_{60} В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Меджитов Р.А., Шупова Е.В., Бучельникова В.А., Бучельников А.С.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: asbuchelnikov@sevsu.ru

Поступила в редакцию: 26.08.2021

Аннотация. Работа посвящена исследованию агрегации алкалоида растительного происхождения берберина с кофеином и фуллереном C_{60} в водных растворах. Методом спектрофотометрического титрования была исследована агрегация данных молекул. С помощью статистико-термодинамических моделей получены оценки равновесных констант агрегации, при этом константа гетероассоциации берберина и кофеина оценена впервые. Методом молекулярного докинга получено подтверждение этих количественных оценок. Полученные результаты находятся в полном согласии с выводами проведенных ранее подобных исследований. Сформулированы направления дальнейшей работы по изучению агрегации берберина с биологически важными молекулами.

Ключевые слова: берберин, кофеин, фуллерен C_{60} , агрегация, равновесная константа, спектрофотометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Берберин, или 5,6-дигидро-9,10-диметоксибензо[g]-1,3-бензодиоксоло[5,6-a] хинолизиний (BER; рис. 1а), является широко распространенным в природе алкалоидом растительного происхождения. Кроме барбариса (*Berberis vulgaris*), которому обязан своим названием, он содержится и во многих других видах растений, чаще всего в корнях. С давних пор препараты берберина использовались для лечения бактериальных инфекций, прежде всего, желудочно-кишечного тракта [1,2]. В последние несколько десятилетий было обнаружено, что берберин эффективен при лечении различных типов рака, сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета 2 типа, болезней крови, нейродегенеративных заболеваний и некоторых других [1-6]. Количество публикаций, посвященных берберину и его биологической активности, растет экспоненциально, что подтверждает неослабевающий интерес ученых к этому веществу [1,3].

В числе прочих следует выделить исследования молекулярных механизмов медико-биологического действия берберина. Считается, что он проявляет свою активность посредством антиоксидантного и иммуномодулирующего эффектов [7]. Имеется ряд свидетельств в пользу ДНК-тропного действия берберина [8-10], т.е. когда молекула берберина реализует свою активность путем связывания с ДНК (преимущественно интеркаляционного типа). Кроме того, было показано, что берберин в присутствии других соединений резко изменяет индекс своей активности. Так, при добавлении кофеина (CAF; рис. 1б) на порядок уменьшается цитотоксическая активность берберина в отношении клеток рака груди MCF-7 [9], при одновременном введении берберина и пентоксифиллина ослабляется острая почечная недостаточность, вызванная приемом диклофенака [11]. Последнее время активно исследуются взаимодействия берберина с различными наночастицами [12-15], среди которых особое место занимает фуллерен C_{60} [13,15]. В частности, было показано, что водный коллоидный раствор фуллерена C_{60} усиливает биодоступность берберина за счет того, что является для него своеобразной системой доставки [13].

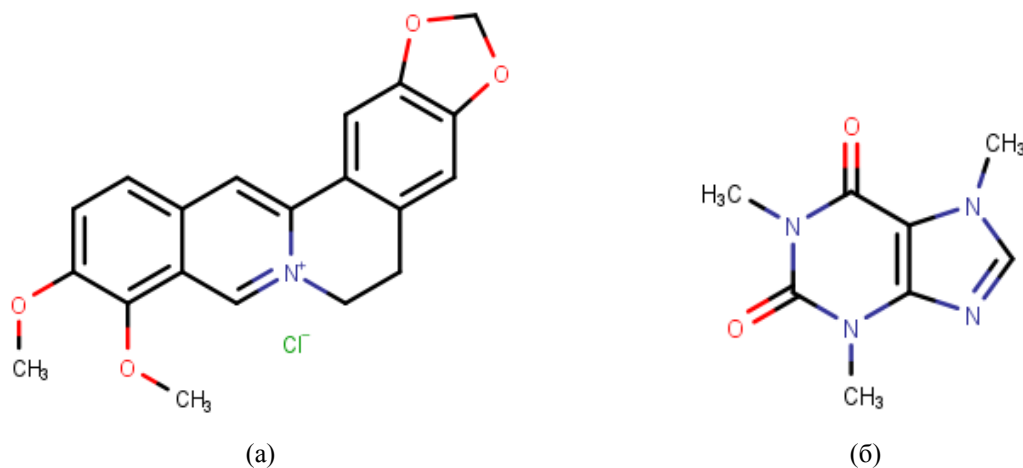


Рисунок 1. Структурные формулы молекул берберина (а) и кофеина (б)

Как правило, подобные исследования, проведенные в конкретных биологических условиях, носят эмпирический характер, и потому их выводы не могут быть непосредственно перенесены на другие системы. Другими словами, бывает сложно предсказать поведение смесей биологически активных соединений в каждом конкретном случае. Выходом из ситуации может быть количественная характеристика взаимодействий этих соединений друг с другом, т.е. нахождение величины равновесной константы их ассоциации, поскольку этот подход максимально независим от внешних условий. В нашем случае необходимо найти константы взаимодействия берберина с кофеином и фуллереном C_{60} . Решению этой задачи и посвящена настоящая работа. Выбор кофеина обусловлен тем, что, во-первых, он является наиболее распространенным и хорошо изученным производным ксантина, что позволяет проводить сравнительный анализ с другими веществами, и во-вторых, литературный поиск не дал результатов по агрегации берберина и кофеина, а это означает, что система BER–CAF будет исследована в настоящей работе впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление растворов.

Раствор фуллерена C_{60} был приготовлен методом замены растворителя. Сухой порошок фуллерена C_{60} растворили в толуоле, затем добавили дистиллированную деионизированную воду и сонифицировали в течение нескольких часов в ультразвуковой ванне. Далее образовавшуюся эмульсию аккуратно отобрали шприцем и поместили в колбу. При помощи ротационного испарителя из этой колбы удаляли азеотропную смесь «толуол – вода» при температуре 80–90 °C. Полученный раствор был отцентрифугирован в течение 5 минут при скорости ротора 15000 об/мин. Супернатант использовали без дальнейшей очистки. Характеризация с помощью методов ^1H ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и спектрофотометрии показала, что водный коллоидный раствор фуллерена C_{60} не уступает по своим характеристикам таким же растворам, использовавшимся ранее (например, в работе [13]). Концентрация исходного водного коллоидного раствора фуллерена C_{60} была оценена как 0,21 мг/мл или $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Порошки хлорида берберина (Sigma Cat. No.: B3251) и кофеина (Sigma Cat. No.: C0750) использовались без дальнейшей очистки. Навески веществ растворялись в дистиллированной деионизированной воде, полученные растворы далее разводились до нужной концентрации. Так, взвесили 1,04 мг порошка берберина с молярной массой 371,81 г/моль и растворили в 35 мл дистиллированной деионизированной воды. Получили раствор берберина с концентрацией $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Для проведения эксперимента по исследованию агрегации BER–CAF приготовили раствор берберина для разбавления с концентрацией $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л следующим образом: 10 мл исходного раствора берберина смешали с 30 мл воды. Взвесили 61,45 мг порошка кофеина с молярной массой 194,19 г/моль и растворили в 2,637 мл полученного раствора берберина. Получили смесь BER–CAF с концентрациями берберина $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л и кофеина $1,2 \cdot 10^{-1}$ моль/л.

Из-за наличия фонового поглощения водного раствора фуллерена C_{60} необходимо проводить синхронное титрование раствора C_{60} и смеси BER– C_{60} . Для этого в первую кювету налили 0,75 мл раствора фуллерена C_{60} с исходной концентрацией и добавили 1,25 мл дистиллированной деионизированной воды. Во вторую кювету налили столько же раствора C_{60} , 0,5 мл исходного раствора берберина и 0,75 мл воды. Таким образом, в обеих кюветах концентрация фуллерена C_{60} стала одинаковой и равной $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Во второй кювете концентрация берберина составила $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Отдельно приготовили раствор берберина для разбавления с концентрацией $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л: 10 мл исходного раствора берберина смешали с 30 мл воды.

Спектрофотометрическое титрование.

Для нахождения равновесных констант ассоциации был выбран простой и вместе с тем достаточно информативный метод спектрофотометрического титрования. Раствор берберина смешивали с водным раствором C_{60} либо с раствором кофеина и разбавляли раствором берберина той же концентрации ($2 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Таким образом, на протяжении всего эксперимента концентрация берберина поддерживалась постоянной, в то время как концентрации кофеина / фуллерена C_{60} изменялись от максимальной концентрации до нуля.

Титрование проводилось в полистироловых кюветах с длиной оптического пути 1 см в диапазоне длин волн 300–550 нм с шагом 0,5 нм. Регистрация спектров осуществлялась с помощью двухлучевого спектрофотометра Lambda 365 (Perkin Elmer, США).

Методы численной оптимизации.

Результатом эксперимента титрованием являлся набор спектров, каждый из которых соответствовал определенной концентрации кофеина / фуллерена C_{60} . Для каждого набора была получена кривая титрования, т.е. зависимость оптической плотности растворов на длине волны 345 нм, соответствующей максимуму поглощения чистого берберина, от концентрации кофеина / фуллерена C_{60} .

Для нахождения параметров комплексообразования эти кривые были аппроксимированы статистико-термодинамическими моделями, учитывающими специфику динамического равновесия в том или ином растворе. Аппроксимация была выполнена методом минимизации квадратичной функции невязки вида

$$\Delta = \sum_i (A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{mod}})^2, \quad (1)$$

где A_i^{exp} , A_i^{mod} – экспериментальные и теоретические, т.е. рассчитанные по модели, значения оптической

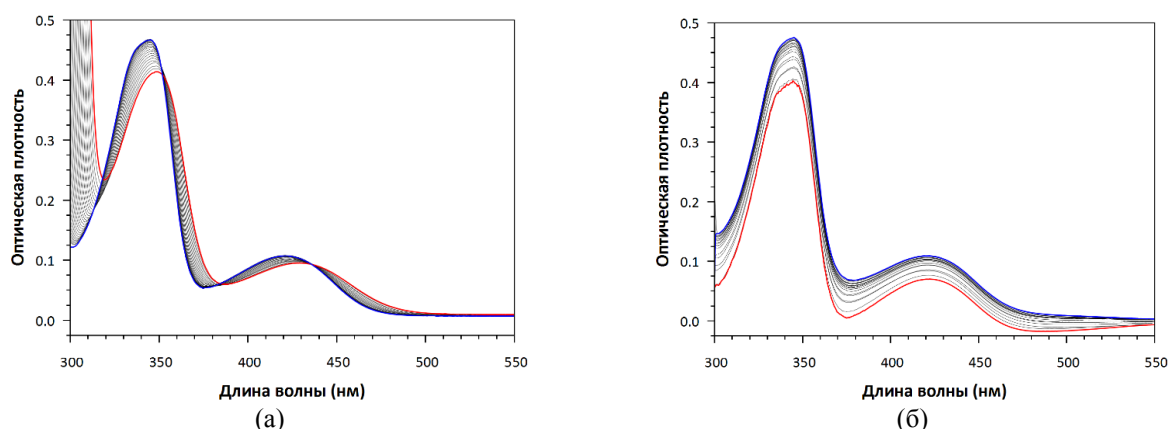


Рисунок 2. Электронные спектры поглощения смесей берберина с кофеином (а) и фуллереном C_{60} (б)

плотности в i -й точке кривой титрования. Значения подгоночных параметров считались найденными, если найден минимум функции невязки (1).

Алгоритм численной оптимизации реализован средствами языка программирования Python 3.

Молекулярный докинг.

Молекулярное моделирование комплексов берберина с кофеином и фуллереном C_{60} было выполнено с целью получения пространственных структур комплексов и оценки расположения хромофоров молекул относительно друг друга. Для проведения молекулярного докинга был использован программный пакет AutoDock Vina 1.1.2, позволяющий провести так называемый гибкий докинг (flexible docking) с учетом конформационной подвижности молекул. Визуализация полученных комплексов осуществлена в программе PyMol.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный анализ спектров поглощения.

Результатом спектрофотометрического титрования явились два набора спектров (рис. 2) при различных концентрациях кофеина / фуллерена C_{60} .

На рисунке 2а виден bathochromic сдвиг полос поглощения берберина на несколько нанометров одновременно с уменьшением интенсивности поглощения (гипохромный эффект), что подтверждает образование комплексов берберина и кофеина. Отчетливо видны также, как минимум, три изобестических точки, которые указывают на наличие в системе строго фиксированного количества типов комплексов

На рисунке 2б заметно понижение оптической плотности раствора с незначительным изменением профиля спектра. Наиболее вероятно, эти изменения также указывают на образование комплексов между молекулами берберина и частицами водного коллоидного раствора фуллерена C_{60} .

Проведенный качественный анализ спектров дает основания для использования статистико-термодинамических моделей комплексообразования берберина с кофеином и фуллереном C_{60} и дальнейшего нахождения значений равновесных констант ассоциации с их помощью.

Статистико-термодинамическая модель гетероассоциации BER-CAF.

Молекулы берберина и кофеина имеют в своей структуре планарные сопряженные π -электронные системы, что в сочетании с изложенным выше позволяет предположить образование «стопочных» агрегатов в растворе. Это определяет выбор статистико-термодинамической модели гетероассоциации BER-CAF. Применим модель 1:2 гетероассоциации, опубликованную ранее в работе [16] для количественного описания агрегации бромистого этидия и кофеина.

В рамках модели будем полагать, что молекулы берберина не агрегируют друг с другом, а молекулы кофеина агрегируют друг с другом, образуя димеры. При этом образуется также гетеродимер, содержащий одну молекулу берберина и одну молекулу кофеина. Обозначим мономерную концентрацию берберина через x_1 , а мономерную концентрацию кофеина – через y_1 . Тогда закон сохранения массы выразится системой уравнений следующего вида:

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_h x_1 y_1 \\ y_0 = y_1 + 2K_y y_1^2 + K_h x_1 y_1 \end{cases}, \quad (2)$$

где K_h , K_y – равновесные константы гетероассоциации и самоассоциации кофеина соответственно, x_0 , y_0 – общие концентрации берберина и кофеина соответственно.

Поскольку кофеин не поглощает в данном диапазоне длин волн, то его вклад в общее поглощение равен нулю. Поэтому выражение для наблюдаемой оптической плотности выглядит следующим образом:

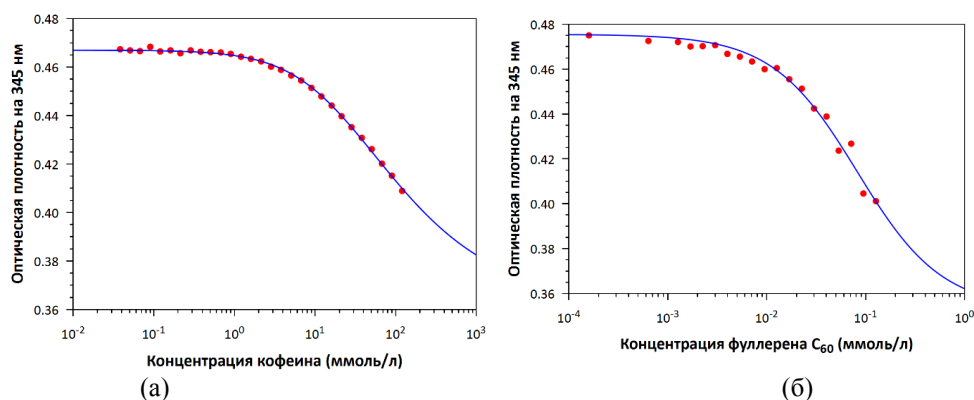


Рисунок 3. Кривые титрования смесей берберина с кофеином (а) и фуллереном C_{60} (б)

$$A(y_0) = \varepsilon_m x_1 + \varepsilon_h K_h x_1 y_1 = (\varepsilon_m - \varepsilon_h) x_1 + \varepsilon_h x_0, \quad (3)$$

где ε_m , ε_h – молярные коэффициенты экстинкции молекулы берберина, находящейся соответственно в мономерном и в связанном с кофеином состоянии. Параметр ε_m находится из точки кривой титрования при $y_0 = 0$ как $\varepsilon_m = A(0)/x_0$.

Выражение (3) описывает кривую титрования. При минимизации функционала (1) подгоночными параметрами являются K_h и ε_h .

Статистико-термодинамическая модель комплексообразования BER- C_{60} .

При описании комплексообразования берберина с фуллереном C_{60} применим модель, опубликованную в работе [17] и описывающую агрегацию фуллерена C_{60} с метиловым голубым. В рамках данной модели предполагается одновременная посадка до N молекул берберина на поверхность молекулы фуллерена C_{60} с микроскопической константой K_h . Полагая y_1 концентрацией несвязанного фуллерена C_{60} , запишем систему уравнений закона сохранения массы

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + NK_h x_1 y_1 (1 + K_h x_1)^{N-1} \\ y_0 = y_1 (1 + K_h x_1)^N \end{cases}, \quad (4)$$

которая имеет аналитическое относительно x_1 решение в виде:

$$x_1 = \frac{-(1 + NK_h y_0 - K_h x_0) + \sqrt{(1 + NK_h y_0 - K_h x_0)^2 + 4K_h x_0}}{2K_h}. \quad (5)$$

Выражение для наблюдаемой оптической плотности совпадает с выражением (3), поскольку фуллерен C_{60} не поглощает в заданном диапазоне длин волн (точнее, его фоновое поглощение вычитается из общего спектра смеси). Окончательное выражение для описания кривой титрования записывается в виде:

$$A(y_0) = (\varepsilon_m - \varepsilon_h) \frac{-(1 + NK_h y_0 - K_h x_0) + \sqrt{(1 + NK_h y_0 - K_h x_0)^2 + 4K_h x_0}}{2K_h} + \varepsilon_h x_0. \quad (6)$$

Подгоночными параметрами при фиксированном N также являются K_h и ε_h .

Расчет равновесных параметров комплексообразования BER-CAF и BER- C_{60} .

Для расчета параметров комплексообразования BER-CAF из работы [16] было взято значение константы самоассоциации K_y кофеина, равное 12 л/моль.

На рисунке 3а изображена экспериментальная кривая титрования точками красного цвета и теоретическая кривая сплошной линией синего цвета. Налицо хорошее соответствие теории (уравнения (2), (3)) эксперименту. На рисунке 3б изображена аналогичная аппроксимация эксперимента уравнением (6), в котором положили $N = 5$. Результаты аппроксимации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Расчетные параметры комплексообразования BER-CAF и BER- C_{60}

Параметр	BER-CAF	BER- C_{60}				
		$N = 1$	$N = 2$	$N = 3$	$N = 4$	$N = 5$
K_h , л/моль	22,42	16051,65	6809,11	4319,55	3162,92	2494,85
ε_h , л/моль·см	18110,83	18020,44	17785,32	17709,30	17671,72	17649,33
R^2	0,9990	0,9819	0,9824	0,9825	0,9826	0,9826

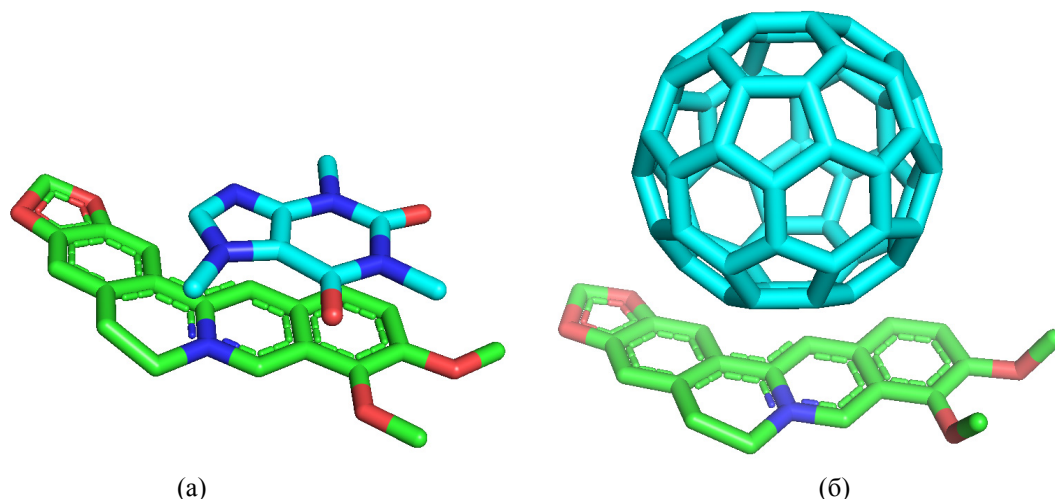


Рисунок 4. Пространственные структуры комплексов берберина с кофеином (а) и фуллереном C_{60} (б)

Также был проведен расчет при различных N от 1 до 5. Однако значения коэффициента детерминации (табл. 1) показывают, что качество аппроксимации при уменьшении N практически не изменяется. Значение равновесной константы агрегации возрастает с уменьшением максимального числа молекул берберина, которые могут одновременно уместиться на поверхности фуллерена C_{60} .

Полученные результаты находятся в полном согласии с выводами работ [16,17], в которых исследования проводились в схожих условиях. Так, по порядку совпадают константы комплексообразования берберина с кофеином (22 л/моль; константа агрегации бромистого этидия с кофеином оставила 71 л/моль [16]) и с фуллереном C_{60} (2500 л/моль; константа агрегации метиленового голубого с фуллереном C_{60} составила 2100 л/моль при том же $N = 5$ [17]).

Моделирование пространственных структур комплексов BER-CAF и BER- C_{60} .

Для визуализации исследуемых комплексов был использован метод молекулярного докинга. В системе BER-CAF в качестве рецептора была выбрана молекула берберина, а в системе BER- C_{60} – молекула фуллерена C_{60} . На рис. 4 изображены пространственные структуры 1:1 комплексов BER-CAF и BER- C_{60} .

Интересно отметить, что изменения энергии Гиббса ΔG реакции комплексообразования в системах BER-CAF и BER- C_{60} по итогам расчета структур равны соответственно -2,8 и -4,8 ккал/моль. Равновесные константы комплексообразования, рассчитанные с помощью уравнения Вант-Гоффа, равны 100 л/моль для BER-CAF и 3300 л/моль для BER- C_{60} , что очень близко к значениям констант, полученным из эксперимента. Таким образом, результаты молекулярного моделирования могут служить дополнительным подтверждением правильности расчетных значений параметров комплексообразования берберина с кофеином / фуллереном C_{60} из таблицы 1. Для более точного расчета, включая расчет комплексов BER- C_{60} при $N = 5$, требуется использовать методы молекулярной динамики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом проведенного исследования является количественная оценка параметров агрегации, в первую очередь, равновесной константы ассоциации, берберина с кофеином и фуллереном C_{60} . Стоит отметить, что, насколько нам известно, константа комплексообразования BER-CAF была рассчитана впервые. Эти значения прекрасно согласуются с данными аналогичных экспериментов, проведенных ранее. Более того, они подтверждаются предварительными результатами молекулярного моделирования. Все это позволяет сделать вывод о правильности предложенных методов и подходов, а значит развивать данную тематику дальше.

Знание величины константы агрегации позволит в будущем оценить взаимодействие берберина с биологически важными молекулами, прежде всего, ДНК, и, что наиболее важно, сопоставить эту оценку с реальным биологическим экспериментом. В свою очередь, это откроет перспективу управления биологическим действием берберина путем изменения концентраций молекул, с которыми он образует комплексы.

Таким образом, последующие исследования будут связаны с углублением изучения агрегации берберина с кофеином и фуллереном C_{60} , с изучением связывания его с ДНК, а также поведения берберина в тройных системах Берберин-Лиганд-ДНК. Отдельным вопросом будет молекулярное моделирование всех перечисленных систем с использованием методов молекулярной динамики.

Список литературы / References:

1. Gao Y., Wang F., Song Y., Liu H. The status of and trends in the pharmacology of berberine: A bibliometric review (1985-2018). *Chin. Med.*, 2020, vol. 15, no. 1, art. no. 7. doi: 10.1186/s13020-020-0288-z
2. Malhotra B., Kulkarni G.T., Dhiman N., Joshi D.D., Chander S., Kharkwal A., Sharma A.K., Kharkwal H. Recent advances on berberis aristata emphasizing berberine alkaloid including phytochemistry, pharmacology and drug delivery system. *J. Herb. Med.*, 2021, vol. 27, art. no. 100433. doi: 10.1016/j.hermed.2021.100433

3. Patel P. A bird's eye view on a therapeutically 'wonder molecule': Berberine. *Phytomedicine Plus*, 2021, vol. 1, no. 3, art. no. 100070. doi: 10.1016/j.phyplu.2021.100070
4. Sudomova M., Berchova-Bimova K., Marzocco S., Liskova A., Kubatka P., Hassan S.T.S. Berberine in human oncogenic herpesvirus infections and their linked cancers. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 6, art. no. 1014. doi: 10.3390/v13061014
5. Chang W., Chen L., Hatch G.M. Berberine as a therapy for type 2 diabetes and its complications: From mechanism of action to clinical studies. *Biochem. Cell Biol.*, 2015, vol. 93, no. 5, pp. 479-486. doi: 10.1139/bcb-2014-0107
6. Habtemariam S. Recent advances in berberine inspired anticancer approaches: From drug combination to novel formulation technology and derivatization. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 6, art. no. 1426. doi: 10.3390/molecules25061426
7. Kumar A., Ekavali Chopra K., Mukherjee M., Pottabathini R., Dhull D.K. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *Eur. J. Pharmacol.*, 2015, vol. 761, pp. 288-297. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.068
8. Bhadra K., Kumar G.S. Interaction of berberine, palmatine, coralyne, and sanguinarine to quadruplex DNA: A comparative spectroscopic and calorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, 2011, vol. 1810, no. 4, pp. 485-496. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.01.011
9. Hill G.M. Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine. *Sci. Pharm.*, 2011, vol. 79, no. 4, pp. 729-747. doi: 10.3797/scipharm.1107-19
10. Bhowmik D., Hossain M., Buzzetti F., D'Auria R., Lombardi P., Kumar G.S. Biophysical studies on the effect of the 13 position substitution of the anticancer alkaloid berberine on its DNA binding. *J. Phys. Chem. B*, 2012, vol. 116, no. 7, pp. 2314-2324. doi: 10.1021/jp210072a
11. Al-Kuraishy H., Al-Gareeb A., Hussien N. Synergistic effect of berberine and pentoxifylline in attenuation of acute kidney injury. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.*, 2019, vol. 9, no. 2, art. no. 69. doi: 10.4103/IJCIIS.IJCIIS_85_18
12. Kyzyma O., Bashmakova N., Gorshkova Yu., Ivankov O., Mikheev I., Kuzmenko M., Kutovyy S., Nikolaienko T. Interaction between the plant alkaloid berberine and fullerene C₇₀: Experimental and quantum-chemical study. *J. Mol. Liq.*, 2019, vol. 278, pp. 452-459. doi: 10.1016/j.molliq.2019.01.062
13. Grebinyk A., Prylutska S., Buchelnikov A., Tverdokhle N., Grebinyk S., Evstigneev M., Matyshevska O., Cherepanov V., Prylutsky Yu., Yashchuk V., Naumovets A., Ritter U., Dandekar T., Frohme M. C₆₀ fullerene as an effective nanoplateform of alkaloid berberine delivery into leukemic cells. *Pharmaceutics*, 2019, vol. 11, no. 11, art. no. 586. doi: 10.3390/pharmaceutics11110586
14. Grebinyk A., Yashchuk V., Bashmakova N., Gryn D., Hagemann T., Naumenko A., Kutsevol N., Dandekar T., Frohme M. A new triple system DNA-Nanosilver-Berberine for cancer therapy. *Appl. Nanosci.*, 2019, vol. 9, no. 5, pp. 945-956. doi: 10.1007/s13204-018-0688-x
15. Grebinyk A., Prylutska S., Grebinyk S., Evstigneev M., Krysiuk I., Skaterna T., Horak I., Sun Y., Drobot L., Matyshevska O., Prylutsky Yu., Ritter U., Frohme M. Antitumor efficiency of the natural alkaloid berberine complexed with C₆₀ fullerene in Lewis lung carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Nanotechnol.*, 2021, vol. 12, no. 1, art. no. 24. doi: 10.1186/s12645-021-00096-6
16. Baranovsky S.F., Bolotin P.A., Evstigneev M.P., Chernyshev D.N. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.*, 2009, vol. 76, no. 1, pp. 132-139. doi: 10.1007/s10812-009-9139-5
17. Buchelnikov A.S., Kostyukov V.V., Yevstigneev M.P., Prylutsky Yu.I. Mechanism of complexation of the phenothiazine dye methylene blue with fullerene C₆₀. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2013, vol. 87, no. 4, pp. 662-667. doi: 10.1134/S0036024413040067

AGGREGATION OF PLANT ALKALOID BERBERINE WITH CAFFEINE AND C₆₀ FULLERENE IN AQUEOUS SOLUTION

Medzhitov R.A., Shupova E.V., Buchelnikova V.A., Buchelnikov A.S.

Sevastopol State University

33 Universitetskaya str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: asbuchelnikov@sevsu.ru

Abstract. The work is devoted to the study of aggregation of the plant alkaloid berberine with caffeine and C₆₀ fullerene in aqueous solutions. The aggregation of these molecules was investigated by UV/Vis titration technique. Statistical thermodynamic models were used to estimate the equilibrium aggregation constants, while the hetero-association constant of berberine and caffeine was estimated for the first time. The molecular docking technique was used to confirm these quantitative estimates. The results obtained are in full agreement with the conclusions of previous similar studies. The directions of further work on the study of the aggregation of berberine with biologically important molecules are formulated.

Key words: berberine, caffeine, C₆₀ fullerene, aggregation, equilibrium constant, UV/Vis spectroscopy.

ПУТИ ФИКСАЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Геворгиз Р.Г., Лелеков А.С.

ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Россия; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru
Поступила в редакцию: 20.07.2021

Аннотация. В работе рассматриваются механизмы ассимиляции, фиксации и утилизации неорганических форм углерода клетками цианобактерий. Источниками углерода являются углекислый газ, который в зависимости от величины pH может находиться в форме CO_2 , гидрокарбонат-ионов HCO_3^- или карбонат-ионов CO_3^{2-} . Углекислый газ и гидрокарбонат-ионы являются источниками неорганического углерода для микроводорослей. Поэтому именно доступность углерода в той или иной форме может выступать в роли лимитирующего рост фактора. На сегодняшний день достаточно подробно исследован CO_2 -концентрирующий механизм в клетках микроводорослей и цианобактерий, благодаря которому максимальные скорости фотосинтетического выделения кислорода при низких и высоких концентрациях CO_2 одинаковые. Эффективность использования внутриклеточного углерода повышается за счёт наличия внутриклеточного пула, в котором углерод представлено в форме гидрокарбонат-ионов, и снижения потерь CO_2 из-за диффузионных процессов. В литературе приводятся описания CO_2 -концентрирующего механизма для разных видов микроводорослей. Большая часть исследований CO_2 -КМ выполнено на эукариотических клетках, у которых внутриклеточный пул углерода может находиться и в цитоплазме, и в стромах хлоропласта. Также описан CO_2 -КМ для цианопрокариот, у которых, согласно, в цитоплазме карбоангидраза не обнаружена. На основе современных представлений о CO_2 -КМ для спиролины *A. platensis* предложена обобщённая схема, которая описывает основные пути метаболизма неорганического углерода.

Ключевые слова: спиролина, углекислый газ, гидрокарбонат-ион, карбонат-ион, ассимиляция, углерод-концентрирующий механизм.

Цианобактерии – представители низших фототрофов – обладают чрезвычайно гибким метаболизмом, что позволяет им расти и вегетировать практически в любых типах экосистем, включая экстремальные. В ходе эволюции цианобактерии приобрели способность переживать неблагоприятные периоды лимитирования роста различными абиотическими факторами среды. Особую роль в лимитировании роста играют биогенные элементы: азот, фосфор, углерод и др. В среднем для фитопланктона нормальное соотношение данных элементов в структуре клеток является $1 \text{ P} : 7 \text{ N} : 40 \text{ C}$ [1]. Содержание биогенов в клетках микроводорослей может сильно варьировать. Например, скорость поглощения того или иного элемента определяется не только его внешней концентрацией, но и активностью, количеством транспортных систем, которые участвуют в ассимиляции. Причём перенос биогенных элементов через мембрану обычно требует затрат энергии в виде АТФ [2]. Величина внешней концентрации, строго говоря, не может рассматриваться как основной параметр, от которого зависит поглощение элемента. При низких температурах среды даже в условиях питательно насыщенного раствора, скорость поглощения элементов микроводорослями будет мала либо равна нулю вследствие низкой активности транспортных систем. Кроме того, их активность зависит от pH среды, солёности. Исключением могут являться незаряженные молекулы, например, углекислый газ, который может диффундировать через мембрану клетки без затрат энергии.

Доля углерода в биомассе низших фотоавтотрофов составляет около 50 % сухого вещества (СВ) клеток [3]. Источниками углерода являются углекислый газ, который в зависимости от величины pH может находиться в форме CO_2 , гидрокарбонат-ионов HCO_3^- или карбонат-ионов CO_3^{2-} . Известно [4], что именно углекислый газ и гидрокарбонат-ионы являются источниками неорганического углерода для микроводорослей. Поэтому именно доступность углерода в той или иной форме может выступать в роли лимитирующего рост фактора. В некоторых случаях микроводоросли способны к миксотрофному или даже гетеротрофному росту, поглощая органический углерод [5]. Однако для ассимиляции органических источников углерода на клеточной мембране должны сформироваться транспортные симпорт-системы, что требует определённого времени, которое может достигать нескольких суток [6].

Понимание путей метаболизма углерода у цианобактерий имеет важнейшее прикладное значение, например, при разработке технологий использования щелочных водоёмов, при алголизации почв, при очистке сточных вод, а также при культивировании цианобактерий в промышленных масштабах (спиролина, носток и др.). При интенсивном культивировании спиролины (*Arthrospira platensis*) одним из ключевых факторов, определяющих форму кривой роста, является углеродное обеспечение. При оптимальных световых и температурных условиях скорость роста будет определяться концентрацией биогенных элементов в питательной среде. Обычно при выращивании спиролины используется питательная среда Заррук [7], основным элементом которой является гидрокарбонат натрия. Способность клеток *A. platensis* выдерживать высокие величины pH позволяет культивировать спиролину без дополнительной подачи CO_2 , что значительно упрощает лабораторные исследования и удешевляет промышленное культивирование данного объекта. Без дополнительной подачи CO_2

в культуру единственным источником углерода является гидрокарбонат-ионы. Известно, что из-за высокого начального содержания пищевой соды в питательной среде именно поглощение гидрокарбонат-ионов клетками определяет динамику pH в накопительной культуре. При высоких значениях pH среды (>11) углерод представлен в растворе только карбонат-ионами [8].

Целью данной работы являлся анализ и обобщение литературных данных о путях метаболизма неорганического углерода в культурах цианопрокариот.

Ключевой фермент, обеспечивающий связывание неорганического углерода с последующим образованием фосфолированных сахаров, является рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РБФК). РБФК локализована в строме хлоропластов у микроводорослей или в карбоксисомах цианобактерий. Количество данного белка может составлять до половины всех белков клетки [4]. В планетарном масштабе РБФК обеспечивает практически всю первичную продукцию [9]. РБФК катализирует присоединение CO_2 к первичному акцептору углерода в цикле Кальвина рибулозо-1,5-бисфосфату, при этом образуется две C_3 молекулы фосfogлицериновой кислоты (ФГК). Также фермент катализирует оксигенацию рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием одной C_3 ФГК и C_2 молекулы гликолата, который преобразуется в цепи метаболических реакций фотодыхания при участии АТФ до ФГК. В некоторых случаях происходит экскреция гликолата, что приводит к значительным энергетическим потерям и снижению скорости и эффективности фиксации углерода [10]. Карбоксилазная и оксигеназная активность РБФК определяются соотношением концентраций углекислоты и кислорода в окрестностях реакционного центра фермента. Поэтому адаптация клеток микроводорослей к недостатку CO_2 может проявляться в увеличении внутриклеточного количества CO_2 либо в увеличении количества активности самого РБФК [4].

На сегодняшний день достаточно подробно исследован CO_2 -концентрирующий механизм в клетках микроводорослей и цианобактерий, благодаря которому максимальные скорости фотосинтетического выделения кислорода при низких и высоких концентрациях CO_2 одинаковые [4]. Эффективность использования внутриклеточного углерода C_i повышается за счёт наличия внутриклеточного пула, в котором C_i представлено в форме гидрокарбонат-ионов, и снижения потерь CO_2 из-за диффузионных процессов. Существенную роль в ассимиляции углерода играет цинк-содержащий фермент карбоангидраза (КА), участвующий в различных стадиях работы CO_2 -концентрирующего механизма [4]. У цианобактерий внутриклеточная β -карбоангидраза ассоциирована с карбоксисомами [11]. В результате работы карбоангидразы на один поглощенный ион HCO_3^- образуется одна молекула CO_2 и один гидроксил-ион OH^- [12]. CO_2 используется в цикле Кальвина, а OH^- выносятся во внешнюю среду. В литературе приводятся описания CO_2 -концентрирующего механизма для разных видов микроводорослей. Большая часть исследований CO_2 -КМ выполнено на эукариотических клетках, у которых внутриклеточный пул C_i может находиться и в цитоплазме, и в строме хлоропласта [11]. Также описан CO_2 -КМ для цианопрокариот [12], у которых, согласно [13], в цитоплазме карбоангидраза не обнаружена. Многочисленные исследования хлоропластов показали присутствие КА как в мембранах, так и в строме. C_i из внутриклеточного пула поступает в карбоксисому, где за счёт работы КА в зоне активного центра РБФК преобразуется в CO_2 . При этом образуются гидроксил-ионы, избыток которых поступает в цитоплазму или удаляется за пределы клетки [4,12].

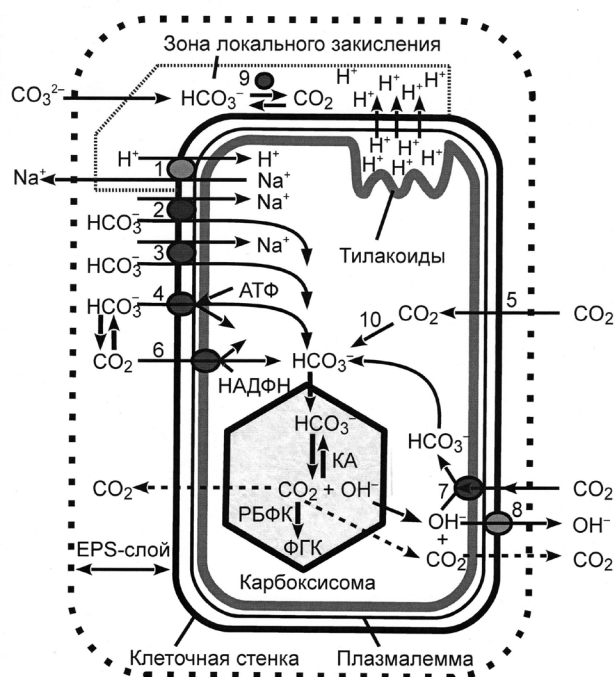


Рисунок 1. Схема поглощения и утилизации неорганического углерода клетками цианобактерий. Пояснения в тексте

Рассмотрим пример работы CO_2 -КМ у цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont. На рисунке 1.2 представлена схема ассимиляции неорганического углерода. Согласно современным представлениям [8] существует три основных переносчика, которые обеспечивают транспорт гидрокарбоната в клетку, причём активность переносчиков при разных концентрациях HCO_3^- в среде различная. При высоких концентрациях HCO_3^- работает переносчик BicA, который характеризуется низким сродством к гидрокарбонат-иону. Этот переносчик не требует затрат энергии, осуществляет, по сути, облегчённый транспорт (или симпорт с Na^+). Также низкое сродство препятствует избыточному поступлению гидрокарбонатов в клетку. Избыток натрия удаляется из клетки посредством специального канала (антипорт с H^+), который играет важную роль в регуляции внутриклеточного pH и транспорта многих ионов [4].

При снижении потока углерода в клетку включается дополнительный канал SbtA, который характеризуется большим сродством к HCO_3^- . SbtA, также как BicA, осуществляет облегчённый транспорт при участии катиона Na^+ без затрат энергии АТФ. В условиях недостатка углерода для реализации максимально возможного потока включается активный транспорт за счёт энергии АТФ посредством работы переносчика ВСТ1, который характеризуется высоким сродством к HCO_3^- . Отметим, что на начальных этапах накопительного культивирования величина pH стандартной питательной среды Заррук около 8,5 единиц. Следовательно, доля неорганического углерода в форме CO_2 составляет около 20 % от суммарного углерода в среде [11]. Поэтому поток углерода в клетку может быть представлен не только ионами HCO_3^- , но и углекислым газом. Молекулы CO_2 проникают в клетку либо за счёт диффузии, либо за счёт облегчённого транспорта с участием переносчиков NDH-13 и NDH-14 [13].

В современной литературе вопросам ассимиляции углерода клетками цианопрокариот уделено достаточно большое внимание. Однако практически нет упоминаний об ассимиляции карбонат-ионов. Хотя, в некоторых работах показано [11], что в качестве источника углерода для спироулины могут использоваться ионы CO_3^{2-} . Возможно, карбонат-ион при участии экстрацеллюлярной КА, находящейся в слое экзополисахаридов [4] в локальных зонах закисления [12], преобразуется в гидрокарбонат-ион и CO_2 , которые, согласно вышеуказанному механизму, поступают в клетку. Отметим, что ключевую роль в поддержании низких значений pH в зоне локального закисления играет транспорт протонов из полости тилакоидов.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

- Егоров В.Н., Поповичев В.Н., Гулин С.Б. и др. Влияние первичной продукции фитопланктона на оборот биогенных элементов в прибрежной акватории Севастополя (Чёрное море). *Биология моря*, 2018, т. 44, № 3, с. 207-214. [Egorov V.N., Popovichev V.N., Gulin S.B. et al. The influence of primary phytoplankton production on the turnover of biogenic elements in the coastal water area of Sevastopol (the Black Sea). *Marine biology*, 2018, vol. 44, no. 3, pp. 207-214. (In Russ.)]
- Железнова С.Н. Продукционные характеристики морской диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin в интенсивной культуре при различных источниках азота в питательной среде. *Морской биологический журнал*, 2019, т. 4, № 1, с. 33-44. [Zheleznova S.N. Production characteristics of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Rayman net Levin in intensive culture with various sources of nitrogen in the nutrient medium. *Marine biological journal*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 33-44. (In Russ.)] doi: 10.21072/mbj.2019.04.1.04
- Кожемяка А.Б. Зависимость концентрации органического вещества в клетке от её объёма для черноморских видов Bacillariophyta. *Морський екологічний журнал*, 2014, т. XIII, № 1, с. 35-43. [Kozhemyaka A.B. The dependence of the concentration of organic matter in the cell on its volume for the Black Sea species of Bacillariophyta. *Morsky ekologichny zhurnal*, 2014, vol. XIII, no. 1, pp. 35-43. (In Russ.)]
- Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль CO_2 -концентрирующего механизма. *Физиология растений*, 2000, т. 47, № 5, с. 801-810. [Pronina N.A. Organization and physiological role of the CO_2 -concentrating mechanism. *Plant physiology*, 2000, vol. 47, no. 5, pp. 801-810. (In Russ.)]
- Стуколова И.В., Тренкеншу Р.П. Основные типы питания водорослей (краткий глоссарий). *Вопросы современной альгологии*, 2020, № 1 (22), с. 34-38. [Stukolova I.V., Trenkenshu R.P. The main types of algae nutrition (a brief glossary). *Questions of modern algology*, 2020, no. 1 (22), pp. 34-38. (In Russ.)] doi: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-34-38
- Тренкеншу Р.П., Жондарева Я.Д. Кинетика симпорта органических форм биогенов у микроводорослей. *Морские биологические исследования: достижения и перспективы*. Севастополь: Экози-гидрофизика, 2018, т. 3, с. 452-455. [Trenkenshu R.P., Zhondareva Ya.D. Kinetics of import of organic forms of biogens from microalgae. *Marine biological research: achievements and prospects*. Sevastopol: Ekosi-hydrophysics, 2018, vol. 3, pp. 452-455. (In Russ.)]
- Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. Paris: Ph.D. thesis, 1966, 138 p.
- Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. Advances in understanding the cyanobacterial CO_2 -concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J. Exp. Bot.*, 2008, vol. 59, no. 7, pp. 1441-1461. doi: 10.1093/jxb/erm112
- Losh J.L., Young J.N., Morel F.M. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytol*, 2013, vol. 198, pp. 52-58.

10. Raven J.A., Beardall J. Dark respiration and organic carbon loss / In: Borowitzka M.A., Beardall J., Raven J., Beardall J. *The physiology of microalgae*. Springer, 2016, pp. 129-140.
11. Самылина О.С. Углерод-концентрирующий механизм как компонент адаптации экстремально натронофильной цианобактерии *Eubhalothece natronophila* к существованию в содовых озёрах: *автореф. дис. канд. биол. наук*. М., 2008, 24 с. [Samylina O.S. Carbon-concentrating mechanism as a component of adaptation of the extremely natronophilic cyanobacterium *Eubhalothece natronophila* to existence in soda lakes: *abstract of the dissertation of the candidate. biol. nauk*. М., 2008, 24 p. (In Russ.)]
12. Janson Ch., Northen T. Calcifying cyanobacteria – the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Op. Biotech*, 2010, vol. 21, pp. 365-371.
13. Price G.D. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynth. Res*, 2011, vol. 109, pp. 47-57. doi: 10.1007/s11120-010-9608-y

PATHWAYS OF INORGANIC CARBON METABOLISM IN CYANOBACTERIA

Gevorgiz R.G, Lelekov A.S.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Abstract. The paper considers the mechanisms of assimilation, fixation and utilization of inorganic forms of carbon by cyanobacteria cells. Carbon sources are carbon dioxide, which, depending on the pH value, can be in the form of CO₂, bicarbonate ions HCO₃⁻ or carbonate ions CO₃²⁻. Carbon dioxide and bicarbonate ions are sources of inorganic carbon for microalgae. Therefore, it is the availability of carbon in one form or another that can act as a limiting factor for growth. To date, the CO₂-concentrating mechanism in the cells of microalgae and cyanobacteria has been studied in sufficient detail, due to which the maximum rates of photosynthetic oxygen release at low and high concentrations of CO₂ are the same. The efficiency of using intracellular carbon is increased due to the presence of an intracellular pool in which carbon is represented in the form of bicarbonate ions, and the reduction of CO₂ losses due to diffusion processes. The literature describes the CO₂-concentrating mechanism for different types of microalgae. Most of the studies of CO₂-CM were performed on eukaryotic cells, in which the intracellular pool of carbon can be located both in the cytoplasm and in the stroma of the chloroplast. CO₂-CM is also described for cyanoprokaryotes, in which, according to, carbonic anhydrase is not detected in the cytoplasm. On the basis of modern concepts of CO₂-CM for *A. platensis*, a generalized scheme is proposed that describes the main pathways of inorganic carbon metabolism.

Key words: *spirulina, carbon dioxide, bicarbonate ion, carbonate ion, assimilation, carbon-concentrating mechanism*

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ТРАНСГЕННЫХ БАКТЕРИЙ (ГМО) В МОДЕЛЬНЫХ И ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Брильков А.В.¹, Логинов Ю.Ю.^{1,2}, Брилькова Е.В.^{1,3}, Ганусов В.В.^{2*}, Жабрун И.В.⁴, Шуваев А.Н.⁵

¹ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

² Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф. Решетнева

пр. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ; e-mail: loginov@sibsau.ru

^{2*} Present address: University of Tennessee

Knoxville, TN 37996-1937, USA; e-mail: vitality.ganusov@gmail.com

³ Институт биофизики ФИЦ СО РАН

Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: evmorbril@mail.ru

⁴ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: ijabrun@sfu-kras.ru

⁵ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: ashuvaev@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2021

Аннотация. В работе проанализирована экспериментальная эволюция трансгенных микроорганизмов (ГМО) в условиях ограничения их роста по энергетическим субстратам. Эти условия характерны для развития ГМО в природе. Наиболее адекватной экологической моделью природных условий является непрерывное культивирование в хемостате. Показано, что стоимость поддержания ГМО резко возрастает при низких скоростях размножения трансгенных бактерий. Это связано с повышением эффективности экспрессии клонированных генов при ограничении роста ГМО. В экспериментах обнаружено возрастание эффективности экспрессии генов биолюминесценции морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi*, клонированных в *Escherichia coli* Z905, при низких скоростях размножения при непрерывном культивировании.

Ключевые слова: трансгенные микроорганизмы, экспериментальная эволюция, стоимость приспособленности, математическое моделирование, непрерывное культивирование.

ВВЕДЕНИЕ

Причины широкого распространения трансгенных микроорганизмов в природных экосистемах не совсем понятны [1-3]. Экспериментальные исследования указывают на то, что трансгенные плазмидосодержащие микроорганизмы имеют, как правило, меньшую удельную скорость роста, чем их бесплазмидные варианты [3,4]. Это может быть прямое влияние экспрессии плазмидных генов на жизнеспособность плазмидосодержащих клеток или же расходование клеточных ресурсов на поддержание плазмид. Почему трансгенные микроорганизмы теряют плазмиды при культивировании и не теряют их в природе, остается загадкой (плазмидный парадокс) [1-4]. В настоящей работе предложена математическая модель влияния различной эффективности экспрессии клонированных генов на селективное преимущество трансгенных бактерий. Анализ математической модели позволяет оценить популяционную «стоимость» поддержания плазмид трансгенных микроорганизмов при периодическом культивировании и при лимитировании роста в хемостате. Стоимость плазмид, содержащих активно функционирующие клонированные гены, определяет вероятность распространения генетически модифицированных организмов в природных экосистемах.

Математическая модель. Эффективность экспрессии клонированных генов в клетке, как и сама удельная скорость роста популяции бактерий, определяется уровнем активности метаболических систем [3]. Ответ на этот вопрос непосредственно связан с локализацией “узкого места” метаболизма клеток, которое для клеток различных микроорганизмов в природных условиях известно далеко не всегда. Для трансгенных бактерий *E. coli* при лимитировании роста источником углерода и энергии в хемостате, можно полагать, что “узкое место” метаболизма определяется потребностью клеток в энергии [5,6].

Пусть в клетках трансгенных плазмидосодержащих бактерий *E. coli* находится i копий плазмиды и, следовательно, i копий клонированного гена. Вероятность присоединения *RNA*-полимеразы к промотору клонированного гена на определенной плазмиде пропорциональна внутриклеточной концентрации регулятора A (комплекс *cAMP-CAP*), связанного с промотором, или $p \sim A/i$. Полагая, что после присоединения *RNA*-полимеразы к промотору происходит образование полноценного транскрипта клонированного гена, находим, что эффективность экспрессии пропорциональна вероятности считывания p , что в общем случае описывается зависимостью Михаэлиса-Ментен:

$$\varepsilon_i = \frac{\varepsilon_m \left(\frac{A}{i} \right)}{K_A + \left(\frac{A}{i} \right)}. \quad (1)$$

Тогда уровень экспрессии клетки с i копиями плазмиды находится из выражения:

$$\varepsilon = i\varepsilon_i = \frac{\varepsilon_m A}{i \cdot K_A + A} \cdot i. \quad (2)$$

Концентрация регулятора A (комплекс $cAMP$ - CAP) зависит от концентрации ATP в клетках бактерий. Поскольку концентрации $cAMP$ и ATP в клетках бактерий связаны:



концентрация $cAMP$ зависит от концентрации энергетического субстрата в клетках следующим образом:

$$[cAMP] \approx \frac{A_m}{S^n}, \quad (4)$$

где A_m – константа, связанная со стехиометрией процесса (3), и n – число связывающих центров аденилатциклазы.

Отсюда следует, что эффективность экспрессии генов, клонированных под контролем lac -промотора, является функцией концентрации энергетического субстрата и количества плазмид в клетках бактерий:

$$\varepsilon(i, S) = i\varepsilon_i \approx \frac{\varepsilon_m \cdot i}{1 + i \cdot S^n / K_1} = \frac{\varepsilon_{\max}}{1 + \alpha \sigma^n}, \quad (5)$$

где $\alpha = \frac{K_S^n}{A_m} K_A \cdot i$, $\sigma = S / K_S$ – безразмерная концентрация субстрата, $\varepsilon_{\max} = \varepsilon_m i$ – уровень экспрессии клонированных генов.

Влияние экспрессии клонированных генов увеличивает траты на поддержание, трансгенных бактерий [6]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - \varepsilon(i, S). \quad (6)$$

Подставляя явный вид экспрессии клонированных генов (5) в выражение (6) получаем зависимость удельной скорости роста популяции трансгенных бактерий от количества копий плазмиды i и концентрации субстрата в среде σ (рис. 1):

$$\mu(\sigma) = \mu_{\max} \frac{\alpha \sigma^{n+1} + (1 - \beta)\sigma - \beta}{(1 + \sigma)(1 + \alpha \sigma^n)}, \quad (7)$$

где $\beta = \varepsilon_{\max} / \mu_{\max}$, $\sigma = S / K_S$, – концентрация субстрата в среде в единицах K_S .

Таким образом, для трансгенных бактерий, содержащих клонированные гены в составе плазмид, существуют критические концентрации субстрата $\sigma_{кр}$, отличные от нуля, при которых рост бактерий прекращается и селективное преимущество бесплазмидных клеток σ_0 максимально. Для простейшего случая $n = 1$ эта концентрация субстрата находится из выражения:

$$\sigma_0 = \frac{1 - \beta}{2\alpha} \left(\sqrt{1 + \frac{4\alpha\beta}{(1 - \beta)^2}} - 1 \right). \quad (8)$$

Расчеты по формуле (7) показывают, что даже при постоянных тратах на поддержание клонированных генов селективное преимущество бесплазмидных клеток возрастает при низких скоростях размножения трансгенных бактерий (рис. 1).

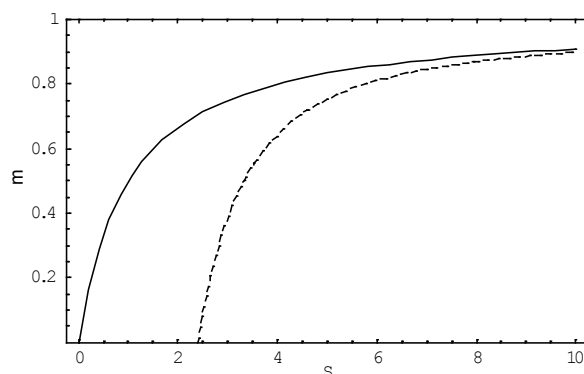


Рисунок 1. Теоретическая зависимость удельной скорости роста популяции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r Lux $^+$) μ от концентрации энергетического субстрата (рассчитано по формуле (7)). $n = 3$, $\mu_{\max} = 1$. Непрерывная кривая - $\alpha = 10$ и $\beta = 0$ (бесплазмидный вариант бактерий), штрихованная - $\alpha = 2$ и $\beta = 20$ (плазмидсодержащие трансгенные бактерии)

ЭКСПЕРИМЕНТЫ В НЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЕ

В наших экспериментах проводилось изучение экспериментальной эволюции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z905, содержащих клонированные гены биолюминесценции морских фотобактерий *Photobacterium leiognathi*, при длительном непрерывном культивировании бактерий в хемостате (рис. 2). Скорость размножения клеток популяции бактерий зависит от типа источника углерода и энергии (глюкоза, глицерин) и температуры среды. Удельная скорость разбавления среды в хемостате поддерживалась постоянной $D=0,22 \text{ час}^{-1}$, температура среды $T=30^\circ \text{C}$. Плотность популяции трансгенных бактерий на протяжении всего эксперимента составляла $X=0,33 \pm 0,03 \text{ г/л}$ по сухому весу. Гены биолюминесценции были клонированы на плазмиде pPHL-7 (Ap^r , Lux $^+$) с помощью вектора pUC-18 под контролем *lac*-промотора [10]. Интенсивность биолюминесценции трансгенных бактерий прямо пропорциональна концентрации люциферазы в клетках [10-12] и, таким образом, непосредственно характеризует уровень экспрессии клонированных генов.

Результаты экспериментов при непрерывном культивировании *Escherichia coli* Z 905 (pPHL-7), (Ap^r , Lux $^+$) при различных температурах среды представлены на рис. 3. При снижении температуры культивирования с 37°C до 15°C уменьшается удельная скорость роста популяции, но при этом уровень удельного свечения клеток возрастает и достигает максимального значения при 15°C . Известно, что оптимальная температура роста для клеток бактерий *E. coli* составляет 37°C [5-8], в то же время, для морских фотобактерий *P. leiognathi*, из которых получены клонированные гены биолюминесценции, оптимальные температуры роста и свечения совпадают 26°C [10-12]. Возрастание экспрессии клонированных генов биолюминесценции при низких скоростях размножения у трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 (pPHL-7), (Ap^r , Lux $^+$) при низких температурах среды приводит к повышению популяционной стоимости плазмид («cost of plasmid», рис. 1, 3, 4).

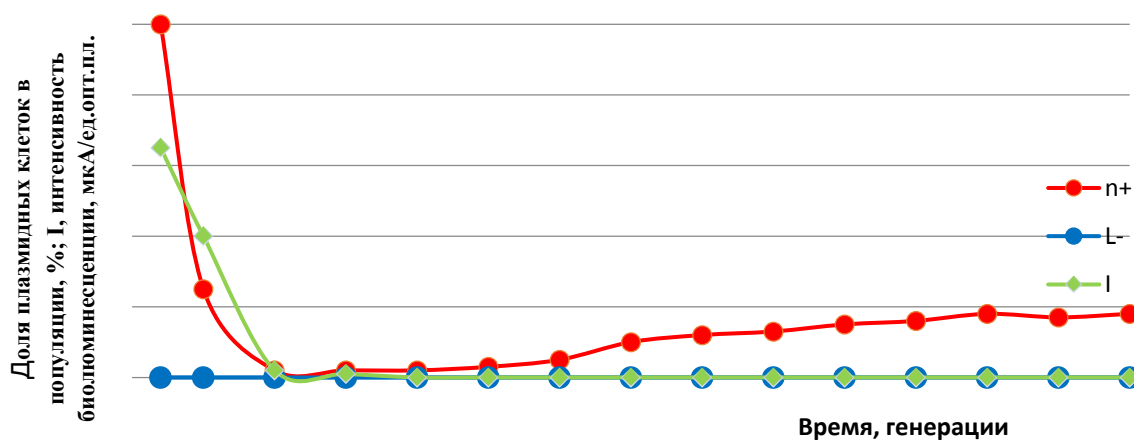


Рисунок 2. Экспериментальная эволюция популяции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r Lux $^+$) при длительном непрерывном культивировании в хемостате с лимитированием роста бактерий по глицерину в селективных условиях (50 мкг/мл ампициллина Ap в среде). Обозначения: n^+ – доля плазмидсодержащих клеток в популяции, выражающих фенотип (Ap^r , Lux $^+$); L^- – доля плазмидсодержащих клеток в популяции, выражающих фенотип (Ap^r , Lux $^-$); I – удельная интенсивность биолюминесценции трансгенных бактерий, мкА/ед. опт. пл.; 48 генераций – момент времени, когда была отключена подача ампициллина в среду для культивирования

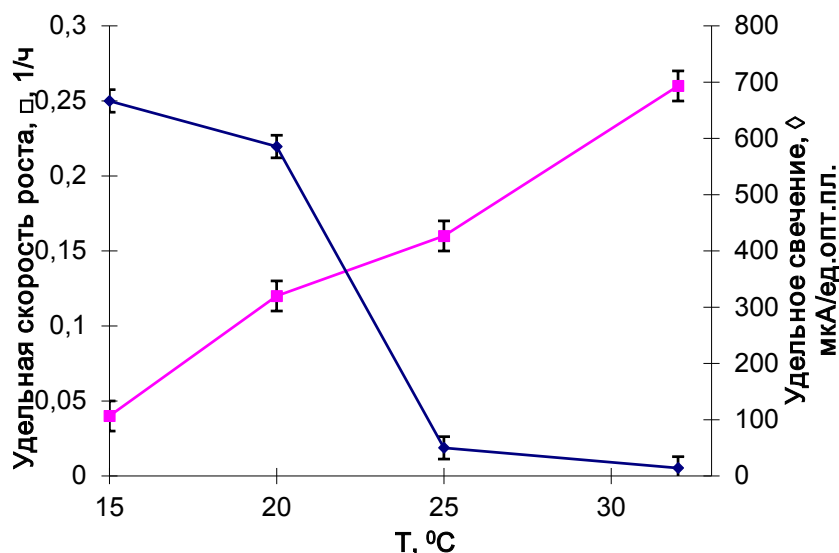


Рисунок 3. Зависимость удельной скорости роста популяции и удельной интенсивности биолуминесценции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r , Lux^+) от температуры среды с глицерином. Обозначения: $\square$ – удельная скорость роста популяции, час $^{-1}$; $\diamond$ – удельная интенсивность биолуминесценции, мкА/ед. опт. пл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что непрерывное культивирование микроорганизмов в хемостате является наиболее адекватной моделью природных условий с лимитированием роста недостатком субстратов, прежде всего, энергетических. Однако существует ряд экспериментальных данных, которые не учитываются в математической модели хемостата [5-8]. Выше предложена математическая модель, описывающая влияние экспрессии клонированных на плазидах генов на селективное преимущество бесплазмидных клеток при низких скоростях размножения бактерий (рис. 1). Таким образом, показано, что селективное преимущество бесплазмидных бактерий должно возрастать при низких скоростях размножения бактерий (формула (7), рис. 1).

С другой стороны, эффективность экспрессии клонированных генов у трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 (pPHL-7), (Ap^r , Lux^+) снижается при длительном культивировании в хемостате в процессе экспериментальной эволюции (рис. 2). Таким образом, в процессе приспособления к условиям окружающей среды селективное преимущество бесплазмидных бактерий, или «стоимость» поддержания плазмид в клетках бактерий, снижается, что приводит к выживанию и сохранению трансгенных бактерий в природных условиях (так называемый «плазмидный парадокс» [1-4,15,16]).

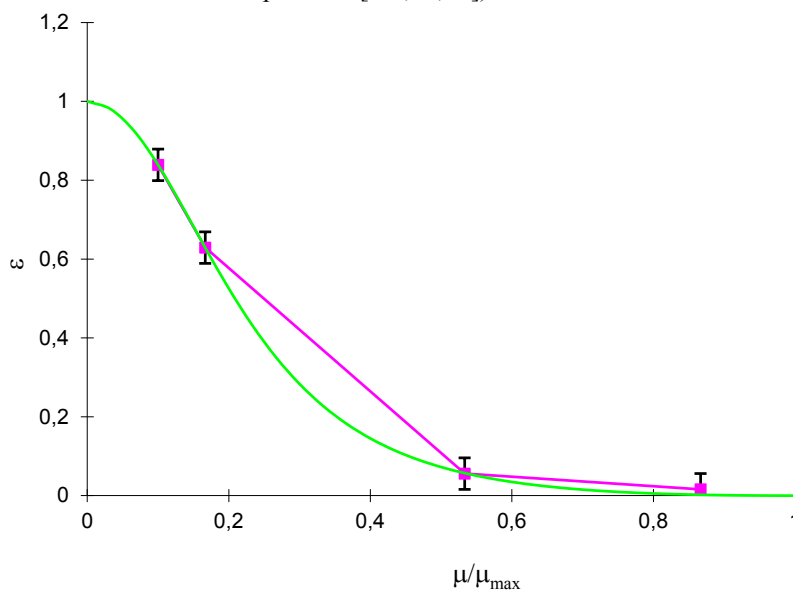


Рисунок 4. Снижение эффективности экспрессии клонированных генов биолуминесценции при оптимальной удельной скорости роста популяции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r , Lux^+) при непрерывном культивировании на среде с глицерином как источником углерода и энергии. Обозначения: непрерывная линия – теоретическая кривая, рассчитанная по формуле (5)

В наших экспериментах было показано, что эффективность экспрессии клонированных генов биолюминесценции морских фотобактерий в *E. coli* Z 905 (Ap^r, Lux⁺) зависит не только от типа источника углерода и энергии, но и от температуры культивирования, задающей определенное физиологическое состояние клетки (рис. 3, 4). При низких температурах культивирования (15-20° С), далеких как от оптимальных для люминесцентной системы морских фотобактерий *P. leiognathi* (26° С), так и для роста *E. coli* (37° С), обнаружено возрастание эффективности экспрессии клонированных генов биолюминесценции фотобактерий (рис. 3). Причем, чем меньше удельная скорость роста популяции, тем выше уровень экспрессии клонированных на плазидах генов биолюминесценции. Таким образом, интенсивность экспрессии генов биолюминесценции отличается от аналогичной у исходных природных клеток-хозяев (морских светящихся бактерий *P. leiognathi*), и у новых трансгенных бактерий *E. coli* Z 905 (Ap^r, Lux⁺), которые получили их. Повышение эффективности экспрессии клонированных генов может привести к резкому возрастанию селективного преимущества бесплазмидных вариантов при низких скоростях роста трансгенных бактерий [2,3], что необходимо учитывать при использовании трансгенных бактерий, например, в процессах биоремедиации (биоаугментации).

Селективное преимущество бесплазмидных клеток по сравнению с плазмидсодержащими трансгенными бактериями («давление отбора», [8]) оценивается по разнице скоростей размножения трансгенной и бесплазмидной популяций [8,13] (рис. 1). Часто используемый близкий по смыслу параметр «стоимость приспособленности» («fitness cost») отличается от общепринятого определения селективного преимущества [1,2,4,15,16]. Стоимость приспособленности («fitness cost») определяется по динамике численностей этих популяций в конкурентных экспериментах при последовательных пересевах («transfer experiments») в смешанной культуре плазмидных и бесплазмидных клеток бактерий. Очевидно, что влияние экспрессии клонированных генов на скорость размножения бактерий необходимо учитывать в процессе оценки популяционной «стоимости» и динамики приспособленности трансгенных бактерий к условиям среды.

Список литературы / References

1. MacLean R.C., Millan A.S. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current biology*, 2015, vol. 25, no. 17, pp. R764-R767.
2. Wein T., Hultner N.F., Mizrahi I., Dagan T. Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. *Nature com*, 2019, vol. 10, p. 2595.
3. Брильков А.В., Логинов Ю.Ю., Брилькова Е.В., Ганусов В.В., Шуваев А.Н. ГМО: Экспериментальная эволюция и проблемы безопасности. Красноярск: Изд-во Сибирского федерального университета, 2021, 224 с. [Bril'kov A.V., Loginov Yu.Yu., Brilkova E.V., Ganusov V.V., Shuvaev A.N. GMOs: *Experimental Evolution and Safety Issues*. Krasnoyarsk: Publishing house of the Siberian Federal University, 2021, 224 p. (In Russ.)]
4. Carroll A.C., Wong A. Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can. J. Microbiol.*, 2018, vol. 64, pp. 293-304.
5. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 1949, vol. 3, pp. 371-394.
6. Pirt S.J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Oxford: Blackwell Sci. publ., 1975, 274 p.
7. Novick A., Szilard L. Description of the chemostat. *Science*, 1950, vol. 112, pp. 715-718.
8. Moser H. *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat*. Carnegie institution of Washington, 1958, 136 p.
9. Gitelzon I.I., Pechurkin N.S., Bril'kov A.V. *Population Problems in the Biology of Unicellular Organisms*. London: Harwood Academic Publ. GmbH (United Kingdom), 1989, 77 p.
10. Illarionov B.A., Blinov V.M., Donchenko A.P. et al. Isolation of Bioluminescent Functions From *Photobacterium leiognathi*: Analysis of luxA, luxB, luxG and Neighboring Genes. *Gene*, 1990, vol. 86, pp. 89-94.
11. Zavilgelsky G.B., Shakulov R.S. Mechanisms and Origin of Bacterial Bioluminescence. *Mol. biol.*, 2018, vol. 52., no. 6, pp. 935-947.
12. Тюлькова Н.А., Сандалова Т.П. Сравнительное исследование влияния температуры на бактериальные люциферазы. *Биохимия*, 1996, т. 61, вып. 2, с. 275-287. [Tyulkova N.A., Sandalova T.P. Comparative study of the effect of temperature on bacterial luciferases. *Biochemistry*, 1996, vol. 61, no. 2, pp. 275-287. (In Russ.)]
13. Levin B.R., Stewart F.M. The population biology of bacterial plasmids: A priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*, 1977, vol. 87, no. 10, pp. 209-228.
14. Jones I.M., Primrose S.B., Robinson A., Ellwood D.C. Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture. *Mol. Gen. Genet.*, 1980, vol. 180, pp. 579-584.
15. Lenski R.E. Evaluating the fate of genetically modified microorganisms in the environment: are they inherently less fit? *Experientia*, 1993, vol. 49, pp. 201-209.
16. Cooper T.F., Rozen D.E., Lenski R.E. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Echerichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 3, pp. 1072-1077.

MATHEMATICAL MODELLING OF TRANSGENIC BACTERIA EXPERIMENTAL EVOLUTION (GMO)
IN MODEL AND NATURAL ECOSYSTEMSBrilkov A.V.¹, Loginov Yu.Yu.^{1,2}, Brilkova E.V.^{1,3}, Ganusov V.V.^{2*}, Jabrun I.V.⁴, Shuvaev A.N.⁵¹ Siberian Federal University*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru*² Reshetnev Siberian State University of Science and Technology*Krasnoyarskii rabochii pr., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia; e-mail: loginov@sibsau.ru*³ Institute of biophysics FRC SB RAS*Akademgorodok, 50 building 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru*^{2*} Present address: University of Tennessee*Knoxville, TN 37996-1937, USA; e-mail: vitya.ganusov@gmail.com*⁴ Siberian Federal University*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: ijabrun@sfu-kras.ru*⁵ Siberian Federal University*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: ashuvaev@sfu-kras.ru*

Abstract. The paper analyzes the experimental evolution of transgenic microorganisms (GMOs) under conditions of limiting their growth by energy substrates. These conditions are typical for the development of GMOs in nature. The most adequate ecological model of natural conditions is a continuous cultivation in the chemostat. It has been shown that the cost of maintaining GMOs sharply increases at low rates of reproduction of transgenic bacteria. This is due to an increase in the efficiency of expression of cloned genes while limiting the growth of GMOs. Experiments revealed an increase in the efficiency of expression of bioluminescence genes of marine luminescent bacteria *Photobacterium leiognathi*, cloned in *Escherichia coli* Z905, at low growth rates during continuous cultivation.

Key words: transgenic microorganisms, experimental evolution, fitness cost, mathematical modeling, continuous culture.

ЭЛЕКТРОТРАНСПОРТНЫЕ СВОЙСТВА ОДНОСЛОЙНОГО ГЕРМАНЕНА В КВАЗИКЛАССИЧЕСКОМ ПРИБЛИЖЕНИИ

Судоргин С.А.

Волгоградский государственный аграрный университет
пр. Университетский, д. 26, г. Волгоград, 400002, РФ; e-mail: sergsud@mail.ru
Поступила в редакцию: 23.07.2021

Аннотация. В работе выполнено исследование электротранспортных характеристик однослойного германена во внешнем постоянном электрическом поле. Малая запрещенная щель германена поддается управлению электрическим полем, адсорбцией различных атомов, деформацией и взаимодействием с подложкой. Используя метод квазиклассического приближения получено аналитическое соотношение для удельной проводимости однослойного германена. Эволюция электронной системы германеновых листов описывалась с помощью кинетического уравнения Больцмана в рамках квазиклассического приближения времени релаксации. В качестве геометрической модели германеновой наноленты выбирался двумерный гексагональный слой. Математическая модель электронного строения недеформированных германеновых нанолент строится на основе их геометрического строения и зонной структуры гексагонального слоя. Используется зонная структура нанолент в рамках метода сильной связи в приближениях Хюккеля и ближайших соседей. Исследованы зависимости удельной проводимости германеновых слоев различной хиральности от величины напряженности внешнего электрического поля.

Ключевые слова: германен, электронный транспорт, электропроводность, наноструктуры, квазиклассическое приближение.

Современная физика и материаловедение в настоящее время активно занимаются синтезом и исследованием новых наноматериалов на основе углерода (графен, графеновые наноленты), обладающих уникальными электрофизическими, транспортными, оптоэлектронными, механическими свойствами, что может расширить спектр их практического использования [1,2].

Электрофизические свойства однослойных углеродных нанолент меняются в зависимости от природы и концентрации примесей, приложенных внешних электрических и магнитных полей, механических воздействий, деформаций различного типа (сдвига, растяжения, сжатия, изгиба и кручения и т.д.) До недавнего времени графен являлся одним из основных кандидатов для элементов наноэлектроники будущего. Вместо кремния он может быть использован в качестве основы для транзисторов, кантилевера для атомно-силового микроскопа, химических сенсоров и др.

Но графеновые структуры в плане практического применения не лишены ряда недостатков, например, практически полного отсутствия запрещенной энергетической зоны, что не дает возможности закрытия канала полевого транзистора на его основе [3]. Одним из приоритетных решений этой проблемы является поиск новых неуглеродных эффективных квазидвумерных материалов, имеющих структуру, аналогичную графену, но при этом обладающих запрещенной энергетической зоной.

Германен является новым материалом, состоящим из одного слоя атомов германия. Двумерная кристаллическая структура германена аналогична графену [4]. Теоретическая возможность существования германеновой структуры обсуждалась с середины 1990-х годов [5], и её устойчивость была предсказана в работе 2009 года [6], согласно которой германен представляет собой изогнутые слои. В 2013 г. путем компьютерного моделирования материалов со свойствами, подобными графену и со схожей двумерной структурой были выявлены 92 таких претендента [7]. Более сорока из них ранее никогда не предлагались в качестве графенового аналога, и их свойства, в том числе и проводящие, остаются малоизученной областью. Несмотря на такое обилие кандидатов, перспективных с точки зрения основы наноэлектронных устройств, их использование сильно ограничивает возможность синтеза и взаимодействия с подложкой. Поэтому актуальной задачей первого этапа работы будет поиск среди наноматериалов «семейства графена», реально синтезированных, и изучение их электротранспортных свойств. Также было показано, что носители заряда в германене описываются уравнением Дирака для безмассовых фермионов: закон дисперсии вблизи дираковских точек линейен и ширина запрещенной зоны равна нулю. С точки зрения электропроводности германен является полуметаллом.

Запрещенная энергетическая зона германена и его электронные свойства чувствительны к внешним полям, механическим деформациям и химической адсорбции. [8]. Запрещенная щель в германене составляет приблизительно 24 мэВ. Данное значение существенно превосходит аналогичные для графена (приблизительно 0.05 мэВ), что делает германеновые структуры идеальным кандидатом для изучения квантовых эффектов при технически достижимых температурах. Возрастание ширины запрещенной энергетической зоны создает возможности использования германена в устройствах, работа которых основана на полевых эффектах, таких как транзисторы. Этого можно добиться как приложением внешних воздействий [9], так и целенаправленным допированием наноматериала акцепторными и донорными примесями различных концентраций.

Экспериментально германен впервые получен в 2014 году двумя двумя независимо работавшими научными

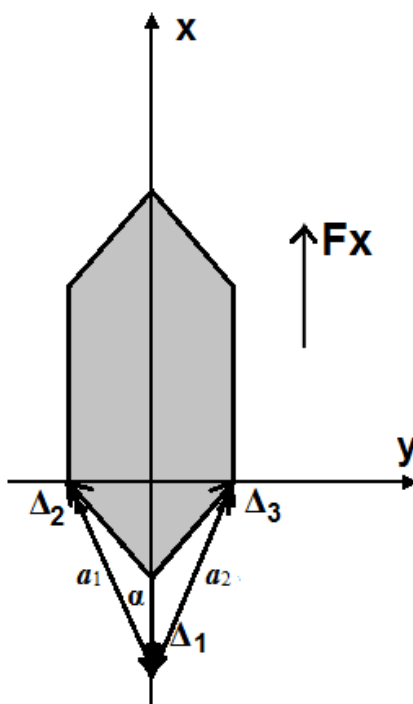


Рисунок 1. Фрагмент структуры германеновой наноленты, с выбранной системой координат, Δ_1 , Δ_2 , Δ_3 – вектора расстояний между ближайшими атомами, a_1 , a_2 – вектора основных трансляций, α – угол между векторами трансляций

группами: европейской и китайской. Процесс его получения схож с процессом получением силицена и графена: для осаждения слоя германия на инертную подложку-основу используется глубокий вакуум и высокая температура. Европейская группа в качестве подложки использовала золото, а китайская – платину.

Выполнено исследование электротранспортных характеристик однослойного германена во внешнем постоянном электрическом поле. Малая запрещенная щель германена поддается управлению электрическим полем, адсорбцией различных атомов, деформацией и взаимодействием с подложкой [3]. Германен обладает большими потенциальными возможностями применения в солнечных элементах.

В качестве геометрической модели германеновой наноленты выбирался двумерный гексагональный слой. Фрагмент кристаллической структуры изображен на рисунке 1, на котором обозначены угол α между векторами основных трансляций a_1 и a_2 и вектора межатомных расстояний Δ_i , $a_1 = a_2 = a$ – постоянная решетки деформированной германеновой наноленты. Система координат выбрана таким образом, что вдоль оси ОХ отмеряется длина ленты, а ось ОУ направлена вдоль ширины ленты.

Математическая модель электронного строения недеформированных германеновых нанолент строится на основе их геометрического строения и зонной структуры гексагонального слоя. Используется зонная структура нанолент в рамках метода сильной связи в приближениях Хюккеля и ближайших соседей [7]:

$$\begin{aligned} \varepsilon(\mathbf{k}) &= \pm \gamma_0 \left\{ 3 + 2\cos(\mathbf{k}a_1) + 2\cos(\mathbf{k}a_2) + 2\cos(\mathbf{k}(a_1 - a_2)) \right\}^{1/2} = \\ &= \pm \gamma_0 \left\{ 1 + 4\cos\left(\frac{\mathbf{k}(a_1 + a_2)}{2}\right) \cos\left(\frac{\mathbf{k}(a_1 - a_2)}{2}\right) + 4\cos^2\left(\frac{\mathbf{k}(a_1 - a_2)}{2}\right) \right\}^{1/2} \end{aligned} \quad (1)$$

где γ_0 – прыжковый интеграл, матричный элемент перехода электрона между соседними атомами, $\mathbf{k}$ – волновой вектор, одна из компонент которого квантуется вдоль ширины ленты. Уровень Ферми в законе дисперсии (1) принимается равным 0 эВ.

Если длину германеновой наноленты выбрать вдоль направления вектора $(a_1 + a_2)$, то получится энергетический спектр наноленты типа «arm-chair», а если вдоль вектора $(a_1 - a_2)$, то спектр наноленты типа «zig-zag».

Условие квантования волнового вектора $\mathbf{k}$ в направлении, поперечном длине германеновой наноленты, можно записать следующим образом [9]:

$$3k_x R_0 = \frac{2\pi q}{N_x}, \quad q=1,2,\dots,N_x, \quad (2)$$

для германеновых нанолент кресельного («arm-chair») типа,

$$\sqrt{3}k_y R_0 = \frac{2\pi q}{N_y}, \quad q=1,2,\dots,N_y \quad (3)$$

для нанолент зигзагообразного («zig-zag») типа. Где R_0 – равновесное межатомное расстояние в

недеформированной GeNR, волновые числа k_x и $k_y \in$ зоне Бриллюэна.

В результате выражение (1) и соотношения (2), (3) полностью определяют энергетический спектр электронов недеформированных германеновых нанолент.

Для моделирования электротранспортных свойств однослойных германеновых нанолент используется кинетическое уравнение Больцмана. В рамках квазиклассического приближения функция распределения электронов $f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ находится из кинетического уравнения Больцмана. Интеграл столкновений выбираем в виде, используемом в τ -приближении. Можно считать, что время релаксации $\tau = const$, т.к. экспериментально установлено, что в наноструктурах уже при температурах порядка 40 К время релаксации постоянно и не зависит от температуры.

Запишем кинетическое уравнение Больцмана в τ -приближении в виде [10]

$$\frac{\partial f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\partial t} + \mathbf{F} \frac{\partial f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\partial \mathbf{p}} = \frac{f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r}) - f_{0s}(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\tau}, \quad (4)$$

Постоянная сила $\mathbf{F}$, действующая на частицу, может быть выражена с помощью закона динамики:

$$\mathbf{F} = \frac{d\mathbf{p}}{dt} = e\mathbf{E}.$$

В рамках квазиклассического метода получено аналитическое соотношение для плотности тока:

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}) = e \sum_{\mathbf{p}, s} \mathbf{v}_s(\mathbf{p}) f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r}). \quad (5)$$

Так как в стационарном случае отсутствуют источники зарядов, т.е. $\text{div} \mathbf{j}(\mathbf{r}) = 0$, то в стационарном приближении решение уравнения (4) имеет вид

$$f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = \hat{L}_p^{-1} \left(\frac{f_{0s}(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\tau} \right). \quad (6)$$

Обратный оператор определяется следующим правилом

$$\hat{L}_{\pm p}^{-1} \psi(\mathbf{p}) = \int_0^\infty \psi(\mathbf{p} \mp \mathbf{p}(t)) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt, \quad (7)$$

где $\mathbf{p}(t)$ – решение уравнения движения $d\mathbf{p}/dt = \mathbf{F}$, с начальным условием $\mathbf{p}(0) = 0$, $\mathbf{F}$ – действующая на частицу постоянная сила, в данном случае электростатическая $\mathbf{F} = e\mathbf{E}$.

Чтобы не нарушить условие нормировки и корректно осуществить итерационную процедуру отыскания функции распределения $f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ в виде ряда по степеням величины $\nabla_x n(\mathbf{r})$, в правую часть уравнения (4) добавляем равное нулю слагаемое $f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) \text{div} \mathbf{j} / en$. Такой прием использовался в работах по исследованию неравновесных флуктуаций в электронном газе с синусоидальным и параболическим законом дисперсии [11]. После добавления слагаемого уравнение (3) запишется в виде

$$\hat{L}_p f_s = \frac{f_{0s}(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\tau} - \text{div}(f_s \mathbf{v}_s) + f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) \text{div} \mathbf{j} / en.$$

Получено аналитическое соотношение для продольной компоненту плотности тока $j = j_x$:

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}) = \sigma(\mathbf{E})\mathbf{E} + D(\mathbf{E}) \frac{\nabla_x n}{n} \quad (8)$$

Для случая однородного распределения температуры $T(r) = const$ в линейном приближении по величине градиента концентрации электронов $\nabla_x n$ можно получить выражения для транспортных коэффициентов однослойных германеновых нанолент: удельной электропроводности и коэффициента диффузии электронов.

Удельная электропроводность германеновых нанолент задается следующим аналитическим соотношением:

$$\sigma(E) = \sum_s \int_{-\pi}^{\pi} \sum_m A_{ms} m f_{0s}(p_x, x) \frac{E}{E^2 m^2 + 1} [\sin(m p_x) + E m \cos(m p_x)] dp_x \quad (9)$$

На основе полученной зависимости построены графики зависимости электропроводности от напряженности внешнего электрического поля.

На рисунке 2 представлены зависимости удельной электропроводности однослойных германеновых нанолент от напряженности внешнего электрического поля для трех типов лент (12,0), (17,0) и (20,0). Полученные зависимости говорят о том, что с увеличением ширины германеновой ленты удельная электропроводность возрастает. Зависимость проводимости от напряженности электрического поля нелинейная, что также связано с периодическим и ограниченным законом дисперсии германена.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Волгоградской области в рамках научного проекта № 19-42-343001.

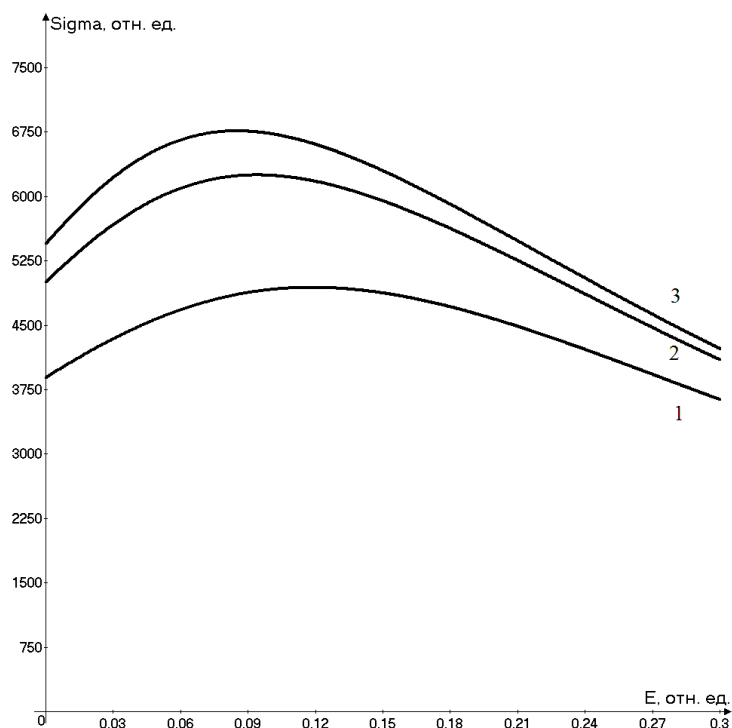


Рисунок 2. Зависимости удельной электропроводности однослойных германеновых нанолент от напряженности внешнего электрического поля для лент: 1 – для лент типа (12,0), 2 – для лент типа (17,0), 3 – для лент типа (20,0)

Список литературы / References:

1. Лозовик Ю.Е., Меркулова С.П., Соколик А.А. Коллективные электронные явления в графене. *Успехи физических наук*, 2008, т. 178, № 7, с. 758-776. [Lozovik Yu.E., Merkulova S.P., Sokolik A.A., Collective electron phenomena in graphene. *Phys. Usp.*, 2008, vol. 51, no. 7, 727-744. (In Russ.)]
2. Чернозатонский Л.А., Сорокин П.Б., Артукх А.А. Новые наноструктуры на основе графена: физико-химические свойства и приложения. *Успехи химии*, 2014, т. 83, вып. 3, с. 251-279. [Chernozatonskii L.A., Sorokin P.B., Artukh A.A. New nanostructures based on graphene: physical and chemical properties and applications. *Russ. Chem. Rev.*, 2014, vol. 83, pp. 251-279. (In Russ.)]
3. Lemme M.C. Current status of graphene transistors. *Solid State Phenomena*, 2009, vol. 156, pp. 499.
4. Davila M.E, Xian L., Cahangirov S., Rubio A., Le Lay G. Germanene: a novel two-dimensional germanium allotrope akin to graphene and silicene. *New Journal of Physics*, 2014, vol. 16, no. 9 p. 095002. doi: 10.1088/1367-2630/16/9/095002
5. Kyozauro T., Kenji S. Theoretical possibility of stage corrugation in Si and Ge analogs of graphite. *Physical Review B*, 1994, vol. 50, no. 20, pp. 14916-14922. DOI: 10.1103/PhysRevB.50.14916
6. Cahangirov S., Topsakal M., Aktürk E., Şahin H., Ciraci S. Two- and one-dimensional honeycomb structures of silicon and germanium. *Physical Review Letters*, 2009, vol. 102, no. 23, p. 236804. doi: 10.1103/PhysRevLett.102.236804
7. Lebe`gue S., Bjoerkman T., Klintonberg M., Nieminen R.M., Eriksson O. Two-Dimensional Materials from Data Filtering and Ab Initio Calculations. *Physical Review X*, 2013, vol. 3, p. 031002.
8. Mortazavi B., Rahaman O., Makaremi M., Dianat A., Cunibert G., Rabczuk T. First-principles investigation of mechanical properties of silicene, germanene and stanine. *Physica E*, 2017, vol. 87, pp. 228-232.
9. Kazemlou V. Phirouznia A. Influence of compression strains on photon absorption of silicene and germanene. *Superlattices and Microstructures*, 2019, vol. 128, pp. 23-29.
10. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Физическая кинетика*. Физ.-мат. лит., 1979, 528 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Physical kinetics*. Phys.-mat. lit., 1979, 528 p. (In Russ.)]
11. Дыкман И.М., Томчук П.М. *Явления переноса и флуктуации в полупроводниках*. Наук. думка, Киев, 1981, 320 с. [Dykman I.M., Tomchuk P.M. *Transport phenomena and fluctuations in semiconductors*. Science. dumka, Kiev, 1981, 320 p. (In Russ.)]

ELECTRIC TRANSPORT PROPERTIES OF SINGLE-LAYER GERMANENE IN THE SEMICLASSICAL APPROXIMATION

Sudorgin S.A.

Volgograd State Agricultural University

Universitetsky ave., 26, Volgograd, 400002, Russia; e-mail: sergsud@mail.ru

Abstract. This article is devoted to the study of electrical transport characteristics of single-layer germanene in an external constant electric field. The small forbidden gap of germanene can be controlled by the electric field, adsorption of various atoms, deformation, and interaction with the substrate. Using the method of the semiclassical approximation, an analytical relation is obtained for the specific conductivity of single-layer germanene. The evolution of the electron system of germanene sheets was described using the kinetic Boltzmann equation in the framework of the semiclassical relaxation time approximation. A two-dimensional hexagonal layer was chosen as a geometric model of a germanene nanoribbon. The mathematical model of the electronic structure of undeformed germanene nanoribbons is based on their geometric structure and the band structure of the hexagonal layer. The band structure of nanoribbons is used within the framework of the tight binding method in the Hückel and nearest neighbors approximations. The dependences of the specific conductivity of germanene layers of different chirality on the strength of the external electric field are investigated.

Key words: *germanene, electron transport, electrical conductivity, nanostructures, semiclassical approximation.*

ПРОДУКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* В УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Чекушкин А.А., Лелеков А.С.

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.08.2021

Аннотация. В работе исследован рост накопительной культуры *Phaeodactylum tricornutum* в условиях естественного освещения. Эксперимент проводился в районе города Севастополя в горизонтальном фотобиореакторе в зимний период. Все внешние факторы (температура, pH, количество биогенных элементов питательной среды) находились в оптимальном для данного вида диапазоне. Единственной вариабельной величиной являлся приток солнечной радиации. В эксперименте определяли изменения биомассы феодактилума и притока солнечной радиации в течение девяти суток. Показано, что средняя скорость роста составила $2,37 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$, а прирост плотности *Ph. tricornutum* за световой день – $4 - 8 \text{ г СВ/м}^2$. Величина ночной потери биомассы в среднем равнялась 18 % от текущей биомассы, а потери от дневного прироста достигали 100 %. Сравнение полученных значений с литературными данными показало, величина продуктивности определяется притоком солнечной радиации в области ФАР для данной географической широты. Величина суточного прироста культуры и ночные потери биомассы определяются её биохимическим составом.

Ключевые слова: микроводоросли, приток солнечной радиации, ночная потеря биомассы.

Диатомовые водоросли обеспечивают до 25 % первичной продукции мирового океана, а их биомасса является самой большой среди микроводорослей [1]. Среди множества диатомовых видов микроводорослей лишь немногие культивируют в промышленных масштабах. Для получения биологически активных веществ необходимо подобрать такой вид, который бы обладал высокими скоростями роста и высокой продукцией требуемых биохимических компонентов. Этим требованиям отвечает морская диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricornutum*. Клетки *Ph. tricornutum* содержат каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, данный вид также используется в кормах для животных и аквакультуре [2,3]. Особое внимание заслуживает эйкозапентаеновая кислота [4,5] и уникальный каротиноид фукоксантин, на основе которого созданы препараты для лечения раковых заболеваний [6]. В последнее время *Ph. tricornutum* был включен в число потенциальных объектов для производства биодизельного топлива [7].

В промышленных масштабах микроводоросли, как правило, выращивают в открытых фотобиореакторах в условиях естественного освещения, что обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. В литературе имеются публикации, в которых сообщается о подборе питательных сред для выращивания *Ph. tricornutum*, исследуется влияние факторов среды на рост, рассматриваются способы проточного культивирования [6, 8, 9]. Температурный оптимум скорости роста *Ph. tricornutum* находится при 20 °C [10], поэтому привлекательной является идея разработки технологии производства биомассы *Ph. tricornutum* в культиваторах открытого типа (бассейнах) в зимний период в южных регионах России. Юг России, благодаря высокому притоку солнечной радиации [11], является самым перспективным регионом для производства биомассы различных видов микроводорослей, которая может быть использована при решении задачи оздоровления населения, повышения эффективности сельского хозяйства путем альголизации почв, утилизации сельскохозяйственных и городских сточных вод и др. Так как световые условия являются наиболее значимым фактором, определяющими скорость роста культуры микроводорослей, необходимо оценить влияние солнечной радиации на продукционные характеристики *Ph. tricornutum*. Поэтому исследование суточной динамики изменения биомассы в осенне – весенний период является первым этапом при разработке теоретических основ роста культуры *Ph. tricornutum* в условиях естественного освещения.

Цель данной работы – определение продуктивности накопительной культуры *Ph. tricornutum* при её полупромышленном выращивании на юго-западе Крымского полуострова (г. Севастополь).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные работы выполнялись на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» с 25 января по 02 февраля 2021 г. Культивирование *Ph. tricornutum* осуществлялось в условиях естественного освещения в альгобиотехнологическом модуле, расположенном в г. Севастополь на территории радиобиологического корпуса ФИЦ ИнБЮМ. Модуль выполнен на базе многоцелевой оцинкованной конструкции «Урожай-Абсолют», покрытой сотовым поликарбонатом 4 мм. Размеры модуля 4 м на 3 м, высота в верхней точке арки 2,5 м. Модуль оборудован двумя дверными проёмами с обоих торцов, в верхней части которых находятся форточки. По центру выполнен технологический проход шириной 1 м, по обеим сторонам которого находятся прямоугольные бассейны. Модуль электрифицирован 220 В, подведена морская и пресная вода. Каркас каждого бассейна изготовлен из необрезной доски шириной 150 мм, бассейны выстелены полиэтиленовой плёнкой. Перемешивание культуры микроводорослей

осуществлялось аквариумной помпой Barbus pump 001 (400 л/ч). Модуль оснащён баллоном с углекислотой, которая необходима для нормального роста и развития водорослей [12].

Культуру диатомовой микроводоросли *Ph. tricornutum* Bohlin (штамм IBSS-41 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана») выращивали в накопительном режиме на питательной среде для морских микроводорослей [13] в плоскопараллельном бассейне. Объём бассейна составлял 15,5 л, толщина слоя суспензии 6,5 см, площадь освещаемой поверхности – 0,24 м². Для определения количества солнечной энергии ФАР использовали автоматический датчик измерения освещённости на базе платформы Arduino [14]. Величины освещённости (клк) переводили в облучённость ФАР (Вт/м²), приходящуюся на поверхность бассейна, с помощью коэффициента 4,26 [15]. Для сравнения полученных значений энергии ФАР с литературными данными, величины световой энергии переводили в микромоли квантов на единицу площади в единицу времени. Для этого определяли долю световой энергии, приходящуюся на каждую длину волны в области ФАР. Далее рассчитывали количество энергии для каждой длины волны, с учётом энергии одного кванта определяли число квантов на каждой длине волны. Окончательно, находили суммарное количество квантов, полученное значение делили на число Авогадро. С учётом спектра солнца для зимнего периода и географической широты г. Севастополя [15], для перевода единиц освещённости (клк) в единицы интенсивности света (мкмоль·м⁻²·с⁻¹) необходимо использовать коэффициент 23,51.

Биомассу микроводоросли *Ph. tricornutum* определяли оптическим методом и методом прямого взвешивания с центрифужных пробирках. Отбор проб проводили из разных точек бассейна: отбирали по 20 мл суспензии клеток, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 100 мл. Среднюю пробу перемешивали и определяли величину оптической плотности на фотометре UNICO-2100 при длине волны 750 нм, относительная погрешность измерения не превышала 1 % пропускания. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (ниже 30 % пропускания), проба разбавлялась дистиллированной водой. Для определения сухого веса из средней пробы отбирали 10 мл суспензии в полипропиленовые пробирки, доведённые до постоянного веса, осаждали при 3000 об./мин на центрифуге ОПН – 3, сливали надосадочную жидкость, промывали дистиллированной водой и высушивали при 60°C. Полученный коэффициент для пересчёта единиц оптической плотности D_{750} в биомассу (г СВ/л) составил 0,55 (рис. 1).

Температуру и pH суспензии поддерживали в оптимальном диапазоне [10]. Температуру стабилизировали на уровне 22 ± 1 °C с помощью аквариумного обогревателя Atman AT-50W. pH культуры поддерживали в диапазоне 9 – 9,5 путём подачи углекислого газа непосредственно в бассейн с культурой. Толщина слоя культуры составляла 6,5 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Начальная плотность культуры *Ph. tricornutum* составляла 0,06 г СВ/л или 3,57 г СВ/м² (рис. 2 А). За 9 суток культивирования прирост биомассы *Ph. tricornutum* составил около 0,43 г СВ/л или 27,89 г СВ/м². Таким образом, суммарный прирост составил 24,32 г СВ в расчёте на квадратный метр освещаемой поверхности. Отметим, что рост плотности культуры характеризовался сильной нелинейностью, которая обусловлена изменяющимися световыми условиями. Так в течение светового дня наблюдался рост биомассы, однако ночью отмечалось значительное её уменьшение.

Определим продуктивность культуры за световой день и её среднее значение за всё время эксперимента. Для расчёта продуктивности использовали выражение [12]:

$$B = B_l + P_m(t - t_l) \quad (1)$$

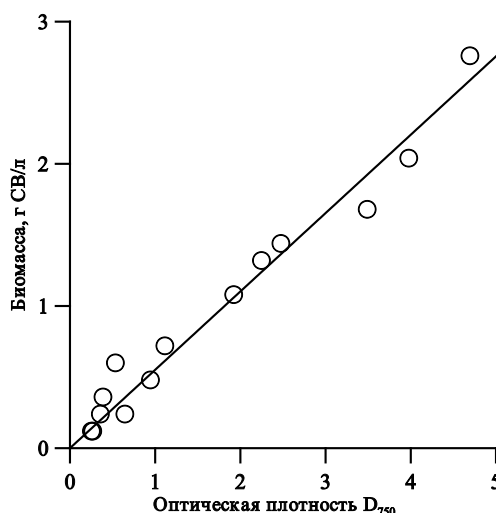


Рисунок 1. Линейная зависимость биомассы *Ph. tricornutum* от оптической плотности D_{750}

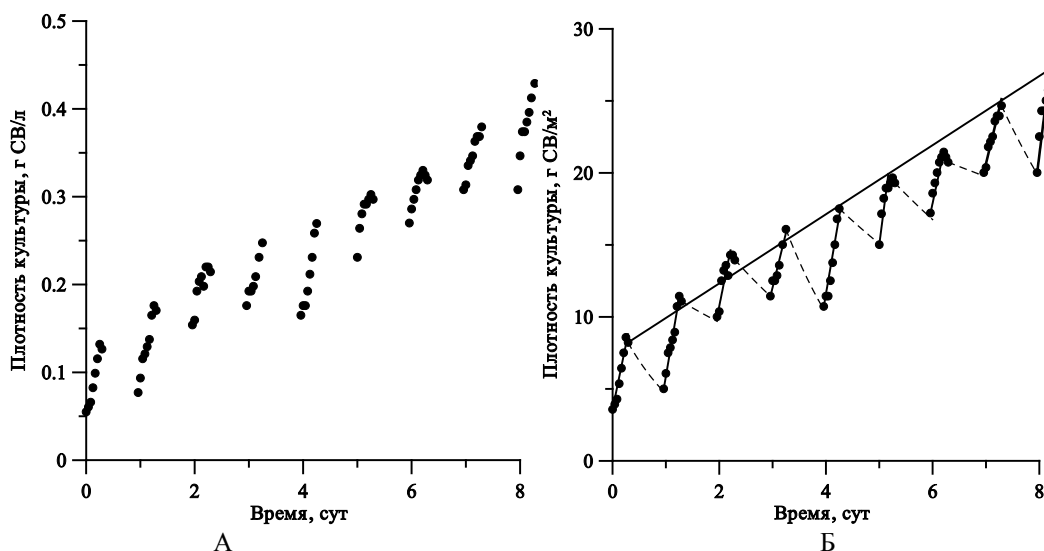


Рисунок 2. А – Динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricorutum*. Б – Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1) за каждый световой день и за всё время эксперимента

где B – текущая биомасса, измеряемая в данный момент времени t , B_l – биомасса в моменте начала линейной фазы роста t_l , P_m – продуктивность (скорость роста).

Например, аппроксимация экспериментальных данных выражением (1) позволила определить среднюю скорость роста для всей накопительной кривой. Для расчёта использовали максимальные значения плотности культуры каждого светового дня (см. рис. 2 Б). Полученное выражение имеет вид:

$$B = 8,22 + 2,27 (t - 0,29) \quad (2)$$

На рисунке 3 представлена динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricorutum* и изменение поверхностной облучённости бассейна за световой день (28 января 2021 г). Отметим, что рост плотности культуры за 8 часов светового дня с высокой точностью ($R^2=0,96$) описывается выражением (1):

$$B = 11,44 + 0,62 (t - 9) \quad (3)$$

Значение продуктивности культуры *Ph. tricorutum* за световой день составило $0,62 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ ч}^{-1}$. В таблице 1 представлены величины прироста плотности культуры *Ph. tricorutum* за каждый световой день эксперимента, а также суммарная энергия ФАР, приходящаяся на поверхность фотобиореактора. Отметим, что продолжительность светового дня составляла 8 часов, при этом рост феодактилума регистрировали в течение 7 часов, потому что утренние и вечерние часы наблюдалось затенение бассейна. Средний прирост биомассы за световой день составлял $4\text{--}8 \text{ г СВ/м}^2$, а количество световой энергии – $0,5\text{--}0,7 \text{ МДж/м}^2$.

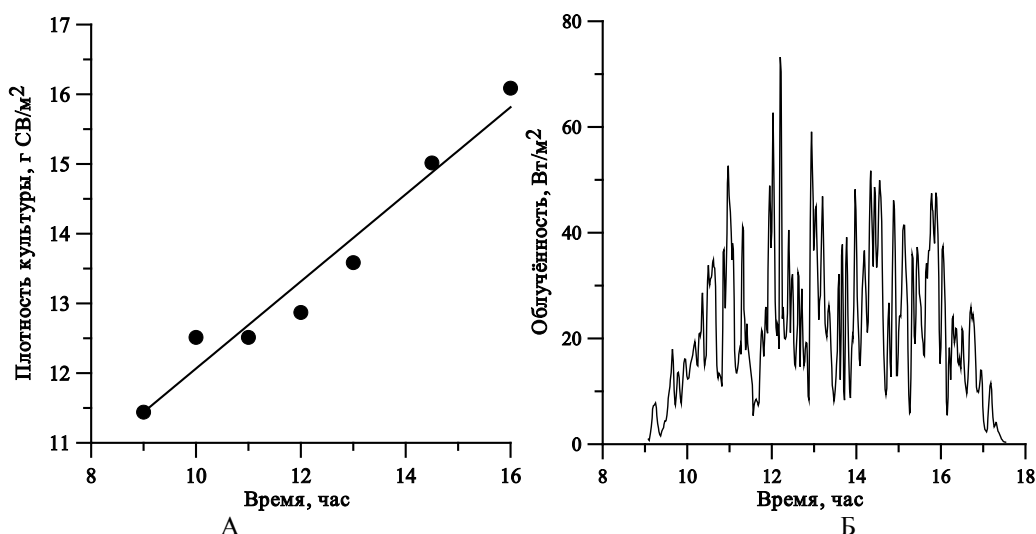


Рисунок 3. А – Динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricorutum* 28 января 2021 г. Б – Изменение поверхностной облучённости бассейна в течение светового дня

Таблица 1. Прирост биомассы *Ph. tricornutum* за световой день, ночная потеря биомассы и суммарная энергия ФАР, приходящаяся на поверхность фотобиореактора в эксперименте

Дата	P , г СВ/м ²	НБП, %	НБП, % от прироста за световой день	E , МДж/м ²
25.01.2021	5,24	—	—	0,66
26.01.2021	6,37	40	40	0,61
27.01.2021	5,38	10	17	0,53
28.01.2021	4,41	18	46	0,59
29.01.2021	6,30	33	121	0,48
30.01.2021	8,41	14	40	0,95
31.01.2021	5,04	11	25	0,89
01.02.2021	4,50	4	14	0,95
02.02.2021	8,79	19	103	0,62

По литературным данным известно, что в летний период продуктивность накопительной культуры *Ph. tricornutum* в открытых бассейнах составляет около 14 г СВ/м² в сутки [1]. В нашем эксперименте в зимний период среднее значение продуктивности составило 2,37 г СВ/м² в сутки, а максимальный прирост за световой день – 8,79 г СВ/м² (рис. 2 Б). Так как используемая питательная среда рассчитана на 4 г СВ/л [12], а плотность культуры в эксперименте не превышала 0,4 г СВ/л (рис. 1 А), то клетки *Ph. tricornutum* не испытывали недостатка в биогенных элементах. Кроме того, температуру и pH культуральной среды поддерживали в оптимальном диапазоне для *Ph. tricornutum*. Следовательно, скорость роста зависела от количества поглощённой энергии. На рисунке 3 представлена динамика изменения облучённости на поверхности фотобиореактора. Среднее количество энергии ФАР, приходящееся на поверхность бассейна, было в 2 – 3 раза меньше значений, характерных для данного региона [11]. Это связано с тем, что часть света поглощалась или отражалась от поверхности альгобиотехнологического модуля.

Сравним полученные значения облучённости с данными работы [1], в которой *Ph. tricornutum* выращивался в летний период на той же географической широте (44° N). Известно, что облучённость горизонтального фотобиореактора на этой широте в июле больше, чем в январе примерно в три раза [11]. Поэтому можно предположить, что среднее значение продуктивности культуры составит 14 г СВ м⁻² сут⁻¹ / 3 = 4,6 г СВ м⁻² сут⁻¹. Полученное значение практически в два раза выше, чем продуктивность *Ph. tricornutum* в нашем эксперименте, которая составила 2,37 г СВ м⁻² сут⁻¹. Разница объясняется тем, что наш фотобиореактор находился в альгобиотехнологическом модуле, материал которого отражал и поглощал до 50 % падающего солнечного света.

Особый интерес представляет продуктивность феодактилума за световой день, которая в 2-4 раза выше, чем средние суточные значения и составляет 4 – 8 г СВ м⁻². Продуктивность культуры за световой день не уменьшается за счёт ночных потерь биомассы (НБП), которые в среднем составляли 18 % от текущей плотности культуры (табл. 1). По литературным данным известно, что НБП накопительной культуры *Arthrospira platensis* в лабораторных условиях составляла около 8 % от величины биомассы в начале темного периода [16]. Такие значения НБП отмечены при культивировании спирулины и в условиях естественного освещения в летний период, однако НБП от величины дневного прироста равнялась 35 % [17]. Для схожих световых условий НБП накопительной культуры *Ph. tricornutum* составляла 17 % от дневного прироста [1]. Этот результат получен в летний период, когда продолжительность светового дня – 12 часов, в то время как в данном эксперименте в январе продолжительность светового дня составляла около 7 часов. По нашим расчётам НБП от величины

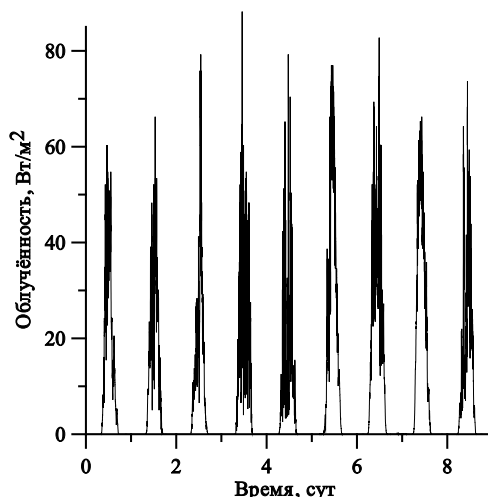


Рисунок 4. Изменение облучённости горизонтального фотобиореактора с 25 января по 1 февраля

дневного прироста варьировала от 14 до 121 %. В целом она не зависела ни от температуры суспензии, ни от притока солнечной радиации. Анализ литературных источников показывает, что в ночные часы происходят значительные изменения биохимического состава микроводорослей [16-18]. Известно, что число клеток *Ph. tricornutum*, общий органический углерод и азот увеличивались в ночное время, при этом глюкоза и триацилглицерины уменьшались в абсолютных величинах [18]. Кроме того, по данным цитируемой работы число клеток феодактилума первые шесть часов после восхода не изменялось несмотря на то, что облучённость фотобиореактора была в 5-7 раз выше, по сравнению с нашими данными. Таким образом, величина НПБ зависит от биохимического состава биомассы, физиологического состояния клеток культуры и пр. Световой режим в которой находится культура влияет на продукционные характеристики *Ph. tricornutum* не на прямую, а через изменение продукции того или иного биохимического компонента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены продукционные характеристики накопительной культуры *Ph. tricornutum* при её выращивании в зимний период. Неблагоприятные световые условия значительно ограничивают продуктивность феодактилума, которая в среднем составила 2,37 г СВ м⁻² сут⁻¹. Показано, что данная величина определяется количеством поглощенной световой энергии и биохимическим составом культуры. В накопительном режиме выращивания наблюдаются значительные потери биомассы в ночное время, которые достигают 100 % от величины дневного прироста. Поэтому при организации промышленного производства *Ph. tricornutum* необходимо учитывать продолжительность светового дня, средний приток солнечной радиации для конкретной географической широты, а также определить кинетические коэффициенты изменения содержания макромолекулярных компонентов биомассы. Для достижения последнего необходимы системы автоматического контроля числа клеток, биомассы, общего белка, углеводов, липидов.

Список литературы / References:

1. Benavides A.M.S., Torzillo G., Kopecky J., Masojídek J. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, 2013, vol. 54, pp. 115-122. doi: 10.1016/2013.03.016
2. Lebeau T., Jean-Michel R.L. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: cultivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 60, no. 6, pp. 612-623. doi: 10.1007/s00253-002-1176-4
3. Lebeau T., Jean-Michel R.L. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putative products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 60, no. 6, pp. 624-32. doi: 10.1007/s00253-002-1177-3
4. Kikuchi M., Hirano A., Kunito Sh., Kawakami Y. Fucoxanthin, an antioxidative substance from marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Marine Biotechnology*, 1995, vol. 3, no. 1, pp. 132-135.
5. Kim S.M., Jung Y.-J., Kwon Oh.-N., Cha K.H., Um B.-H., Chung D., Pan Ch.-H. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, vol. 166, no. 7, pp. 1843-1855. doi: 10.1007/s12010-012-9602-2
6. Alonso D.L., Belarbi E.H., Fernandez S.J., Rodriguez-Ruiz J., Grima M.E. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 2000, vol. 54, no. 5, pp. 461-471.
7. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, vol. 14, pp. 217-232. doi: 10.1016/2009.07.020
8. Kudo I., Miyamoto M., Noiri Y., Maita Y. Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 2000, vol. 36, no. 6, pp. 1096-1102.
9. Okay O.S., Gaines A., Davie A.M. The Growth of Continuous Cultures of the Phytoplankton *Phaeodactylum Tricornutum*. *Turkish J. Eng. Env. Sci*, 2003, vol. 27, pp. 145-155.
10. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, 481 p.
11. *Справочник по климату СССР. Вып. 10. Украинская ССР. Часть 1. Солнечная радиация, радиационный баланс и солнечное сияние.* Л.: Гидрометиздат, 1966, 124 с. [*Handbook on climate USSR. Issue 10. Ukrainian SSR. Part 1. Solar radiation, radiation balance and solar radiance.* L.: Gidrometizdat, 1966, 124 p. (In Russ.)]
12. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей в культуре. Севастополь: ООО "Константа-Принт", 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. Modeling of microalgae growth in culture. Sevastopol-OOO "Konstanta-Print", 2007, 152 p. (In Russ.)]
13. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Изв. СО АН СССР (сер. Биол.)*, 1981. № 15, вып. 3, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov. I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Izv. SO ANSSSR (ser. Biol.)*, 1981, no. 15, vol. 3, pp. 75-82. (In Russ.)]
14. Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование суточных колебаний освещённости в районе г. Севастополя. *Актуальные вопросы биологической химии и физики*, 2018, т. 3, № 3, с. 547-552.

[Chekushkin A.A., Lelekov A.S., Trenkenshu R.P. Modeling of daily fluctuations of illumination in the area of Sevastopol. *Actual problems of biological chemistry and physics*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 547-552. (In Russ.)]

15. Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г. Сезонная динамика предельной продуктивности в горизонтальном фотобиореакторе. *Актуальные вопросы биологической химии и физики*, 2020, т. 3, № 3, с. 405-412. [Chekushkin A.A., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G. Seasonal dynamics of productivity in horizontal photobiosynthesis. *Actual problems of biological chemistry and physics*, 2020, vol. 3, no. 3, pp. 405-412. (In Russ.)]

16. Авсиян А.Л. Динамика потери биомассы в культуре *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanoprokaryota) в темновых условиях. *Альгология*, 2014, т. 24, № 3, с. 417-420. [Avsiyan A.L. Dynamics of biomass loss in the culture of *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanoprokaryota) under dark conditions. *Algology*, 2014, vol. 24, no. 3, pp. 417-420. (In Russ.)]

17. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R. et al. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Journal Applied Phycology*, 1991, vol. 3, pp. 103-109.

18. Jallet D., Caballero M.A., Gallina A.A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 2016, vol. 18, pp. 51-60. doi: 10.1016/2016.05.014

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0.

PRODUCTIVITY OF *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* CULTURE IN NATURAL LIGHT CONDITIONS

Chekushkin A.A., Lelekov A.S.

Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

Abstract. The paper is focused on the growth *Phaeodactylum tricornutum* batch culture in the natural light conditions. The experiments were carried out in the area of the city of Sevastopol in a horizontal photobioreactor in winter. All external factors (temperature, pH, amount of nutrients in the nutrient medium) were in the optimal range for this species. The only variable value was the influx of solar radiation. In the experiment, changes in the *Ph. tricornutum* biomass and the influx of solar radiation were determined for nine days. It is shown that the average growth rate was $2.37 \text{ g DW m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. The daylight productivity of *Ph. tricornutum* was about $4-8 \text{ g SV/m}^2$. The averaged value of the night biomass loss was 18 % of the current culture density, and the losses from the daytime gain reached 100%. A comparison of the obtained average productivity of *Ph. tricornutum* with the literature data showed that the average value is determined by the influx of solar radiation for given geographical latitude. The daylight productivity and night biomass loss is determined by biochemical composition of *Ph. tricornutum* culture.

Key words: microalgae, influx of solar radiation, night biomass loss.

MULTILAYER PERCEPTRON NEURAL NETWORK TO PREDICT THE SURFACE PLASMON RESONANCE OF GOLD NANOSPHERES USING THEIR MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS

Lima Navarro G., Arzola Flores J.A., Maldonado García A., Guarneros Bejarano G., Vidal Robles E., Hernandez Santiago A.A.

Benemerita Universidad Autonoma de Puebla

Avenida San Claudio y 18 Sur, Colonia San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Mexico; email: jesus.arzola@correo.buap.mx

Received: 07.08.2021

Abstract. The Surface Plasmon Resonance (SPR) is an interesting optical property of metallic nanoparticles, which is strongly influenced by the morphology of the nanoparticles, their surface chemistry, and of course, the medium in which the particles are dispersed; therefore, knowing the position of the SPR is of vital importance to define its possible field of application. Here, we present the prediction of the position of the dipolar SPR in gold nanospheres, employing a Multilayer Perceptron Neural Network (MLP). The data for the training, validation and testing of the MLP were obtained by calculating the extinction efficiencies of gold nanospheres with different diameters using the Mie Theory and the MiePlot software. 5-fold cross-validation was used as evaluation method and MSE, RMSE, MAE and R^2 as evaluation metrics. The MLP allows predicting the dipolar SPR of gold nanospheres with an accuracy close to 100%, knowing only its diameter, so our methodology can be extended to predict different physicochemical, optical, or morphological properties of metallic and non-metallic nanoparticles.

Key words: Surface Plasmon Resonance, Artificial Intelligence, Machine Learning, Multilayer Perceptron Neural Network, Mie Theory, MiePlot.

INTRODUCTION

Au nanoparticles have been widely used in different fields of application due to their interesting optical properties, specifically surface plasmon resonance (SPR) [1], so this optical property has been used in photocatalytic processes [2], elimination of bacteria and cancer cells [3,4], to improve the efficiency of solar cells [5], etc.

When an electric field whose frequency coincides with the natural oscillation frequency of the conduction electrons in metals a resonance phenomenon emerges, giving rise to a collective movement of the sea of conduction electrons. From the point of view of Quantum Mechanics, a quantum of this oscillation is called a plasmon. Plasmons, based on the Fermi electron sea model, can be described as a cloud of negatively charged electrons consistently displaced from their equilibrium position around a lattice made of positively charged ions [1,5].

Knowing the position of the dipolar SPR in Au nanoparticles is of vital importance because the possible field of application depends on this [1]. Nowadays, thanks to the development of nanoscience, it is possible to synthesize nanoparticles with a great variety of morphologies, which allows the position of the dipolar SPR to be tuned [1]. However, this process is usually expensive, so it is necessary to implement computational tools that allow us to predict the position of the dipolar SPR and thus optimize resources. Currently, thanks to the rise of Artificial Intelligence, specifically Machine Learning (ML), it is possible to implement computational models that have a certain learning capacity, which can be obtained from experience, that is, from the analysis of historical data of the phenomenon under study [6]. An example of these models are artificial neural networks [6].

Inspired by the human brain, the Artificial Neural Networks (ANN) were born of the necessity of automating prediction, identification, and control tasks. To create a functional model of the biological neuron, three elements are required. Firstly, the synapses are represented by a value called weight, which indicates the strength of the connection between an input and the neuron. The second component must be an adder that sums up all the inputs, and, finally, an activation function that controls the output of the neuron [6-8].

In the present work, an ANN known as multilayer feed-forward neural network or Multilayer Perceptron Neural Network (MLP) is proposed for predicting the dipolar SPR of Au nanospheres as a function of their diameter, using their extinction spectra, which were obtained using the MiePlot software.

METHODOLOGY

The rigorous method chosen to generate the data needed to train, validate, and test the neural network is the Mie theory [9,10], which is applied by means of MiePlot software (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>) [11,12]. The required values are those of the wavelength of incident light at which extinction reaches its highest point for different diameter values. To obtain the desired results, one must input data as it is described below.

Firstly, method and graphic variables are selected as it is showed in Figure 1. In this case, the extinction efficiencies (Q_{ext}) were calculated for Au nanospheres with different diameters and dispersed in a medium with a refractive index of 1.33 (water).

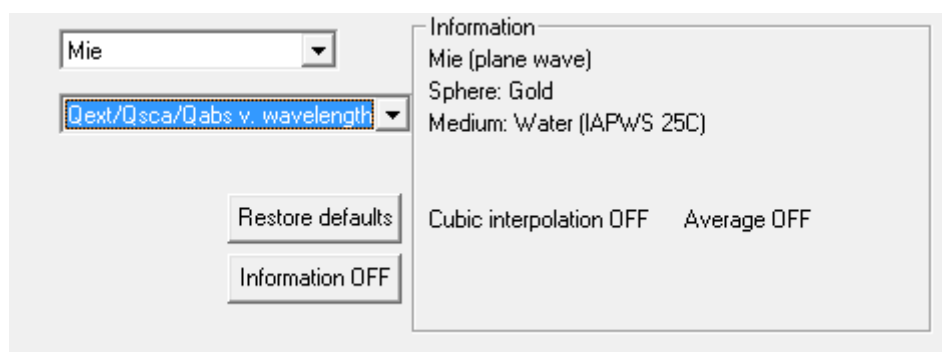


Figure 1. Method and variables selection in Mie Scattering's interface

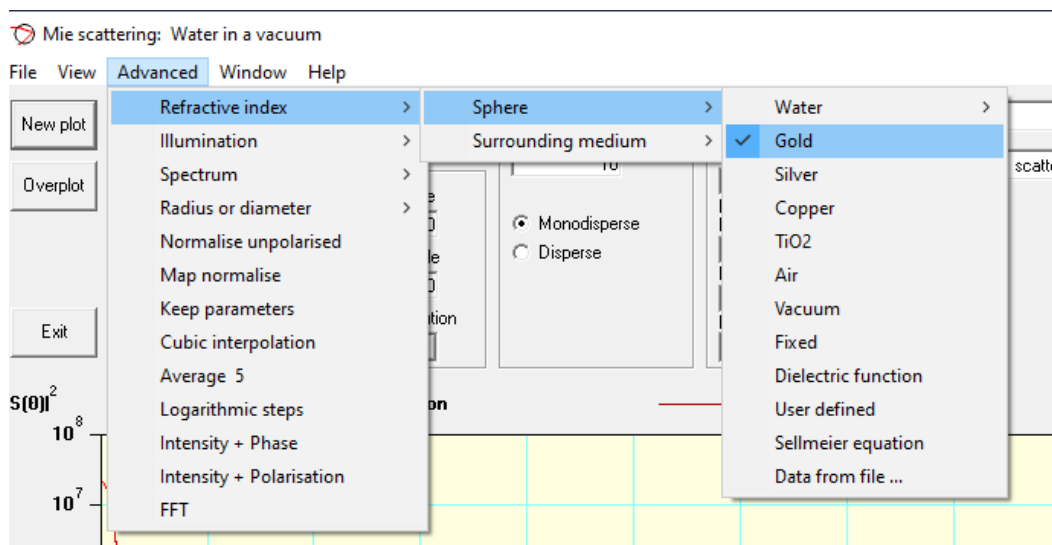


Figure 2. Procedure to select the type of material in MiePlot interface

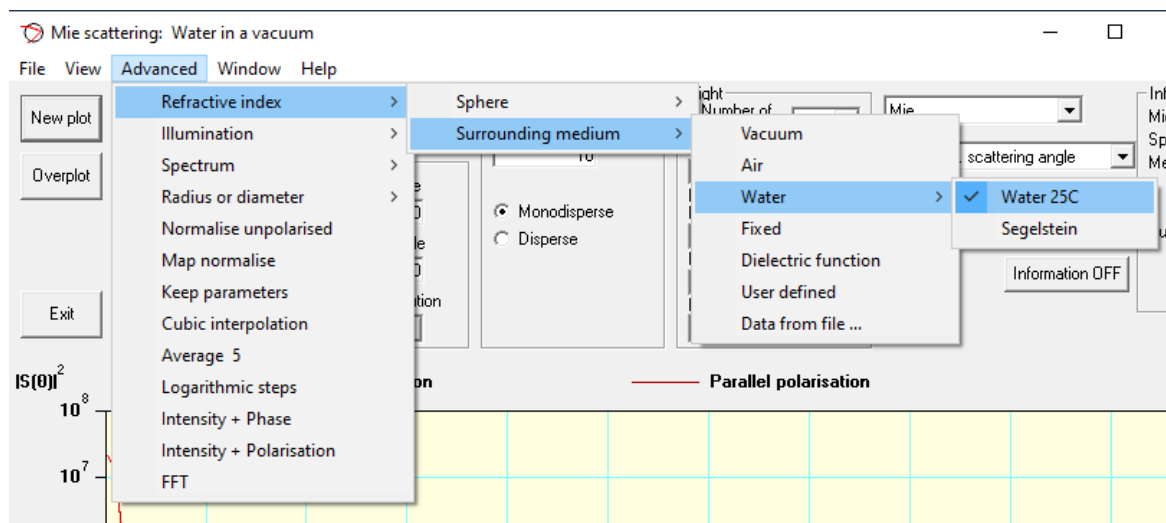


Figure 3. Procedure to select the surrounding medium in MiePlot interface

Later, the refractive index is selected; there, the pointer must be placed on the “Sphere” option to display the available materials, out of which gold is selected. Then, the surrounding medium chosen is water, and temperature is fixed at 25 °C (Figs. 2 and 3).

The particle size (spherical) was varied from 0.002 μm (2 nm) to 0.1 μm (100 nm), and the lower wavelength limit is fixed at 200 nm and the upper at 1000 nm. It is also important to select “linear” at intensity scale and horizontal scale (see Fig. 4). Fig. 5 shows the Q_{ext} for an Au nanosphere with a diameter equal to 20 nm. In this figure, it is possible to observe that the maximum of the Q_{ext} is around 520 nm. This maximum is related to the position of the dipolar SPR.

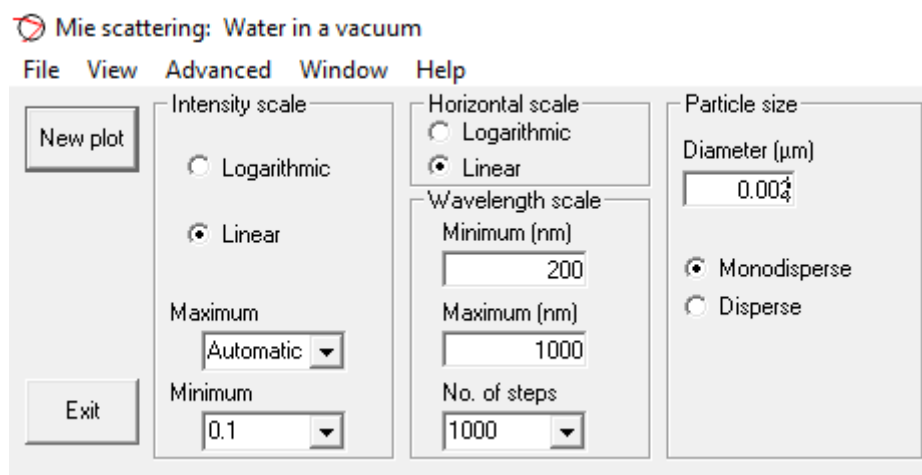


Figure 4. Selection of scale and particle size in MiePlot interface

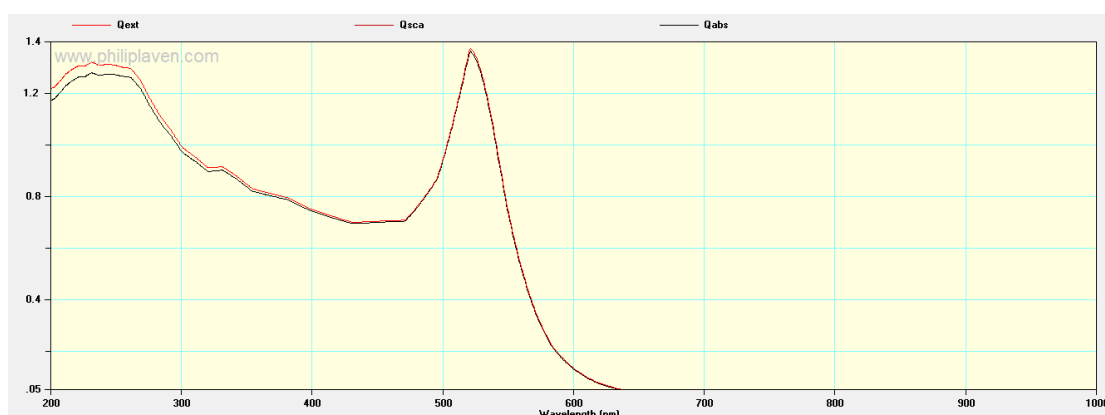


Figure 5. Q_{ext} for a 0.02 μm Au nanosphere dispersed in water at 25 $^{\circ}\text{C}$ (obtained using MiePlot). The maximum of the extinction spectrum is related to the position of the dipolar SPR

This procedure is repeated for several particle diameter values between 0.002 and 0.1 μm to obtain the corresponding wavelength results at which resonance phenomenon is reached.

Once the SPR was obtained for the Au nanospheres with different diameters, the training, validation, and testing of an MLP was carried out, using the 5-fold cross-validation evaluation method [6], and the Mean Square Error (MSE), the Root Mean Square Error (RMSE), the Mean Absolute Error (MAE), and the Determination Coefficient (R^2) were used as evaluation metrics [6,8]. The MLP consisted of one input layer (related to the diameter of the nanosphere as a predictor variable), a hidden layer formed by ten neurons with rectified lineal activation function (RELU) [6,8], and one output layer of a neuron (related to the target variable, in this case, the position of the dipolar SPR). In addition, the $L_2 = 0.001$ penalty was used as a regularization method, and as an optimizer of synaptic weights, the quasi-newton L-BFGS-B method was used [6,8]. For the implementation of this supervised learning model, Orange V2.28 software was employed (<https://orangedatamining.com/>) [13].

RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 6 a) the Orange workflow for predicting dipolar SPR of Au nanospheres is shown. Figure 6 b) shows the dialog box to interact with the Neural Network widget. In this window it is possible to select the number of hidden layers and the number of neurons per hidden layer, the value of the L_2 regularization and the optimization method of the synaptic weights. On the other hand, in Figure 6 c) the dialog window of the “Test and Score” widget is observed, in which it is possible to select the 5-fold cross validation method as the model evaluation technique. In addition, in this widget the evaluation metrics for the prediction of the dipole SPR are appreciated, as can be seen, the following values of the evaluation metrics are obtained: MSE = 0.173, RMSE = 0.416, MAE = 0.309 and $R^2 = 0.999$, which implies an excellent prediction of the dipole SPR of Au nanospheres as a function of their diameter.

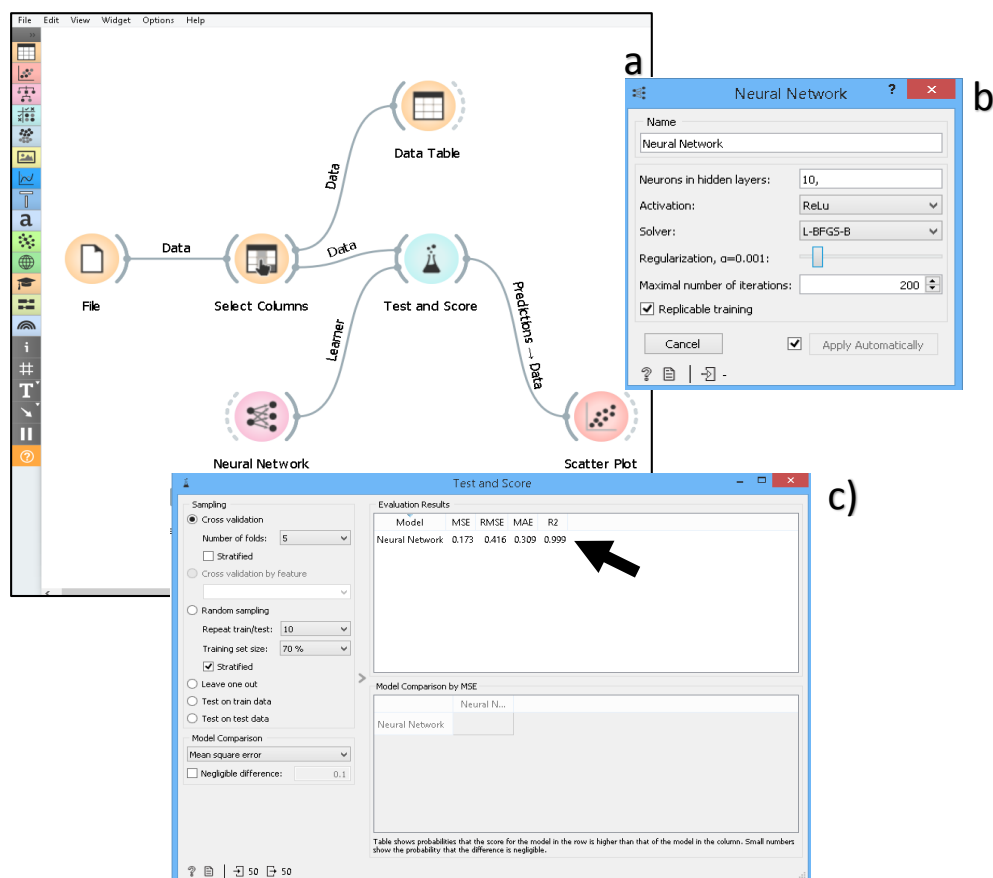


Figure 6. a) General workflow in Orange to predict the dipolar SPR of Au nanospheres, b) "Neural Network" widget dialog window, and c) "Test and Score" widget dialog window

On the other hand, Fig. 7 shows the dipole SPR prediction parity diagram. In this figure, the horizontal axis is related to the position value of the dipole SPR in nanometers obtained using MiePlot, while the vertical axis is related to the dipolar SPR values obtained from the MLP. As can be seen, by making a linear fit with those SPR values, it is possible to obtain both a Pearson correlation coefficient and a determination coefficient close to unity, which indicates that it is possible to predict the position of the dipole SPR with a precision close to 100%.

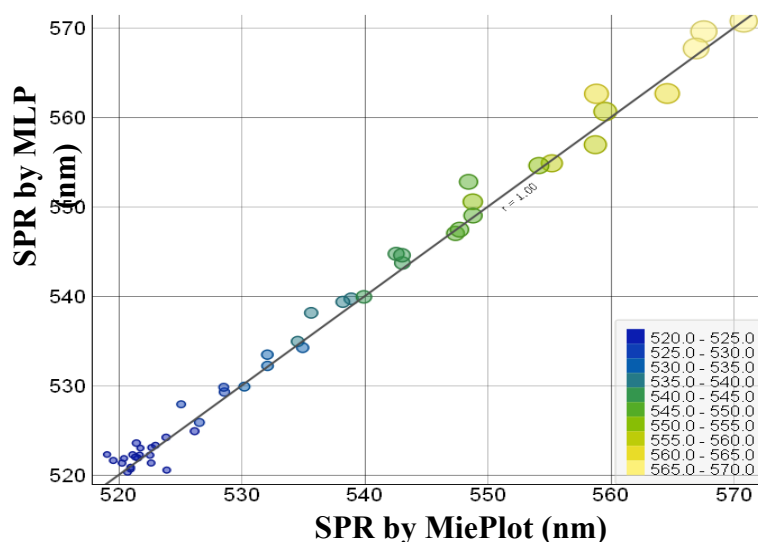


Figure 7. Parity Plot for the prediction of the dipolar SPR of Au nanospheres. The horizontal axis represents the SPR values obtained using MiePlot, while the vertical axis is related to the SPR values obtained from the MLP prediction. The color and size of the points is related to the position of the SPR in nanometers. On the other hand, the black line shows a good fit of the data

CONCLUSIONS

Today, thanks to the rise of Artificial Intelligence, it is possible to optimize resources in nanoscience, to the point that it is possible to predict the optical properties of different types of nanoparticles. Here we can conclude that it is possible to use an MLP to predict the position of the SPR dipole of Au nanospheres with an accuracy close to 100%, knowing only their diameter. This result opens the possibility of expanding our methodology to predict different physicochemical, optical, or morphological properties of metallic and non-metallic nanoparticles.

References:

1. Amendola V., Pilot R., Frascioni M., Marogo O. M., Iati M.A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of physics: Condensed Matter*, 2017, vol. 29, no. 20, p. 203002.
2. Thompson D.T. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today*, 2007, vol. 2, no. 4, pp.40-43.
3. Giljohann D.A., Seferos D.S., Daniel W.L., Massich M.D., Patel P.C., Mirkin C.A. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Spherical Nucleic Acids*, 2020, pp. 55-90.
4. Sperling R.A., Gil P.R., Zhang F., Zanella M., Parak W.J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2008, vol. 37, no. 9, pp. 1896-1908.
5. Notarianni M., Vernon K., Chou A., Aljada M., Liu J., Motta N. Plasmonic effect of gold nanoparticles in organic solar cells. *Solar Energy*, 2014, vol. 106, pp. 23-37.
6. Berzal F. *Redes neuronales & deep learning: Volumen II*. Independently published, 2019.
7. Dongare A.D., Kharde R.R., Kachare A.D. () Introduction to Artificial Neural Network. *International Journal of Engineering an Innovative Technology*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 189-194.
8. Arzola-Flores J. A., Gonzalez A.L. Machine Learning for Predicting the Surface Plasmon Resonance of Perfect and Concave Gold Nanocubes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2020, vol. 124, no. 46, pp. 25447-25454.
9. Wriedt T. Mie theory: a review. *The Mie Theory*, 2012, pp. 53-71.
10. Hergert W., Wriedt T. (Eds.). *The Mie theory: basics and applications*. Springer, 2012, vol. 169.
11. Laven P. Simulation of rainbows, coronas, and glories by use of Mie theory. *Applied optics*, 2003, vol. 42, no. 3, pp. 436-444.
12. Laven P. Simulation of rainbows, coronas and glories using Mie theory and the Debye series. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2004, vol. 89, no. 1-4, pp. 257-269.
13. Demsar J., Curk T., Erjavec A., Gorup C., Hocevar T., Milutinovic M., Zupan B. Orange: data mining toolbox in Python. *The Journal of machine Learning research*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 2349-2353.

GLIOBLASTOMA GROWTH COMPUTATIONAL SIMULATION: A MINIMAL MODEL OF MULTISCALE ANGIOGENESIS

Rodriguez-Meza M.A., Morales M.A., Cervantes-Tavera A.M., Zenteno-Mateo B., Hernandez-Santiago A.A.

Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.

Av. San Claudio y 18 Sur C.U. Col. San Manuel, C. P. 72570 Puebla, Pue., Mexico.

Received: 20.07.2021

Abstract. The tumor growth computational simulation is a fundamental step for the cancer management future, especially in this work the glioblastoma is modeled by a reaction-diffusion system. It is shown that the following mathematical models can simulate tumor behavior, analyzing the control parameters of the model that could help to avoid the tumor aiming to increase the percentage of survivors of this ailment.

Key words: Cancer, Computational simulation, Glioblastoma, Tumor growth.

INTRODUCTION

Cancer or neoplasm is defined as a phenomenon originating when a group of cells grows without control with certain characteristics like: proliferative, invasive and migratory advantages. This ailment is one of the most lethal diseases that takes millions of lives every year. Indeed, the number of people suffering from cancer is increasing annually, therefore it is important to analyze the factors that could contribute to the spread of tumors.

Glioblastoma is the most common malignant primary brain tumor, representing approximately 57% of all gliomas and 48% of all primary malignant central nervous system (CNS) tumors. Despite recent advances in multimodality therapy for glioblastoma incorporating surgery, radiotherapy, systemic therapy (chemotherapy, targeted therapy), and supportive care, the overall prognosis remains poor and long-term survival is rare, just with less 22% survivors after 5 years and in most cases 14 months is the life expectancy. If the biologic processes that characterize this illness are known, new molecular techniques will be put in clinical practice, improving the prevention strategies and patient management. However, it is still difficult to integrate computational oncology in clinic practice, and *requires different professional profile collaboration to achieve it*.

At this point, the computational dimensional (2D) simulations are considered as a powerful tool. There are certain mathematical models that help to understand the way glioblastoma grows: continue models and discrete models. The cellular automata discrete models are useful to model effects at cellular level and interactions based on agents. Nevertheless, continuous models are more appropriate if it is intended to model interactions and temporal effects at very different scales, helping to advance toward growth models more personalized.

A new minimal model of glioblastoma growth.

It is important to know the dynamics of cancer cell growth in order to propose new in-silico research methodologies to understand the underlying mechanisms. This future knowledge could help improve current brain cancer treatment techniques. Mathematical models of tumor growth try to represent, through functions and laws, the complex mechanisms of oncogenesis. In this research work, a multiscale mathematical model of angiogenesis is proposed based on the continuous Proliferation Invasion Hypoxia Necrosis Angiogenesis (PIHNA) model [1-9]. The new model considers the production and consumption of angiogenic factors, cell diffusion, chemotaxis, and macroscopic tissue processes such as tumor invasion and growth.

The reaction-diffusion equations of the proposed model are the following:

$$\frac{\partial g}{\partial t} = \nabla \cdot (D_g \nabla g) + \rho_g g(1 - T) + (\theta_{mg} H_{mg})m - (\theta_{gm} H_{gm})g \quad (1)$$

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \nabla \cdot (D_m \nabla m) + \rho_m m(1 - T) + (\theta_{gm} H_{gm})g - (\theta_{mg} H_{mg})m - (\theta_{mN} H_{mN})m \quad (2)$$

$$\frac{\partial a}{\partial t} = \nabla \cdot (D_a \nabla a) + \rho_{am}m - \gamma v \quad (3)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \nabla \cdot (\chi v \nabla a) + \rho_v v m(1 - N) + (\theta_{vN} H_v)v \quad (4)$$

g (cell/cm³) is the proliferating cell density, m (cell/cm³) is the invasive cell density, a (mol/cm³) is the concentration of angiogenic factors and v (cell/cm³) is the vascularization density. From these variables, the total tumor density T can be defined such that: $T = g + m$. The terms of Eq. (1) take into account respectively: the cellular diffusion of proliferating cells, the cell proliferation due to the tumor growth and the phenotype change from one population to another that is mediated by the local availability of oxygen. This change is controlled by the Heaviside function such that: $H_{mg} = 1$ if there is hypoxia and $H_{mg} = 0$ if there is not hypoxia. So: $H_{gm} = 1 - H_{mg}$. While the terms of Eq. (2) only considers the cellular diffusion and the cell proliferation of the invasive cells. At this point, two cases are distinguished regarding the diffusion between g and m : when invasive cells are capable of greater mobility than proliferative cells ($D_m > D_g$), and vice versa ($D_m < D_g$). The terms of Eqs. (3) and (4) modeling that: Invasive m cells produce angiogenic factors a , which attract endothelial cells v

Table 1. Values for the control parameters taken for the glioblastoma simulation

Da	ρ_{am}	ρ_v	θ_{mN}	θ_{vN}	O_{2hyp}	O_{2death}	$[O_2]_a$	α_g	α_m	γ	φ	x	k_{max}
1×10^{-5} cm ² /s	1×10^{-9} mol/s	$\frac{\rho_g}{10}$	1.2 day s ⁻¹	$\frac{\theta_{mN}}{10}$	7 mmHg	0.7 mmHg	60 mmH g	1×10^{-17} mol/cel ls · s	$\frac{\alpha_g}{5}$	α_g	0.3	0.1	1×10^8 cell/c m ³

by chemotaxis. As a consequence, vascular density increases. To avoid introducing another non-linear term, we assume that the consumption of angiogenic factors by endothelial cells occurs at a constant ratio γ , where $H_{vN}=1$ if there is hypoxia and $H_{vN}=0$ if there is not hypoxia. Nevertheless, γ can be a function of a , m , or both. Also, the Eqs. (3) and (4) considers the chemical diffusion of concentration of angiogenic factors and the proliferation of invasive cells. The rest of control parameters are defined in the Table 1.

The numerical simulation results show evidence of glioblastoma growth inhibition in at least one case for the control parameter values of Table 1. The model presents a situation under which the growth of a brain tumor is viable, which is promising for new methods or treatments of this type of brain pathology.

Stability linear analysis.

The Fixed points were obtained of the following equations:

$$\begin{aligned} \rho_g g(1-T) + (\theta_{mg} H_{mg})m - (\theta_{gm} H_{gm})g &= 0 \\ \rho_m m(1-T) + (\theta_{gm} H_{gm})g - (\theta_{mg} H_{mg})m - (\theta_{mN} H_{mN})m &= 0 \\ \rho_{am} m - \gamma v &= 0 \\ \rho_v v m(1-N) + (\theta_{vN} H_v)v &= 0 \end{aligned}$$

And its results, respectively:

$$g = -m \frac{(\theta_{mg} H_{mg})}{((\theta_{gm} H_{gm}))} \quad (5)$$

$$T = 1 \text{ ó } m = 0 \quad (6)$$

$$m = \frac{(\theta_{vN} H_{vN})}{\rho_v (1-N)} \quad (7)$$

$$v = \frac{(\theta_{vN} H_{vN}) \rho_{am}}{\rho_v (1-N) \gamma} \quad (8)$$

The Jacobian of the model is:

$$J(g, m, a, v) = \begin{pmatrix} \rho_g(1-T) + (\theta_{gm} H_{gm}) & (\theta_{mg} H_{mg}) & 0 & 0 & \rho_m(1-T) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \rho_{am} & 0 & 0 & 0 & \rho_v v(1-N) & 0 \\ 0 & \gamma & 0 & 0 & 0 & \rho_v m(1-N) - \theta_{mg} H_{vN} \end{pmatrix}$$

And their trace and determinant are respectively:

$$\begin{aligned} Tr J &= \rho_g(1-T) + (\theta_{gm} H_{gm}) + \rho_m(1-T) + \rho_v m(1-N) - \theta_{mg} H_{vN} \\ |J(g, m, a, v)| &= 0 \end{aligned}$$

At consider the diffusion effect in Eqs. (1) to (4), the extended determinant is:

$$\left| \lambda \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} - J(g, m, a, v) + k^2 \begin{pmatrix} D_g & 0 & 0 & 0 \\ 0 & D_m & 0 & 0 \\ 0 & 0 & D_a & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \chi + 1 \end{pmatrix} \right| = 0$$

And from here the eigenvalues are:

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= \rho_g(1-T) - (\theta_{gm} H_{gm}) - k^2 D_g \\ \lambda_2 &= \rho_m(1-T) - k^2 D_m \\ \lambda_3 &= -k^2 D_a \\ \lambda_4 &= -k^2(\chi + 1) \end{aligned}$$

To finalize the section are presents the graphs of eigenvalues in **Fig 1**, using the control parameters values of Table 1 and the fixed points given for Eqs. (5) to (6). In these graphs are presents the regions where there are instability zones and here are solved numerically the Eqs. (1) to (4). The 2D simulations are presented in the next section employing the numerical solution obtained previously.

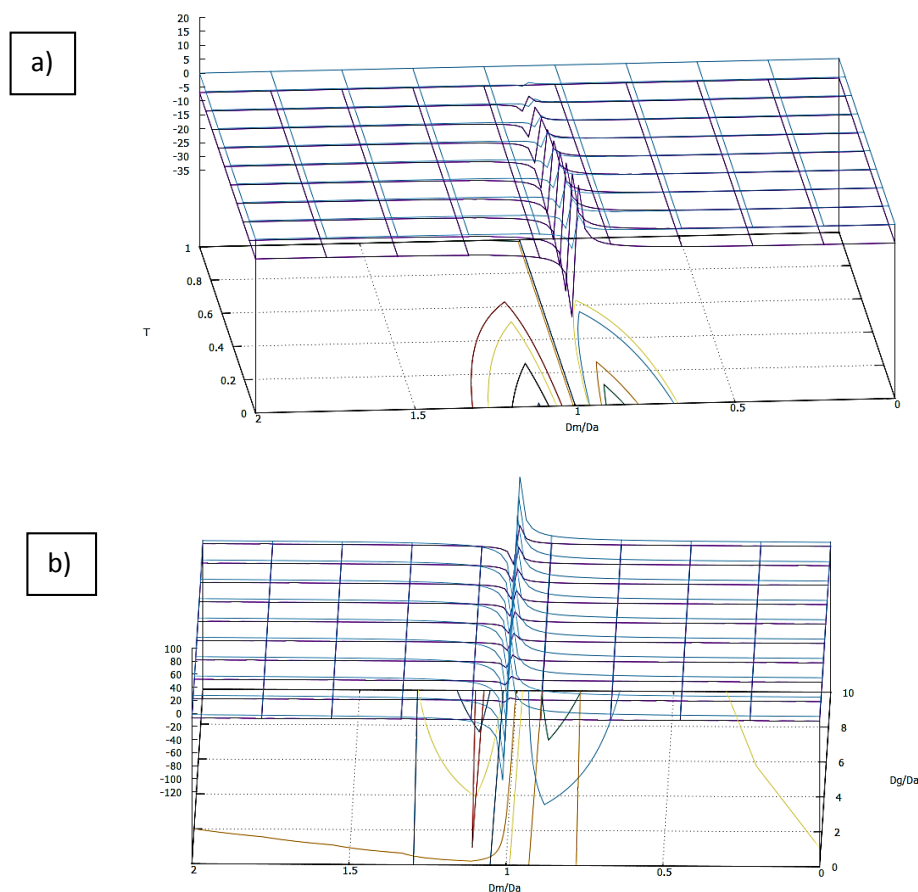


Figure 1. a) Eigenvalues graphs λ_1 and λ_2 for T vs d_m . b) Eigenvalues graphs λ_1 and λ_3 for d_m vs D_g/D_a

The graphs of Fig. 1 shows that the sensitive control parameters are T , d_m , and D_g/D_a . A similar behavior is found for the case of the eigenvalues 1 and 4. In all cases a saddle-type instability (Turing saddle points) is found

RESULTS OF COMPUTATIONAL

After taking those equations, the simulation was made with “Python 3.8” in its version of 32-Bit. The simulation development was possible due to 4 libraries called: math, numpy, random and pickle. It was just taken the first, second and third coupled reaction-diffusion space-time PDE to do the 1st and 2nd code and later it was made the third code, modifying the previous ones taking the entire model to compare if there is a variation considering different values. The numerical solution is obtained by means of difference finite algorithm in the space with a mesh step $dx=0.5$ and the Euler ruler for the temporal evolution with step $dt=0.001$.

Considering time as dimensionless, were obtained the followings results from the simulations:

1. *First simulation* with Eqs. (1) to (3) where the parameter $d_m=D_m/D_a > 1$ (associated with the diffusion of m) is defined with a value superior to general parameters (Fig. 2). The values are taken from control parameters are taken of Table 1 and the fixed points are given for Eqs. (5) to (8).

2. *Second simulation* with Eqs. (1) to (3) where the parameter $d_m=D_m/D_a$ (associated with the diffusion of m) is defined as with 0. It is: $D_m=0$ (Fig. 3). The values are taken from control parameters are taken of Table 1 and the fixed points are given for Eqs. (5) to (8).

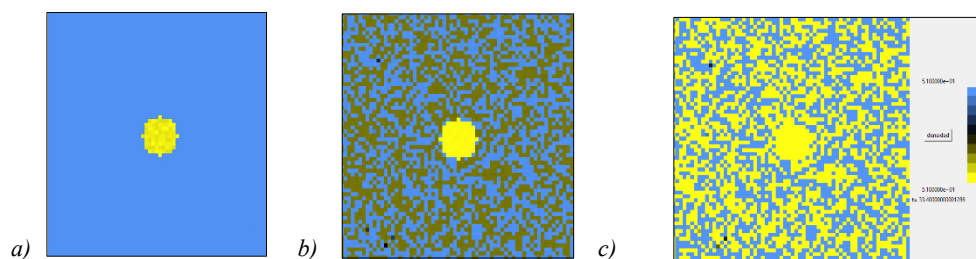


Figure 2. a) Growing tumor at $t=1.9$, b) Tumor starting its spread in the brain tissue at $t=9.3$, c) Tumor already spread in the brain tissue with $t=33.4$. When $d_m > 1$

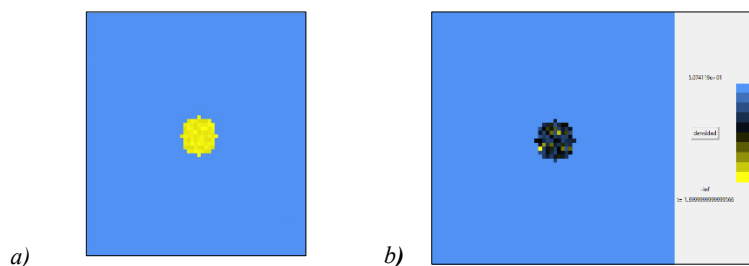


Figure 3. a) Initial condition. b) Tumor that did not spread through the tissue and remains stable in time. When $d_m=0$

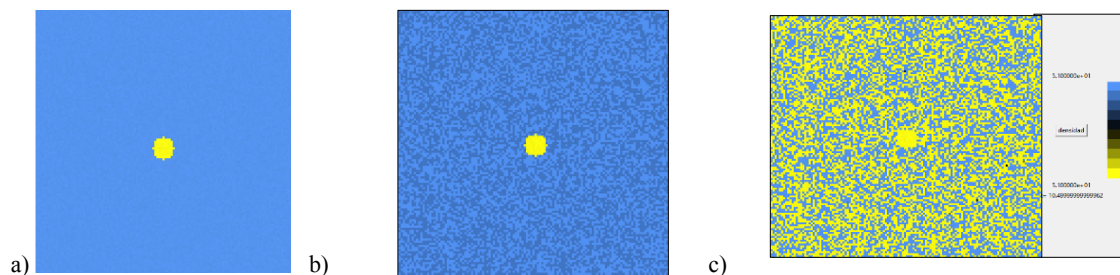


Figure 4. a) Tumor growing at $t=0.1$, b) Tumor starting its spread in the brain tissue at $t=8.5$, c) Tumor already spread in the brain tissue at $t=10.49$. When $d_m>1$

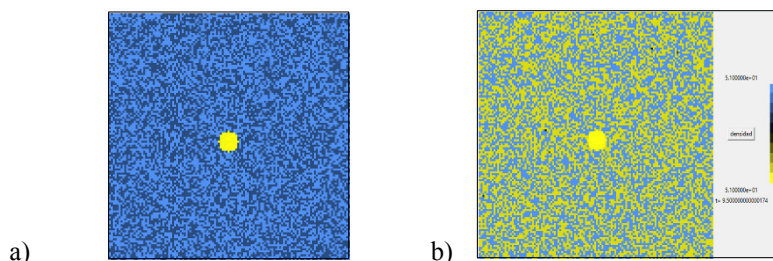


Figure 5. a) Tumor starting its spread in the brain tissue at $t=8.8$, b) Tumor already spread in the brain tissue at $t=9.5$. When $d_m>1$

3. *Third simulation* made with Eqs. (1) to (4) where the values are taken from control parameters are taken of Table 1 and the fixed points are given for Eqs. (5) to (8) (Fig. 4).

4. *Fourth simulation* made with Eqs. (1) to (4) where the values are taken from control parameters are taken of Table 1 and the fixed points are given for Eqs. (5) to (8). The v is taken is an inferior value than the third simulation (Fig. 5).

CONCLUSIONS

From the numerical experiments and their simulations 2D, it was seen that some parameters contribute to the tumor growth and ingrowth simulations as it follows:

- Increasing d_m (invasive cell density) in the first simulation employing Eqs. (1) to (3), it was seen that the growth increased when taking the general parameter with a difference of $t=0.6$.
- Taking $D_m=0$, it's that the tumor isn't growing employing Eqs. (1) to (3). This means that by completely inhibiting the vascularization of the tumor, the lack of growth of the tumor is found.
- It is seen that the tumor grows faster if it is taken the Eqs. (1) to (4) model.
- In spite of decrease v (vascularization), the tumor spreads. It could be interpreted as metastasis.

Therefore, mathematical models can be used to simulate biological conditions under which the growth and decrease of a cerebral glioblastoma take place. This may be useful in future studies to find new treatments for this medical condition.

References:

1. American Cancer Society. *Tasas de supervivencia de ciertos tumores de encéfalo y tumores de médula espinal en adultos*. Recuperado de, 2020
2. De la Garza-Salazar F., Lankenau-Vela D., Cadena-Nunez B., Gonzalez-Cantu A., Romero-Ibarguengoitia M.E. The effect of functional and intra-coronary imaging techniques on fluoroscopy time, radiation dose and contrast volume during coronary angiography. *Scientific reports*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 1-8.

3. Deisboeck T.S., Zhang L., Yoon J., Costa J. In silico cancer modeling: is it ready for prime time? *Nature Clinical Practice Oncology*, 2009, vol. 6, no. 1, pp. 34-42.
4. Del Moral-Chavarrias L. (s/f) *Simulación numérica del crecimiento tumoral* (trabajo de grado de Matemáticas) Universidad de Zaragoza.
5. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, no. 5, pp. 646-674.
6. Ortiz-Pla J. *Desarrollo e implementación de un modelo matemático multiescala de crecimiento de glioblastoma y radioterapia, inicializado a partir de imágenes de resonancia magnética* (tesis de ingeniería biomédica). Universitat Politècnica de Valencia, 2017.
7. Saldana-Ulloa D. *Modelo de tratamiento para tumores en presencia de radiación* (tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2017.
8. Shrestha S.M.B., Joldes G., Wittek A., Miller K. Modeling Three-Dimensional Avascular Tumor Growth Using Lattice Gas Cellular Automata. In *Computational Biomechanics for Medicine*. Springer, New York, NY, 2014, pp. 15-26. doi:10.1007/978-1-4939-0745-8_2
9. Tan A. *Management of glioblastoma: State of the art and future directions*. MBBS, 2020, doi: 10.3322/caac.21613

ОЛИГОМЕРЫ УРОМОДУЛИНА В РАСТВОРАХ РАЗЛИЧНОЙ ИОННОЙ СИЛЫ И pH

Верлов Н.А., Ланда С.Б., Эмануэль В.Л.

НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ

Мкр. Орлова роца 0.1, 188300, РФ; e-mail: verlov_na@nrcpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию: 21.07.2021

Аннотация. В работе рассматривается влияние ионной силы и pH раствора на фракционную композицию олигомерных форм уромодулина. Белок уромодулин в моче находится в виде олигомерных форм, в норме основной вклад относится к олигомерной форме массой 7МДа (UM(7)). Показано, что в растворах, содержащих монофракцию UM(7) при уменьшении pH и при увеличении ионной силы раствора, за счёт увеличения концентрации одновалентных ионов, наблюдается появление олигомерной формы массой 28МДа (UM(28)) на фоне уменьшения вклада UM(7). Полученные данные подтверждены на образцах нативной мочи методом анализа треков наночастиц при обессоливании раствора мочи и при увеличении концентрации ионов Na⁺ при титровании 1М NaCl. В исследованном диапазоне концентрации солей показана стабильность белка уромодулина и его олигомерных форм методом дифференциальной сканирующей флуорометрии. Полученные данные позволили определить границу концентрации одновалентных ионов (находится в диапазоне 150 мМ Na⁺/K⁺) при превышении которой в моче в норме наблюдается образование UM(28). Подтверждены данные о переходе UM(7) в UM(28) при увеличении концентрации одновалентных ионов, однако сам феномен, а также роль UM(28) в стабилизации коллоида мочи, требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: Уромодулин, олигомеры, ионная сила, pH, титрование.

ВВЕДЕНИЕ

Уромодулин является основным белком мочи (в норме). Уромодулин экспрессируется исключительно клетками эпителия, выстилающими просвет канальца в толстом восходящем сегменте петли Генле. После выхода в просвет канальца нефрона мономеры, за счёт ZP-домена в структуре белка, демонстрируют тенденцию к образованию олигомеров – высокомолекулярных фибриллярных нитей, которые иногда можно обнаружить при микроскопическом исследовании осадка мочи в виде гиалиновых цилиндров. Олигомеры уромодулина играют важную роль в регуляции водно-ионного обмена, особенно в толстом восходящем сегменте петли Генле. Доказана их иммуномодулирующая роль и противобактериальная активность, а также показано, что именно олигомеры уромодулина играют существенную роль в стабилизации коллоида мочи за счёт ингибирования образования первичных микрокристаллитов и, возможно, препятствования агрегации уже образовавшихся микрокристаллов в более крупные конкременты. Несмотря на то, что белок экспрессируется исключительно в эпителиальных клетках канальца нефрона, его также можно определить в крови, где его концентрация почти в 1000 раз меньше, чем в моче. Уровень уромодулина в крови и моче является биомаркером функциональной активности почек [1].

В настоящее время опубликовано множество работ, описывающих связь концентрации уромодулина с тяжестью развития патологического процесса в почках, в том числе работ, в которых показано, что при мутациях в гене UMOD, кодирующем уромодулин, радикально возрастает риск возникновения уролитиаза и, как следствия тубулоинтестинальных повреждений - хронической болезни почек. Тем не менее, в настоящее время отсутствует единое мнение относительно механизмов, лежащих в основе стабилизирующего действия, которое оказывают на коллоид мочи олигомеры уромодулина. Важно отметить, что мономер уромодулина, вышедший в просвет канальца, является сильноотрицательным полианионом (за счет высокого содержания силовых кислот в 7 сайтах гликозилирования изoeлектрическая точка – 3,2). Олигомеры уромодулина, в т.ч. наиболее широко представленная в моче в норме олигомерная форма с массой 7МДа – UM(7), также сохраняют выраженные электроотрицательные свойства. Вклад крупной электроотрицательной молекулы в стабилизацию коллоида мочи является значимым в широком диапазоне pH и концентрации литогенных ионов в моче. Однако в области низких значений pH и при высокой концентрации литогенных ионов имеет место превращение формы UM(7) в олигомерную форму с молекулярной массой 28 МДа – UM(28), характеризующуюся меньшим поверхностным зарядом и демонстрирующую выраженную тенденцию к гелеобразованию. Данный феномен наблюдается в норме, но существенно более выражен при уролитиазе. Ранее авторами исследования было показано, что UM(7) обладает выраженными электроотрицательными свойствами (величина дзета-потенциала $-23,7 \pm 3,2$ мВ), тогда как UM(28) характеризуется существенно меньшим поверхностным зарядом - $-3,5 \pm 3,1$ мВ. Можно предположить, что стабилизация коллоида мочи в норме, в физиологически адекватном диапазоне концентраций одновалентных ионов, происходит за счет связывания избыточных ионов вблизи поверхности электроотрицательных молекул UM(7). При увеличении концентрации ионов, когда электроотрицательных свойств заряженной молекулы UM(7) становится недостаточно для ингибирования процесса кристаллогенеза в моче, наблюдается образование микрокристаллитов и их последующий рост в конкременты более крупных размеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения влияния pH и концентрации одновалентных катионов на олигомерные формы УМ готовили универсальный буфер из смеси уксусной фосфорной и борной кислот в эквимольном соотношении по 40 мМ каждая. До требуемого pH смесь доводили 200 мМ NaOH. В выбранном диапазоне pH ионная сила (IF) буферного раствора колебалась от 123 мМ для pH - 2,56 до 136 мМ для pH – 9,91. Для получения необходимой ионной силы раствор буфера либо разбавляли дистиллированной водой до нужной концентрации, либо доводили до нужной концентрации 1М или 3М раствором NaCl. Аликвоты белка, выделенного и очищенного, как описано выше, разбавлялись буфером в соотношении 1:1000 и помещались в кювету лазерного корреляционного спектрометра для определения фракционного состава. Для формы УМ(7) ($R_h = 100$ нм) строили кривые зависимости вклада в рассеяние от pH раствора для каждой ионной силы отдельно. Для выяснения различий в действии одновалентных катионов буферные растворы готовили также, только NaOH заменяли на KOH или водный раствор аммиака, а NaCl на KCl или NH₄Cl.

При исследовании образцов мочи проводилась оценка осадка мочи и общеклинический анализ мочи. При исследовании осадка мочи для осаждения конкрементов мочи использовали центрифугу Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific) с последующим микроскопическим анализом полученного осадка. Клинический анализ производился на анализаторе DocUReader (77 Elektronika) с использованием тест-полосок Labstrip U-11 Plus. Критерием включения в исследуемую группу являлось отсутствие в поле кристаллов оксалата.

Обессоливание образца мочи проводили двумя способами, с применением гель-фильтрации на колонке Sephadex G25 Coarse) и с применением процедуры диализа с использованием мембраны с размером пор 12-14 кДа. Контроль проводимости образца при диализе проводился с использованием Analog Electrical Conductivity Sensor /Meter V2 (DFRobot Gravity). Полученный в результате диализа ретентат отбирался через равные промежутки времени, для проведения анализа методом анализа треков наночастиц и методом корреляционной спектроскопии.

Метод анализа треков наночастиц позволяет исследовать состав коллоида и определять абсолютную концентрацию частиц коллоида и их размеров. Измерение проводилось на приборе NanoSight LM10 (Malvern instruments) с использованием лазерного источника 405 нм.

Метод корреляционной спектроскопии в настоящем исследовании реализован на лазерном корреляционном спектрометре DLS (ООО “ИнтоксМед”) с гетерогенной схемой измерения [2]. Результатом измерения образца является гистограмма распределения размеров частиц и вклада частиц, заданного размера, в рассеяние, при этом общее рассеяние всех частиц образца берется за 100%.

Оценка конформационной стабильности уромодулина в образцах нативной и разбавленной мочи проводилась с использованием метода дифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF) на установке Tycho (NanoTemper). Данным методом можно обнаруживать изменения флуоресценции ароматических остатков аминокислот (триптофан, тирозин) исследуемого белка при нагревании образца в капилляре, в процессе измерения производится регистрация флуоресценции на длинах волн 330/350 нм. Флуоресценция белка зависит окружения триптофанов и тирозинов входящих в его структуру, внутри гидрофобного ядра белков, аминокислоты экранируются от окружающего водного растворителя и не флуоресцируют в выбранном диапазоне, в процессе разворачивания происходит изменение интенсивности флуоресценции и/или длины волны максимума излучения.

Статистический анализ проводился в R – язык и среда для статистических вычислений (v. 4.0.4; R Core Team, Австрия) с использованием пакетов: rstatix (v. 0.7.0.; Alboukadel Kassambara, 2021), ggpubr (v. 0.4.0.; Alboukadel Kassambara, 2020), tidyverse (Wickham et al., 2019), PerformanceAnalytics (Brian G. Peterson., 2020). Различия в средних значениях для соседних групп анализировали с использованием критерия Стьюдента. Коэффициент корреляции Пирсона использовали для оценки статистической значимости взаимосвязи между двумя непрерывными переменными. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании образцов выделенного белка и образцов нативной мочи, на основании данных, полученных методом анализа треков наночастиц и динамического рассеяния света, количество олигомерной формы УМ(7), с характерным размером 100 нм, у здоровых людей всегда близко к 100 %, при титровании кривая имеет вид типичной «пороговой кривой» с точкой перегиба при концентрации 250 мМ для натрия и аммония и 150 мМ для калия. До достижения пороговой величины ионной силы при увеличении концентрации одновалентных ионов образование формы УМ(28) идет медленно, а при достижении порога концентрации резко ускоряется. Уровень в 10% достигается при концентрации равной 580 мМ для натрия, 545 мМ для аммония и 450 мМ для калия. Для натрия точка перегиба близка к физиологическому верхнему референтному интервалу концентрации этого катиона в моче (220 мМ). Для калия точка перегиба наступает при 150 мМ и еще больший запас имеется по аммонiu.

Переход из формы УМ(7) в форму УМ(28) происходит и при увеличении кислотности раствора. Кривые зависимости количества формы УМ(7) от pH так же, как и в случае с одновалентными катионами, носят ярко

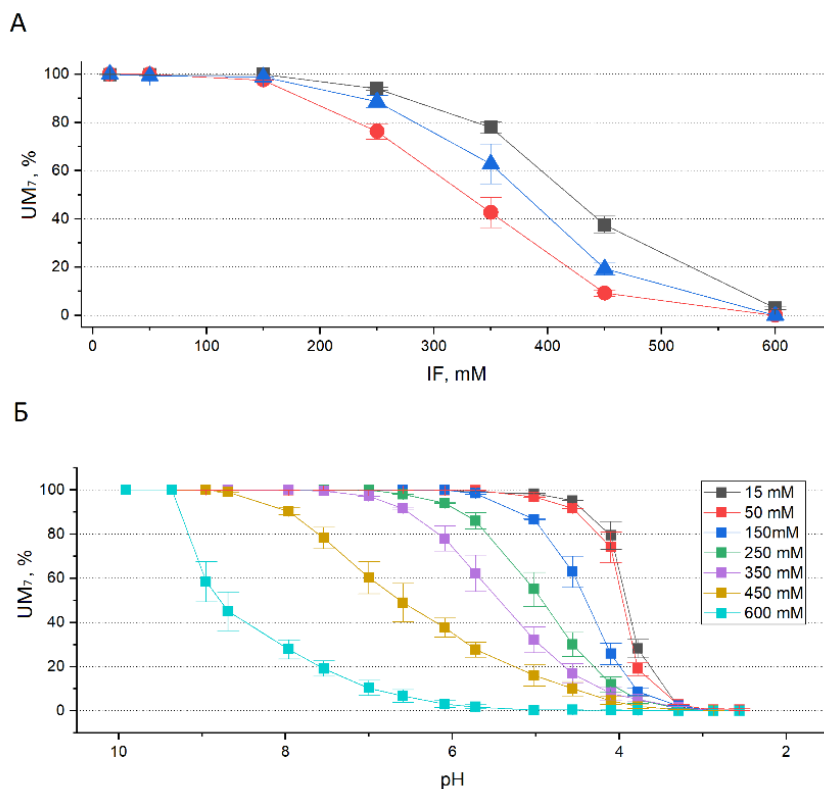


Рисунок 1. А - зависимость вклада в рассеяние UM(7) от ионной силы растворителя (при титровании NaOH, KOH и водным раствором NH₄); Б - зависимость вклада в рассеяние UM(7) от pH (в т.ч. при титровании при титровании NaOH)

выраженный пороговый характер. Особенно это заметно, когда концентрация соли в растворе не превышает физиологического диапазона (250 mM Na). В этом случае резкое уменьшение содержания формы UM(7) происходит при pH менее 4, то есть вблизи изоэлектрической точки нормального UM, при этом уровень 10% достигается при pH 3,5–4,0. При увеличении концентрации соли выше физиологического предела точка перегиба смещается сначала в область pH = 6, а затем и в область щелочных pH: при концентрации Na 450 mM точка перегиба находится при pH = 8, а при 600 mM NaCl кривая становится беспороговой. При этом 10% предел при концентрации соли 450 mM достигается при pH = 4,5, а при 600 mM NaCl при pH = 7.

Исходя из полученных зависимостей, можно сделать вывод, что превышение содержания одновалентных ионов сверх порогового значения приводит к трансформации UM(7) в UM(28) в тестовом растворе. Чувствительность раствора белка к концентрации ионов Na⁺, K⁺ и NH₄⁺ также различна, так перегиб для K⁺ наблюдается при 150 mM, а для Na⁺ - 250 mM. Зависимость содержания UM(7) от величины pH раствора также имеет пороговый характер (обратная шкала выбрана для того, чтобы показать переход от 100% UM(7) до 0%). Можно отметить, что pH и ионная сила раствора обладают аддитивным эффектом в части инициации процесса трансформации UM(7) в UM(28). Полученные зависимости позволяют сделать вывод о наличии процессов агрегации UM(7) и образования UM(28) внутри физиологически адекватного (для мочи в норме) диапазона параметров растворителя.

Сопоставление полученных данных с данными, полученными из литературных источников и данных, полученных в рамках исследования дзета-потенциала уромодулина, полученного от здоровых добровольцев, позволяют предположить следующее: изоэлектрическая точка белка уромодулина в норме располагается вблизи точки 3,5 [3], что можно видеть на кривых титрования (рис. 1Б) – точка перегиба находится в 3,5, при увеличении pH раствора наблюдаем увеличение абсолютной величины дзета-потенциала до величины $-23,7 \pm 3,2$ мВ.

При диализе образца мочи происходит обессоливание и удаление из образца низкомолекулярных соединений, в ретентате содержится олигомеры уромодулина UM(7) и UM(28) и альбумин. Предварительно образец мочи охарактеризован на предмет отсутствия кристаллов оксалатов в осадке мочи, для каждого образца в эксперименте проводили общеклинический анализ мочи, pH образцов мочи в эксперименте находилась в диапазоне от 5,5 до 7,5, остальные параметры мочи находились в диапазоне нормы. Проводимость нативной мочи в исследованных образцах находилась в диапазоне от 6,3 до 10,1 мСм/см, динамика изменения проводимости образца при диализе представлена на рисунке 2А. Проводимость раствора мочи в основном определяется содержанием ионов Na⁺ и K⁺, данные зависимости проводимости от суммарной концентрации Na⁺ и K⁺ в моче и данные, полученные при титровании хлорида натрия в водном растворе, представлены на рисунке 2Б. Измерение фракционного состава исследуемых образцов при различной проводимости представлены на Рисунке 2В. Можно отметить, что при увеличении проводимости раствора до 15 мСм/см (ионной силы раствора по Na⁺

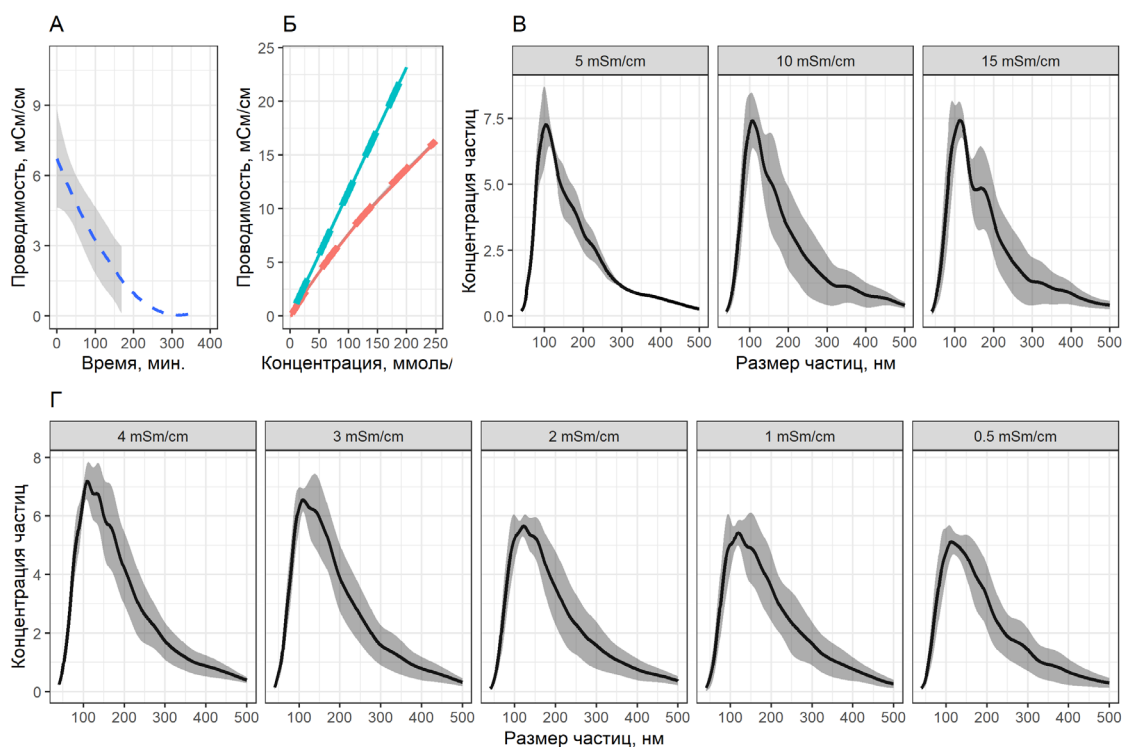


Рисунок 2. А – зависимость проводимости образца мочи от длительности диализа; Б – Зависимость проводимости образца мочи от концентрации ионов Na^+ и K^+ (синяя кривая) [4], кривая зависимости проводимости от концентрации NaCl (красная кривая); В – Фракционный состав мочи при титровании NaCl ; Г – фракционный состав мочи при диализе

и K^+ до 150 мМ см. рис. 2Б) можно наблюдать появление пика в области 150–200 нм соответствующий UM(28). Диализ раствора и постепенное снижение проводимости (ионной силы) до величины 0,5 мСм/см не приводит к изменению фракционного состава образца, при этом наблюдается изменения концентрации образца, что обусловлено разбавлением образца при диализе.

Для диализованных образцов и для образцов мочи для которых проводили титрование NaCl проводили процедуру оценку конформационной стабильности методом дифференциальной сканирующей флуорометрии. Ни Рисунок 3 представлены полученные данные, можно отметить, что несмотря на сдвиг на константу, а также отсутствие перегиба характерного для кривой плавления белка, зависимость отношения флуоресценции 330 нм / 350 нм в зависимости от температуры идентичны для всех исследованных образцов, что позволяет говорить о том, что структура и упаковка уромодулинов в исследованных образцах идентична и не меняется в зависимости от проводимых манипуляций.

ВЫВОДЫ

В рамках исследования показана зависимость содержания UM(7) и UM(28) в образцах выделенного белка уромодулина и в нативной моче при титровании в растворах с измененных pH и в растворах различной ионной

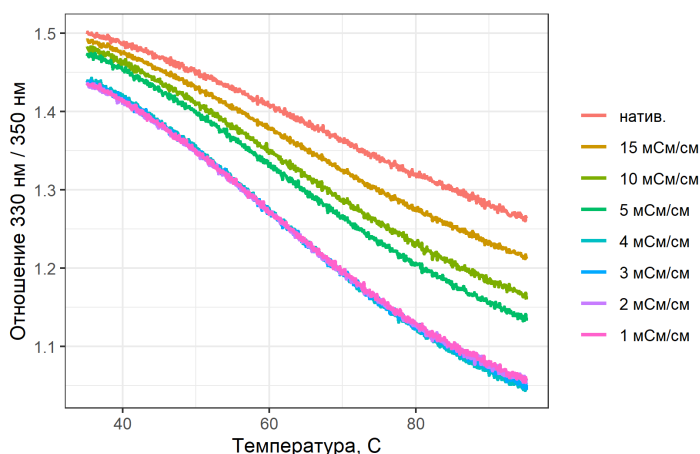


Рисунок 3. Данные дифференциальной сканирующей флуорометрии для исследованных образцов мочи при титровании NaCl и при диализе

силы. Можно отметить, что в исследованном диапазоне проводимости, данные динамического рассеяния света на образцах, полученных при титровании выделенного белка, совпадают с данными, полученными при титровании разбавлении и титровании NaCl нативной мочи. Можно сделать вывод, что в норме для уромодулина, как выделенного из мочи, так и находящегося в нативных условиях мочи диапазон начала образования UM(28) находится в диапазоне 150 mM Na⁺/K⁺.

Список литературы / References:

1. Devuyst O., Olinger E., Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2017, vol. 13, no. 9, pp. 525-544.
2. Lebedev A.D. et al. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.*, 1997, vol. 36, no. 30, pp. 7518-7522.
3. Pesce A.J. et al. Renal tubular interactions of proteins. *Clin. Biochem.*, 1980, vol. 13, no. 5, pp. 209-215.
4. Parkin W.G., Dickinson R.W. The use of electrical conductivity measurement in the calculation of ion-free water loss in urine. *Anaesth. Intensive Care*, 1987, vol. 15, no. 4, pp. 379-383.

OLIGOMERS OF UROMODULIN IN SOLUTIONS OF DIFFERENT IONIC STRENGTH AND PH

Verlov N.A., Landa S.B., Emanuel V.L.

NRC "Kurchatov Institute" - PNPI

Mkr. Orlova Roshcha 1, 188300, Russia; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Abstract. We investigated effect of ionic strength and pH solution on fractional composition uromodulin oligomeric forms. Uromodulin in urine exist in oligomeric forms: normally, main contribution belongs oligomeric form with a mass 7MDa (UM(7)). It has been shown that in solutions, monofraction UM(7) with a decrease in pH and with an increase in the ionic strength of the solution, due to an increase monovalent ion concentration, appearance oligomeric form with a mass 28MDa (UM(28)) against background of a decrease in contribution UM(7). Obtained data were confirmed on native urine samples by method of nanoparticle track analysis during urine solution desalting and with increasing Na⁺ ions concentration during titration with 1M NaCl. Stability of the uromodulin protein and its oligomeric forms in salt concentration range was shown by differential scanning fluorometry. Data obtained made it possible to determine limit of the concentration of monovalent ions (in range of 150 mM Na⁺ / K⁺), above which the formation UM(28) is observed in urine of healthy patients. The data on the transition of UM (7) to UM (28) with an increase in the concentration of monovalent ions have been confirmed; however, the phenomenon itself, as well as the role of UM (28) in stabilizing the urine colloid, require further study.

Key words: Uromodulin, oligomers, ionic strength, pH, titration.

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ ПАПАИНА С ИНГИБИТОРАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Сакибаев Ф.А.¹, Холявка М.Г.^{1,2}, Нехаев И.С.¹, Артюхов В.Г.¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

пл. Университетская, 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: farkhatlukum@gmail.com

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию: 23.07.2021

Аннотация. Цистеиновые протеазы имеют широкое распространение в природе, являются значимым звеном в физиолого-биохимических процессах во всех живых организмах. Точный контроль их протеолитической активности необходим для правильного функционирования целых клеток и организмов. В работе исследуются взаимодействия папаина с ингибиторами различной природы. Аминокислотный состав участков связывания определяли с помощью программы LigPlot. Выявлены аминокислотные остатки, непосредственно контактирующие с анализируемыми соединениями. Показано наличие как гидрофобных взаимодействий, так и водородных связей. Последние формируются в количестве: 4 с метиловым эфиром *N*-трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина с участием 3 аминокислотных остатков; 3 с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом и локсистатиновой кислотой (E64-с) с участием 3 остатков; 2 с хлорметилкетон с участием одного остатка. В реализации гидрофобных взаимодействий с локсистатиновой кислотой участвуют 10 аминокислотных остатков, по 13 с метиловым эфиром *N*-трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина, хлорметилкетон и сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом. Установлено, что в случае связывания папаина с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом не происходит перекрывания аминокислот активного центра, что может указывать на ингибирование фермента данным соединением посредством изменения пространственной структуры биокатализатора. Представленные в работе данные могут быть использованы при изучении характера взаимодействия папаин-подобных цистеиновых протеаз с их ингибиторами.

Ключевые слова: папаин, ингибиторы, аминокислотный состав, *in silico* анализ.

Цистеиновые протеазы являются одними из наиболее широко распространенных и актуальных для изучения протеаз. Они присутствуют практически во всех живых организмах и участвуют во множестве биологических процессов [1]. Сообщалось, что дисбаланс активности эндогенных цистеиновых протеаз может приводить к многочисленным патологиям, таким как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, неврологические расстройства, опухоли и остеопороз [2]. Цистеиновые протеазы, продуцируемые бактериями, вирусами и паразитами, также считаются важными факторами в развитии многих заболеваний человека, таких как пародонтоз [3], малярия, болезнь Шагаса, шистосомоз [4, 5]. Особого упоминания заслуживает роль папаин-подобной цистеиновой протеазы из SARS-CoV-2, которая необходима для процессинга вирусных полипротеинов во время вирусного распространения и защиты от врожденного иммунитета хозяина [6]. С более общей точки зрения, ферменты данной группы играют важную роль в росте, дифференцировке клеток, передаче сигналов и инвазии патогенов и часто действуют как фактор вирулентности, нападая на иммунную систему хозяина [6-8]. Таким образом, точный контроль протеолитической активности необходим для правильного функционирования целых клеток и организмов. Фактически, это достигается на многих уровнях, от регуляции экспрессии, секреции и созревания белка (посредством специфического расщепления профермента) до блокирования его активности посредством ингибирования специфическими соединениями [9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали модели пространственной структуры папаина, связанного с лигандами различной природы (табл. 1). Аминокислотный состав участков связывания определяли с помощью программы LigPlot.

Таблица 1. Лиганды, связанные с молекулой папаина

Номер модели в базе PDB	Лиганд
1KHQ	метиловый эфир <i>N</i> -трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина
1PIP	сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala- <i>p</i> -нитроанилид
1PPP	локсистатиновая кислота (E64-с)
5PAD	хлорметилкетон

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены сведения о взаимодействиях между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами. Выявлено формирование следующего количества водородных связей: 4-х с метиловым эфиром *N*-*mpet*-бутилоксикарбонил-фенил-глицина с участием 3 аминокислотных остатков; 3-х с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом и локсистатиновой кислотой (E64-с) с участием 3 остатков; 2-х с хлорметилкетонем с участием одного остатка. Расстояния и аминокислоты, участвующие при этом, приведены в таблице 2. В моделях 1KHQ и 1PPP в формировании водородных связей участвует остаток Cys25, входящий в состав активного центра папаина.

В формировании гидрофобных взаимодействий с локсистатиновой кислотой участвуют 10 аминокислотных остатков, по 13 с метиловым эфиром *N*-*mpet*-бутилоксикарбонил-фенил-глицина, хлорметилкетонем и сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом. Остатки Cys25 и His159, входящие в состав активного центра, принимают участие в данном типе взаимодействий в моделях 1KHQ, 1PPP и 5PAD (табл. 3).

Анализ комплекса молекулы папаина с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом как в случае водородных связей, так и при гидрофобных взаимодействиях не показал вовлеченность в них аминокислот активного центра. Это может указывать на тот факт, что в данном случае ингибирование осуществляется за счет изменения конформации фермента таким образом, что его связывание с субстратом либо реализация акта катализа становятся невозможными.

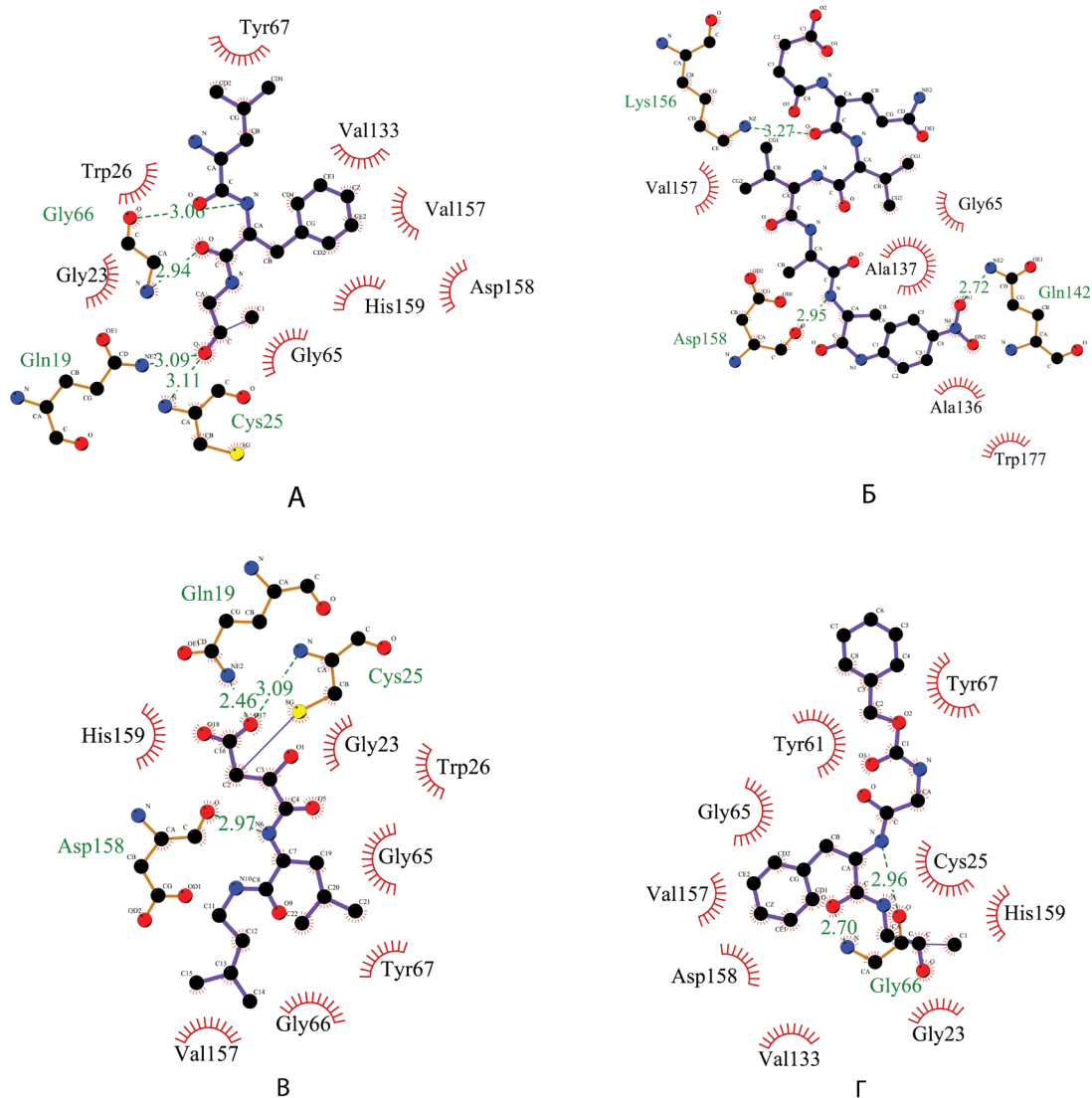


Рисунок 1. Связи (обозначены пунктирными линиями) и взаимодействия между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами в исследуемых моделях: А – 1KHQ, Б – 1PIP, В – 1PPP, Г – 5PAD

Таблица 2. Водородные связи между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами

Номер модели в базе PDB	Длина связи, Å	Аминокислотный остаток, с которым образуется водородная связь
1KHQ	3.09	Gln19
	3.11	Cys25
	3.06, 2.94	Cly66
1PIP	2.72	Gln142
	2.95	Asp158
	3.27	Lys156
1PPP	2.46	Gln19
	3.09	Cys25
	2.97	Asp158
5PAD	2.7, 2.96	Cly66

Таблица 3. Гидрофобные взаимодействия между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами

Номер модели в базе PDB	Аминокислотный остаток, с которым происходят гидрофобные взаимодействия
1KHQ	Gln19, Gly23, Cys25, Trp26, Gly65, Gly66, Tyr67, Val133, Val157, Asp158, His159, Phe252, Gly253
1PIP	Gly65, Ala136, Ala137, Gln142, Lys156, Val157, Asp158, Trp177, Gln400, Val401, Val402, Ala403, Ala404
1PPP	Gln19, Gly23, Cys25, Trp26, Gly65, Gly66, Tyr67, Val157, Asp158, His159
5PAD	Gly2, Phe3, Gly4, Gly23, Cys25, Tyr61, Gly65, Gly66, Tyr67, Val133, Val157, Asp158, His159

Представленные в работе данные позволяют сделать вывод о том, что ингибиторы могут формировать с остатком Cys25 активного центра папаина как водородные связи, так и участвовать в гидрофобных взаимодействиях. При этом инактивирующее действие, вероятно, может быть опосредовано не только физическим экранированием каталитически значимых аминокислот, но и через изменение конформации анализируемого фермента. Результаты нашей работы могут быть использованы при изучении характера взаимодействия папаин-подобных цистеиновых протеаз с их ингибиторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

Список литературы / References:

1. Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D., Turk V., Turk B., Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current pharmaceutical design*, 2007, vol. 13, no. 4, pp. 387-403.
2. Berdowska I., Ski M. The role of cysteine cathepsins and their inhibitors in physiological and neoplastic processes. *Postepy biochemii*, 2000, vol. 46, no. 1, pp. 73-84.
3. Memmert S., Damanaki A., Nogueira A.V., Eick S., Nokhbehshaim M., Papadopoulou A.K., Deschner J. Role of cathepsin S in periodontal inflammation and infection. *Mediators of inflammation*, 2017, vol. 2017, pp. 2017.
4. Ndao M., Nath-Chowdhury M., Sajid M., Marcus V., Mashiyama S.T., Sakanari J., Caffrey C.R. A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, vol. 57, no. 12, pp. 6063-6073.
5. Rosenthal P.J. Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. *Cysteine proteases of pathogenic organisms*, 2011, vol. 30, p. 48.
6. Zhang L., Lin D., Sun X., Curth U., Drosten C., Sauerhering L., Hilgenfeld R. Crystal structure of SARS-CoV-main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 2020, vol. 2, pp. 409-412.
7. Sajid M., McKerrow J.H., Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and biochemical parasitology*, 2002, vol. 120, no. 1, pp. 1-21.

8. Stoch S.A., Wagner J.A., Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2008, vol. 83, no. 1, pp. 172-176.
9. Hellinger R., Gruber C.W., Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug discovery today*, 2019, vol. 24, no. 9, pp. 1877-1889.

IN SILICO STUDY OF AMINO ACID COMPOSITION OF PAPAIN BINDING SITES WITH DIFFERENT NATURAL INHIBITORS

Sakibaev F.A.¹, Holyavka M.G.^{1,2}, Nekhaev I.S.¹, Artyukhov V.G.¹

¹ Voronezh State University

sq. Universitetskaya, 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: farkhatlukum@gmail.com

² Sevastopol State University

st. Universitetskaya, 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

Abstract. Cysteine proteases are widespread in nature, as well as they are an important link in physiological and biochemical processes in all living organisms. Precise control of their proteolytic activity is essential for the proper functioning of whole cells and organisms. The work investigated the interaction of papain with inhibitors of various natures. The amino acid composition of the binding sites was determined using the LigPlot software. Amino acid residues that are in direct contact with the analyzed compounds have been identified. The presence of both hydrophobic interactions and hydrogen bonds was shown. The latter are formed in the following amounts: 4 with methyl ester of *N*-tert-butyloxycarbonyl-phenyl-glycine with the participation of 3 amino acid residues; 3 with succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide and loxystatinic acid (E64-c) with the participation of 3 residues; 2 with chloromethyl ketone with the participation of one residue. In the implementation of hydrophobic interactions with loxystatinic acid, 10 amino acid residues are involved, 13 amino acid residues each with *N*-tert-butyloxycarbonyl-phenyl-glycine methyl ester, chloromethyl ketone and succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide. It was found that in the case of binding of papain to succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide, no overlapping of the amino acids of the active center occurs, which may indicate inhibition of the enzyme by this compound by changing the spatial structure of the biocatalyst. The data presented in this work can be used to study the nature of the interaction of papain-like cysteine proteases with their inhibitors.

Key words: *papain, inhibitors, amino acid composition, in silico analysis.*

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЛИТИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

Слобожанина Е.И., Зубрицкая Г.П., Скоробогатова А.С., Белевич Е.И., Венская Е.И.,
Лукияненко Л.М.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by
Поступила в редакцию: 26.07.2021

Аннотация. Выявлено достоверное увеличение внутриклеточной концентрации лития после воздействия на эритроциты 6-10 мМ Li_2SO_4 в течение 3 ч. Накопление ионов лития в эритроцитах сопровождается ингибированием их эстеразной активности, незначительным снижением уровня активных форм кислорода и увеличением проницаемости клеточной мембраны. Показано, что воздействие солей лития в токсичных концентрациях на эритроциты человека *in vitro* незначительно снижает уровень активных форм кислорода, но приводит к модификации физико-химического состояния мембраносвязанных белков и липидов. Полученные результаты являются основой для создания клеточной тест-системы для оценки токсичности лития.

Ключевые слова: эритроциты, литий, микроэлементы, активные формы кислорода, микровязкость липидов, мембраносвязанные белки.

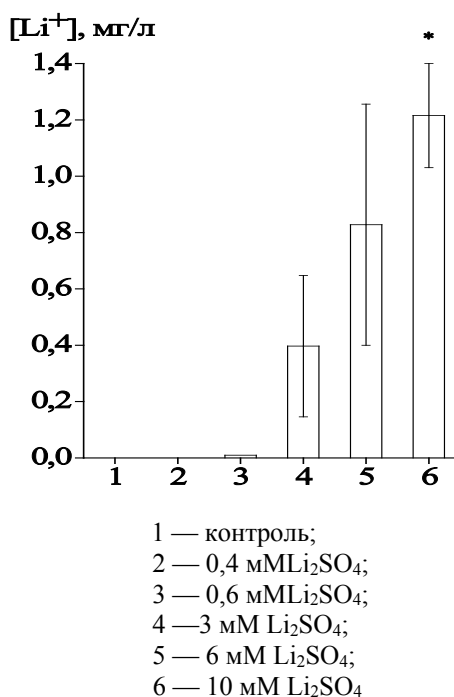
Литий является микроэлементом с малоизученной биологической ролью. Ежедневно вместе с пищей в организм человека поступает около 2 мг лития. Соли лития широко применяются в медицине в качестве психотропных и других лекарственных средств, а также в животноводстве в составе кормовых добавок. Литий используют и для изготовления литиевых аккумуляторов. Важно отметить, что литий воздействует на гомеостаз допамина, активность рецепторов серотонина [1]. Точные биохимические механизмы терапевтических эффектов лития до сих пор окончательно не установлены [2]. Препараты лития в терапевтических дозах обычно не производят никаких явных и немедленных психотропных эффектов, таких, как эйфория или наоборот депрессия, ни у здоровых людей, ни у больных с различными психическими заболеваниями. Все терапевтические эффекты лития развиваются медленно, постепенно [3]. Поиски специфического клеточного рецептора для лития продолжаются, но высокая концентрация лития, требующаяся для оказания существенного фармакологического эффекта, привела большинство исследователей к мысли о том, что существование подобного рецептора маловероятно. Вероятнее всего, литий оказывает своё терапевтическое действие за счёт конкуренции с другими ионами, прежде всего с ионами натрия и магния (с которыми ионы лития имеют наибольшее химическое сходство), и в гораздо меньшей мере – с ионами калия и кальция (с которыми сходство ионов лития значительно меньше), за их специфические ионные каналы, транспортные механизмы и места связывания с белками клеток [1]. Установлено участие лития в метаболизме простых сахаров (в т. ч. регуляции секреции инсулина), в обмене липидов, регуляции артериального давления, кроветворения [4]. Ферментные механизмы переноса лития через мембрану эритроцитов аналогичны таковым для клеток мозга, содержание ионов лития в эритроцитах может быть наилучшим способом предсказать его концентрацию в клетках мозга [5]. До сих пор неизвестны механизмы реализации фармакологического и токсического действия ионов лития на клетки крови, однако большой объем литературных данных позволяет предположить, что в зависимости от действующих концентраций литий способен оказывать как протекторное, так и токсическое воздействие.

Цель настоящей работы – выявить механизмы действия лития на эритроциты человека

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы периферической крови практически здоровых доноров. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500 g 5 мин. Затем эритроциты трижды отмывали в натрий-фосфатном буфере pH 7,4. Отмытые эритроциты (10 % гематокрит) инкубировали в PBS - буфере, содержащем Li_2SO_4 или LiCl (0,1-3 мМ фармакологические и 6-10 мМ токсические концентрации), в течение 3 ч при 37°C. Диапазон использованных концентраций солей лития отражал как используемые для терапии аффективных заболеваний, так и значения, при которых наблюдается проявление токсических эффектов в экспериментах *in vitro/in vivo* или при накоплении ионов данного элемента в крови пациентов, постоянно принимающих препараты лития.

Анализ элементного состава эритроцитов выполнен методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе ICPE-9000 (Shimadzu, Япония). Уровень образования активных форм кислорода в эритроцитах определяли с помощью 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (H_2DCFDA) по интенсивности конечного продукта – DCF. Оценку внутриклеточной эстеразной активности эритроцитов проводили по интенсивности флуоресценции кальцеина АМ. Цитофлуориметрический анализ на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (BeckmanCoulter, США), в FL-1 канале. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли спектрофотометрически по методу Элмана, а мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы – по скорости окисления NADH. Для выявления изменений микровязкости липидов в мембранах эритроцитов были



* — различия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Рисунок 1. Накопление лития в эритроцитах человека в зависимости от концентрации сульфата лития в среде инкубации

использованы липофильные флуоресцентные зонды 1-(4-триметиламмоний- 6-фенил-1,3,5-гексатриен (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафтален (лаурдан). Измерение параметров зондовой флуоресценции мембран эритроцитов проводили на спектрофлуориметре LSF-222 ("СОЛАР" Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре SPECORD M-40 (Германия).

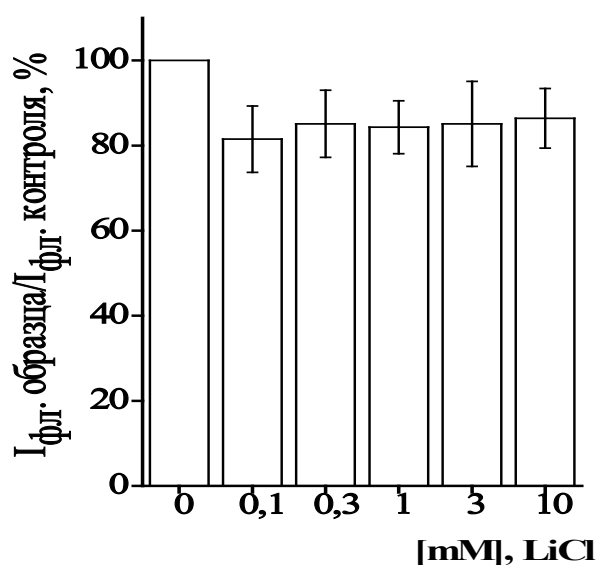
Все приведенные результаты являются средними значениями 5–12 независимых экспериментов. Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием параметрического критерия ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ). Статистически значимыми были признаны значения p ниже 0,05. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе проведена оценка влияния фармакологических и токсических концентраций солей лития на мембранные компоненты эритроцитов *in vitro*. Как известно, фармакологическая эффективность препаратов лития определяется их способностью вызывать стабильное повышение концентрации ионов лития в плазме крови и эритроцитах. Повышение концентрации ионов лития в крови не только способствует стабилизации настроения пациентов с психоневрологическими расстройствами, но и проявляет нейропротекторное действие [6]. Для изучения возможности накопления клетками ионов лития, а также изменения элементного статуса эритроцитов нами была проведена их предварительная инкубация в средах с концентрацией сульфата лития от 0,4 до 10 мМ в течение 3 ч при 37°C. В контрольных клетках (без воздействия соли лития) ионы лития обнаружены в следовых количествах, что согласуется с ранее полученными нами данными (рис. 1).

Обнаружено, что инкубация эритроцитов в среде, содержащей минимальные терапевтические концентрации сульфата лития (0,4 мМ и 0,6 мМ) не приводит к накоплению металла в клетке. Увеличение содержания сульфата лития в среде инкубации до 3 мМ (максимальная терапевтическая концентрация) привело к незначительному накоплению лития в клетках. Достоверное возрастание лития в эритроцитах происходило только при воздействии на них 10 мМ сульфата лития (рисунок 1). Полученные нами данные согласуются с литературными источниками, в которых показана возможность накопления ионов лития эритроцитами. Однако, вероятно, вследствие постоянной работы котранспорта Li^+/Na^+ в эритроцитах, в условиях невысокой концентрации элемента в среде инкубации не происходит его значимого накопления в клетках.

Одновременно с этим нами был изучен элементный профиль эритроцитов до и после инкубации их с терапевтическими и токсическими концентрациями сульфата лития. В исследуемых образцах наблюдалось незначительное увеличение уровня магния и натрия (например, в эритроцитах до инкубации с 6 мМ сульфатом лития содержание Mg $68,80 \pm 15,71$ и Na $871,10 \pm 171,80$ мг/л; после 3-х час инкубации – содержание Mg $78,83 \pm 16,79$ и Na $1071,60 \pm 221,53$ мг/л) Однако полученные результаты на данный момент не позволяют говорить о выраженных эффектах. Внутриклеточная конкуренция ионов лития с ионами натрия и коррекция им избыточного внутриклеточного содержания натрия остаётся одним из важных объяснений (но, как принято



За 100% принято среднее значение интенсивности флуоресценции DCF в контрольных образцах

Рисунок 2. Отношение значений медиан интенсивностей флуоресценции зонда DCF в эритроцитах после воздействия на них LiCl в различных концентрациях

считать сегодня, далеко не единственным и даже не главным) для объяснения механизмов его лечебного действия [3]. Исследования показывают, что как маниакальные состояния различного генеза, так и депрессивные состояния различного генеза сопровождаются повышенным уровнем окислительного, нитрозативного стресса, в качестве одного из возможных механизмов воздействия лития на клетки рассматривают повышение уровня активных форм кислорода (АФК) [7-9]. Стоит отметить, что в литературе имеются противоречивые данные о влиянии лития на продукцию АФК. Так, в работах [10-11] показано, что воздействие лития на кардиомиоциты и на клетки гепатоцеллюлярной карциномы приводит к повышению уровня АФК и последующему окислительному стрессу. С другой стороны, обнаружен протективный эффект лития на нейроны клеточной линии PC5 в условиях окислительного стресса, вызванного диабетической гипергликемией [12], а в работе [13] показано, что литий способен минимизировать побочные эффекты другого антипсихотического препарата «Оланзапина», обусловленные запуском окислительных и воспалительных реакций в клетках линии RAW 264.7, тогда как воздействие только лития на данный тип макрофагов приводило лишь к краткосрочному повышению уровня АФК и супероксид аниона в клетках. К началу наших исследований влияние лития на уровень АФК в эритроцитах оставалось не исследованным. Можно предположить, что воздействие лития на эритроциты будет влиять на протекание свободнорадикальных процессов в клетках и приводить к изменению уровня их жизнеспособности. Поэтому целью данного этапа стало изучение влияния лития в терапевтических и токсических концентрациях на образование АФК и жизнеспособность эритроцитов человека. Для выяснения влияния лития на протекание свободнорадикальных процессов в эритроцитах и жизнеспособность клеток были использованы терапевтические и токсические концентрации LiCl и флуоресцентный зонд H₂DCFDA. На рисунке 2 представлены данные об изменении интенсивности флуоресценции зонда DCF (маркера АФК) в эритроцитах, подвергшихся воздействию Li⁺ в течение 3 ч при 37°C. Из рисунка видно, что инкубация эритроцитов в среде, содержащей LiCl в концентрациях 0,1–10 mM, приводила к снижению интенсивности флуоресценции DCF на 15–20% по сравнению с контрольными клетками.

Снижение интенсивности флуоресценции DCF может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, для того, чтобы зонд мог вступить в реакцию с АФК, от H₂DCFDA внутриклеточные эстеразы должны отщепить ацетатные группы, если же активность внутриклеточных эстераз будет снижена, то будет снижена и продукция H₂DCF, способного вступить в реакцию с АФК. Во-вторых, в случае повышения проницаемости клеточной мембраны будет происходить выход DCF (флуоресцирующей формы зонда) из клеток в буфер, что проявляется в снижении интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах.

Далее было изучено изменение уровня жизнеспособности эритроцитов, подвергшихся воздействию LiCl. Маркером жизнеспособности эритроцитов является активность цитозольных внутриклеточных эстераз, которую оценивают с использованием красителя кальцеина-AM [14]. Данный краситель, проникая через мембрану клетки, гидролизуется внутриклеточными эстеразами до флуоресцирующего кальцеина (CAL) и удерживается внутри клеток с интактной мембраной [15]. На рисунке 3 представлены репрезентативные точечные диаграммы флуоресценции CAL в эритроцитах, обработанных различными концентрациями LiCl, на примере одного из доноров. Процентное содержание жизнеспособных эритроцитов, в выбранном по параметрам прямого и бокового рассеяния света регионе, в среднем составило 98,0±0,6%.

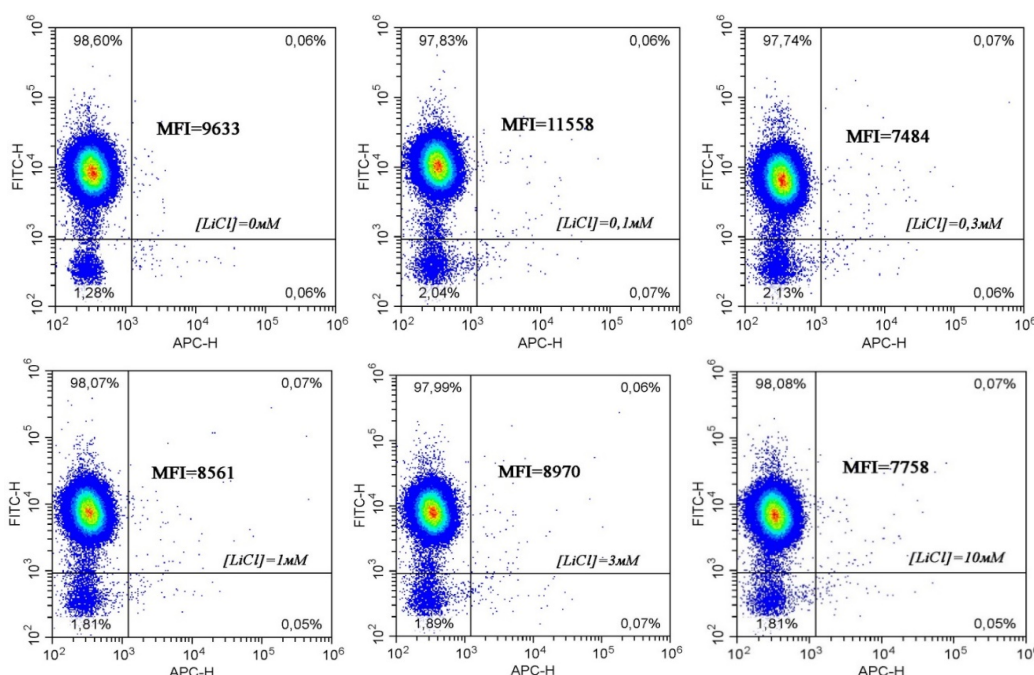


Рисунок 3. Репрезентативные точечные диаграммы, отражающие распределение эритроцитов, подвергшихся воздействию LiCl в концентрациях 0,3-10 мМ, по интенсивности флуоресценции кальцеина (отн.ед.)

Проведенные эксперименты позволили выявить статистически значимое снижение жизнеспособности эритроцитов на 20-25% по сравнению с контрольными клетками при воздействии на них LiCl в концентрациях 0,3-10 мМ в течение 3 ч при 37° С (рис. 3).

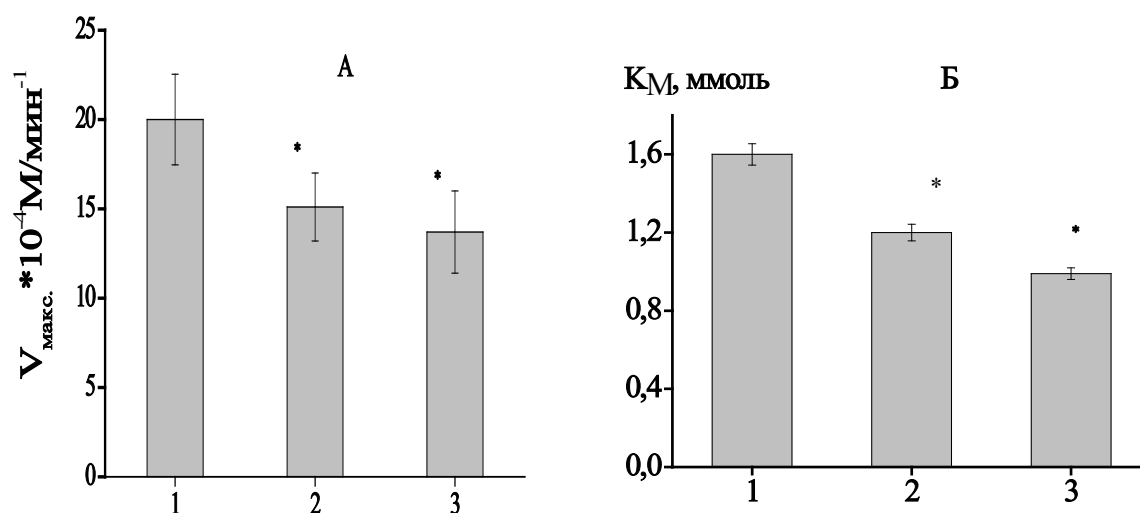
Полученные нами результаты согласуются с данными работы [16], где воздействие лития на эритроциты, истощенные по глюкозе, приводило к росту содержания Ca^{2+} и АТФ в цитозоле, и увеличению экспонирования фосфатидилсерина во внешнем липидном монослое мембраны эритроцитов, что свидетельствовало о запуске запрограммированной гибели эритроцитов – эритроптоза.

Изучение молекулярных механизмов действия соединений лития дает возможность понять как причины эффективности его применения при заболеваниях нервной системы, так и механизмы влияния на другие системы организма. В литературе показано, что ионы лития в фармакологических концентрациях оказывают существенное влияние на гомеостаз ацетилхолина, энкефалинов, катехоламинов (в том числе дофамина), серотонина и других нейротрансмиттеров. В частности, ионы лития влияют на активность АХЭ и секрецию ацетилхолина в коре головного мозга. Холин способствует активации транспорта ионов лития внутрь клеток. В процессе лечения пациентов с биполярными расстройствами карбонатом лития отмечено накопление холина в эритроцитах. Соли лития способствуют также стабилизации мускариновых рецепторов ацетилхолина, влияют на активность протеинкиназы С [17]. В литературе практически отсутствует информация о влиянии ионов лития на эритроцитарную АХЭ, которая структурирована в поверхностном слое мембраны в виде липопротеидного комплекса. Каталитическая активность мембраносвязанной АХЭ находится под контролем структурного состояния липидной фазы мембраны, а нарушение же структуры мембраны под действием ионов лития может привести к изменению конформации мембраносвязанных ферментов (например, АХЭ и метгемоглобинредуктазы).

Нами проведена серия экспериментов по изучению активности мембраносвязанных ферментов (АХЭ и метгемоглобинредуктазы) в эритроцитах, подвергшихся воздействию *in vitro* сульфата лития в фармакологических и токсических концентрациях. Как видно из рисунка 4, средние значения максимальной скорости ($V_{\text{макс}}$) (рис. 4, А) и константы Михаэлиса (K_M) мембраносвязанной АХЭ (рис. 4, Б) достоверно снижены ($p < 0,05$) в эритроцитах, подвергшихся воздействию максимальной фармакологической и токсической концентраций сульфата лития по сравнению с контролем.

При воздействии токсических концентраций (10 мМ Li_2SO_4) обнаружен наиболее выраженный эффект снижения параметров активности АХЭ в изолированных мембранах, чем при воздействии фармакологических концентраций (3 мМ Li_2SO_4). Из литературы известно, что активность АХЭ в нервных клетках в процессе жизни может снижаться в результате химических воздействий и генетических изменений. При этом относительно небольшое снижение активности АХЭ приводит к облегчению синаптической передачи, что позволяет применять ингибиторы АХЭ при лечении ряда заболеваний, тогда как значительное снижение активности АХЭ делает синаптическую передачу затруднительной [18]. Что касается эритроцитарной АХЭ, то функциональное значение ее до конца не изучено.

Другим ферментом, который привлек наше внимание при изучении влияния солей лития на эритроциты, явилась NADH-зависимая метгемоглобинредуктаза, которая ответственна за восстановление метгемоглобина (MetHb) до оксигемоглобина.



* – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Рисунок 4. Средние значения параметров активности ацетилхолинэстеразы (А – V_{max} , Б – K_M) в мембранах, изолированных из эритроцитов, которые были подвергнуты воздействию различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2, 3 – подвергшихся воздействию Li_2SO_4 в концентрациях 3 и 10 мМ соответственно

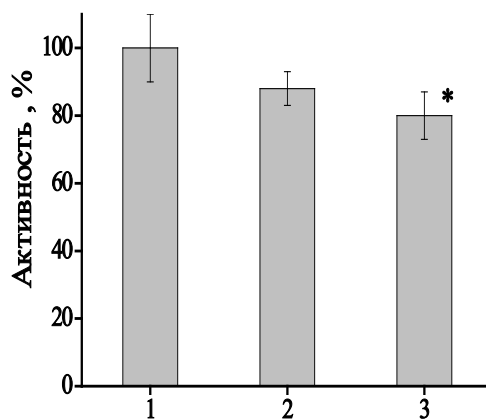
В молекуле гемоглобина железо присутствует в ферроформе (Fe(II)), однако под воздействием ряда физико-химических факторов оно может окисляться до ферриформы (Fe(III)). MetHb – продукт окисления железа в молекуле гемоглобина. Нормальная оксигенация гемоглобина предполагает высвобождение электрона из атома железа для связи с кислородом. Если железо гема не переходит обратно в ферроформу, то образуется MetHb, что в свою очередь приводит к нарушению транспорта кислорода. При высоком содержании MetHb присутствуют как полностью окисленные молекулы гемоглобина, так и частично окисленные – так называемые «валентные гибриды» с измененными функциональными параметрами. Они вызывают нарушение процессов оксигенации органов и тканей с развитием гипоксии и цианоза [19,20]. Возникновение метгемоглобинемии может быть связано с врожденными факторами, повышенным синтезом и/или уменьшением восстановления MetHb, а также с воздействием токсинов, которые резко влияют на окислительно-восстановительные реакции, увеличивая концентрацию MetHb.

Нами показано, что в эритроцитах, подвергшихся воздействию сульфата лития в фармакологических и токсических концентрациях, активность мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы была снижена на 13 % (3 мМ Li_2SO_4) и 20 % (10 мМ Li_2SO_4) по сравнению с контролем (рис. 5).

Таким образом, установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся *in vitro* воздействию как фармакологических, так и токсических концентраций сульфата лития, происходит снижение активности мембраносвязанных АХЭ и метгемоглобинредуктазы, что свидетельствует об индуцированном ионами лития изменении структурно-функционального состояния мембран эритроцитов.

Известно, что ключевую роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах, играет их текучесть (микровязкость). Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузные аспекты липидных составляющих мембран. Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от фосфолипидного состава, ненасыщенности липидов и содержания холестерина в мембранах. Изменение вязкостных характеристик отражает различные модификации межмолекулярных связей, которые, по сути, определяются сочетанием уровней подвижных и стабильных взаимодействий компонентов мембран. Важность поддержания относительной стабильности структуры мембран определяется необходимостью сохранения тех специфических мембранных функций, которые вызваны их тканевой принадлежностью, клеточной специализацией. Относительная стабильность связана с бислойностью липидной организации мембран, характерным для каждого вида мембран химическим составом и сохранением асимметричности в распределении белков и липидов во внутренних и поверхностных слоях и в создании агрегатов липидов с белками, липидов с липидами, липидных рафтов и белковых комплексов в пределах слоя [21,22].

Для выявления изменений микровязкости липидов в мембранах эритроцитов при воздействии сульфата лития нами были использованы липофильные флуоресцентные зонды ТМА-ДФГ и лаурдан, параметры флуоресценции которых позволяют оценить изменение физического состояния фосфолипидов на разной глубине липидного бислоя мембран. Известно, что ТМА-ДФГ равномерно распределяется в мембране, встраиваясь в гидрофильной области полярных головок фосфолипидов [23], а лаурдан встраивается в мембрану в гидрофильно-



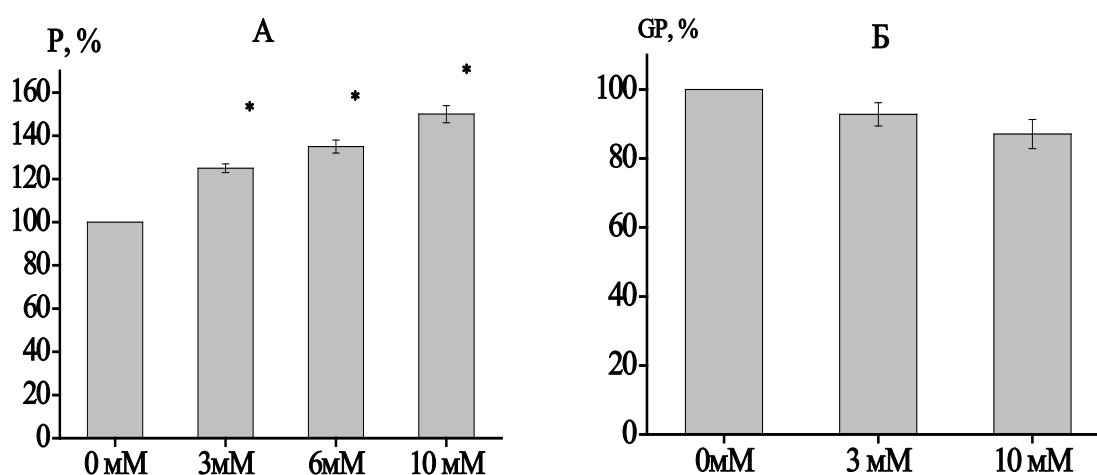
– *различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

За 100 % принято среднее значение активности фермента в нативных эритроцитах

Рисунок 5. Средние значения активности мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы в мембранах, изолированных из эритроцитов, подвергшихся воздействию различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2, 3 – подвергшихся воздействию Li_2SO_4 в концентрациях 3 и 10 мМ соответственно

гидрофобной области липидного бислоя, при этом остаток лауриновой кислоты локализуется в основном в области углеводородных цепочек жирных кислот фосфолипидов, а его флуоресцентный нафталиновый остаток – на уровне полярных головок фосфолипидов [24].

Нами выявлено достоверное повышение степени поляризации флуоресценции (P) ТМА-ДФГ в изолированных мембранах из эритроцитов, подвергшихся воздействию сульфата лития: в фармакологических (3 мМ) – на 25 %, в токсических концентрациях (6 и 10 мМ) – на 35 и 40-45 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 6, А). Известно, что ТМА-ДФГ обладает интенсивной флуоресценцией и чувствителен к физическому состоянию липидов в мембранах, а значение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ прямо пропорционально изменению микровязкости гидрофильной области липидного бислоя мембран. Увеличение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в изолированные мембраны эритроцитов, свидетельствует о снижении текучести липидного бислоя в мембранах под влиянием ионов лития. Обнаружено незначительное снижение генерализованной поляризации (GP) флуоресценции лаурдана, включенного в изолированные мембраны из эритроцитов, обработанных как фармакологическими, так и токсическими концентрациями сульфата лития, по сравнению с контролем (рис. 6, Б).



* – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

За 100 % принято среднее значение поляризации флуоресценции зонда в контрольных образцах

Рисунок 6. Флуоресцентные параметры ТМА-ДФГ (А, $\lambda_{\text{возб.}} = 365$ нм) и лаурдана (Б, $\lambda_{\text{возб.}} = 340$ нм), встроенных в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия различных концентраций сульфата лития

Полученные результаты позволяют предположить, что имеется сильное электростатическое взаимодействие ионов лития с мембранными липидами клеток и с гидрофобными частями белковых молекул, чем отчасти можно объяснить фармакологическую и токсическую специфичность иона лития. Более высокая липофильность лития по сравнению с натрием, калием, рубидием и цезием играет важную роль в механизмах его фармакологического и токсического действия [3]. Вблизи гидрофобных участков мембран катион лития с легкостью теряет свои «водные оболочки» и электростатически взаимодействует с липидными мембранами клеток или с гидрофобными частями белковых молекул, изменяя их конфигурацию или даже встраиваясь в них [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию *in vitro* солей лития в фармакологических и токсических концентрациях, происходит снижение уровня жизнеспособности и АФК в эритроцитах, что говорит о снижении эстеразной активности в них, а также об увеличении проницаемости клеточной мембраны при воздействии ионов лития на клетки, что, в свою очередь, указывает на потенциальную токсичность ионов лития для эритроцитов человека. Снижение параметров активности мембраносвязанных ацетилхолинэстеразы и метгемоглобинредуктазы, а также изменение параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов дает основание заключить, что на разной глубине липидного бислоя мембран имеет место литий-индуцированная модификация липидов. Полученные результаты могут быть использованы для создания клеточной тест-системы для оценки токсичности лития.

Список литературы / References:

1. Chang C.M., Wu C.S., Huang Y.W., Chau Y.L., Tsai H.J. Utilization of psychopharmacological Treatment Among Patients With Newly Diagnosed Bipolar Disorder From 2001 to 2010. *J Clin Psychopharmacol*, 2016, vol. 36, no. 1, pp. 32-44.
2. Birch N.J. Lithium and the cell: pharmacology and biochemistry. *New York: Academic Press*, 2012.
3. Ruiz P. Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry. *Cambridge: Cambridge University Press*, 2017, pp. 418.
4. Остренко К.В., Громова О.А., Сардарян И.С. Демидов В.И. Эффективность аскорбата лития на модели хронической алкогольной интоксикации, *Фармакинетика и фармакодинамика*, 2017, № 1, с. 11-21. [Ostrenko K.V., Gromova O.A., Sardaryan I.S. Demidov V.I. The effectiveness of lithium ascorbate on the model of chronic alcohol intoxication, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2017, no. 1, pp.11-21. (In Russ.)]
5. McNamara R.K., Jandacek R., Tso P., Blom T.J., Welge J.A., Strawn J.R., Adler C.M., Delbello M.P., Strakowski S.M. First-episode bipolar disorder is associated with erythrocyte membrane docosahexaenoic acid deficits: Dissociation from clinical response to lithium or quetiapine. *Psychiatry Res.*, 2015, vol. 230, no. 2, pp. 447-453.
6. Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Громова О.А., Расташанский В.А., Федотова Л.Э. Хемореактомное моделирование аскорбата лития. *Фармакинетика и фармакодинамика*, 2016, no. 3, с. 47-58. [Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., Gromova O.A., Rastashansky V.A., Fedotova L.E. Chemoreactom modeling of lithium ascorbate. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2016, no. 3, pp. 47-58 (In Russ.)]
7. Лукьяненко Л.М., Скоробогатова А.С., Логацкая М.А., Кутько А.Г., Касько Л.П., Слобожанина Е.И. Микроэлементы в эритроцитах беременных женщин с риском развития метаболического синдрома. Сборник материалов X-й международной конференции "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем", Минск, 2012, № 2, с. 179-182. [Lukyanenko L.M., Skorobogatova A.S., Logatskaya M.A., Kutko A.G., Kasko L.P., Slobozhanina E.I. Trace elements in erythrocytes of pregnant women at risk of developing metabolic syndrome. Collection of materials of the X-th international conference "Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems" Minsk, 2012, no. 2, pp. 179-182. (In Russ.)]
8. Jakobsson E., Arguello-Miranda O., Chiu S.W., Fazal ZKruczek J., Nunez-Corrales S., Pandit S., Pritchett L. Towards a unified understanding of lithium action in basic biology and its significance for applied. *Biology. J. Membr. Biol.*, 2017, vol. 250, no. 6, pp. 587-604. DOI: 10.1007/s00232-017-9998-2
9. Malhi G.S., Tanious M., Das P., Coulston C.M., Berk M. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. *Current understanding. CNS drugs*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 135-153. DOI: 10.1007/s40263-013-0039-0
10. Lee Y., Kim S.M., Jung E.H., Park J., Lee J.W., Han I.O. Lithium chloride promotes lipid accumulation through increased reactive oxygen species generation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.*, 2019, vol. 1865, no. 2, pp. 1-27.
11. Fernandes M.S., Barbisan F., Azzolin V.F., Schmidt do Prado-Lima P.A., Teixeira C.F., Cruz Jung I.E. da. Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 1-16.
12. Aminzadeh A., Dehpour A., Safa M., Mirzamohammadi S. Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2014, vol. 34, no. 8, pp.1143-1150.
13. Wu C.P., Klokouzas A., Hladky S.B., Ambudkar S.V., Barrand M.A. Interactions of mefloquine with ABC proteins, MRP1 (ABCC1) and MRP4 (ABCC4) that are present in human red cell membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 2005, vol. 70, no. 4, pp. 500-510.

14. Bratosin D., Tcacenco L., Sidoroff M., Cotoraci C., Slomianny C., Estaquier J., Montreuil. Active caspases-8 and caspases-3 in circulating human erythrocytes purified on immobilized annexin-V: a cytometric demonstration. *Cytometry A.*, 2009, vol. 75A, pp. 236-244.
15. Nicolay J.P., Gatz S., Lang F., Lang U.E. Lithium-induced suicidal erythrocyte death. *J. Psychopharmacol.*, 2010, vol. 24, no. 10, pp. 1533-1539.
16. Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров С.Д. Бабенко В.А. Скулачев М.В., Зоров Д.Б. Соли лития простые, но магические (обзор). *Биохимия*, 2014, т. 9, № 8, с. 932-943. [Plotnikov E.Yu., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Yankauskas S.S., Zorov S.D., Babenko V.A., Skulachev M.V., Zorov D.B. Lithium salts are simple but magical (review). *Biochemistry*, 2014, vol. 9, no. 8, pp. 932-943 (In Russ.)]
17. Hillert M.H., Imran I., Zimmermann M., Lau H., Weinfurter S., Klein J. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *J. Neurochem.*, 2014, vol. 131, no. 1, pp. 42-52. doi: 10.1111/jnc.12787
18. Vlachos D.G., Schulpis K.H., Antsaklis A., Mesogitis S., Biliatis I., Tsakiris S. Erythrocyte membrane AchE, Na, K-ATPase and Mg-ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2010, vol. 70, no. 8, pp. 568-574. doi: 10.3109/00365513.2010.527365
19. Топунов А.Ф., Космочевская О.В. Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование. *Биомика*, 2018, т. 10, № 3, с. 251-267. [Topunov A.F. Kosmochevskaya O.V. Multiple functional forms of hemoglobin in the human body: modern view and practical use. *Biomics*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 251-267. (In Russ.)]
20. Gay H.C. Amaral A.P. Acquired methemoglobinemia associated with topical lidocaine administration: a case report. *Drug Safety – Case Reports*, 2018, vol. 5, № 1, pp. 15-20. doi: 10.1007/s40800-018-0081-4
21. Мокрушников П.В. Методика и результаты измерения микровязкости биомембран. *Тр. Новосиб. гос. архит.-строит. ун-та (Сибистрин)*, 2018, т. 2, № 1, с. 17-24. [Mokrushnikov P.V. Methods and results of measuring the microviscosity of biomembranes. *Tr. Novosib. state architect-build un-that (Sibistrin)*, 2018, vol. 2, no. 1, pp. 17-24. (In Russ.)]
22. Li H., Lykotrafitis G. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophys. J.*, 2014, vol. 107, no. 3, pp. 642-653. doi: 10.1016/j.bpj.2014.06.031
23. Ballweg S., Ernst R. Control of membrane fluidity: the OLE pathway in focus. *Biol. Chem.*, 2017, vol. 398, no. 2, pp. 215-228. doi: 10.1515/hsz-2016-0277
24. Bagatolli L., Mely Y., Duportail G. Laurdan fluorescence properties in membranes: a journey from the fluorometer to the microscope. *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*, Heidelberg, 2012, pp. 3-35.
25. Bekker R.A., Bykov Yu.V. Lithium preparations in psychiatry, addiction medicine and neurology. Part II. Biochemical mechanisms of its action. *Acta Biomed. Scientifica*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 82-102. doi: 10.29413/ABS.2019-4.2.13

MECHANISMS OF LITHIUM ACTION ON HUMAN ERYTHROCYTES

Slobozhanina E.I., Zubritskaya G.P., Skarabahatava A.S., Belevich E.I., Venskaya E.I., Lukyanenko L.M.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus

Akademicheskaya str., 27, 220072 Minsk, Republic of Belarus; e-mail: slobozhanina@ibp.org.by

Abstract. A significant increase in the intracellular concentration of lithium was revealed after exposure of erythrocytes to 6-10 mM Li_2SO_4 for 3 hours. The accumulation of lithium ions in erythrocytes is accompanied by inhibition of their esterase activity, a slight decrease in the level of reactive oxygen species and an increase in the permeability of the cell membrane. It has been shown that the effect of lithium salts in toxic concentrations on human erythrocytes in vitro slightly reduces the level of reactive oxygen species, but leads to a modification of the physicochemical state of membrane-bound proteins and lipids. The results obtained are the basis for creating a cell test system for assessing the toxicity of lithium.

Key words: erythrocytes, lithium, trace elements, reactive oxygen species, lipid microviscosity, membrane-bound proteins

КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Сологуб Т.В.¹, Мастерова О.А.², Ермолаев Ю.Л.³, Овсянников В.А.³,¹ СПб Медицинская академия последипломного образования

г. Санкт-Петербург, РФ

² СПб «Центр Профилактики и борьбе со СПИД»

г. Санкт-Петербург, РФ

³ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе

г. Санкт-Петербург, РФ; e-mail: victorovs@mail.ru

Поступила в редакцию: 28.07.2021

Аннотация. Инфекционные вирусные заболевания можно лечить с помощью фармацевтических препаратов, а также, способом восстановления собственных защитных систем организма больного. У человека есть система, которая сама распознаёт инородные вирусы, их уничтожает и выводит из организма – это фагоцитарная система. При вирусных заболеваниях её способности сильно уменьшаются. Поэтому, ещё в конце прошлого века был предложен способ восстановления свойств этой системы с помощью неинвазивных лазерных терапевтических воздействий на кровь и иммунокомпетентные зоны организма больного – костный мозг. Создана специальная лазерная аппаратура, и проведены расчёты количества лазерной энергии на длине волны 890нм, которую необходимо доставить при транскутанном облучении больного, до костного мозга. Таким способом можно обеспечить его нормальную работу и восстановить собственные защитных системы организма больного. Предложенный способ был проверен в клиниках С.-Петербурга и Москвы: с его помощью было зарегистрировано выздоровление больных вирусными гепатитами (300 человек), серозными менингитами (47 человек) и ВИЧ инфицированных больных (свыше 100 человек). Лазерные терапевтические воздействия проводились при одновременном использовании, имевшихся в то время в клиниках, фармацевтических средств для лечения таких больных. При таком комплексном лечении, больные выздоравливали в более короткие сроки и без рецидивов заболеваний. При этом был установлен клиническими исследованиями и объяснён теоретически, противотромбозный эффект от лазерных воздействий на зоны костного мозга. Медицинской частью этих исследований руководила профессор Сологуб Тамара Васильевна; лазерной частью – Овсянников В.А. Результаты этих исследований докладывались на российских и международных конференциях и защищены патентами РФ. На их основе были защищены две кандидатские и одна докторская диссертации, а также выпущено и утверждено в 2001 г. Минздравом РФ «Пособие для врачей-клиницистов, клинических ординаторов и студентов медицинских вузов». К сожалению, сейчас этот способ незаслуженно забыт Минздравом РФ. В докладе будут рассмотрены возможности его использования для лечения других вирусных заболеваний.

Ключевые слова: лечение, вирусы, восстановление свойств фагоцитарной и антиоксидантной системы, тромбы лазерная терапия.

Когда в России появился вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), от него не было средств и способов лечения. По просьбам врачей, физиками был создан способ восстановления собственных защитных систем самого больного, а именно, фагоцитарной системы человека.

Эта система состоит из частиц крови – лимфоцитов, которые распознают инородные вирусы, вступают с ними в контакт, уничтожают их и выводят из организма. Но возможности этой системы ограничены, и при инфекционных вирусных заболеваниях они сильно ослабевают. Когда защитные способности фагоцитарной системы заканчиваются, и ей не помогают извне, человек может погибнуть.

В данной работе показано, что в Санкт-Петербурге ещё в 90-х годах был создан способ восстановления собственных защитных систем от вирусных заболеваний на основе лазерных терапевтических воздействий. Он успешно проверен в клиниках при лечении больных вирусными гепатитами В и С, больных ВИЧ инфицированных и серозным менингитом. Он сочетался с традиционным фармацевтическим лечением, поэтому лечение проводится комплексом и фармацевтическими воздействиями, и лазерными воздействиями на иммунокомпетентные зоны организма больного.

Способы лазерной терапии используются при лечении ряда заболеваний с эффективностью в 2-5 раз больше, чем одно фармацевтическое лечение [1]. Они стали применяться даже для лечения некоторых заболеваний, которые считались неизлечимыми, например, для лечения лучевых реакций у онкологических больных, получающих лучевую терапию [2], для лечения больных сахарным диабетом [3] или для лечения онкологических больных в стадии метастазирования [4]. Для них лазерная терапия стала единственным особым сохранения жизни. Значит, лазерная терапия в своей основе имеет что-то фундаментальное, чего принципиально нет у фармацевтической терапии.

У здорового человека в процессе уничтожения вирусов участвует только 60%- 65% от всех лимфоцитов – это лимфоциты хелперы и киллеры CD-4 и CD-8. Их процент называется фагоцитарным индексом.

При инфекционных заболеваниях количество лимфоцитов, участвующих в фагоцитозе, естественно, снижается. Организм не успевает выращивать новые лимфоциты.

Так, при урогенном сепсисе фагоцитарный индекс снижается до 30%, а у ВИЧ – до 38%. Для каждого больного это снижение будет своё. Свойства самих лимфоцитов в процессе заболевания тоже изменяются. У здорового человека каждый лимфоцит поглощает и выводит из организма, в среднем, 6,3–7,0 вирусов – эта величина называется фагоцитарное число.

При заболевании каждый лимфоцит будет поглощать меньшее количество вирусов: так, при урогенном сепсисе каждый лимфоцит поглощает только 3,4 вируса, а при ВИЧ – только 3,8 вируса.

Мы знали, что с помощью воздействий инфракрасным, низкоинтенсивным лазерным излучением на живые ткани можно нормализовать энергетический цикл их клеток, и, в результате, лечить ряд заболеваний [5-7].

Если мы хотим восстановить фагоцитарные способности лимфоцитов, то можно воздействовать на кровь в подкожных венах. Так рекомендуют делать при лечении инфекционных вирусных заболеваний авторы книги [1].

Если же мы хотим увеличить само количество лимфоцитов, участвующих в фагоцитозе, то надо воздействовать на зоны их созревания и дифференцировки – на костный мозг [2]. Для доставки нужного количества лазерной энергии для таких задач через кожу, подкожные мышцы и костную ткань до костного мозга, потребовалось создать новую лазерную установку. Промышленно выпускаемые лазеры не могли доставить нужную энергию до костного мозга.

Для повышения глубины тканей, до которых можно доставить нужное количество лазерной энергии, в нашем лазере предусмотрена схема сложения лучей нескольких лазеров под кожей. Таким способом мы увеличиваем глубину терапевтического воздействия наших лазеров [8]. В дальнейшем мы работали только с такими лазерами.

Такие лазеры получили название – лазеры с матричными излучателями. Модель «АЛТ-НИИЭФА – Солнышко», получила разрешение Минздрава РФ: «на производство и клиническое применение» [9]. С его помощью в клиниках Санкт-Петербурга и Москвы лечение прошли свыше 1000 больных с различными заболеваниями. При этом ни у одного больного не было зарегистрировано отрицательных побочных эффектов. Научно-технические отчёты об этих работах регулярно сдавались в Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга.

Попав в организм человека, вирус не только вызывает истощение резервов фагоцитарной системы, но даёт осложнения. Он может разрушать другие системы, в частности, антиоксидантную систему.

Если «посмотреть глубже», то причиной тромбозов следует признать «нарушение работы антиоксидантной системы», начинающееся с изменения функционирования ферментативного звена антиоксидантной системы, а именно, с нарушения реакционно – способных тиоловых групп SH и SS и возрастания количества дисульфидных групп SS в сыворотке крови.» [11].

Так в организме больного происходит нарушение липидного обмена, приводящее к тромбообразованию, закупорке сосудов, осложнениям и к смерти больного.

Известно, что коронавирус COVID-19 приводит к пневмонии. Эта пневмония, по наблюдению московского патоморфолога Л. Селивановой [10], «приводит к тромбозам лёгочных и коронарных артерий и мелких вен», и является причиной гибели большинства больных. Поэтому некоторые врачи считают, что в лечении этих больных следует «применять как можно раньше антикоагулянты».

Исследование возможностей лазерной терапии для лечения больных вирусными гепатитами проводилось в Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И. Мечникова на базе двух отделений.

Оказалось, что при заболевании гепатитом С, в отличие от гепатита В, происходят значительные поражения стромальных клеток костного мозга, что приводит к более тяжёлому протеканию болезни. [11,12] Эти поражения приводят к изменениям интенсивности окисления липидов. Но лазерные терапевтические воздействия на иммунокомпетентные зоны, одновременно с восстановлением фагоцитарной системы, способны восстановить соотношения концентрации тиоловых групп SS и SH, которое характеризует нормализацию работы антиоксидантной системы.

Впервые это было установлено Мастеровой О.А. [11].

Клинически это выражалось так: при лечении больных серозным менингитом: через 6–8 сеансов лазерной терапии улучшалось общее состояние больных и срок лечения больных, получивших курс лазерной терапии, в больнице сокращался, примерно на 10 % без признаков тромбообразования. [2,11-13]

Итак, мы создали лазер, излучением которого мы можем не только нормализовать работу тканей костного мозга и восстановить фагоцитарные способности больных, но и нормализовать работу антиоксидантной системы.

Фагоцитарный индекс, и фагоцитарное число у больных урогенным сепсисом восстанавливается до 58% и до 6,3 число поглощаемых вирусов. У ВИЧ инфицированных больных фагоцитарный индекс восстанавливался до 60% и число поглощённых вирусов – до 6,2.

Эти результаты были получены ещё в 90-х годах и без оптимизации режимов лазерного восстановления фагоцитарных способностей и антиоксидантной системы. Значит, таким способом можно в четыре раза, т.е. почти до нормы здорового человека, восстановить ослабленную вирусным заболеванием фагоцитарную систему больного.

В клинических условиях после курса лазерного облучения у больных быстрее стали вырабатываться новые лимфоциты. Это показали лабораторные исследования крови больных.

В результате такого комплексного лечения инфекционные больные с вирусными заболеваниями стали выздоравливать в более короткие сроки. Об этом мы доложили на ряде российских и зарубежных научных конференциях, включая, три международных конгресса по лечению ВИЧ больных. Эти результаты были опубликовали в научной печати и защитили патентами РФ [15-26].

Лазерные воздействия рекомендуется проводить ежедневно за один сеанс, путём последовательного облучения всех иммунокомпетентных зон и крови в крупных венах:

1. Грудина – тимус,
2. Подвздошные крылья
3. Печень – селезенка
4. Облучение шейных, локтевых и подколенных вен
5. Паравerteбральные зоны позвоночника, облучение со спины.

Мы использовали лазер с излучателем, составленным из 20 групп лазерных полупроводниковых излучателей ЛПИ -101, длина волны излучения - 890 нм, по 5 лазеров в группе, смонтированных вплотную с минимальными изоляционными зазорами между ними.

Всего 80 лазеров в матричном излучателе.

Средняя мощность излучения одного лазера 4–5 мВт.

Матричная головка лазера располагалась вплотную к коже, облучение каждой зоны проводили в сканирующем режиме.

Все лазеры в матричной головке работают синхронно в импульсно-периодическом режиме, с частотой повторения импульсов - 3 кГц и с длительностью импульса излучения 120 нсек, при длительности воздействия на каждую зоны от - 4 мин до 10 мин.

Таким образом, каждый ежедневный сеанс занимал 30–60 мин.

Курс лазерной терапии составлял от 7 до 14 сеансов. Он определялся характером заболевания и состоянием больного. При этом для больных вирусными гепатитами учитывались длительность желтушного периода, и периода гепатомегалии; а у больных ВИЧ - головокружения, потливость, нормализация сна, уменьшения проявления кожных дерматитов. Но, в основном, учитывались результаты биохимических анализов и лабораторных исследований состава крови.

Так для ВИЧ больных обращали внимание на лимфоцитный состав крови и вирусную нагрузку – количество копий вирусов в крови.

Для примера, приведём выписку из истории больного Н., у которого было сразу два тяжёлых заболевания: вирусный гепатит В и. ВИЧ [26].

Ему сначала вылечили гепатит, а затем ВИЧ.

В лечении этого пациента следует обратить внимание на то, что его лечение проводилось без всяких вакцин и антиретровирусных препаратов – их просто тогда не было. В результате, ему не только восстановили состав крови и лимфоцитную составляющую, но и его вирусная нагрузка уменьшилась до нерегистрируемой величины. При этом результат лазерной терапии наблюдался спустя даже 10 месяцев после окончания лазерных воздействий.

Можно отметить, что, если такие лазерные воздействия проводить на здоровом человеке, то он их просто не чувствует, так как оно не производит никакого теплового эффекта.

Таблица 1. Лечение ВИЧ-пациента Н. с вирусным гепатитом В

Тип лейкоцита и вирусная нагрузка	CD-4 ед/мл	CD-8 ед/мл	Вирусная нагрузка, копии/мл
Перед началом лечения Обострение вирусного гепатита В АЛаТ =1303 ед/мл Начало лазерного лечения 26.01.2001	182	574	2 250 000
05.02.2001 АЛаТ=148 ед/мл			
Окончание лазерного лечения 13.02.2001 АЛаТ= 23 ед/мл			
Через 1 месяц	392	726	4 010
Через 3 месяца	507	1896	691 000
Через 4 месяца	414	1342	4 080
Через 6 месяцев	396	645	776
Через 8 месяцев	394	724	251
Через 10 месяцев	520	821	<50

Мы также не обнаружили нежелательных проявлений даже при длительности лазерных воздействий до 1–2 часов на одну иммуннокомпетентную зону организма. Этот факт был установлен при лечении больных с рассеянным склерозом [28].

Так при лечении гепатита В и при лечении гепатита С пришлось применять разные схемы лазерных воздействий. Оказалось, что эти заболевания вызываются разными вирусами и дают разные осложнения. Оказалось, что при заболевании гепатитом С происходят значительные поражения стромальных клеток костного мозга, что приводит к более тяжёлому протеканию болезни [12].

Состояние антиоксидантной системы и интенсивность свободнорадикального окисления липидов при заболевании изменяются, что показали биохимические исследования (концентрации сульфогидрильных и дисульфидных групп в сыворотке крови) и физические исследования (хемилюминисценция сыворотки крови).

Потребовалось проводить обязательное облучение зон костного мозга для нормализации с состояния больных и повышения качества лечения: сокращения сроков лечения и отсутствие рецидивов заболевания.

Установление влияния лазерных терапевтических воздействий на процесс нормализации окисления липидов имело принципиальное значение, так как от него зависело образование тромбов в кровеносных сосудах.

Анализ полученных результатов такого лечения, а также успешные защиты кандидатских диссертации по этой теме Мастеровой О.А. [11] и Казади М.А. [13] свидетельствовали о перспективности этого направления в лечении вирусных инфекционных заболеваний.

По лазерному лечению вирусных гепатитов были выпущены Методические рекомендации [15], утверждённые Минздравом в 2001 г в качестве учебного пособия.

Использование лазерного способа позволило сохранить жизнь некоторым ВИЧ больным и «дотянуть их» до появления антиретровирусных препаратов.

Поэтому мы, (А.Г. Забродский, академик, член Президиума РАН и В.А. Овсянников, - ведущий научный сотрудник ФТИ им. А.Ф. Иоффе, д.т.н.) предложили Комитету по здравоохранению Санкт-Петербурга использовать этот способ и для лечения больных COVID-19. При этом мы были готовы передать лазерную аппаратуру, все расчёты и «ноу хау» лазерного способа в клиники города безвозмездно.

К сожалению, мы не получили никаких ответов из двух больниц, проводящих лечение COVID-19, которым передали наше предложение.

Фундаментальность лазерной терапии в том, что она не вносит в живой организм чужеродный материал, а только энергию, которой не хватает живым клеткам для нормально метаболизма в нужном спектральном диапазоне. Эта энергия лишь нормализует работу живых тканей и ничего не разрушает.

Обращаем особое внимание на то, что этот способ лазерных терапевтических воздействий теоретически не зависит от типа вируса и его мутаций. Так Кузнецовым Н.И. было показано, что гепатиты В и С вызываются различными вирусами, но лечить их можно одним лазерным способом.

Это может оказаться решающим в случаях появления новых подобных вирусов с неизвестными мутациями, дающие им более агрессивные свойства.

В этой статье специально дано подробное описание и способ лечения, и лазерной аппаратуры, чтобы его могли повторить и использовать в клиниках любых развитых стран мира, включая Россию.

Список литературы/References:

1. Картелишев А.В., Румянцев А.Г., Евстигнеев А.П., Смирнова Н.С., Наседкин А.Н. *Лазерная терапия и профилактика в педиатрической практике: руководство для врачей*. М.: Изд. БИНОМ, 2016, 672 с. [Kartelishv A.V., Rumyantsev A.G., Evstigneev A.P., Smirnova N.S., Nasedkin A.N. *Laser therapy and prevention in pediatric practice: a guide for physicians*. Moscow: Ed. BINOM, 2016, 672 p. (In Russ.)]
2. Овсянников В.А. *Биофизика лазерных терапевтических воздействий*. Диссертация на соискание учёной степени доктора технических наук. Защита в СПб, 2003, 219 с. [Ovsyannikov V.A. *Biophysics of laser therapeutic effects*. Dissertation for the degree of Doctor of Technical Sciences. Sewn up in St. Petersburg, 2003, 219 p. (In Russ.)]
3. Способ лечения сахарного диабета. Патент на изобретение РФ № 2679865, Приоритет от 12.08.2016 г. Патентообладатель Овсянников В.А. Гос. Регистрация 13.02.2019 г. [A method of treating diabetes mellitus. Patent for invention of the Russian Federation No. 2679865, Priority dated 12.08.2016. Patent holder Ovsyannikov V.A. State Registration 13.02.2019 (In Russ.)]
4. Способ лечения больных раком с метастазами. Патент РФ № 2741711, Приоритет от 19.02.2020 г. Патентообладатель Овсянников В.А. Гос. Регистрация 28.01.2021 г. [A method of treating cancer patients with metastases. RF Patent No. 2741711, Priority dated 02.19.2020. Patent holder Ovsyannikov V.A. State Registration 28.01.2021. (In Russ.)]
5. Галь Л.Н., Галь Н.Р. Механизм межмолекулярной передачи энергии и восприятия сверх слабых воздействий химическими и биологическими системами. *Биофизика*, 2009, т. 54, № 3, с. 563-574. [Gal L.N., Gal N.R. The mechanism of intermolecular energy transfer and perception of super weak effects by chemical and biological systems. *Biophysics*, 2009, vol. 54, no. 3, pp. 563-574. (In Russ.)]
6. Кокая А.А., Козяков В.П., Мухина И.В. Специфичность действия ЭМП, преобразованного различными биоструктурами. *Вестн. Росс. ВМА*, 2012, т. 40, с. 163-168. [Kokaya A.A., Kozyakov V.P., Mukhina I.V. The specificity of the action of EMF transformed by various biostructures. *Vestn. Ross. VMA*, 2012, vol. 40, pp. 163-168. (In Russ.)]

7. Красавцева Л.В., Овсянников В.А. Применение лазера в поликлинической практике хирурга. *Вестник хирургии*, 1988, т. 141, № 7, с. 114- 116. [Krasavtseva L.V., Ovsyannikov V.A. The use of a laser in the outpatient practice of a surgeon. *Bulletin of surgery*, 1988, vol. 141, no. 7, pp. 114-116. (In Russ.)]
8. Овсянников В.А., Петров И.Б., Ахмелкин А.Г., Борисов В.З., Иванов Л.В. *Устройство для чрезкожного облучения крови и тканей*. Патент РФ № 2112567, патентообладатель Овсянников В.А., приоритет от 15.03.1996 г. Оpubл. БИ 16-98. [Ovsyannikov V.A., Petrov I.B., Akhmelkin A.G., Borisov V.Z., Ivanov L.V. Device for transdermal blood and tissue irradiation. RF patent No. 2112567, patentee VA Ovsyannikov, priority from 03/15/1996, Publ. BI 16-98. (In Russ.)]
9. Выписка из протокола № 9, заседания комиссии по аппаратам и приборам, применяемым в физиотерапии, 09.10 2000, Комитета по новой медицинской технике Минздрава РФ, подписана Проф. О.И. Ефановым. [(In Russ.)]
10. Селиванова Л.А. Частное сообщение. 2020.
11. Мастерова О.А. *Исследование влияния низкоинтенсивного лазера на клинико-иммунологические показатели перекисного окисления липидов у больных ВГВ и ВГС*. Дис. канд. мед. наук. СПб. 2000. Гос. Мед. Академия последипломого образования, 158 с. [Masterova O.A. *Investigation of the effect of a low-intensity laser on the clinical and immunological parameters of lipid peroxidation in patients with HBV and HCV*. Dis. Cand. honey. sciences. SPb. 2000. State. Honey. Academy of Postgraduate Education, 158 p. (In Russ.)]
12. Кузнецов Н.И. *Состояние стромальных клеток костного мозга у больных вирусными гепатитами В, С и ВИЧ-инфекцией, и их значение в различных заболеваниях*. Дис. доктора мед. наук. СПб. МАПО, 2002, 217 с. [Kuznetsov N.I. *The state of bone marrow stromal cells in patients with viral hepatitis B, C and HIV infection, and their importance in various diseases*. Dis. Dr. mad. sciences. SPb. MAPO, 2002, 217 p. (In Russ.)]
13. Казади М.А. *Клинико-эпидемиологическая и лабораторная характеристики менингитов различной этиологии*. Дис. канд. мед. наук. СПб. 2000. Гос. Мед. Академия им. И.И. Мечникова, 126 с. [Kazadi M.A. Clinical, epidemiological and laboratory characteristics of meningitis of various etiologies. Dis. Cand. honey. sciences. SPb. 2000. State. Honey. Academy named after I.I. Mechnikov, 126 p. (In Russ.)]
14. Сологуб Т.В., Пусташева Н.Н., Рахманова А.Г., Кузнецов Н.И., Мастерова О.А., Овсянников В.А., Петров И.Б. *Применение низко-интенсивной лазерной терапии в лечении вирусных гепатитов*. Пособие для врачей-клиницистов, клинических ординаторов и студентов медицинских вузов. ГМА им. И.И. Мечникова, МАПО, НИИЭФА им. Д.В.Ефремова, 2001. [Sologub T.V., Pustasheva N.N., Rakhmanova A.G., Kuznetsov N.I., Masterova O.A., Ovsyannikov V.A., Petrov I.B. *The use of low-intensity laser therapy in the treatment of viral hepatitis*. A guide for clinicians, clinical residents and medical students. GMA them. I.I. Mechnikov, MAPO, NIIIEFA them. D.V. Efremova, 2001. (In Russ.)]
15. Овсянников В.А. *Анализ лечения некоторых онкологических и инфекционных заболеваний низкоэнергетическими лазерными воздействиями*. Международный конгресс "Лазеры накануне третьего тысячелетия", Афины, Греция, 1996, Сб. тезисов с. 70. [Ovsyannikov V.A. *Analysis of the treatment of some oncological and infectious diseases with low-energy laser treatments*. International Congress "Lasers on the Eve of the Third Millennium", Athens, Greece, 1996, Sat. abstracts p. 70. (In Russ.)]
16. Овсянников В.А., Петров И.Б., Пусташова Н.Н., Сологуб Т.В., Кузнецов Н.И., Мастерова О.А. *Лазерная терапия вирусного гепатита*. I-ый Международный конгресс ассоциации лазерной терапии, Иерусалим, Израиль, 1996, Сб. тезисов с. 71. [Ovsyannikov V.A., Petrov I.B., Pustashova N.N., Sologub T.V., Kuznetsov N.I., Masterova O.A. *Laser therapy for viral hepatitis*. 1st International Congress of the Association of Laser Therapy, Jerusalem, Israel, 1996, Sat. abstracts p. 71. (In Russ.)]
17. Овсянников В.А., Сизова Н.В., Маслов В.П., Гневашева Г.И. *Лечение ВИЧ - СПИД пациентов лазерными воздействиями*. Международная конференция по СПИДу, Ванкувер, Канада, 1996, Сб. тезисов т. 2, с. 88. [Ovsyannikov V.A., Sizova N.V., Maslov V.P., Gnevasheva G.I. *Treatment of HIV - AIDS patients with laser treatments*. International AIDS Conference, Vancouver, Canada, 1996, Sat. abstracts vol. 2, p. 88. (In Russ.)]
18. Ovsyannikov V.A., Pustashova N.N., Sologub T.V., Kuznetsov N.I., Masterova O.A., Rakhmanova A.G., Petrov I. B. Laser therapy of viral hepatitis, «Laser & Technology» (Italy), 1996, vol. 6, no. 3, pp. 115-119.
19. Овсянников В.А., Сизова Н.В. *Лазерный способ лечения СПИДа*. Патент РФ № 2142828, патентообладатель Овсянников В.А., приоритет от 15.03.1996г. Оpubл. БИ 35-99. [Ovsyannikov V.A., Sizova N.V. *Laser treatment for AIDS*. RF patent No. 2142828, patent holder VA Ovsyannikov, priority from 03/15/1996. Publ. BI 35-99. (In Russ.)]
20. Овсянников В.А., Петров И.Б., Пусташева Н.Н., Сологуб Т.В. *Способ фототерапии вирусного гепатита*. Патент РФ № 2153905, патентообладатель НИИЭФА им. Д.В. Ефремова, приоритет от 15.03.1996г. Оpubл. БИПМ № 22, 2000. [Ovsyannikov V.A., Petrov I.B., Pustasheva N.N., Sologub T.V. *Method for phototherapy of viral hepatitis*. RF patent No. 2153905, patent holder NIIIEFA im. D.V. Efremova, priority from 03/15/1996 Publ. BIPM no. 22, 2000. (In Russ.)]
21. Ovsyannikov V.A. Analysis of the Low-Energy Laser Treatment of Some Cancer and Infectious Diseases. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, (USA), 1997, vol. 15, no 1, pp. 39-44.
22. Овсянников В.А., Петров И.Б., Сизова Н.В., Кузнецов Н.И., Мастерова О.А., Пусташева Н.Н., Сологуб Т.В. *О возможном механизме и особенностях лазерной терапии инфекционных заболеваний*. Международная конференция "Проблемы лазерной медицины", Москва, 1997, Сб. тезисов с. 284. [Ovsyannikov V.A., Petrov I.B., Sizova N.V., Kuznetsov N.I., Masterova O.A., Pustasheva N.N., Sologub T.V. Possible mechanism and features of laser

therapy for infectious diseases. International Conference "Problems of Laser Medicine", Moscow, 1997, Sat. abstracts p. 284. (In Russ.)]

23. Овсянников В.А., Петров И.Б., Сизова Н.В., Кузнецов Н.И., Мастерова О.А., Пусташева Н.Н., Сологуб Т.В. *Лазерная терапия инфекционных заболеваний: гепатит, ВИЧ/СПИД*. Всероссийская конференция "Медицинская физика", Обнинск, 1997, Сб. тезисов с. 128. [Ovsyannikov V.A., Petrov I.B., Sizova N.V., Kuznetsov N.I., Masterova O.A., Pustasheva N.N., Sologub T.V. *Laser therapy of infectious diseases: hepatitis, HIV / AIDS*. All-Russian conference "Medical Physics", Obninsk, 1997, Sat. abstracts p. 128. (In Russ.)]

24. Овсянников В.А., Сизова Н.В., Маслов В.П., Гневашева Г.И. *О механизме лазерного лечения ВИЧ-пациентов*. IV-й Международный конгресс по СПИДу стран Азии и Тихого океана, Манила, Филиппины, 1997, Сб. тезисов с. 89. [Ovsyannikov V.A., Sizova N.V., Maslov V.P., Gnevasheva G.I. On the mechanism of laser treatment of HIV patients. IV-th International AIDS Congress in Asia and the Pacific, Manila, Philippines, 1997, Sat. abstracts p. 89. (In Russ.)]

25. Овсянников В.А., Пусташева Н.Н., Сологуб Т.В., Кузнецов Н.И., Мастерова О.А., Рахманова А.Г. *Механизм лазерной терапии вирусных гепатитов*. III-я Международная конференция по терапии вирусных гепатитов, Гавайи, США, 1999, сб. тезисов с. 41. [Ovsyannikov V.A., Pustasheva N.N., Sologub T.V., Kuznetsov N.I., Masterova O.A., Rakhmanova A.G. The mechanism of laser therapy for viral hepatitis. III International Conference on Viral Hepatitis Therapy, Hawaii, USA, 1999, coll. abstracts p. 41. (In Russ.)]

26. Ovsyannikov V.A., Sologub T.V., Pustasheva N.N., Kuznetsov N.I., Masterova O.A., Rakhmanova A.G., Sizova N.V., Karpushina I.A. *Laser therapy of infectious diseases: results and mechanism of therapeutic action*. Laser Florence 2000: A Window on the Laser Medicine World. Proceeding of SPIE, 2001, vol. 4606, pp. 131-137. [(In Russ.)]

27. Ovsyannikov V.A. Mechanism of Laser Therapy of Viral Hepatitis. - A chapter in a book "Frontiers in Viral Hepatitis" Ed. by R.F. Schinazi, C. Rice and J-P. Sommadossi. Printed in the Netherlands, 2002, pp. 325-331.

28. *Способ лечения больных рассеянным склерозом лазерным излучением*. Патент РФ № 2200041. Патентообладатель Овсянников В.А., приоритет от 18.01. 2000г. Оpub.в Гос. реестре 10.03. 2003. [A method of treating patients with multiple sclerosis with laser radiation. RF patent No. 2200041. Patent holder VA Ovsyannikov, priority from 18.01. 2000 Published in the State. registry 10.03. 2003. (In Russ.)]

COMPLEX THERAPY FOR VIRAL DISEASES

Sologub T.V.¹, Masterova O.A.², Ermolaev Yu.L.³, Ovsyannikov V.A.³

¹ St. Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education
Saint-Petersburg, Russia

² SPb "Center for the Prevention and Control of AIDS"
Saint-Petersburg, Russia

³ Physico-Technical Institute named after A.F. Ioffe
Saint-Petersburg, Russia; e-mail: victorovs@mail.ru

Abstract. Infectious viral diseases can be treated with the help of pharmaceuticals, as well as by restoring the patient's own protective systems of the body. A person has a system that recognizes foreign viruses by itself, destroys them and removes them from the body – this is the phagocytic system. With viral diseases, its abilities are greatly reduced. Therefore, at the end of the last century, a method was proposed to restore the properties of this system using non – invasive laser therapeutic effects on the blood and immune-competent areas of the patient's body-the bone marrow. A special laser equipment was created, and calculations were made of the amount of laser energy at a wavelength of 890nm, which must be delivered to the bone marrow during transcutaneous irradiation of the patient. In this way, it is possible to ensure its normal operation and restore the patient's own protective systems of the body. The proposed method was tested in clinics of St. Petersburg and Moscow: with its help, the recovery of patients with viral hepatitis (300 people), serous meningitis (47 people) and HIV-infected patients (over 100 people). Laser therapeutic effects were carried out with the simultaneous use of pharmaceutical drugs available at that time in clinics for the treatment of such patients. With such complex treatment, patients recovered in a shorter time and without relapses of diseases. At the same time, the antithrombotic effect of laser effects on bone marrow areas was established by clinical studies and explained theoretically. The medical part of these studies was led by Professor Tamara Sologub; the laser part was led by V.A. Ovsyannikov. The results of these studies have been reported at Russian and international conferences and are protected by patents of the Russian Federation. On their basis, two candidate's and one doctoral dissertations were defended, and the "Manual for clinicians, clinical residents and students of medical universities" was issued and approved by the Ministry of Health of the Russian Federation in 2001. Unfortunately, now this method is undeservedly forgotten by the Ministry of Health of the Russian Federation. The report will consider the possibilities of its use for the treatment of other viral diseases.

Key words: treatment, viruses, restoration of the properties of the phagocytic and antioxidant system, blood clots laser therapy.

ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ И МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ОНКОКЛЕТОК КУЛЬТУРЫ HELa В ПРОЦЕССЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ И ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ АДЕНОВИРУСОМ

Морозова Г.И.¹, Корнилаева Г.В.², Гринкевич О.М.², Аскарова К.З.¹, Лопатина О.А.²,
Фирсова Е.Л.²

¹ Российский университет дружбы народов

ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: gimorozova@mail.ru

² ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи

г. Москва, РФ; e-mail: lopatina.online@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.08.2021

Аннотация. В последнее время актуально использование патогенных вирусов для борьбы с раковыми клетками, в том числе аденовирусов. Культура клеток линии карциномы шейки матки (HeLa) является популярной моделью для исследования факторов, влияющих на показатели жизнеспособности онкоклеток. Целью данной работы является исследование трансмембранных потенциалов (ТМП) и энергетической активности митохондрий в клетках HeLa чистой культуры в процессе их размораживания и культивирования после инфицирования аденовирусом. Для оценки цитофизических показателей использовали полихроматический флуоресцентный зонд 4-п-диметиламиностирил-1-метилпиридиний (ДСМ). Микрофлуориметрические исследования показали, что высокий уровень отрицательного ТМП $\geq |-150|$ mV, достигается через 6 - 12 ч, а максимальный ТМП $\geq |-200|$ mV - через 24 ч после размораживания и культивирования чистых клеток. Размножение аденовируса в клетках культуры HeLa приводит к дезэнергизации митохондрий, к изменению электрических и структурных свойств клеточных мембран и ядерного хроматина, в итоге к нарушению жизнеспособности раковых клеток.

Ключевые слова: культура клеток HeLa, аденовирусная инфекция, криоконсервация, трансмембранные потенциалы, активность митохондрий, флуоресцентный зонд ДСМ.

Культура клеток линии карциномы шейки матки (HeLa) широко используется в модельных медико-биологических исследованиях для выявления физико-химических особенностей жизнедеятельности раковых клеток [1]. В последние годы возрос интерес к микробиологическим способам борьбы с онкологией. Некоторые патогенные вирусы специально вводят в опухолевые клетки с целью частичного изменения клеточного генома, что в свою очередь ведёт к изменению свойств разных мембран, рецепторов на внешней поверхности, к усилению атаки макрофагов и Т-лимфоцитов на опухоль [2]. Криоконсервация является необходимым моментом сохранения клеточной культуры. Эффективность деконсервации (размораживания) клеток определяется способностью восстановления исходных свойств клеток [3,4]. Ранее установлено, что клетки культур с исходно более высоким уровнем отрицательных трансмембранных потенциалов (ТМП) на внешней и митохондриальных мембранах способны сохранять высокую функциональную и пролиферативную активность после их размораживания [1,3,5].

Целью данной работы является исследование ТМП и митохондриальной активности в клетках культуры HeLa в процессе её размораживания, культивирования и после инфицирования аденовирусом. В серии предыдущих исследований выявлены возможности полихроматического флуоресцентного зонда 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) как чувствительного и информативного молекулярного инструмента для исследования митохондриальной активности и трансмембранных потенциалов (ТМП) в клетках при разных условиях [3,6-13]. Как показано ранее при исследовании оптических свойств ДСМ [6], изменение цвета (сдвиг спектра) его флуоресценции в клеточных структурах зависит от соотношения двух форм зонда в клетке: зелёной - при вертикальном погружении молекул в неполярную область мембран, и красной - за счёт свободного зонда в водной среде внутри митохондрий и горизонтально расположенных молекул ДСМ на поверхности полимерных структур при связывании его катионов с ДНК, РНК. В последнем случае резко возрастает квантовый выход красной флуоресценции ДСМ из-за снижения подвижности связанных молекул зонда. Соответственно, конечный цветовой эффект зависит от концентраций ДСМ внутри митохондрий и ядра, что регулируется их ТМП-ми и отражает энергетический статус клеток. Согласно хемиосмотической теории Митчелла снижение энергетической активности митохондрий в клетках сопряжено с падением протонного потенциала на их мембранах [14]. В результате происходит перераспределения катионов ДСМ между митохондриями, цитоплазмой и ядром в соответствии с электродиффузной теорией [6,15]. При этом цвет флуоресценции зонда в митохондриях изменяется от ярко-жёлтого до бледно-зеленого. Одновременно снижается энергезависимый градиент электрического поля на ядерной мембране (плюс со стороны карิโอплазмы) [12,16]. В итоге катионы ДСМ проникают в ядро, появляется оранжевая флуоресценция ДСМ связанного с отрицательно заряженными полимерными структурами хроматина (ДНК, РНК) [6,13]. Возгоранию оранжевой флуоресценции ДСМ в ядрах соответствует превышение оптимальной концентрации свободного зонда внутри митохондрий (до предела растворимости в воде), что свидетельствует об исходно высоком ТМП клеток, прежде всего в митохондриях. Эти особенности изменения полихроматической флуоресцентной картины ДСМ позволяют

визуально распознавать различные степени энергетической активности клеток. При этом можно оценить соответствующие им уровни ТМП на внешней и митохондриальной мембранах с помощью калибровки – метода прямого измерения суммарного ТМП в клетках по насыщению катионов ДСМ в митохондриях [7,13].

ОБЪЕКТЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В работе использовали культуру клеток карциномы шейки матки линии HeLa. Для культивирования клеток применяли 199 питательную среду («Биолот») с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco»). Клетки инкубировали в термостате с CO₂ в культуральных флаконах (матрасах) объёмом 50 мл [1]. Для процедуры снятия размороженных клеток использовали версен 0,02% с химопсином 0,1 мг/мл. Для последующих исследований размороженные клетки из суспензии осаждали центрифугированием (5 мин, 500 g), удаляли культуральную среду и ресуспендировали осадок в среде без сыворотки. Инфицирование клеток культуры после размораживания производили путём добавления аденовируса человека (тип 2) из расчета 1–10 БОЕ/кл. с последующим перемешиванием и культивированием заражённой культуры в течение 1 ч при 37°C. Суспензии чистых и заражённых клеток разводили теплой средой с 2% СНТ до концентрации (3–4)·10⁵ кл/мл, параллельно инкубировали при 37°C в течении 3–24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали по тесту с трипановым синим аналогично [3, 13].

Для окрашивания клеток в работе использовали флуоресцентный зонд 4-п-диметиламиностирил-1-метилпиридиний (ДСМ), синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии [6,17]. В специальном эксперименте с целью выбора контрольных образцов деконсервированных клеток в наиболее адекватном энергетическом состоянии исследовали клетки, окрашенные ДСМ (в монослое на покровных стёклах в пенициллиновых флаконах) через различные временные интервалы после их размораживания и культивирования согласно предложенной ранее методике [11]. Витальное флуорохромирование чистых клеток после их культивирования осуществляли путём добавления физиологического раствора с ДСМ до конечных концентраций зонда в интервале 0,5–20 мкМ с последующим перемешиванием и инкубацией клеток при 37° С в течение 15–40 мин. По интенсивности флуоресценции ДСМ в митохондриях, нарастающей по мере аккумуляции в них катионов зонда (до 1 мМ – предела растворимости ДСМ в водной среде митохондрий), оценивали ТМП клеток согласно [7] в разное время после культивирования.

Препараты окрашенных клеток на стёклах, приготовленные методом раздавленной капли, исследовали на микроскопе – флуориметре Люмам-И2 с фотометрической приставкой ФМЭЛ (ЛОМО). Условия возбуждения, наблюдения и регистрации флуоресценции ДСМ в клетках использовали аналогично условиям в работах [3-13]. Микрофотографирование клеток на микроскопе осуществляли через объектив 90^x в фоторежиме на видеокамеру фирмы Sony, закрепленной на специальном тубусе микроскопа. Для каждого образца исследовали массивы по 100–200 клеток в контроле и опыте. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований установлено, что флуоресценция ДСМ в цитоплазме клеток зависит от времени их культивирования после размораживания. Экспериментально выбраны оптимальные рабочие концентрации ДСМ в диапазоне 2-5 мкМ для контрольных чистых клеток и время инкубации их с зондом – 30 мин при 37° С. При этих же условиях в сравнительных опытах производили окрашивание клеток путём добавления ДСМ к суспензиям чистых и заражённых клеток с последующим их перемешиванием и культивированием.

В таблице 1 представлены результаты микрофлуорометрической оценки значений ТМП в чистых клетках в разные сроки после их размораживания и культивирования. Оценки показали, что в первые 3 ч в этих клетках сохраняется сравнительно низкий уровень ТМП, который фактически близок к уровню ТМП на внешней мембране, что соответствует начальному этапу адаптации мембран и клеточного метаболизма после размораживания и температурного скачка. Рост флуоресценции ДСМ и ТМП митохондрий в чистых клетках отчётливо регистрируется после 6ч, высокий уровень суммы ТМП в большинстве клеток достигается только через 12- 24 ч преимущественно за счёт периодической активации митохондриального ретикулума, когда идёт активный митотический процесс.

Люминесцентно-микроскопические исследования показали, что клетки HeLa в разных образцах отличаются по характеру флуоресценции в них зонда ДСМ. На рисунке 1 представлены изображения в свете флуоресценции зонда чистых клеток (а) после их культивирования в течение 24 ч, и аналогичных клеток после заражения их

Таблица 1. Средние значения ТМП ($\Delta\Phi$) в чистых клетках HeLa через разные интервалы времени после размораживания и культивирования

Время культивирования клеток, часы	3	6	12	24
$\Delta\Phi = \Delta\Phi_{\text{п}} + \Delta\Phi_{\text{мх}}$ mv	95 ± 7	168 ± 10	187 ± 10	255 ± 15

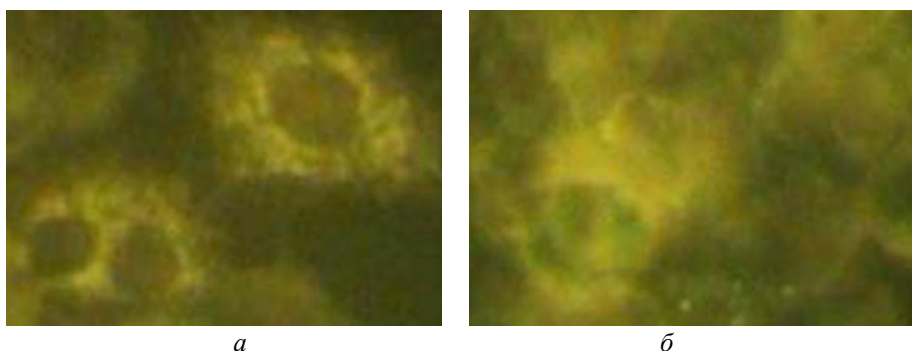


Рисунок 1. Клетки HeLa в свете флуоресценции зонда ДСМ (5 мкМ) через 24 ч их культивирования: *а* – чистые клетки, *б* – клетки, инфицированные аденовирусом (пояснение в тексте). Об. 90^х

аденовирусом (*б*). На изображении контрольных клеток видны гранулярные и цепочечные активные митохондрии с ярко-жёлтой флуоресценцией, накопившие катионы зонда. В то же время есть клетки с низкой энергетической активностью или без активных митохондрий, что может быть связано с конкуренцией активно делящихся клеток за кислород и питательный ресурс.

Как видно на рисунке 1б, в препарате клеток с аденовирусом через 24 ч их культивирования происходят катастрофические изменения: большинство клеток в состоянии с низкими ТМП и митохондриальной активностью, при этом много дезэнергизированных клеток с оранжевыми ядрами, утратившими положительный ТМП на ядерной мембране [16]. Характерны области с диффузной жёлто-зелёной флуоресценцией ДСМ, обусловленные, по-видимому, связыванием катионов ДСМ с отрицательно-заряженными участками биополимеров в аденовирусных скоплениях и в разрушенных структурах клеток [6,11].

В серии дальнейших экспериментов производили сравнительную оценку уровней ТМП в чистых и заражённых клетках через 12 ч их культивирования, когда в препаратах с аденовирусом ещё нет катастрофического разрушения клеточных структур, а в чистых препаратах размороженные клетки достигают уже достаточно высокий энергетический потенциал.

Используя предложенную ранее методику, основанную на полихроматических свойствах флуоресценции ДСМ, все исследуемые клетки распределяли по четырём диапазонам суммы ТМП на их плазматической (Φ_n) и митохондриальной (Φ_{mx}) мембранах, откалиброванных с помощью зонда ДСМ [6,7,13]. При этом в качестве информативного и чувствительного показателя энергетической активности популяции клеток (ЭАП) для каждого образца использовали отношение между количеством клеток в пулах с высокими и низкими значениями ТМП по аналогии с работой [13].

Данные экспериментов, представленные в таблице 2 и на рисунке 2, демонстрируют снижение доли активных клеток с высокими ТМП почти в 2 раза и росте доли клеток с очень низкими ТМП на 34 % после культивирования клеток с аденовирусом по сравнению с чистыми клетками. Показатель ЭАП наиболее наглядно отражает эффекты снижения энергетического потенциала онкоклеток в присутствии аденовируса. Наблюдаемые эффекты в заражённых клетках могут быть обусловлены резким снижением количества активных митохондрий, осмотическим нарушением и соответственно снижением ТМП на внешней мембране в результате прямого взаимодействия аденовирусов с клеточными структурами и под влиянием процесса его размножения в клетках.

Таблица 2. Распределение клеток по величинам суммы трансмембранных потенциалов ($\Delta\Phi$) в чистой культуре HeLa и с аденовирусом через 12 ч культивирования. ЭАП – индекс энергетической активности клеток каждого пула (n_i).

$\Delta\Phi = \Delta\Phi_n + \Delta\Phi_{mx}$ mv	< 80	90 - 150	160 - 220	230 - 290	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
чистые клетки, %	4 ± 1	15 ± 2	32 ± 3	48 ± 5	4.2 ± 0.3
клетки с аденовирусом, %	43 ± 4	13 ± 2	44 ± 4	9 ± 1	0.95 ± 0.01

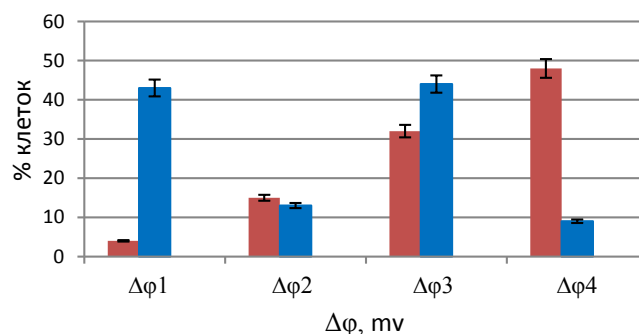


Рисунок 2. Диаграммы распределения пулов клеток по диапазонам их суммарного ТМП ($\Delta\phi$) в чистой культуре HeLa (красная) и с аденовирусом (синяя). По вертикали - % клеток в пуле (n_i) с $\Delta\phi_i$ определённого диапазона

Сопоставление полученных результатов позволяет заключить, что в размороженных клетках HeLa после их культивирования в течение 12 ч в присутствии аденовируса (типа 2) изменяются биофизические свойства по сравнению с чистой культурой: резко увеличивается пул клеток в низком диапазоне ТМП, преимущественно, за счёт снижения энергетической активности митохондрий. Флуоресцентные эффекты ДСМ в инфицированных онкоклетках свидетельствуют не только об изменении электрических свойств у трёх типов клеточных мембран, но и о деструктивных изменениях в ядерном хроматине в присутствии активных аденовирусов, которые существенно нарастают через 24 ч культивирования таких клеток. Вследствие этих процессов возможно нарушение функциональной активности и в итоге снижение жизнеспособности раковых клеток.

Можно предполагать, что в реальной карциноме такие изменения в мембранах и в энергетическом статусе митохондрий (при локальном инфицировании опухолевой зоны аденовирусом) будут способствовать сдерживанию роста опухоли, в том числе и благодаря активации иммунных клеток микроокружения [2,19].

Список литературы/References:

1. Подчерняева Р.Я., Корнилаева Г.В., Морозова Г.И. Новый подход к методам крио и деконсервации для сохранения генофонда коллекции клеточных культур. *Цитология*, 2004, т. 46, № 9, с. 837 [Podchernyaeva R.Y., Kornilaeva G.V., Morozova G.I. New approach to cryopreservation and deconservation methods for preservation of gene pool of cell culture collection. *Cytology*, 2004, vol. 46, no. 9, p. 837. (In Russ.)]
2. Разумов И.А., Святченко В.А., Протопопова Е.В., Кочнева Г.В., Киселёв Н.Н. и др. Оценка онколитической активности ряда ортопоксвирусов, аденовирусов и парвовирусов в отношении клеток глиом человека. *Вестник РАМН*, 2013, № 12, с. 4-8. [Razumov I.A., Svyatchenko V.A., Protopopova E.V., Kochneva G.V., Kiselev N.N. et al. Oncolytic evaluation of a number of orthopoxviruses, adenoviruses and parvoviruses against human glioma cells activity. *RAMS Bulletin*, 2013, no. 12, pp. 4-8. (In Russ.)]
3. Toshakov V.G., Morozova G.I., Onishchenko N.A. Energy metabolism of cryopreserved rat hepatocytes. *Cryoletters*, 1991, no. 12, pp. 259-272.
4. Лопатина О.А., Морозова Г.И., Подчерняева Р.Я., Фирсова Е.Л., Данлыбаева Г.А., Михайлова Г.Р., Бакланова О.В. Энергетическое состояние клеток Mpf после криоконсервации. *Биофизика живой клетки*. Пушкино: РАН, ИБФ, 2008, т. 9, с. 84-85. [Lopatina O.A., Morozova G.I., Podchernyaeva R.Ya., Firsova E.L., Danlybaeva G.A., Mikhailova G.R., Baklanova O.V. Energy state of Mpf cells after cryopreservation. *Biofizika zhivoj kletki*. Pushchino: RAS, IBF, 2008, vol. 9, pp. 84-85. (In Russ.)]
5. Parkhomenko T.V., Galibin O.V., Verbitskaya E.V., Tomson V.V. Evaluation of energy potential of fresh and stored bone marrow cells using a fluorescent potential-sensitive probe. *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*, 2016, vol. 5, no. 2(15), pp. 60-65.
6. Морозова Г.И., Добрецов Г.Е., Дубуре Р.Р., Дубур Г.Я., Голицын В.М., Владимиров Ю.А. Флуоресценция зонда 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке. *Цитология*, 1981, т. 23, № 8, с. 916-923. [Morozova G.I., Dobretsov G.E., Dubur R.R., Dubur G.Ya., Golitsyn V.M., Vladimirov Yu.A. Fluorescence of 4-(*n*-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium probe in a living cell. *Cytology*. 1981, vol. 23, no. 8, pp. 916-923 (In Russ.)].
7. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273. [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu. A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266 -273. (In Russ.)]
8. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И. Г., Коробкова Е. Н., Полосина О. В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценка физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, с. 43-47. [Morozova G.I.,

Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Baziyeva F.H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematol. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47. (In Russ.)]

9. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating Effect of Erythropoietin on Thymocyte Energetics Established in vitro with Potential-sensitive Fluorescent Probe. *Biochemistry Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, Moscow: 2008, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.

10. Тарнопольская О.В., Непомнящая Е.М., Бирбраер В.М., Тюрбеева М.Л., Макарова Е.И. Средний мембранный потенциал клеток опухолей пяти гистотипов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2014, № 10, с. 108-109. [Tarnopolskaya O.V., Nepomnyaschaya E.M., Birbraer V.M., Tyurbееva M.L., Makarova E.I. Average membrane potential of five histotypes tumor cells. *International Journal of Applied and Basic Research*, 2014, no. 10, pp. 108-109 (In Russ.)]

11. Морозова Г.И., Лопатина О.А., Михайлова Г.Р., Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я. Сравнительное исследование эффектов частотно-резонансных воздействий и голографической информационной копии на модели клеток мозга хорька с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2013, № 5, с. 28-34. [Morozova G.I., Lopatina O.A., Mikhailova G.R., Danlybaeva G.A., Podchernyaeva R.Ya. Comparative study of the frequency-resonance and holographic information copy effects on ferret brain cells as model using a potential-sensitive fluorescent probe. *Biomedicine Radioengineering*, 2013, no. 5, pp. 28-34. (In Russ.)]

12. Морозова Г.И., Корнилова Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластоидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2014, № 11, с. 31-38. [Morozova G.I., Kornilova G.V., Podchernyaeva R.Ya., Kulenich T.M., Bozhenko V.K. Study of influence millimeter-wave EHF-irradiation on membrane structures of the T-lymphoblastoid cells culture using a fluorescent probe-cation DSM. *Biomedicine Radioengineering*, 2014, no. 11, pp. 31-38. (In Russ.)]

13. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424. [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-sensitive fluorescent probe. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424 (In Russ.)]

14. Askarova K.Z., Morozova G.I., Anoshin A.A. Modeling the Accumulation Kinetics of Anionic Photo-sensitizers in Tumor Cells with Different Trans-membrane Potentials. *J. Mech.Cont.& Math. Sci., Special Issue-1*, March, 2019, pp. 483-490.

15. Скулачев В.П. *Энергетика биологических мембран*. М: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V. P. *Energy of biological membranes*. M.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)]

16. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник докладов 2-го съезда биофизиков России*. М.: 1999, с. 256-257. [Morozova G.I., Poletaev A.I., Borschevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*. M.: 1999, pp. 256-257. (In Russ.)]

17. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов*. М.: Наука, 1989, 277 с. [Dobretsov G. E. *Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins*. M.: Science, 1989, 277 p. (In Russ.)]

18. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277 с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. M.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)]

19. Кжышковская Ю.Г., Стахеева М.Н., Литвяков Н.В. и др. *Иммунная система и эффективность противоопухолевого лечения*. Томск: издательство ТГУ, 2015, 130 с. [Kzhyshkovska Yu.G., Stakheeva M.N., Litviakov N.V. et al. *Immune system and the effectiveness of anticancer treatment*. Tomsk: University Publishing House, 2015, 130 p. (In Russ.)]

TRANSMEMBRANE POTENTIALS AND MITOCHONDRIA ENERGY ACTIVITY IN HELA CANCER CELLS DURING ITS DEFROSTING AND AFTER INFECTED WITH ADENOVIRUS**Morozova G.I.¹, Kornilaeva G.V.², Grinkevich O.M.², Askarova K.Z.¹, Lopatina O.A.², Firsova E.L.²**¹ Russian Peoples' Friendship University

st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia, e-mail: gimorozova@mail.ru

² N.F. Gamalei Research Center of Epidemiology and Microbiology

Moscow, Russia, lopatina.online@ya

Abstract. Recently, the use of pathogenic viruses including adenoviruses to fight cancer cells, has become relevant. Cervical carcinoma cell line (HeLa) culture is a convenient model to study the factors influencing the cancer cells viability. This work aim is to study the transmembrane potentials (TMP) and mitochondria energy activity in pure HeLa cells during its defrosting and after infected with adenovirus. A polychromatic fluorescent probe 4–n-dimethylamnostyryl-1-methylpyridinium (DSM) was used to evaluate the cells cytophysical parameters. Microfluorometric studies found that high TMP $\geq | -150 |$ mv is reached after 6–12 hours and the maximum TMP $\geq | -200 |$ mv is reached after 24 hours after thawing and culturing pure cells. It was found that adenovirus reproduction in HeLa culture cells leads to mitochondria deenergization, a change in the electrical and structural properties of cell membranes and nuclear chromatin, as a result, to disruption of cancer cells viability.

Key words: *HeLa cell culture, adenovirus infection, cryopreservation, transmembrane potentials, mitochondria energy.*

MACHINE LEARNING FOR PREDICTING THE SURFACE PLASMON RESONANCE OF SILVER NANOSPHERES

Ramos Esparaza S., Arzola Flores J.A., Maldonado Garcia A., Guarneros Bejarano G., Vidal Robles E., Hernandez Santiago A.A.

Benemerita Universidad Autonoma de Puebla

Avenida San Claudio y 18 Sur, Colonia San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Mexico; email: jesus.arzola@correo.buap.mx

Received: 07.08.2021

Abstract. Today it is known that silver nanoparticles have interesting optical properties, especially surface plasmon resonance (SPR). This property has opened a sea of possible applications for silver nanoparticles, so knowing the effect of the size and morphology of the nanoparticles on the SPR is a very important task in synthesis processes. In this work, we present the prediction of the dipole SPR of spherical silver nanoparticles using their diameter as a predictor variable. To carry out the prediction, two Machine Learning algorithms were used, the Lasso regression with L_1 regularization and the Ridge regression with L_2 regularization. For the evaluation of the models, data obtained from the extinction spectra of silver nanospheres with different diameters calculated with the MiePlot software were used. For the evaluation of the models, the 5-fold cross-validation was used and MSE, RMSE, MAE, and R^2 were used as evaluation metrics. Both regression models allow the dipole SPR to be predicted with an accuracy above 95%. However, performing the Bayesian t-student test shows that the Ridge regression is slightly better than the Lasso regression for making the prediction.

Key words: Machine Learning, Mie Theory, MiePlot, Surface Plasmon Resonance, Ridge Regression, Lasso Regression.

INTRODUCTION

Noble metals are chemical elements of metallic type characterized by their high resistance to corrosion, air humidity and oxidation, so they are chemically unreactive; therefore, they have diverse applications. Noble metals are widely used in the petroleum, chemical, electronics, electrical, marine and aviation industries, known as the "industrial vitamin" [1]. Noble metal nanoparticles, especially gold (Au) and silver (Ag) exhibit unique and tunable optical properties due to their surface plasmon resonance (SPR) [2].

As first pointed out by Gustav Mie in 1908, the interaction of light with metal nanoparticles results in the collective oscillation of the metal free electrons with respect to the nanoparticle lattice in resonance with the electric field [3]. This phenomenon is known as SPR [2]. For gold (Au), silver (Ag), and copper (Cu), the resonance condition is fulfilled at visible frequencies, making them the plasmonic metals of choice for optical applications [2].

The SPR depends on parameters such as the morphology of the nanoparticle, its concentration, the refractive index of the solvent, the surface charge, and the temperature [2], so tuning this optical property is not usually so trivial from the experimental point of view; therefore, that it is vitally important to use computational methods to make the synthesis process more efficient and with this, minimize the expenditure of resources.

Nowadays, thanks to the development of artificial intelligence, specifically machine learning (ML), the development of materials science has accelerated since it is possible to optimize processes and minimize the use of resources [4], using a wide variety of computational algorithms that are capable of acquiring a certain level of learning from the analysis of previous data on the process or phenomenon under study [5,6], so in this work, we intend to study the effect of the morphology of silver nanoparticles (AgNPs), specifically, their diameters, on SPR, using Mie theory and MiePlot software (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>) [7,8], in order to generate a data set for the training, validation, and testing of two machine learning algorithms.

In this work, we employed two ML algorithms, Lasso regression [9,10], and Ridge regression [9,11], to predict the position of the SPR of AgNPs as a function of their diameter, using the extinction spectra of spherical nanoparticles obtained through MiePlot.

METHODOLOGY

For the training, validation, and testing of the ML algorithms, the extinction spectra or extinction efficiencies of spherical AgNPs obtained using the MiePlot software were used. The extinction spectra were calculated for nanoparticles with diameters from 0.002 μm (2 nm) to 0.1 μm (100 nm), dispersed in a medium with a refractive index of 1.33 (water), at a temperature of 25° C. Figure 1 shows the extinction efficiency of an AgNP with a diameter of 50 nm.

Once the extinction efficiencies of the AgNPs were obtained, the position in nanometers of the maximum of each of the spectra was located, since this position corresponds to the position of the SPR, to build a data set where the target variable corresponds to the position in nanometers of the SPR and their diameter as a predictor variable.

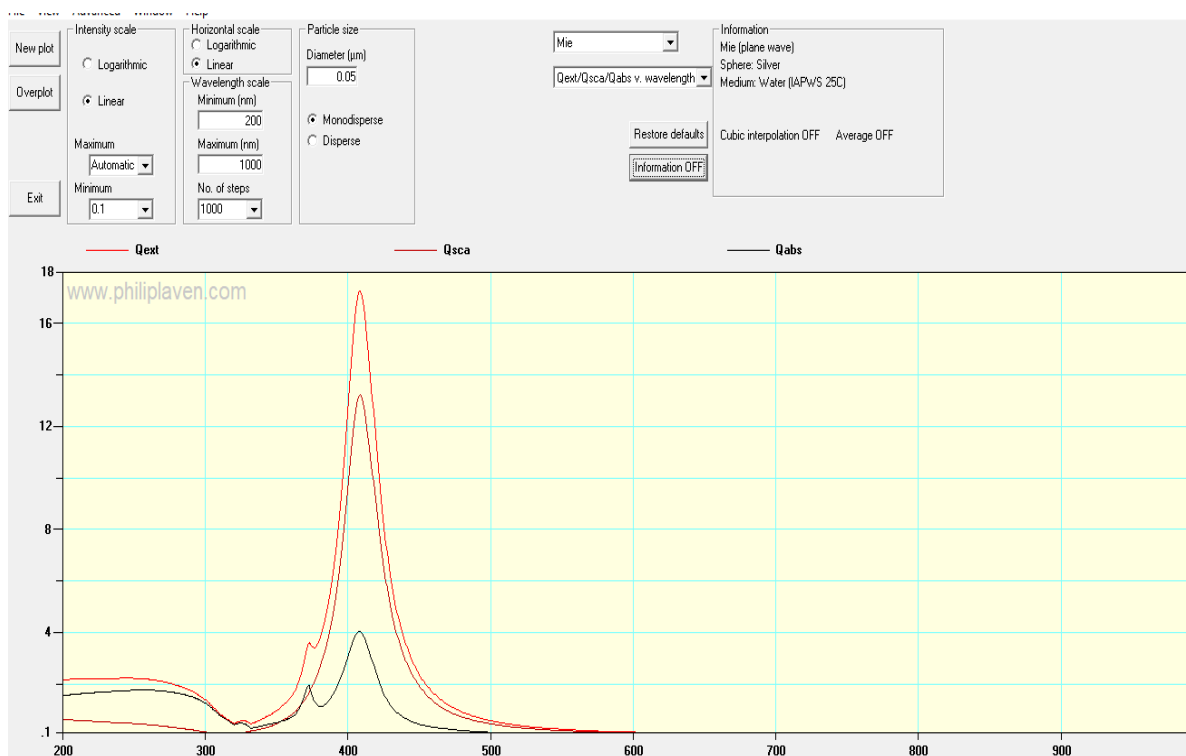


Figure 1. Extinction, dispersion, and absorption efficiency for an Ag nanosphere dispersed in water at 25°C

The training, validation, and testing of the two regression models were carried out using Orange software (<https://orangedatamining.com/>) [12]. For the Lasso regression, a regularization $L_1 = 1$ was used, while for the Ridge regression, a regularization $L_2 = 2$ was used. As an evaluation technique, a 5-fold cross-validation was employed, and the mean square error (MSE), the Root Mean Square Error (RMSE), the Mean Absolute Error (MAE), and the Coefficient of Determination (R^2) were used as evaluation metrics [5].

RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 2 a) the Orange workflow for the prediction of the dipolar SPR of AgNPs is observed. In Figure 2 b) we can see the dialog window to interact with the Ridge regression widget. In this widget, it is possible to select the value of the L_2 regularization. On the other hand, in Figure 2 c) we can see the dialog window to interact with the Lasso regression widget, where the value of the L_1 regularization can be selected. Finally, in Figure 2 d) the dialog box of the Test and Score widget is observed, in this window the evaluation method is selected, which in this case corresponds to 5-fold cross-validation. In addition, it is possible to observe the value of the evaluation metrics and the result of performing a Bayesian t-student test to identify which of the two algorithms is better to predict the dipolar SPR. Table 1 shows the evaluation metrics obtained by the two regression algorithms for predicting the dipolar SPR of AgNPs.

As can be seen in Table 1, it is possible to use both algorithms to predict the position of the dipole SPR, since excellent evaluation metrics are obtained. However, in the dialog window of the Test and Score widget, it is observed that the Bayesian t-student test¹³ shows that the probability that the Ridge regression is better than the Lasso regression is slightly higher ($P = 0.527$) than the probability that the Lasso regression is a better model than the Ridge regression (0.473), so the Ridge regression could be a better model to predict the position of the dipole SPR of AgNPs.

Figure 3 shows the parity diagram for the prediction of the dipole SPR of AgNPs using the Ridge regression. While in Figure 4 the parity diagram is distinguished for the same prediction but using the Lasso regression. In both figures, the horizontal axis explains the dipolar SPR values in nanometers obtained from the extinction spectra calculated with the MiePlot software, while the vertical axis shows the dipolar SPR values in nanometers predicted by the ML models. Furthermore, in both figures the black line shows the existence of a linear relationship between both SPR values, since it is possible to obtain excellent values of the Pearson linear correlation coefficient and the coefficient of determination.

Table 1. Evaluation metrics for ML models

Model	MSE	RMSE	MAE	R2
Ridge Regression	23.534	4.851	4.168	0.955
Lasso Regression	23.521	4.850	4.170	0.955

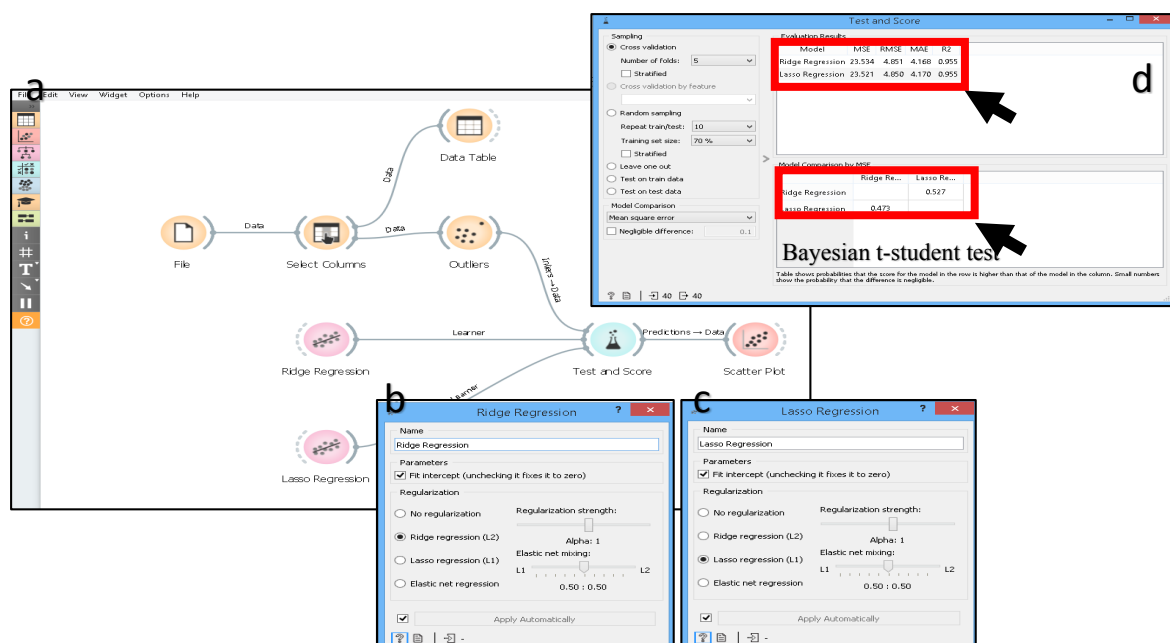


Figure 2. a) Orange workflow for predicting dipolar SPR, b) Ridge Regression widget dialog box, c) Lasso Regression widget dialog box, and d) Box thrown by Test and Score widget

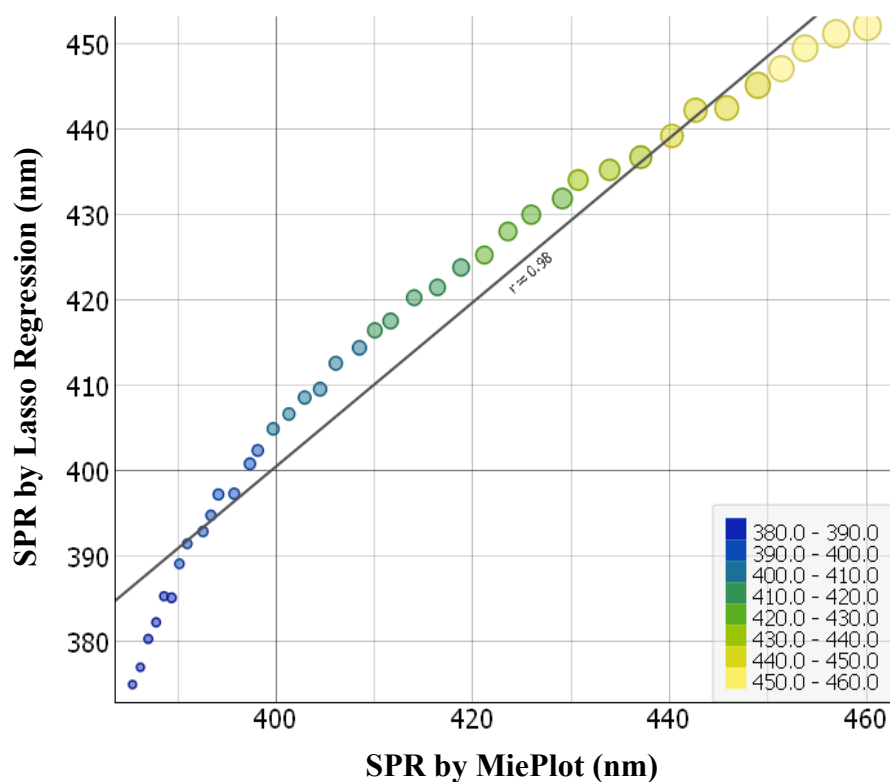


Figure 3. Scatter or parity diagram for predicting the dipole SPR of Ag nanoparticles obtained using Lasso regression

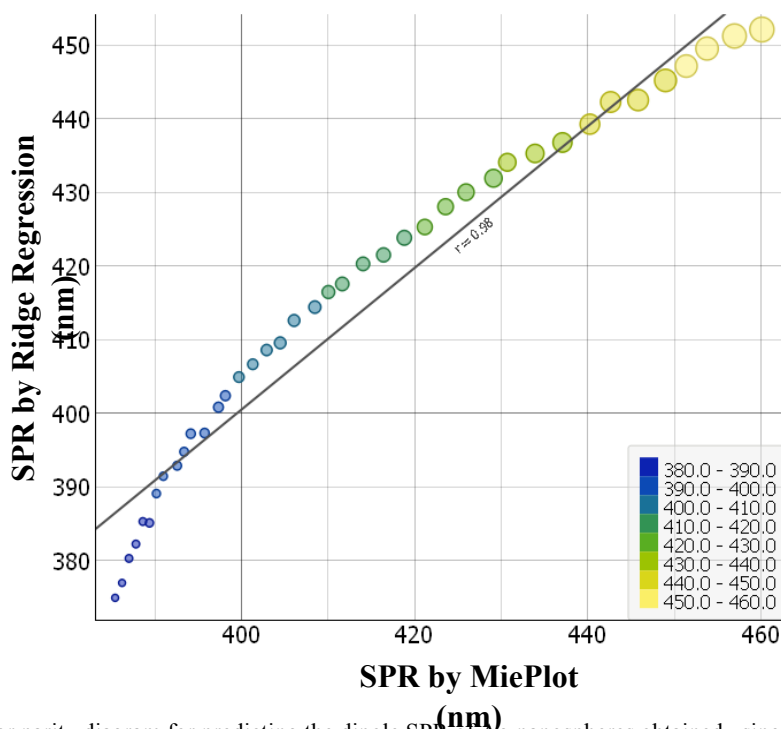


Figure 4. Scatter or parity diagram for predicting the dipole SPR of Ag nanospheres obtained using Ridge regression

CONCLUSIONS

Knowing the effect of size and morphology on the dipolar SPR of metallic nanoparticles is of vital importance to define its possible application. Currently, the tuning of the SPR of metallic nanoparticles is usually done experimentally or using computationally expensive theoretical methods, so the implementation of machine learning algorithms can help to streamline the processes of synthesis of metallic nanoparticles. Here we conclude that it is possible to use both a Ridge regression model and a Lasso regression to predict the dipole SPR of AgNPs with an accuracy above 95% for both cases. However, when using the Bayesian t-student test to compare both models, Ridge regression tends to be a better method for making the prediction.

References:

1. Wu L., Wang H., Xu T.W., Xu Z.L. Polymeric Membranes. In Membrane-Based Separations in Metallurgy. Elsevier, 2017, pp. 297-334.
2. Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*, 2007, vol. 2, no. 3, pp. 107-118.
3. Wriedt T. Mie theory: a review. *The Mie Theory*, 2012, pp. 53-71.
4. Arzola-Flores J.A., Gonzalez A.L. Machine Learning for Predicting the Surface Plasmon Resonance of Perfect and Concave Gold Nanocubes. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2020, vol. 124, no. 46, pp. 25447-25454.
5. Berzal F. *Redes neuronales & deep learning: Volumen II*. Independently published, 2019.
6. Morgan D., Jacobs R. Opportunities and challenges for machine learning in materials science. *Annual Review of Materials Research*, 2020, vol. 50, pp. 71-103.
7. Laven P. Simulation of rainbows, coronas, and glories by use of Mie theory. *Applied optics*, 2003, vol. 42, no. 3, pp. 436-444.
8. Laven P. Simulation of rainbows, coronas and glories using Mie theory and the Debye series. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2004, vol. 89, no. 1-4, pp. 257-269.
9. Melkumova L.E., Shatskikh S.Y. Comparing Ridge and Lasso estimators for data analysis. *Procedia engineering*, 2017, vol. 201, pp. 746-755.
10. Ranstam J., Cook J.A. Lasso regression. *Journal of British Surgery*, 2018, vol. 105, no. 10, pp. 1348-1348.
11. McDonald G.C. Ridge regression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2009, vol. 1 (1), pp. 93-100.
12. Demsar J., Curk T., Erjavec A., Gorup C., Hocevar T., Milutinovic M., Zupan B. Orange: data mining toolbox in Python. *The Journal of machine Learning research*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 2349-2353.
13. Corani G., Benavoli A. A Bayesian approach for comparing cross-validated algorithms on multiple data sets. *Machine Learning*, 2015, vol. 100, no. 2, pp. 285-304.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В СИСТЕМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЦИНКОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ: *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЕ НА ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В.

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий

г. Минск, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru

Поступила в редакцию: 13.08.2021

Аннотация. Используя внутриклеточный и внеклеточный хелаторы для Zn^{2+} – ТРЕН и ДТРА, продемонстрировано существование специфических рецепторов на поверхности эритроцитов и внутриклеточных депо, отвечающих за поддержание цинкового гомеостаза. В тоже время было показано, что увеличение цитозольного пула лабильного Zn^{2+} свыше 100 нМ приводит к запуску процессов эриптоза, а цитотоксические эффекты цинка обусловлены внутриклеточными молекулярными механизмами, приводящими к выходу Zn^{2+} из клеточных депо. Более того, выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активности эритроцитов, при моделировании окислительного стресса, используя H_2O_2 *in vitro*, что свидетельствует о прямом участии Zn^{2+} в запуске эриптоза, а дисбаланс “прооксиданты/антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера данного процесса. При этом обнаружен рост уровня экспрессии цитозольных тиол-содержащих белков металлотионеинов, как в эритроцитах, истощенных по Zn^{2+} , так и в клетках после индукции окислительного стресса *in vitro* путем воздействия H_2O_2 . Это свидетельствует о функционировании данных белков в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе эритроцитов в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: эритроциты человека, цинковый гомеостаз, лабильный пул цинка, эстеразная активность, металлотионеины, окислительный стресс.

Вопрос о количестве цинка, необходимого для нормального функционирования клеток, до сих пор широко обсуждается в научной литературе. Концепция о “квоте цинка” была впервые предложена O’Halloran [1]. “Квотой цинка” называется общее содержание цинка в клетке, необходимое для ее оптимального роста – около 0,1–0,5 мМ (на одну клетку). Существуют типы клеток, которые не подчиняются этому правилу (напр.: определенные типы нейронов, клетки простаты) [2]. Таким образом, цинк обладает уникальной особенностью, которая заключается в том, что большое количество хелатируемого и лабильного цинка накапливается в ряде клеток и тканей.

В клетках млекопитающих цинк распределен следующим образом: в цитоплазме – 50%, в ядре – 30–40% и в мембране – около 10% [3]. Однако, значительное количество внутриклеточного цинка связывается с белками и таким образом опосредует их важные структурные и каталитические функции. Эти семейства белков называют цинковыми металлопротеинами. На модельных организмах получены данные о степени ассоциации цинка с такими белками. В дрожжах, например, главными Zn-связывающими белками являются Cu/Zn-СОД и преобладающий изофермент алкогольдегидрогеназа (Adh1). В дополнении к этим высокоаффинным сайтам, в клетке также существуют низкоаффинные Zn-связывающие сайты. Они включают слабосвязывающие сайты на белках, липидах, ДНК, а также низкомолекулярные компоненты, такие как, органические анионы (например, цитрат), аминокислоты (гистидин) и глутатион [4]. С учетом этих фактов, стало очевидно, что свободный цинк в клетках присутствует в очень низкой концентрации. Термин “свободный” используется обычно для обозначения специфичного цинка, который является свободно доступным для связывания с вновь синтезированными цинковыми металлопротеинами.

Исследования последних лет показали, что функции цинка более обширны, чем подразумевали ранее под простым определением – необходимый микроэлемент. С одной стороны, существуют прямые доказательства того, что цинк может функционировать как нейротрансмиттер [2]. С другой стороны, Zn^{2+} имитирует действие гормонов, ростовых факторов, цитокинов, что свидетельствует о том, что он может оказывать влияние на внутриклеточные молекулы [5]. Действительно, Zn^{2+} – хорошо известный ингибитор белковых тирозинфосфатаз. Интересен и тот факт, что ионы цинка связывают некоторые ростовые факторы и цитокины напрямую, изменяя их структуру, и тем самым, модулируя их биологическую активность. Установлено, что Zn^{2+} влияет на множество сигнальных молекул, включая РКС, Са/кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (CaMKII), Erk1/2, сАМР-зависимую протеинкиназу (РКА), протеинтирозинфосфатазу и каспазу-3 [5].

На сегодняшний день не остается сомнений в том, что цинк – необходимый структурный компонент иммунной системы, так как было показано, что именно недостаток цинка вызывает сильный иммунодефицит [3]. Было установлено, что локализация транскрипционного фактора Snail в ядре зависит от транспортеров ионов цинка семейства ZIP (в частности ZIP6) [4], а TLR4-опосредованное снижение внутриклеточного свободного цинка также зависит от изменения экспрессии транспортеров цинка. На основании этого было сделано заключение, что Zn^{2+} можно идентифицировать как внутриклеточный сигнальный ион [6]. Как межклеточные, так и внутриклеточные сигнальные функции Zn^{2+} влияют на процессы, которые контролируют пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Подобно кальцию, внутриклеточный статус цинка изменяется динамично в ответ

на внешние стимулы, и он способен их преобразовывать во внутриклеточные сигнальные процессы. Отличительной особенностью цинка в клеточной биологии является большая разница между общим (сотни мкМ) и «свободным» (десятки пМ) пулом цинка. Но даже в таких низких свободных концентрациях (диапазон от фМ до пМ) цинк обладает высоким сродством к каталитическим участкам многих белков и ферментов. Для возможности регуляции внутриклеточных процессов необходимо изменение концентрации «свободных» ионов цинка в клетке от базального уровня до сотен пМ. Стоит отметить, что в отличие от цинковой сигнализации внутриклеточные процессы с участием ионов кальция запускаются при превышении базального уровня (сотни нМ) на 1-2 порядка, причем величина общего уровня клеточного кальция составляет около 2 мМ. Как и для кальция, цинку нужна жесткая система контроля на клеточном уровне этих переходных процессов, т.к. повышение его концентрации может привести к цитотоксичности. К настоящему времени различные научные коллективы представили детальные аспекты, характеризующие эту систему контроля (мембранные белки-транспортеры, ответственные за вход, распределение, хранение и выброс цинка; Zn-связывающие белки – металлотионеины (MTs), Zn-чувствительные молекулы, которые поддерживают гомеостаз цинка), а также, какие нарушения на уровне клетки и организма могут происходить, если этот контроль нарушен [6]. Более того, в клетках млекопитающих могут присутствовать везикулярные сайты хранения ионов цинка [4]. Эти везикулы были обозначены таким термином, как «цинкосомы». Однако до сих пор не выявлена функция этих цинкосом в метаболизме и гомеостазе цинка. Некоторые исследователи предположили их роль в детоксикации избытка цинка. Также было отмечено, что стрессовые агенты, такие как оксид азота (NO) [5], повышают уровень лабильного цинка, вероятно, из-за высвобождения цинка из белков. Этот заново высвобожденный лабильный цинк впоследствии также накапливается в цинкосомах. Таким образом, цинкосома может служить для буферизации цитозольного цинка при кратковременных нарушениях гомеостаза цинка так же, как вакуоль в дрожжах [4]. Другие исследования показали, что цинкосомы участвуют в хранении цинка, который впоследствии может быть мобилизован при его дефиците в клетке [4, 5].

Цель данной работы – изучить связь цинкового гомеостаза с функционированием эритроцитов человека (в частности, с их жизнеспособностью) и выявить участие внутриклеточного лабильного пула Zn^{2+} в формировании защитных механизмов клеток при окислительном стрессе.

Эритроциты человека были выбраны в качестве объекта исследования, т.к. они являются подходящими клетками для оценки статуса цинка в организме (при попадании соединений цинка в кровь человека более 90% металла поступает именно в них), а отсутствие ядра позволяет исключить возможные генотоксические эффекты этого микроэлемента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь условно здоровых доноров в консерванте “гепарин”, полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000g в течение 15 мин и трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl (155 мМ). Инкубацию эритроцитов (1 %-ный гематокрит) с хлоридом цинка ($ZnCl_2$, 10–500 мкМ), внутриклеточным хелатором ионов цинка – N',N'-тетракис-(2-пиридил-метил)-этилендиамин (TPEN, 10–100 мкМ), внеклеточным хелатором ионов цинка – диэтилентридиаминпентауксусной кислотой (ДТРА, 10–100 мкМ) и пероксидом водорода (H_2O_2 , 25–1000 мкМ) проводили при 37°C в течение 120 мин для первого и 30 мин для других агентов в 10 мМ трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 155 мМ NaCl.

Оценку внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM. Для этого эритроциты, ресуспензированные в 10 мМ трисHCl буфере, содержащем 155 мМ NaCl pH 7,4 до 0,2% гематокрита, нагружали красителем, который находился в растворе плюроновой кислоты F 127 и ДМСО, в течение 30 мин при 37°C при постоянном перемешивании. Зонд, не связавшийся с лимфоцитами, отмывали путем центрифугирования суспензии клеток (2000g, 10 мин), ресуспензировали в исходном буфере, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте и дважды отмывали (2000g, 10 мин) в исходном буфере. Далее клетки модифицировали по цинковому гомеостазу согласно протоколу, описанному выше, и после этого проводили измерение интенсивности флуоресценции в FITC-H канале на проточном цитофлуориметре либо записывали кинетику флуоресценции на спектрофлуориметре.

Жизнеспособность эритроцитов контролировали по цитозольной эстеразной активности с помощью высоколипофильного красителя кальцеина-AM (Sigma) по интенсивности флуоресценции его деэстерифицированной формы – кальцеина. Для этого суспензию эритроцитов (0,2% гематокрит), предварительно обработанной агентами, модифицирующими цинковый гомеостаз, инкубировали в 10 мМ трисHCl буфере + 155 мМ NaCl с раствором кальцеина-AM в ДМСО в течение 45 мин при 37°C в темноте и затем переводили в исходный буфер pH 7,4 для цитофлуориметрического анализа на проточном цитофлуориметре в FL-1H канале.

Степень образования свободнорадикальных соединений оценивали с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлороди гидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF-DA$, Molecular Probes). Для этого суспензию эритроцитов (0,2 % гематокрит) нагружали $H_2DCF-DA$ в течение 30 мин при 37°C, затем отмывали путем центрифугирования 2000g, 10 мин в 10 мМ трисHCl буфере + 155 мМ NaCl pH 7,4 и ресуспензировали в исходном буфере. Далее клетки

инкубировали с сульфатом цинка в исследуемых концентрациях по протоколу, описанному выше, и измеряли кинетику испускания флуоресцирующего компонента данного зонда 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) при $\lambda_{\text{возб/рег}} = 505/525$ нм на спектрофлуориметре.

Оценку содержания металлотионеинов (MTs) в эритроцитах проводили с помощью моноклональных антител UC1MT (Abcam), а в качестве изотипического контроля был использован IgG1. Об относительном содержании MTs в эритроцитах человека судили по отношению интенсивности флуоресценции комплекса UC1MT-IgG1-FITC ($I_{\text{фл1}}$) к интенсивности флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC ($I_{\text{фл2}}$), характеризующему неспецифическое связывание антител в клетках.

Цитофлуориметрический анализ проводили на FACSCanto II (Beckton Dickinson), а спектрофлуориметрический – на флуориметре “Cary Eclipse” (Varian). Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения модификации цинкового гомеостаза в эритроцитах человека были использованы следующие агенты: 1) сульфат цинка – для внесения дополнительных ионов Zn^{2+} в клетку из вне; 2) хелаторы цинка TPEN и DTPA – для снижения уровня Zn^{2+} в цитозоле и на мембране клетки соответственно [7]; 3) пероксид водорода – для моделирования состояния окислительного стресса в клетке. В таблице 1 представлены результаты оценки изменения цитозольной концентрации лабильного пула цинка в эритроцитах человека с помощью FluoZin-3-AM [8] после инкубации с выбранными Zn-модифицирующими агентами.

Установлено, что инкубация суспензии эритроцитов с ZnSO_4 в физиологической (10 мкМ); фармакологических (50 и 100 мкМ) и токсичных (500 мкМ) концентрациях в течение 2 ч *in vitro* приводит к дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3 (табл. 1). Так, при воздействии ZnSO_4 в концентрации 10 мкМ интенсивность флуоресценции увеличивается в среднем на 15–25%, при инкубации с 50 мкМ – на 30–45%, при инкубации с 100 мкМ – на 50–75%, а при инкубации с 500 мкМ – на 130–170%. Используя разработанный нами способ [9] был проведен пересчет полученных относительных значений интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в численные значения. Установлено, что после инкубации суспензии эритроцитов с ZnSO_4 в течение 2 ч внутриклеточная концентрация лабильных ионов цинка увеличивалась в среднем соответственно на 17–26 нМ, 30–43 нМ, 48–73 нМ и 131–177 нМ относительно интактных клеток. Инкубация эритроцитов человека с H_2O_2 в концентрациях от 30 до 1000 мкМ, как показано в таблице 1, приводит также к статистически достоверному дозозависимому возрастанию интенсивности флуоресценции FluoZin-3, свидетельствующему об увеличении внутриклеточного пула Zn^{2+} . Так, при воздействии H_2O_2 в концентрациях 30–1000 мкМ, интенсивность флуоресценции FluoZin-3 увеличивается в среднем от 10 до 40% (табл. 1). В свою очередь, инкубация с внутриклеточным мембранопроницаемым хелатором TPEN, который обладает высокой аффинностью к Zn^{2+} ($3,8 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$) [7], в концентрациях 10–100 мкМ, выявила статистически достоверное дозозависимое снижение внутриклеточного пула Zn^{2+} в среднем на 10–50% по отношению к интактным клеткам (таблица 1). При проведении сравнительного анализа хелатирующего эффекта внутриклеточного хелатора TPEN с внеклеточным мембранопроницаемым хелатором DTPA выявлены существенные различия в степени снижения внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка – хелатирующий эффект ионов цинка составил лишь 4–25% (табл. 1).

Параллельно с изучением уровня внутриклеточного пула Zn^{2+} в Zn-модифицированных эритроцитах проведена оценка их цитозольной эстеразной активности (с помощью флуоресцентного красителя кальцеина-AM) – основного маркера жизнеспособности клеток [10]. Как видно из таблицы 2, 2-часовое воздействие *in vitro* на клетки ионов цинка в физиологических (10 мкМ) и фармакологических (50–100 мкМ) концентрациях не сопровождается изменением жизнеспособности клеток. В свою очередь, воздействие ионов цинка в токсичной концентрации (500 мкМ) снижает их жизнеспособность до 40%, что свидетельствует о внутриклеточных

Таблица 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от концентрации агентов, модифицирующий цинковый гомеостаз, при их экспозиции с эритроцитами человека

[Агент], мкМ	Интенсивность флуоресценции FluoZin-3, %			
	ZnSO_4 ,	TPEN,	DTPA,	H_2O_2 ,
	2 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C
0	100	100	100	100
10	128,8±10,0	97,01±1,67	99,0±3,4	–
25	–	86,11±1,95	95,1±3,3	106,97±6,67
50	132,5±13,0	75,05±3,04*	87,3±3,6	–
100	166,1±15,0*	53,00±3,62*	76,1±4,8*	107,25±1,95*
500	254,5±25,0*	–	–	119,95±3,04*
1000	–	–	–	132,96±3,62*

За 100% принято значение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах (контроль); * – различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$)

Таблица 2. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции кальцеина от концентрации агентов, модифицирующий цинковый гомеостаз, при их экспозиции с эритроцитами человека

[Агент], мкМ	Интенсивность флуоресценции кальцеина, %			
	ZnSO ₄ ,	TPEN,	DTPA,	H ₂ O ₂ ,
	2 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C	0,5 ч, 37°C
0	100	100	100	100
10	94,72±1,52	120,45±4,56*	101,20±5,23	–
25	–	153,69±20,62*	115,67±13,21	89,00±5,55*
50	94,16±3,33	165,80±11,45*	95,30±10,23	–
100	93,72±2,42	170,20±5,67*	91,20±16,45	73,06±6,60*
500	56,19±2,21*	–	–	31,90±8,33*
1000	–	–	–	8,32±1,36*

За 100% принято значение интенсивности флуоресценции кальцеина в интактных эритроцитах (контроль); *

– различия по сравнению с интактными эритроцитами достоверны ($p < 0,05$)

изменениях, предшествующих эритрозу. Воздействие H₂O₂ в изученных концентрациях (30–1000 мкМ) приводит к снижению интенсивности флуоресценции кальцеина на 5–90%, что также свидетельствует об ингибировании цитозольной эстеразной активности в эритроцитах человека и запуску апоптотических процессов (табл. 2). Инкубация же клеток с внутриклеточным хелатором цинка TPEN в концентрациях 10–100 мкМ в течение 30 мин позволила обнаружить статистически достоверное увеличение интенсивности флуоресценции зонда в среднем на 20–75% (табл. 2). Однако, при воздействии на эритроциты мембранонепроницаемого хелатора DTPA в таких же концентрациях не обнаружено достоверного изменения активности эритроцитарных эстераз по отношению к интактным клеткам (табл. 2).

Более того, проведенный корреляционный анализ выявил обратную статистически значимую зависимость между изменением внутриклеточного уровня лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активности эритроцитов, подвергшихся воздействию *in vitro* ZnSO₄ ($r_{s1} = -0,958$, $p = 0,01$); H₂O₂ ($r_{s2} = -0,98$, $p = 0,003$) и TPEN ($r_{s3} = -0,866$, $p = 0,049$), но не DTPA ($r_{s4} = 0,597$, $p = 0,288$).

Чтобы объяснить разнонаправленные результаты по изменению активности клеточных эстераз, полученные при действии хелаторов двух типов, мы изучили кинетику флуоресценции FluoZin-3, встроенного в суспензию эритроцитов в течение 10 минут после добавления этих модифицирующих агентов. Как видно из рисунка 1А, при добавлении внутриклеточного хелатора TPEN к суспензии клеток было обнаружено резкое скачкообразное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 до базального уровня, что свидетельствует о необратимом истощении эритроцитов по Zn²⁺. В опытах, когда к эритроцитам был добавлен внеклеточный хелатор DTPA (рис. 1Б), мы наблюдали плавное нарастание интенсивности флуоресценции FluoZin-3, что свидетельствует об увеличении цитозольного уровня лабильных ионов цинка.

Т.е., при добавлении цинкового хелатора, который связывает этот ион на поверхности мембраны, происходит высвобождение Zn²⁺, запасенного в клеточных депо (например, металлотионеинов), для восполнения его недостатка на мембране и только при увеличении времени воздействия мы наблюдали плавное снижение уровня цитозольного цинка в результате истощения внутриклеточных запасов (табл. 1). Более того, можно предположить, что на поверхности эритроцитов находятся специфические рецепторы, отвечающие за поддержание цинкового гомеостаза [11].

С целью выявления одного из механизмов описанных выше внутриклеточных изменений при модификации цинкового гомеостаза в эритроцитах, было изучено образование в них свободнорадикальных соединений. На рисунке 2 показана кинетика интенсивности флуоресценции DCF в суспензии эритроцитов человека при

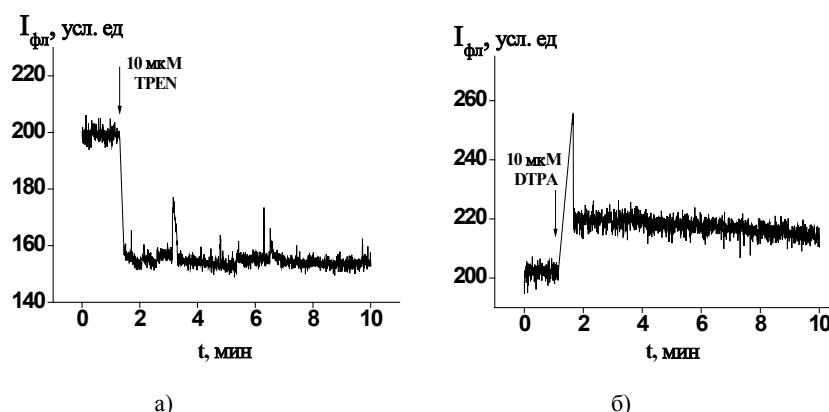


Рисунок 1. Модификация внутриклеточного пула лабильных ионов цинка в эритроцитах человека. Кинетика интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в эритроцитах при последующем добавлении в суспензию клеток внутриклеточного хелатора Zn²⁺ TPEN (а) и внеклеточного хелатора Zn²⁺ DTPA (б)

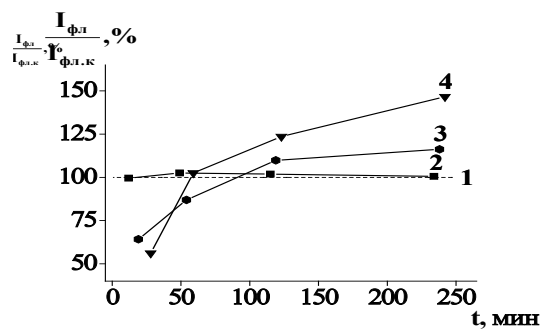


Рисунок 2. Кинетика интенсивности флуоресценции DCF в эритроцитах в зависимости от концентрации сульфата цинка в среде инкубации. За 100% принято значение интенсивности флуоресценции DCF ($I_{фл.к.}$) интактных клеток; 1 – эритроциты без воздействия сульфата цинка (контроль); 2, 3, 4 – эритроциты, подвергшиеся воздействию сульфата цинка в концентрациях 50; 100 и 500 мкМ, соответственно; $\lambda_{возб.} = 505$ нм; $\lambda_{рег} = 525$ нм

воздействию сульфата цинка в субгемолитических концентрациях. Как видно из рисунка 2, сульфат цинка в концентрации 50 мкМ не оказывает существенного влияния на образование свободнорадикальных соединений в этих клетках. Инкубация эритроцитов в среде, содержащей 100 и 500 мкМ сульфата цинка, приводит в течение первых 60–90 мин к снижению интенсивности флуоресценции DCF на 15–35% и 40–45%, соответственно, т.е. ионы цинка проявляют антиоксидантное действие, что хорошо согласуется с литературными данными [12]. При увеличении времени инкубации до 4 ч происходит возрастание свечения DCF на 10–20% и 20–45% по отношению к интактным эритроцитам, соответственно, т.е. ионы цинка оказывают прооксидантное действие. Таким образом, увеличение внутриклеточного пула лабильных Zn^{2+} в концентрациях свыше 100 нМ приводит к нарастанию уровня АФК в эритроцитах, т.е. дисбаланс прооксиданты/антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера запрограммированной гибели эритроцитов. Этот вывод также согласуется с обнаруженной нами обратной зависимостью между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активности эритроцитов при моделировании окислительного стресса, используя пероксид водорода и TPEN *in vitro*. Как было показано ранее, действие этих агентов сопровождаются ингибированием ферментов системы антиоксидантной защиты клетки (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза) и снижением уровня низкомолекулярного антиоксиданта – восстановленного глутатиона [13,14]. Однако остается открытым вопрос, что происходит после модификации цинкового гомеостаза с уровнем другого низкомолекулярного цистеинсодержащего белка – металлотионеина. Данный белок, как было описано в литературном обзоре, является основным депо цинка, т.е. регулирует метаболизм цинка, и совместно с восстановленным глутатионом участвует в поддержании клеточного редокс-состояния [4,15]. Более того, исходя из литературных данных, металлотионеины можно рассматривать как более эффективный антиоксидант по сравнению с другими системами, такими как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза [16].

Как видно из рисунка 3, при моделировании в эритроцитах человека окислительного стресса путем 30-минутного воздействия H_2O_2 в максимально исследуемой концентрации 500 мкМ, также как и при моделировании Zn-дефицитного состояния, используя хелаторы цинка TPEN и DTPA в концентрации 50 мкМ происходит увеличение уровня содержания металлотионеинов в клетках в среднем в 3–5 раз.

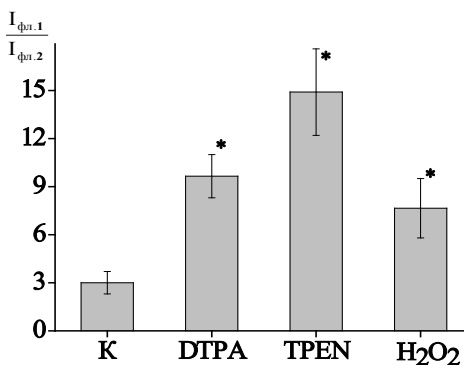


Рисунок 3. Относительный уровень содержания металлотионеинов в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию хелаторов цинка TPEN и DTPA, а также пероксида водорода *in vitro*. К – контроль (инактивные эритроциты); DTPA и TPEN были использованы в концентрации 50 мкМ; пероксид водорода в концентрации 500 мкМ. * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

В тоже время, как было показано нами ранее [13,14], уровень восстановленного глутатиона критически снижается при воздействии пероксида водорода и хелатора ТРЕН, но не ДТРА. Полученные результаты подтверждают наше предположение о функционировании МТs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клетки и проявлении своих антиоксидантных свойств в условиях окислительного стресса, также как и в качестве регулятора метаболизма цинка, что видно на примере действия ДТРА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о существовании в эритроцитах человека механизмов регуляции лабильного пула цинка и концентрационной грани между его “эссенциальными” и токсичными свойствами, нарушение которой может привести к запуску патологических процессов, что было продемонстрировано нами ранее на примере сахарного диабета II типа, где цинковый гомеостаз в этиопатогенезе данной патологии играет важную роль [17].

Список литературы / References:

1. Outten C.E., O'Halloran T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 2001, vol. 292, pp. 2488-2492. doi: 10.1126/science.1060331
2. Frederickson C.J., Suh S.W., Silva D., Frederickson C.J., Thompson R.B. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of Nutrition*, 2000, vol. 130, suppl 5S, pp.1471S-1483S. doi: 10.1093/jn/130.5.1471S
3. Haase H., Rink L. Zinc signals and immune function. *Biofactors*, 2014, vol. 40, pp. 27-40. doi: 10.1002/biof.1114
4. Eide D.J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1763, pp. 711-722. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.03.005
5. Beyersmann D., Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biomaterials*, 2001, vol. 14, pp. 331-341. doi: 10.1023/a:1012905406548
6. Yamasaki S., Sakata-Sogawa K., Hasegawa A., Suzuki T., Kabu K., Sato E., Kurosaki T., Yamashita S., Tokunaga M., Nishida K., Hirano T. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J. Cell Biol*, 2007, vol. 177, no. 4, pp. 637-645. doi: 10.1083/jcb.200702081
7. McCabe M.J., Jiang S.A., Orrenius S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. *Lab. Invest*, 1993, vol. 69, no. 1, pp. 101-110. PMID: 8331893
8. Gee K.R., Zhou Z.-L., Ton-That D., Sensi S.L., Weiss J.H. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*, 2002, vol. 31, no. 5, pp. 245-251. doi: 10.1016/S0143-4160(02)00053-2
9. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Determination of the Dynamics of Change in the Intracellular Pool of Zinc Ions in Human Erythrocytes Using a FluoZin-3 Fluorescent Probe. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2021, vol. 87, no. 6, pp. 1094-1099. doi: 10.1007/s10812-021-01114-6
10. Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J., Montreuil J. Novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*, 2005, vol. 66A, pp. 78-84. doi: 10.1002/cyto.a.20152
11. Hershfinkel M. The Zinc Sensing Receptor, ZnR/GPR39, in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci*, 2018, vol. 19, no. 439, pp. 57-75. doi: 10.3390/ijms19020439
12. Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 264-275. doi: 10.1134/S0006350914020092
13. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Kanash Y.S., Zubritskaya G.P., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. The role of intracellular zinc in H₂O₂-induced oxidative stress in human erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 950-958. doi: 10.1134/S0006350916060087
14. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Zn-дефицитные состояния в эритроцитах человека *in vitro* и свободнорадикальные процессы. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*, 2017, № 3, с. 54-63. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V. Zn-deficient states in human erythrocytes *in vitro* and free radical processes. *J. Belarus. State Univ. Ecol*, 2017, vol. 3, pp. 54-63. (In Russ)]
15. Nordberg J., Arner E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med*, 2001, vol. 31, pp. 1287-1312. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00724-9
16. Sato M., Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J. Exp. Med*, 2002, vol. 196, pp. 9-22. doi: 10.1620/tjem.196.9
17. Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. The role of metallothioneins in the maintenance of zinc homeostasis and state in erythrocytes of cardiologic patients with the metabolic disorders. *Journal of Integrated OMICS*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 10-16. doi: 10.5584/jiomics.v9i1.260

**OXIDATIVE STRESS IN THE INTRACELLULAR ZINC SIGNALING SYSTEM:
IN VITRO INVESTIGATION ON HUMAN ERYTHROCYTES**

Harmaza Y.M., Tamashevski A.V.

Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies

Minsk, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru

Abstract. It was demonstrated the existence of specific receptors on the surface of red blood cells and intracellular stores responsible for maintaining zinc homeostasis using intracellular and extracellular zinc chelators – TPEN and DTPA. At the same time, it was shown that rise the cytosolic pool of labile Zn^{2+} over 100 nM leads to the initiation of apoptotic processes. The intracellular molecular mechanisms leading to Zn^{2+} release from cellular stores determine the cytotoxic zinc effects. Moreover, an inverse relationship between the intracellular labile zinc pool and esterase activity of red blood cells under modeling oxidative stress using H_2O_2 *in vitro* was revealed. It indicates the direct participation of Zn^{2+} in triggering eryptosis and that “prooxidants/antioxidants” imbalance in favor of the former acts as a trigger of this process. At the same time, an increase in the expression level of cytosolic thiol-containing metallothioneins was detected, both in red blood cells depleted by Zn^{2+} and in cells after the oxidative stress induction. These indicate the functioning of metallothioneins as an adjuvant antioxidant in the protective system of red blood cells under oxidative stress.

Key words: *human erythrocytes, zinc homeostasis, labile zinc pool, esterase activity, metallothioneins, oxidative stress.*

АНАЛИЗ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЗУБНОГО ПОРОШКА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПОЛОСТИ РТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА

Богачева Е.А., Ажищева М.В., Сыровец А.А., Лантушенко А.О.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, РФ; e-mail: lantushenko@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.08.2021

Аннотация. В работе представлены результаты экспериментальных исследований изменения состояния буккального эпителия человека при использовании зубного порошка (продукт убтан для зубов "мята" фирмы «Ubtanica»). Исследовалось состояние эпителиальных клеток ротовой полости у 10 доноров с выраженными воспалительными процессами, 5 испытуемым было предложено использовать убтан для зубов, а 5 человек продолжили чистить зубы обычной пастой. После двухнедельного эксперимента у участников были повторно собраны эпителиальные клетки. У всех доноров, применявших зубной порошок, наблюдалось снижение общего количества нарушений, больше всего снизилось количество деструкционных аномалий. У испытуемых, пользовавшихся обычной зубной пастой, результаты не так однозначны: у некоторых наблюдалось снижение количества нарушений, но меньшее в процентном соотношении, у других – увеличение клеток с аномалиями.

Ключевые слова: буккальный эпителий, микроядерный тест, ядерные аномалии, убтан, зубной порошок.

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом всё большую популярность среди потребителей косметических средств приобретает «зелёная» косметика, то есть косметика, созданная на основе натурального сырья [1]. Такая косметика должна обладать не только высокой эффективностью, но и быть максимально безопасной и гипоаллергенной. Одним из вариантов профилактики воспалительных заболеваний полости рта является использование зубных паст и порошков с противовоспалительными компонентами, причем особую актуальность приобретает растительное происхождение сырья.

В работе исследован зубной порошок, основу которого составляет бело-голубая глина, а также комплекс лекарственных трав: мята, корень аира, подорожник, ромашка, зверобой, крапива, репешок, мать-и-мачеха, чабрец, шалфей, эфирное масло (убтан для зубов «Мята» фирмы «Ubtanica»).

Исследования проводили с помощью микроядерного теста буккального эпителия. Данный метод является безопасным, не травматичным, простым и дешёвым и вместе с тем достаточно информативным, что обусловило его широкое применение в различных исследованиях [2,3]. Появление ядерных нарушений в пробе буккальных эпителиоцитов наблюдается не ранее чем через трое суток после воздействия с пиком около семи суток. В данной работе исследовалось состояние эпителиальных клеток ротовой полости у 10 доноров с выраженными воспалительными процессами, далее 5 испытуемым было предложено использовать убтан для зубов, а 5 человек продолжили чистить зубы обычной пастой. После двухнедельного эксперимента у участников были повторно собраны эпителиальные клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования выбирались испытуемые, у которых наблюдались воспалительные процессы в ротовой полости: воспаления, связанные с заболеваниями дёсен или повреждениями из-за брекетов.

Появление ядерных нарушений в пробе буккальных эпителиоцитов наблюдается не ранее чем через трое суток после воздействия с пиком около семи суток, и в течение двух-трёх недель идёт снижение до фонового уровня [4]. Сбор клеток осуществлялся дважды: в период проявления воспалительных симптомов и через 2 недели после использования убтана или обычной пасты. Под воздействием каких-либо факторов в клетках образуются аномалии ядра, которые делятся на: цитогенетические, пролиферативные и деструкционные [5]. К цитогенетическим относятся клетки с микроядрами, протрузиями типа «разбитое яйцо» и «язык», к пролиферативным – двуядерные клетки, насечка, а к деструкционным – клетки с перинуклеарной вакуолью, кариорексисом, кариолизисом и кариопикнозом.

При взятии материала делался соскоб с слизистой оболочки щеки выше линии смыкания зубов стерильным шпателем, который предварительно был обработан спиртом. Клетки помещались на предметное стекло и окрашивались красителем азур-эозином по Романовскому-Гимза в течение 15 минут. Далее образцы промывались дистиллированной водой и просушивались. У каждого донора анализировалось 1500 клеток, среди них несколько процентов составляли клетки с различными ядерными нарушениями. Клетки исследовались с помощью тринокулярного светового микроскопа «Микмед-6» («Ломо», Россия) в ЦКП «Молекулярная структура вещества» СевГУ, используемое увеличение $\times 400$.

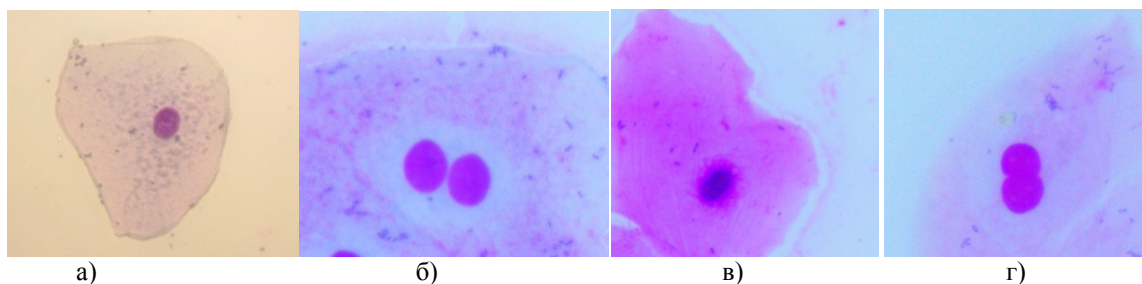


Рисунок 1. Фотографии здоровой клетки (а) и ядерных аномалий в клетках с воспалительными процессами, полученные в результате исследования, б – двухядерная, в – кариорексиз, г – насечка

Анализировались следующие группы ядерных аномалий: цитогенетические, пролиферационные и деструкционные.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При воспалительных заболеваниях наблюдались аномалии всех типов, однако доминировали по количеству клетки с деструкционными нарушениями (кариорексис и кариолизис), также наблюдалось существенное количество двухядерных клеток. Фото некоторых аномалий представлены на рисунке 1.

У всех доноров, применявших зубной порошок, наблюдалось снижение общего количества нарушений (табл. 1 и рис. 2), больше всего снизилось количество деструкционных аномалий (рис. 3). У испытуемых, пользовавшихся обычной зубной пастой, результаты не так однозначны: у некоторых наблюдалось снижение количества нарушений, но меньшее в процентном соотношении, у других – увеличение клеток с аномалиями (рис. 2).

Таблица 1. Количество нарушений (в промилле) в ядрах клеток буккального эпителия при воспалительных заболеваниях и спустя 2 недели после использования убтана/пасты (отмечены*)

номер донора	нарушения в ядрах клеток букального эпителия, %								Общее количеств
	цитогенетические показатели			пролиферативные показатели		деструкционные показатели			
	микродро	протрузия типа разбитое яйцо	протрузия типа язык	двухядерн ая	насечка	кариопикн оз	кариорекс ис	кариолизи с	
Доноры, использовавшие убан									
2	0	0	0	9	2	0	45	14	65
2*	0	0	0	3	1	0	21	4	29
4	0	0	0	7	5	0	53	16	81
4*	0	1	2	3	1	0	29	5	41
5	0	0	0	14	6	0	34	1	55
5*	0	0	1	3	5	0	21	1	30
7	0	0	0	3	1	0	61	9	74
7*	0	0	0	1	1	0	37	25	65
10	0	0	0	3	2	0	25	14	44
10*	0	0	0	1	5	0	12	0	18
Доноры, использовавшие зубную пасту									
1	0	1	0	9	3	0	28	7	48
1*	0	0	0	9	5	0	37	5	55
3	0	0	0	5	6	0	35	9	56
3*	0	0	0	6	7	0	28	5	52
6	0	0	0	5	4	0	27	0	36
6*	0	0	2	9	5	1	48	7	72
8	0	0	0	2	3	0	27	1	34
8*	0	0	0	1	1	0	10	0	12
9	0	1	0	3	2	0	12	1	19
9*	0	0	5	1	1	0	13	4	24

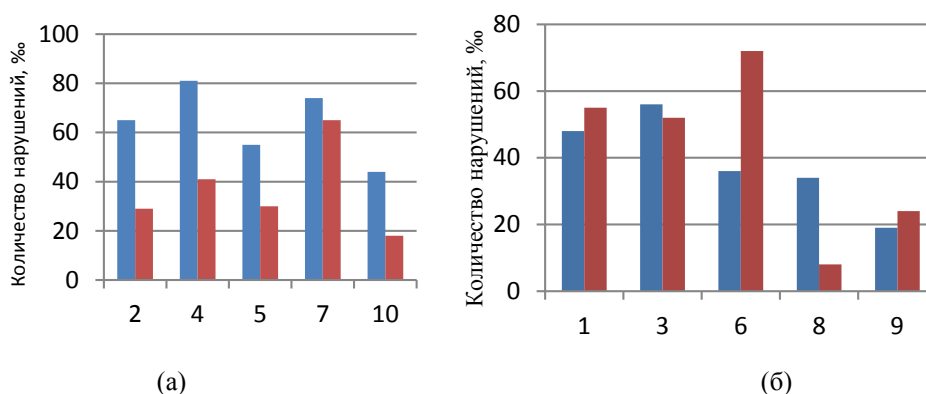


Рисунок 2. Динамика общего количества нарушений в ядрах клеток буккального эпителия доноров, пользовавшихся зубным порошком (а) и зубной пастой (б) ■ - до, ■ - после.

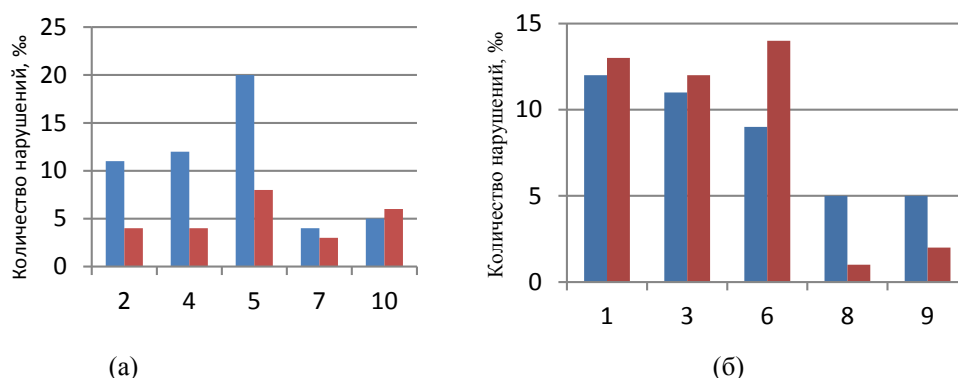


Рисунок 3. Динамика пролиферативных нарушения в ядрах клеток буккального эпителия доноров, пользовавшихся зубным порошком (а) и зубной пастой (б) ■ - до, ■ - после

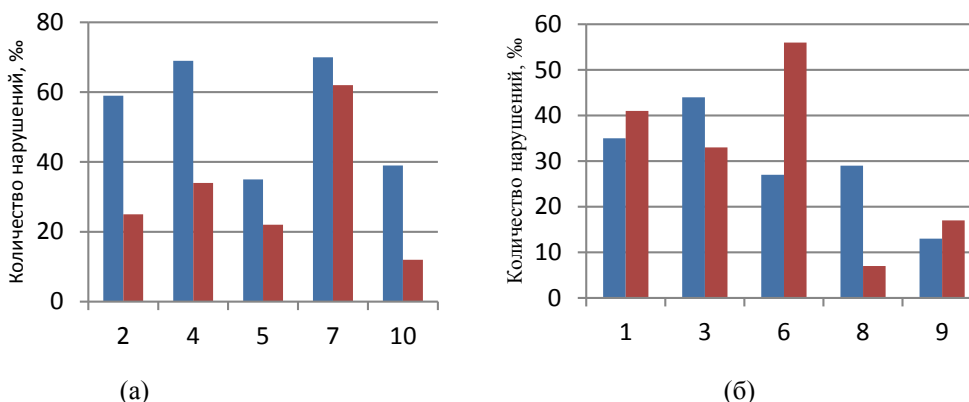


Рисунок 4. Динамика деструкционных нарушений в ядрах клеток буккального эпителия доноров, пользовавшихся зубным порошком (а) и зубной пастой (б) ■ - до, ■ - после

Ранее было исследовано влияние водного экстракта прополиса на состояние клеток буккального эпителия при воспалительных процессах [5]. Сравнивая полученные результаты, можно заметить, что действие прополиса имеет более выраженный противовоспалительный характер. Поэтому для профилактики воспалительных процессов может быть рекомендовано ежедневное использование убтана для зубов, а при появлении воспалительных симптомов в качестве доврачебной помощи – дополнительное применение противовоспалительных средств, например, водного экстракта прополиса.

Список литературы / References:

1. Гаскарова О.В. Перспективы использования фитиновой кислоты как биологически-активной добавки растительного происхождения в косметических средствах. *Проектная культура и качество жизни*, 2018, № 10, с. 47-52. [Gaskarova O.V. Prospects for the use of phytic acid as a biologically active additive of plant origin in cosmetics. *Project culture and quality of life*, 2018, no. 10, pp. 47-52. (In Russ.)]
2. Калаев В.Н., Нечаева М.С., Калаева Е.А. *Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: монография*. Воронежский государственный университет, Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016,

136 с. [Kalayev V.N., Nechaeva M.S., Kalaeva E.A. *Micronucleus test of buccal epithelium of the human oral cavity: monograph*. Voronezh State University, Voronezh: Voronezh State University Publishing House, 2016, 136 p. (In Russ.)]

3. Юрченко В.В. Цитогенетические нарушения в эпителии щеки человека при экспозиции генотоксикантами. *Токсикологический вестник*, 2005, № 6, с. 14-21. [Yurchenko V.V. Cytogenetic disorders in the human cheek epithelium upon exposure to genotoxicants. *Toxicological Bulletin*, 2005, no. 6, pp. 14-21. (In Russ.)]

4. Ильинских Н.Н., Ксенц А.С., Ильинских Е.Н., Васильев С.А., Манских В.Н., Ильинских И.Н. *Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности*. Томск: ТГПУ, 2011, 312 с. [Ilinskikh N.N., Ksenz A.S., Ilinskikh E.N., Vasiliev S.A., Manskikh V.N., Ilinskikh I.N. *Micronucleus analysis in the assessment of cytogenetic instability*. Tomsk: TGPU, 2011, 312 p. (In Russ.)]

5. Скуратовская И.В., Яковлев Д.А., Лантушенко А.О. Воздействие водного экстракта прополиса на клетки буккального эпителия человека при воспалительных заболеваниях ротовой полости. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. БФФХ-2017: материалы XII международной научно-технической конференции, Севастополь, 2017, с. 51. [Skuratovskaya I.V., Yakovlev D.A., Lantushenko A.O. The effect of an aqueous propolis extract on human buccal epithelium cells in inflammatory diseases of the oral cavity. *Topical issues of biological physics and chemistry*. BFF-2017: materials of the XII international scientific and technical conference, Sevastopol, 2017, p. 51. (In Russ.)]

ANALYSIS OF THE ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF TOOTH POWDER IN DISEASES OF THE ORAL CAVITY USING A MICRONUCLEUS TEST

Bogacheva E.A., Azhishcheva M.V., Syrovets A.A., Lantushenko A.O.

Sevastopol State University

Sevastopol, Russia; e-mail: lantushenko@mail.ru

Abstract. The work presents the results of experimental studies of changes in the state of the human buccal epithelium when using the tooth powder (ubtan product for teeth "mint" from the company "Ubtanica"). The condition of the epithelial cells of the oral cavity was studied in 10 donors with pronounced inflammatory processes, 5 subjects were asked to use ubtan for teeth, and 5 people continued to brush their teeth with ordinary paste. After a two-week experiment, epithelial cells were reassembled from the participants. All donors who took tooth powder had a decrease in the total number of violations, the number of destructive anomalies decreased the most. In the subjects who used ordinary toothpaste, the results are not so unambiguous: some had a decrease in the number of violations, but less in percentage, others had an increase in cells with anomalies.

Key words: buccal epithelium, micronucleus test, nuclear anomalies, ubtan, tooth powder.

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС В КАЧЕСТВЕ КРИТЕРИЯ ДЛЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО УЧЕТА ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Тамашевский А. В., Гармаза Ю. М., Федуро Н.А., Пасюков В.В.

Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ

Долгиновский тракт 160, г. Минск, 220053, РБ; e-mail: Tayzoe@mail.ru

Поступила в редакцию: 16.08.2021

Аннотация. Проведена оценка редокс-состояния лимфоцитов пациентов (взрослых и детей) с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) до и после воздействия на них лекарственных средств (флударабела, винкристина, дексаметазона и иматиниба) в концентрациях, близких к терапевтическим, а также определена их чувствительность к данным противоопухолевым химиопрепаратам. Установлено, что краткосрочное (2–3 ч) и долгосрочное (18–20 ч) воздействие исследуемых химиопрепаратов на лимфоциты пациентов с ОЛЛ приводит к разнонаправленному характеру изменения содержания активных форм кислорода в лейкозных клетках. Воздействие исследуемых химиопрепаратов на клетки детей при ОЛЛ приводит к увеличению содержания в них низкомолекулярных антиоксидантов (НА), в клетках условно здоровых доноров подобной тенденции не наблюдается. Обнаружено принципиальное различие роли НА в клетках условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ в процессе метаболизма исследуемых лекарственных средств, причем в интактных клетках детей при ОЛЛ уровень содержания НА в среднем в 2 раза превышает таковой в клетках условно здоровых доноров. Индивидуальная чувствительность клеток пациентов с ОЛЛ при воздействии лекарственных средств характеризуется значительной вариабельностью, что указывает на необходимость персонификации их чувствительности к химиотерапевтическим воздействиям *ex vivo*. Более того, обнаружена определенная чувствительность клеток условно здоровых доноров к исследуемым химиопрепаратам (кроме иматиниба), что необходимо учитывать при использовании протоколов химиотерапии в процессе лечения конкретных пациентов. Для возможности персонифицированного учета ответа клеток пациентов с ОЛЛ на химиотерапию можно использовать изменение их окислительно-восстановительного баланса в качестве прогностического показателя.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, активные формы кислорода, низкомолекулярные антиоксиданты, жизнеспособность клеток, противоопухолевые химиопрепараты.

В настоящее время острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) занимает ведущее место в структуре онкогематологической патологии в детском и подростковом возрасте. На его долю приходится 20% от всех злокачественных заболеваний [1] и 85% от всех лейкозов [2]. Оптимистичные результаты терапии *de novo* при ОЛЛ, полученные в конце 60-х годов прошлого столетия у детей и позволившие через 20 лет говорить об излечении более 50%, а к концу 90-х годов – уже о 80% пациентов [3], давали возможность полагать, что прогноз при ОЛЛ у взрослых будет в такой же степени благоприятным в плане ответа на терапию и длительности безрецидивной выживаемости, как и у детей. И в течение трех последних десятилетий многие группы исследователей, применяя программы химиотерапии различной интенсивности, пытаются воспроизвести у взрослых больных ОЛЛ эти результаты, которые можно назвать эталоном онкологической эффективности. Но, при этом, что полная ремиссия достигается в 70–80% случаев, лишь 30–40% больных переживают пятилетний рубеж без рецидива, т.е. только у 20–25% из общего числа заболевших можно говорить о выздоровлении [4]. Известно, что цитогенетические и молекулярные характеристики лейкозных клеток определяют прогноз заболевания. А тот факт, что у взрослых пациентов с ОЛЛ в 10 раз чаще определяются неблагоприятные хромосомные аномалии, возможно и объясняет малоудовлетворительные результаты лечения.

Рецидивы и резистентные формы регистрируются у взрослых больных ОЛЛ практически с той же частотой, как и при острых миелоидных лейкозах, составляя самую главную причину неудач в лечении. Терапия рефрактерных форм острых лимфобластных лейкозов основывается на принципах высокодозного воздействия, особенно, если речь идет о ранних рецидивах и резистентных вариантах ОЛЛ.

На основе изучения ферментов биотрансформации и транспортеров лекарственных препаратов, молекулярно-генетических предикторов ответа на терапию в настоящее время стал возможным более обоснованный выбор терапии, однако такие маркеры в полной мере не могут характеризовать ответ на конкретный набор химиопрепаратов, используемый для терапии онкогематологических заболеваний. Более адекватным для обоснования выбора протокола терапии является оценка индивидуальной лекарственной чувствительности *in vitro*.

Очевидно, что расширение спектра предсказательных диагностических технологий может способствовать прогнозированию ответа на терапию в организме с целью выбора адекватной стратегии лечения и ее мониторинга. Известно, что окислительный стресс играет особую роль в реализации токсического эффекта в лейкозных клетках, хотя базальный уровень свободных радикалов в клетках различных форм лейкозов и пациентов при одной и той же форме лейкоза характеризуются значительной гетерогенностью [5]. Это

неудивительно, так как двойственная роль активных форм кислорода (АФК) в физиологии и патологии клетки очевидна. Действительно, физиологические уровни АФК способны даже защитить клетку от апоптоза путем активации антиоксидантных механизмов.

С другой стороны, было продемонстрировано, что природное соединение, эффективно отключающее глутатион-зависимую антиоксидантную систему, способно убивать раковые клетки яичников, в которых обнаружена активация генерации АФК, под влиянием онкогенного сигнала *Ras*, но при этом проявляет низкую токсичность для незлокачественных эпителиальных клеток яичников с низким уровнем АФК [6]. На основе этих наблюдений авторы сделали вывод, что лейкозные клетки из-за значительного усиления в них генерации АФК, вероятно, будут также сильно зависеть от функционирования антиоксидантной системы для поддержания редокс-баланса и могут проявлять частичную чувствительность к подобного рода препаратам. Также было установлено, что лимфоциты здоровых людей более толерантны к подобной терапии из-за низкого базального уровня АФК и нормальной метаболической регуляции, что связывают с окислительным повреждением ДНК и с мутациями митохондриального ДНК в лейкозных клетках, в особенности у пациентов, перенесших терапию ДНК-разрушающими лекарственными препаратами [7,8]. Поскольку дыхательная цепь митохондрий является основным источником АФК вследствие бифуркации электронов от транспортных комплексов, предполагается, что дисфункция митохондриального дыхания может усиливать утечку электронов, приводящую к повышенному содержанию АФК в лейкозных клетках.

Было также установлено, что флударабел-резистентные клетки пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) на поздней стадии заболевания с предшествующей терапией или с отключенным белком p53 имеют тенденцию к увеличению уровня АФК и они более чувствительны к соединениям, способным отключать глутатион-зависимую антиоксидантную систему или к его аналогам [9].

Таким образом, один из определяющих факторов клеточного ответа на экзогенные стимулы – окислительно-восстановительный баланс, благодаря жесткой регуляции внутриклеточного содержания АФК с помощью системы антиоксидантной защиты, способен выступать в качестве прогностического показателя устойчивости к лекарственным препаратам не только у пациентов с вновь диагностированным заболеванием, но и проследить изменение чувствительности к получаемой терапии.

В связи с этим актуальными являются оценка выживаемости лейкозных клеток различных типов на основе учета в них содержания АФК, что может лечь в основу доклинической лабораторной оценки индивидуальной лекарственной чувствительности клеток пациентов при лейкозах.

Несмотря на то, что гетерогенность ответа пациентов на терапию полностью не определяется вариантами взаимодействия клеток с лекарственными средствами вне организма, доклинический ответ клеток *in vitro* может исключить назначение неэффективных для конкретного пациента лекарственных средств, что является одним из способов предупреждения развития множественной лекарственной резистентности, а также использования редуцированной цитостатической нагрузки [10,11].

Цель работы – определить жизнеспособность клеток пациентов с ОЛЛ после воздействия лекарственных средств, применяемых при терапии в клинике и оценить их редокс-состояние для выявления критерия, подходящего для персонифицированного учета ответа лейкозных клеток на терапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ, $n=62$), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» и РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Периферическая кровь условно здоровых доноров ($n=20$) была предоставлена РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ. Все образцы крови содержались в консерванте «гепарин».

Критериями включения в группу исследований пациентов с ОЛЛ являлись: начало индукционной терапии - внутри временного промежутка проведения исследования, диагноз ОЛЛ установлен на основании клинических данных, анализов периферической крови, результатов морфологического, цитохимического и иммунологического исследований клеток костного мозга. Критериями исключения из группы исследований пациентов с ОЛЛ являлись: тяжелый соматический статус пациента, который определяет возможность перенести химиотерапию, ОЛЛ – вторая злокачественная опухоль, отклонения от протокола, не обусловленные побочными действиями лечения и/или осложнениями течения заболевания, субъективные причины (например, отказ больных от интенсивной терапии и т.п.).

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистобака-1077 путем центрифугирования крови ($300 \times g$, 30 мин) и последовательных отмывок в 10 мМ фосфатном буфере (PBS, pH 7,4). После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин. Клетки инкубировали в 96-ти луночных планшетах в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием CO_2 при температуре $37^\circ C$ в течение 2–3 ч, 18–20 ч или 44 ч с лекарственными средствами, затем отмывали ($300g$) в 10 мМ PBS (pH 7,4) в течение 10 мин от химиопрепаратов и RPMI-1640 и использовали согласно экспериментальным протоколам.

В качестве лекарственных средств использовали химиопрепараты четырех различных классов в концентрациях, близких к терапевтическим: нуклеозидный аналог флударабел (**Flu**, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл); винка-алкалоид винкристин (**Vincr**, 0,125 мкг/мл или 0,25 мкг/мл); ингибитор протеинтирозинкиназы иматиниб

(**Imat**, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл), а также синтетический глюкокортикостероид дексаметазон (**Dex**, 2,5 мкг/мл или 5 мкг/мл).

Оценку уровня АФК в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ проводили цитофлуориметрически с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) по интенсивности флуоресценции конечного продукта 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеин (CM-DCF) в FITC-Н канале. Известно, что CM-H₂DCFDA [12], прямо или косвенно способен окисляться с образованием флуоресцирующего продукта практически всеми основными АФК, образующимися в клетке в процессе ее жизнедеятельности [13], что позволяет использовать данный зонд для оценки изменения окислительно-восстановительного баланса. Итоговые результаты для данного метода представлены в виде отношения значений средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах после воздействия химиопрепарата (**I_{ф.л}**) к средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в контрольных лимфоцитах (**I_{ф.к}**) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах. При определении интенсивности флуоресценции CM-DCF в клетках пациентов с ОЛЛ учитывались только жизнеспособные лимфоциты, выделенные в отдельный регион по показателям бокового (SSC-H) и прямого (FSC-H) светорассеяния. Клетки, не меченные CM-H₂DCFDA, из анализа исключались. Все измерения проводились на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FITC-Н канале.

Чувствительность ПМНК к лекарственным средствам определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ теста). МТТ тест позволяет проводить сравнительную оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клеток [14]. Итоговые данные представлены в виде отношения значений средней оптической плотности суспензии после воздействия химиопрепарата на клетки (**D**) к средней оптической плотности суспензии в контрольных клетках пациентов и условно здоровых доноров (**D_к**) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах. Все измерения были выполнены на планшетном спектрофотометре Sunrise Microplate Reader (Tecan) при длине волны 540 нм.

Измерение содержания низкомолекулярных антиоксидантов (НА) в ПМНК условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ проводили с помощью коммерческого набора "Antioxidant assay kit" (Sigma) согласно протоколу, предложенному разработчиками [15]. Спектрофотометрические измерения проводили на универсальном анализаторе Wallac 1420 VICTOR2 (Perkin Elmer) при длине волны 405 нм. Содержание НА в ПМНК определяли по эквиваленту концентрации TROLOX (водорастворимого аналога витамина Е) согласно уравнению, полученному из линейной регрессии калибровочной кривой.

Результаты экспериментов анализировали методами вариационной статистики с использованием параметрических и непараметрических критериев согласно характеру распределения выборки. Корреляционные зависимости оценивали с применением критерия Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано [16], что существует связь между генерацией свободнорадикальных соединений на начальном этапе активации (не более 1 ч) противоопухолевыми препаратами *in vitro* лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов с ХЛЛ и степенью их метаболической активности на конечном этапе альтерации (44 ч). В силу того, что ХЛЛ – это неоднородное заболевание с разнообразной клинической картиной [17], а молекулярные механизмы метаболизма в опухолевой клетке исследуемых лекарственных препаратов (Flu, Vincg, Dex и Imat) различны, то получение единичного клеточного ответа спустя определенный промежуток времени о степени образования свободнорадикальных соединений, к сожалению, может не служить адекватной оценкой вклада данного процесса в реализацию программы апоптоза по внутреннему митохондриальному пути. В связи с чем в данной работе была предпринята попытка определения содержания АФК в лейкозных клетках после краткосрочного (2-3 ч) и долгосрочного (18-20 ч) воздействия лекарственных средств *in vitro*.

Известно, что количество АФК, таких как супероксид-анион (O_2^-), гидропероксид (H_2O_2) и гидроксил-радикал ($\bullet OH$) увеличивается в ответ на противоопухолевые лекарственные средства, что является важнейшим компонентом процесса апоптоза [18]. Интересным фактом является то, что АФК способны реагировать на резкие изменения физиологии умирающих клеток, преобразовывая поздние апоптотические стадии в некротическую гибель клетки [19,20]. Эти результаты подтверждают предположение, что внутриклеточный уровень АФК может определять судьбу клеток, включая чувствительность или устойчивость к противоопухолевым препаратам.

Выбранные нами лекарственные средства применяются в терапии различных злокачественных новообразований. Так, Vincg находит применение совместно с другими препаратами при терапии ХЛЛ [21], а также острого лимфобластного лейкоза у взрослых и детей [22]. Flu демонстрирует хорошие результаты при терапии острых лимфобластных лейкозов и неходжкинских лимфом [23]. Dex применяется при остром лимфобластном лейкозе в качестве индукционной терапии, а также при миелодиспластическом синдроме, ангиоиммунной злокачественной Т-клеточной лимфоме в комбинации с противоопухолевыми препаратами [24]. Imat способен селективно подавлять пролиферацию и вызывать апоптоз клеточных линий, позитивных по BCR/ABL, а также незрелых лейкозных клеток при хронической миелоидной лейкемии с положительной филадельфийской хромосомой и при остром лимфобластном лейкозе [25].

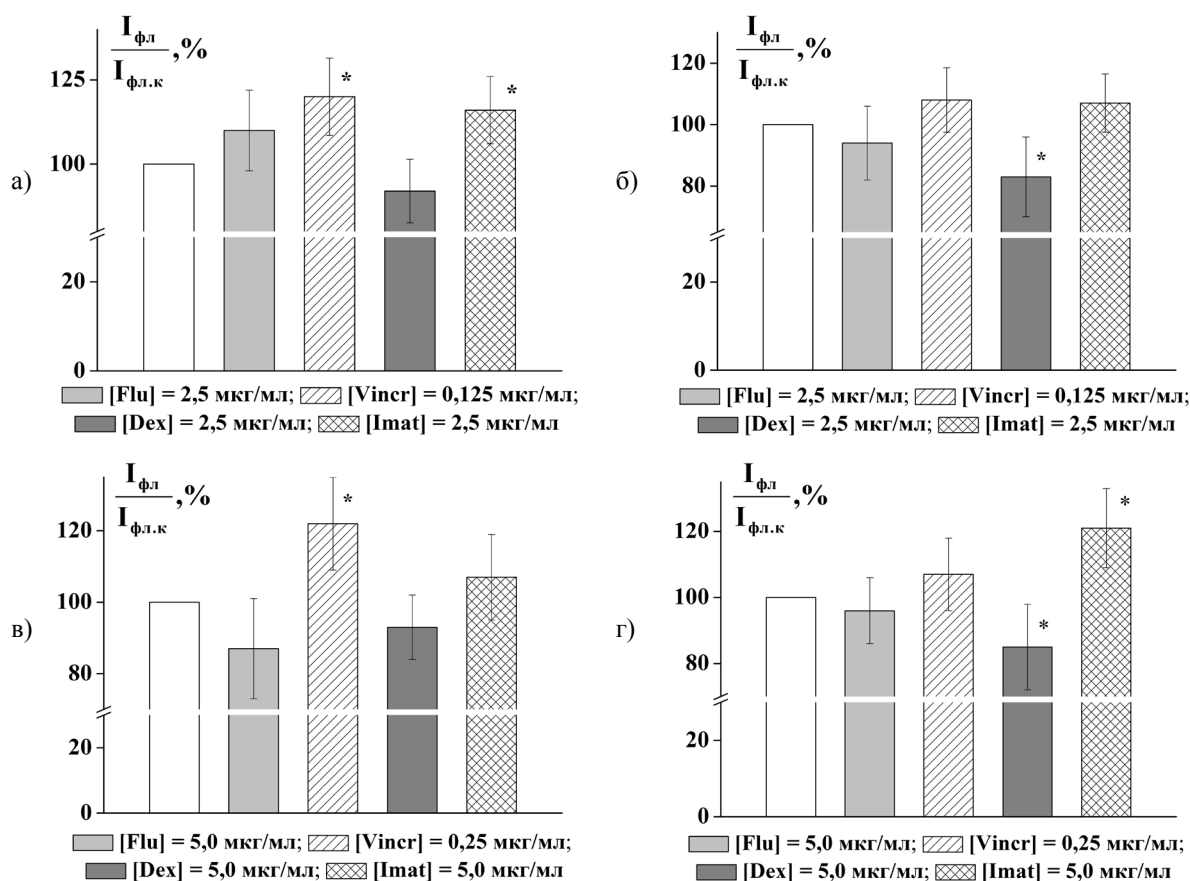
Различия результатов лечения в разных возрастных категориях детской популяции обусловлены отсутствием преемственности в лечении при переходе подростков с ОЛЛ из детской во взрослую онкогематологию и адаптированных для этого возраста терапевтических протоколов [26]. Таким образом, этот факт определил подход, при котором пациенты с ОЛЛ в возрасте до 16 лет составили первую (I) группу исследуемых ($n=18$), а пациенты старше этого возраста вошли во вторую (II) группу ($n=44$).

С целью выяснения вопроса о степени взаимосвязи между уровнем внутриклеточных свободнорадикальных соединений *in vitro* в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ и количеством погибших клеток при действии лекарственных препаратов различной природы была оценена метаболическая активность клеток и их способность к раннему (через 2–3 ч) и позднему (через 18–20 ч) образованию свободнорадикальных соединений при действии лекарственных препаратов в концентрациях, близких к терапевтическим.

Как видно из рисунка 1а, после краткосрочного воздействия Flu и Dex наблюдалась тенденция к изменению интенсивности флуоресценции CM-DCF (для Flu – в среднем на 5–15% увеличение, для Dex – в среднем на 5–15% снижение) по сравнению с клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (контроль), однако полученные результаты статистически не достоверны. Воздействие Vincr и Imat в течение 2–3 ч приводило к статистически достоверному увеличению интенсивности флуоресценции CM-DCF в среднем на 10–25% по сравнению с контролем, что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ (I группа) в сторону “окислителей”, т.е. в клетках происходит накопление АФК.

Через 18–20 ч интенсивность флуоресценции CM-DCF в I-ой группе пациентов с ОЛЛ после воздействия Dex статистически достоверно снижалась в среднем на 15–25% по сравнению с контрольными клетками (рис. 1б), в то же время воздействие остальных химиопрепаратов не оказывало статистически значимого влияния на редокс-статус клеток по сравнению с контролем. Полученный результат указывает на накопление антиоксидантов в клетках пациентов с ОЛЛ (I группа) после долгосрочного воздействия Dex.

Краткосрочное воздействие Flu и Dex на лимфоциты пациентов с ОЛЛ (II группа) в концентрациях, близких к терапевтическим, приводило к снижению интенсивности флуоресценции CM-DCF в среднем на 10–25% и 5–15% соответственно (для Imat наблюдалась тенденция к возрастанию интенсивности флуоресценции



$I_{фл}$ – значение средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах после воздействия химиопрепарата; $I_{фл.к}$ – значение средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах в отсутствие химиопрепаратов (контроль); в качестве контроля принята величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах без воздействия лекарственных средств (100%); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ I (а, б) и II (в, г) группы после краткосрочного (а, в) и долгосрочного (б, г) воздействия лекарственных средств *in vitro*

СМ-DCF в среднем на 5–10%) по сравнению с контролем, однако полученные результаты статистически не достоверны (рис. 1в). Инкубация клеток с Vincr в течение 2–3 ч приводила к статистически достоверному увеличению интенсивности флуоресценции СМ-DCF в среднем на 15–25% по сравнению с интактными лимфоцитами. Это свидетельствует о накоплении свободнорадикальных продуктов в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ (II группа) после воздействия Vincr, что приводит к смещению окислительно-восстановительного баланса в клетках в сторону “окислителей”. Дальнейшее увеличение времени инкубации клеток II группы пациентов при ОЛЛ с Flu и Vincr (до 18–20 ч) приводило к восстановлению значений интенсивности флуоресценции СМ-DCF до контрольных значений (рис. 1г). В тоже время воздействие Dex и Imat в течение 18–20 ч приводило к статистически достоверному снижению/увеличению соответственно интенсивности флуоресценции СМ-DCF в среднем на 15–25% по сравнению с контролем, что указывает на накопление “восстановителей”/“окислителей” в лимфоцитах II группы пациентов при ОЛЛ (рис. 1г).

Стоит отметить, что краткосрочное воздействие (2–3 ч) Flu не оказывает влияния на редокс-статус лимфоцитов пациентов с ОЛЛ обеих групп, однако наблюдается тенденция как к накоплению АФК (группа I), так и к накоплению антиоксидантов (II группа). Vincr спустя 2–3 ч вызывает накопление продукции АФК как у детей, так и у взрослых при ОЛЛ, причем практически в равной степени. Краткосрочное воздействие Dex не оказывает влияния на окислительно-восстановительный баланс лимфоцитов пациентов с ОЛЛ обеих групп.

Долгосрочное воздействие (18–20 ч) Flu и Vincr не оказывает влияния на редокс-статус лимфоцитов пациентов с ОЛЛ обеих групп. Dex спустя 18–20 ч приводит к смещению окислительно-восстановительного баланса в сторону “восстановителей” (антиоксидантов) в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ обеих групп, причем в равнозначной степени.

Краткосрочное воздействие (2–3 ч) Imat в концентрации, близкой к терапевтической, приводит к более существенному сдвигу окислительно-восстановительного баланса в сторону “окислителей” в лимфоцитах детей с ОЛЛ по сравнению с долгосрочным воздействием (спустя 18–20 ч). В свою очередь долгосрочное воздействие (18–20 ч) Imat в концентрации, близкой к терапевтической, на лимфоциты взрослых пациентов с ОЛЛ приводит к более существенному накоплению в них АФК по сравнению с краткосрочным воздействием (через 2–3 ч).

Таким образом, воздействие исследуемых противоопухолевых препаратов на лимфоциты пациентов с ОЛЛ (взрослых и детей) в концентрациях, близких к терапевтическим, приводит к разнонаправленному характеру изменения окислительно-восстановительного баланса в лейкозных клетках.

На рисунке 2 представлены результаты по чувствительности клеток пациентов с ОЛЛ и условно здоровых доноров к исследуемым лекарственным средствам, полученные с помощью МТТ-теста.

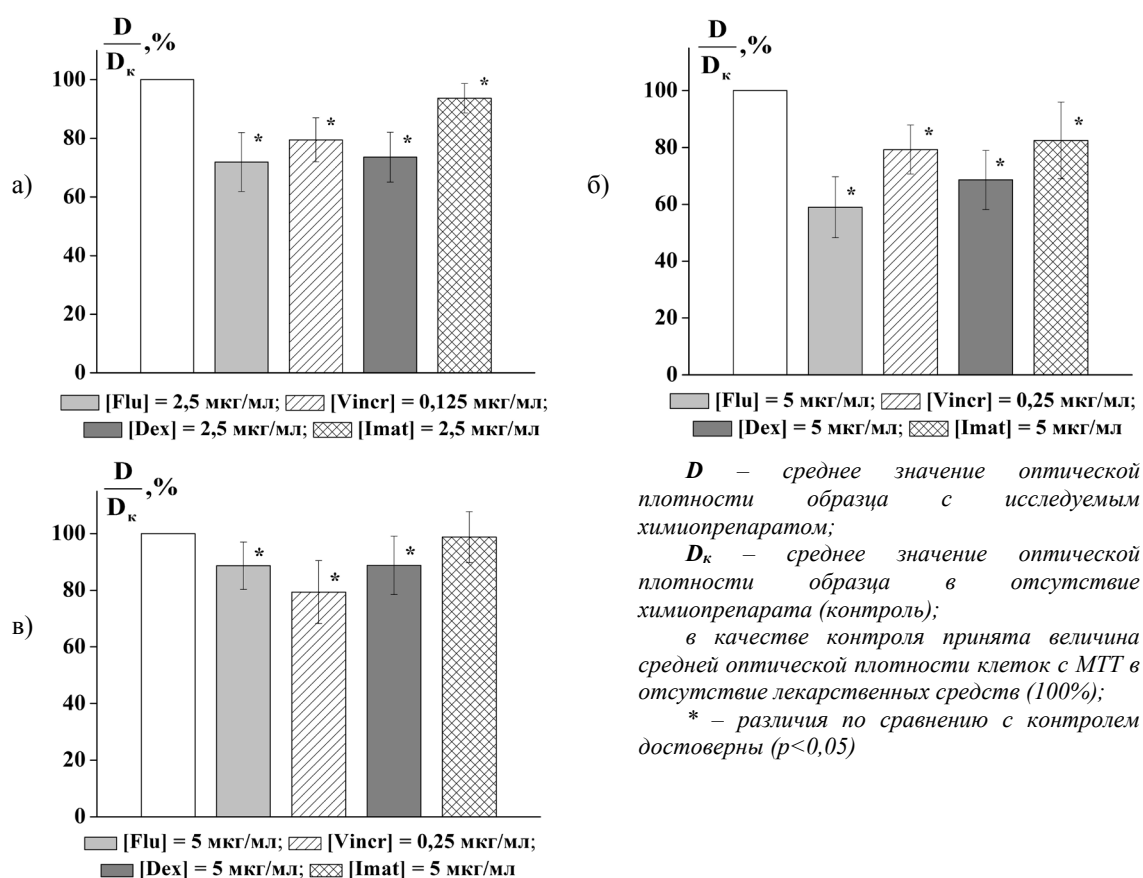


Рисунок 2. Метаболическая активность клеток пациентов с ОЛЛ I (а) и II (б) группы и условно здоровых доноров (в) после воздействия лекарственных средств *in vitro*

Установлено, что в I группе пациентов с ОЛЛ чувствительность клеток к Flu, Dex и Vincr находилась на среднем уровне и статистически достоверно отличалась от контрольных клеток (в среде инкубации которых отсутствовали противоопухолевые препараты) на 15-35% в сторону её увеличения (рис. 2а), что соответствовало снижению дегидрогеназной активности митохондрий клеток (их жизнеспособности) спустя 44 ч после воздействия химиопрепаратов. Воздействие Imat в течение 44 ч приводило к незначительному снижению жизнеспособности клеток I-ой группы пациентов с ОЛЛ в среднем на 5-10% по сравнению с контролем, но, тем не менее, данные статистически достоверны (рис. 2а).

При воздействии исследуемых противоопухолевых средств на клетки пациентов II группы в течение 44 ч наблюдалось статистически достоверное увеличение их чувствительности (рис. 2б), что соответствовало снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем. Так, для Flu и Dex снижение жизнеспособности клеток пациентов с ОЛЛ II группы спустя 44 ч составило в среднем от 20 до 50% по сравнению с интактными клетками (контроль). Через 44 ч для Vincr и Imat количество погибших клеток было снижено и составило в среднем 10-30% относительно контроля (рис. 2б).

Стоит отметить, что жизнеспособность клеток условно здоровых доноров после контакта с исследуемыми лекарственными средствами в концентрациях, соответствующим таковым для взрослых пациентов с ОЛЛ (II группа), также снижалась (рис. 2в). Причем для Flu, Vincr и Dex были зарегистрированы статистически достоверные отличия по сравнению с контролем в среднем на 10-30% (рисунок 2в). Данный факт свидетельствует о наличии базальной чувствительности в клетках условно здоровых доноров к исследуемым химиопрепаратам, что необходимо учитывать при использовании протоколов химиотерапии в процессе лечения конкретных пациентов.

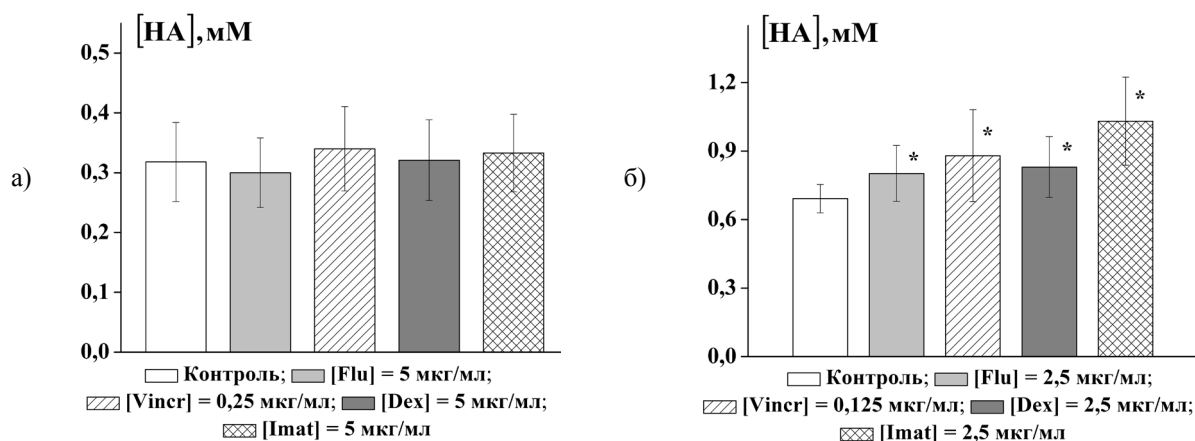
Таким образом, клетки детей с ОЛЛ обладают более низкой чувствительностью к Flu и Imat в концентрациях, близких к терапевтическим, по сравнению с лейкозными клетками взрослых. Причем для Flu и Imat чувствительность клеток взрослых по сравнению с клетками детей увеличена в среднем на 10–20%, что может объясняться более высокой концентрацией данных химиопрепаратов. Чувствительность же клеток пациентов с ОЛЛ к Dex и Vincr находится на одном уровне для обеих групп и сопоставима с таковой для клеток условно здоровых доноров.

Для установления степени взаимосвязи между способностью лимфоцитов пациентов с ОЛЛ к раннему (через 2–3 ч) и позднему (через 18–20 ч) образованию свободнорадикальных соединений *in vitro* и количеством погибших клеток спустя 44 ч при действии лекарственных препаратов различной природы был проведен корреляционный анализ между относительным изменением интенсивности флуоресценции CM-DCF и оптической плотностью клеточной суспензии с МТТ. Установлено, что между процентным содержанием жизнеспособных клеток пациентов с ОЛЛ I группы после воздействия исследуемых лекарственных средств и количеством в них АФК спустя 2–3 ч, существуют статистически достоверные прямые зависимости (критерий Спирмена r_s от 0,86 до 0,95), что свидетельствует о существенном вкладе всех исследуемых лекарственных средств в реализацию процессов апоптоза по внутреннему митохондриальному пути у детей с ОЛЛ. Статистически значимых зависимостей между относительным изменением интенсивности флуоресценции CM-DCF спустя 18-20 ч после воздействия лекарственных средств и оптической плотностью клеточной суспензии с МТТ спустя 44 ч у пациентов с ОЛЛ установить не удалось. Данный факт может указывать на значительные изменения в функционировании внутриклеточных эстераз (отвечают за перевод флуоресцентного зонда CM-H₂DCFDA в активную форму [12]) в лимфоцитах пациентов с ОЛЛ спустя 18–20 ч после воздействия исследуемых химиопрепаратов, что может приводить к чрезмерному снижению/увеличению CM-DCF внутри клеток и не отражать реальной картины по изменению продукции АФК.

С целью уточнения полученного результата был использован альтернативный метод (“тролокс-эквивалент антиоксидантной активности”) оценки редокс-статуса клеток пациентов с ОЛЛ после долгосрочного воздействия (18-20 ч) лекарственных средств. Он основан на количественном определении низкомолекулярных антиоксидантов в ПМНК спектрофотометрическим способом с использованием модельной системы “метмиоглобин-H₂O₂-ABTS-тролокс” согласно уравнению, полученному из линейной регрессии калибровочной кривой [15].

В исследованной группе условно здоровых доноров содержание НА составило в среднем $0,32 \pm 0,13$ мМ, а в ПМНК пациентов с ОЛЛ I группы данный параметр был выше в 1,5–2,5 раза и составил в среднем $0,69 \pm 0,13$ мМ (рис. 3). Полученные результаты для ПМНК пациентов с ОЛЛ статистически достоверно отличались от клеток условно здоровых доноров и хорошо согласуются с предположениями об увеличенном содержании АФК в лейкозных клетках [7,8], т.к. это приводит к необходимости усиленного синтеза в них НА для возможности поддержания редокс-гомеостаза в диапазонах, превышающих физиологические.

Долгосрочное воздействие (18–20 ч) Flu и Dex на клетки пациентов с ОЛЛ (I группа) приводило к статистически достоверному увеличению в них НА в среднем на 10–25% по сравнению с интактными клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (контроль). В тоже время инкубация ПМНК пациентов с ОЛЛ (I группа) с Vincr и Imat в течение 18–20 ч приводила также к увеличению в них содержания НА в среднем на 30–55% по сравнению с контролем (рис. 3б). Стоит отметить, что в ПМНК условно здоровых доноров не наблюдалось статистически достоверных изменений в содержании НА относительно контроля после



Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в нормальных и лейкозных клетках в отсутствие противоопухолевых средств в среде инкубации принято в качестве контроля; * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 3. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в периферических мононуклеарных клетках условно здоровых доноров (а) и пациентов с ОЛЛ I-ой группы после воздействия противоопухолевых средств *in vitro*

инкубации с исследуемыми лекарственными средствами в течение 18–20 ч (рис. 3а), что свидетельствует об отсутствии изменений редокс-статуса в клетках условно здоровых доноров после воздействия данных лекарственных средств.

Для установления степени взаимосвязи между способностью ПМНК условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ (I группа) к накоплению НА через 18–20 ч *in vitro* и количеством погибших клеток спустя 44 ч после воздействия лекарственных препаратов различной природы был проведен корреляционный анализ между содержанием НА и оптической плотностью клеточной суспензии с МТТ. Он выявил между процентным содержанием жизнеспособных клеток ПМНК условно здоровых доноров и количеством в них НА после воздействия исследуемых химиопрепаратов статистически достоверную обратную зависимость (критерий Спирмена r_s от -0,52 до -0,71). Проведение подобного анализа на клетках пациентов с ОЛЛ (I группа) позволило установить статистически достоверные прямые зависимости между содержанием НА и количеством жизнеспособных клеток (значение r_s от 0,54 до 0,85), что может указывать на способность лейкозных клеток при ОЛЛ к повышенному синтезу НА для предотвращения развития окислительного стресса, вызванного метаболизмом исследуемых лекарственных средств.

Полученный результат указывает на принципиальное различие роли антиоксидантов в ПМНК условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ в процессе метаболизма лекарственных средств. Высокие коэффициенты корреляции свидетельствует о возможности использования абсолютной величины содержания НА в клетках пациентов с ОЛЛ *in vitro* в качестве прогностического маркера их чувствительности к исследуемым лекарственным соединениям.

Стоит отметить, что проведенный корреляционный анализ с использованием критерия Спирмена (r_s) между годом рождения пациентов I группы и чувствительностью их клеток к исследуемым противоопухолевым средствам выявил статистически значимую прямую зависимость. Причем для всех исследуемых лекарственных средств она колебалась в диапазоне значений r_s от 0,52 до 0,62, что свидетельствует о снижении чувствительности клеток детей с ОЛЛ ко всем исследуемым лекарственным средствам с уменьшением их возраста. Подобный корреляционный анализ, выполненный для пациентов с ОЛЛ II группы, выявил статистически значимую обратную зависимость. Для всех исследуемых лекарственных средств она колебалась в диапазоне значений r_s от -0,44 до -0,53, что указывает на снижение чувствительности клеток взрослых пациентов с ОЛЛ ко всем исследуемым лекарственным средствам с увеличением их возраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, краткосрочное и долгосрочное воздействие исследуемых противоопухолевых препаратов на лимфоциты пациентов с ОЛЛ (взрослых и детей) в концентрациях, близких к терапевтическим, приводит к разнонаправленному характеру изменения содержания АФК в лейкозных клетках. Наряду с этим, долгосрочное воздействие исследуемых химиопрепаратов приводит к увеличению содержания низкомолекулярных антиоксидантов в клетках детей при ОЛЛ, причем в клетках условно здоровых доноров не наблюдается статистически значимых изменений в содержании низкомолекулярных антиоксидантов по сравнению с контролем. Показано, что в интактных клетках детей при ОЛЛ уровень содержания низкомолекулярных антиоксидантов в среднем в 2 раза превышает таковой в периферических мононуклеарах условно здоровых доноров. Более того, обнаружено принципиальное различие роли низкомолекулярных антиоксидантов в периферических мононуклеарных клетках условно здоровых доноров и пациентов с ОЛЛ в процессе метаболизма исследуемых лекарственных средств.

Индивидуальная чувствительность клеток пациентов с ОЛЛ при воздействии одинаковых концентраций лекарственных средств, близких к терапевтическим, характеризуется значительной вариабельностью, что указывает на необходимость персонификации чувствительности клеток пациентов с данным заболеванием к химиотерапевтическим воздействиям *ex vivo*. Более того, была обнаружена определенная чувствительность клеток условно здоровых доноров к исследуемым химиопрепаратам (кроме иматиниба), что необходимо учитывать при использовании протоколов химиотерапии в процессе лечения конкретных пациентов. В качестве критерия для возможности персонифицированного учета ответа клеток пациентов с ОЛЛ на терапию можно использовать изменение их окислительно-восстановительного баланса.

Список литературы / References:

1. Gaynor J, Chapman D, Little C, et al. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia: the Memorial Hospital experience since 1969. *Journal of Clinical Oncology*, 1988, vol. 6, no. 6, pp. 1014-1030.
2. Schellong G., Potter R., Bramswig J. et al. High Cure Rates and Reduced Long-Term Toxicity in Pediatric Hodgkins Disease: The German -Austrian Multicenter Trial DAL-HD-90. *J. Clin. Oncol.*, 1999, vol.17, no. 12, pp. 3736-3744.
3. Brinkmann V., Geiger T., Alkan S. et al Interferon-alfa increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T-cells. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, pp. 1655-1663.
4. Jansen J.H., de Ridder M.C., Geertsma W.M. et al Complete remission of t(11;17) positive acute promyelocytic leukemia induced by all-transretinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1999, vol. 94, no. 1, pp. 39-45.
5. Zhou F., Shen Q., Claret F. Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *J. Leuk. e Biol.*, 2013, vol. 3, no. 94, pp. 423-429.
6. Trachootham D. et al. Selective killing of oncogenic transformed cells through ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanates. *Cancer Cell.*, 2006, vol. 10, pp. 241-252.
7. Carew J.S. et al. Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine. *Leukemia*, 2004, vol. 18, pp. 1934-1940.
8. Hileman E.O. et al. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, vol. 53, pp. 209-219.
9. Trachootham D. et. al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 5, pp. 1912-1922.
10. Сви́рновский А.И. и др. Лекарственная чувствительность лейкозных клеток *ex vivo* и прогнозирование ответа пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом на терапию. *Здравоохранение*, 2010, № 3, с. 57-60. [Svirnovsky A.I. et al. Drug sensitivity of leukemic cells *ex vivo* and predicting the response of patients with chronic lymphocytic leukemia to therapy. *Healthcare*, 2010, no. 3, pp. 57-60. (In Russ.)]
11. Cramer P., Hallek M. Initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, 2016, № 43, vol. 2, pp. 241-250.
12. Haugland R.P. *Handbook of fluorescent probes and research products*. 9-nd Edition. USA: Molecular Probes Inc, 2002, 964 p.
13. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз. *Биологические мембраны*, 2003, т. 19, № 5, с. 356-377. [Vladimirov Yu.A. Violation of the barrier properties of the inner and outer membranes of mitochondria, necrosis and apoptosis. *Biological membranes*, 2003, vol. 19, no. 5, pp. 356-377. (In Russ.)]
14. Veerman A., Pieters R. Annotation. Drug sensitivity assay in leukaemia and lymphoma. *Brit. J. Haem.*, 1990, vol. 74, no. 4, pp. 381-384.
15. Sigma Aldrich [Electronic resource] Antioxidant Assay Kit, 2012.
16. Тамашевский А.В. и др. Окислительный стресс в лимфоцитах при хроническом лимфоцитарном лейкозе, индуцированный противоопухолевыми препаратами. *Известия НАН Беларуси. Сер. биол. Наук*, 2010, № 3, с. 62-66. [Tamashevsky A.V. et al. Oxidative stress in lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia, induced by anticancer drugs. *Bulletin of the National Academy of Sciences of Belarus. Ser. biol. Nauk*, 2010, no. 3, pp. 62-66. (In Russ.)]
17. Сви́рновский А.И. Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы. Медицинские новости, 2008, № 13, с. 7-19. [Svirnovsky A.I. Chronic lymphocytic leukemia: paradigms and paradoxes. *Medical News*, 2008, no. 13, pp. 7-19. (In Russ.)]
18. Chandra J., Samali A., Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, vol. 29, pp. 323-333.
19. Barzilai A., Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 2004, vol. 3, pp. 1109-1115.
20. Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 2002, vol. 84, pp. 131-141.
21. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, vol. 91, pp. 861-868.

22. Moore A., Pinkerton R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood*, 2009, vol. 53, pp. 1180-1187.
23. Ricci F. et al. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2009, vol. 5, pp. 187-207.
24. Baptista M.J. et al. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin. Cancer Res.*, 2012, vol. 18, no. 21, pp. 5924-5933.
25. Lewandowski K. et al. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia with 11q22.3 Rearrangement in Patient with Chronic Myeloid Leukemia Treated with Imatinib. *Case Rep. Med.*, 2016, p. 9806515.
26. Усс А.Л., Змачинский В.А. Лечение рецидивов и резистентных форм лимфомы Ходжкина. *Материалы VI Российской Онкологической конференции 6-28 ноября 2002 г. Москва*, с. 55-57. [Uss A.L., Zmachinsky V.A. Treatment of recurrent and resistant forms of Hodgkin's lymphoma. *Materials of the VI Russian Oncological Conference November 6-28, 2002 Moscow*, pp. 55-57. (In Russ.)]

REDOX BALANCE AS A CRITERION FOR RESPONSE TO PERSONALIZED CELL THERAPY FOR PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Feduro N.A., Pasiukov V.V.

Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies MH RB

Dolginovsky tract 160, Minsk, 220053, Belarus; e-mail: Tayzoe@mail.ru

Abstract. The redox state of lymphocytes of patients (adults and children) with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and their sensitivity was assessed before and after exposure to anticancer drugs (fludarabel, vincristine, dexamethasone, and imatinib) at concentrations close to therapeutic ones. It was found that alterations of reactive oxygen species level in leukemic cells after the short-term (2-3 h) and long-term (18-20 h) exposure to the studied drugs are differently directed. Affect of the investigated drugs on the children leukemic cells leads to an increase a cytosolic low molecular weight antioxidants (LMWA) content, but for donor's cells this tendency is not observed. A fundamental difference of LMWA participation in the studied anticancer drugs metabolism in donor's and patient's cells was found. Moreover, cytosolic LMWA level in intact ALL children's cells is an average 2 times higher than in donor's cells. The individual sensitivity of the leukemic cells under anticancer drugs exposure is characterized by significant variability. It indicates about necessary to personalize cells sensitivity to chemotherapeutic effects *ex vivo*. Moreover, a certain sensitivity of donor's cells to the studied anticancer drugs (except for imatinib) was found. It should be taken into account under using chemotherapy protocols during treatment of individual patient. For the possibility of personalized accounting of the cells response of ALL patients to chemotherapy, a change in their redox balance can be used as a prognostic indicator.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, reactive oxygen species, low molecular weight antioxidants, cell viability, anticancer drugs.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA*, ШТАММ IBSS-2Лантушенко А.О.¹, Мегер Я.В.¹, Шаповалова В.Е.¹, Дегтяр И.В.¹, Синченко А.В.¹,
Боровков А.Б.²¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, РФ; e-mail: lantushenko@mail.ru

² ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, РФ

Поступила в редакцию: 18.08.2021

Аннотация. *Dunaliella* – род микроводорослей, развивающихся в гипергалинных водоемах. Существовать в таких условиях им позволяет высокая концентрация β -каротина и глицерола, выполняющих протекторные функции. Высокое накопление этих биологически активных веществ обуславливает перспективность использования *D. salina* в биотехнологии. Одним из наиболее перспективных с этой точки зрения штаммов коллекции IBSS -2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ был изучен с целью уточнения его таксономического статуса. Филогенетический анализ показал высокую степень гомологии с *D salina* CCAP 19/31, что позволяет отнести исследованный изолят к виду *Dunaliella salina*.

Ключевые слова: гидробионты, молекулярно-генетический анализ, филогения, *Dunaliella salina*.

ВВЕДЕНИЕ

Dunaliella – род водорослей с высоким экономическим потенциалом по причине продукции большого количества биологически активных веществ, таких как β -каротин, глицерол и др [1]. *Dunaliella salina* – вид, обитающий в гиперсоленых озерах, из-за чего обладает уникальными свойствами – выдерживает широкий диапазон различных абиотических факторов, в том числе общей солености, температуры и освещённости [2]. Эта особенность вызывает интерес к данному объекту и как к модельному организму для изучения устойчивости к различным факторам, так и для его использования в промышленности для получения натуральных биологически активных веществ.

Dunaliella не имеет жесткой клеточной стенки и имеет пластичную клеточную мембрану, способную быстро менять форму в ответ на изменяющиеся факторы среды, что обуславливает интересующие исследователей свойства водоросли. При этом размер клеток настолько сильно колеблется от внешних условий, что не позволяет морфометрически определить видопринадлежность с достаточной степенью достоверности, поскольку внутривидовая изменчивость в зависимости от условий на протяжении всего периода культивирования превосходит межвидовую [3].

Генотипирование в настоящее время считается обязательным для классификации видов рода *Dunaliella*, при этом рибосомальные маркеры ITS предпочтительны в большинстве случаев для филогенетического анализа. Подбор подходящих молекулярных маркеров необходим для точной идентификации вида в изоляте и определения более ценных штаммов, которые продуцируют большее количество, например, 9-цис- β -каротина, который является более ценным, чем его изомер транс- β -каротин [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали культуру зелёной микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, 1905; штамм IBSS-2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ.

Предварительная оценка чистоты и целостности культуры осуществлялась микроскопически, использовалось увеличение $\times 1000$ (рис. 1).



Рисунок 1. Микрофотография исследованной культуры *Dunaliella salina*, увеличение $\times 1000$

Таблица 1. Характеристики праймеров

Название праймера	Целевой участок	Последовательность олигонуклеотида (5'-3')	Размер продукта	Температура отжига	Условия ПЦР реакции	Источник
ITS1	ITS1, 5,8 S рPHK и ITS2	AATCTATCAATAACCA CACCG	678 п.н.	52 C	В тексте	(Preetha et al., 2012)
ITS4		TTTCATTCGCCATTAC TAAGG				

Для уточнения таксономического статуса используемой в эксперименте культуры был проведен филогенетический анализ с использованием внутреннего транскрибируемого спейсера ITS (ITS1, 5,8 S рPHK и ITS2). Исследования проводились в ЦКП «Молекулярная структура вещества» СевГУ.

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реактивов ДНК-Экстран 2 (Синтол, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Количественное определение полученной геномной ДНК и оценку ее чистоты проводили на нанофотометре Inplen (Германия) и с помощью гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Внутренняя транскрибированная область спейсера (ITS) (700 bp), включающая ITS1, 5,8 S рPHK и ITS2, была амплифицирована с использованием праймеров ITS1, ITS4 [4]. Последовательность праймеров приведены в таблице 1. Условия ПЦР следующие: Предварительная денатурация при 94 C в течение 3 минут. Далее 34 цикла из денатурации при 94 C в течение 30 секунд, отжига праймеров при 60 C в течении 30 секунд и элонгации при 72 C в течении 60 секунд. После окончания – финальная элонгация при 72 C в течении 10 минут.

Реакция секвенирования проводилась в объеме 10 мкл с использованием набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Очистка продуктов секвенирования производилась с помощью EDTA и этилового спирта. Капиллярный электрофорез производился на устройстве секвенирования НАНОФОР-05 с использованием полимера ПДМА-6 в режиме секвенирования с рекомендуемыми производителем параметрами. Бэйсколинг производился с помощью программ встроенного бэйсколлера “ДНК Анализ” (Синтол).

Полученную нуклеотидную последовательность использовали для филогенетического анализа. Поиск ближайших гомологов проводили при помощи программы BLAST в базе данных GenBank NCBI. Множественное выравнивание осуществляли с использованием алгоритма Muscle, филогенетический анализ проводили по эволюционной модели замещения GTR с гамма-распределенным изменением скорости между участками и долей неизменных участков моделированием цепи Маркова методом Монте-Карло на основании 200 тысяч генераций в интерфейсе MrBayes [5]. В качестве внешней группы использовали последовательности *Yamagishiella unicocca* strain UTEX2431 (код Genbank AF375785.1) и *Chlamydomonas reinhardtii* (AB511842.1). Конечная визуализация производилась инструментами Figtree.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате реакции ПЦР были получены амплифицированные продукты, длина которых составила порядка 700 п.н. После очистки продуктов ПЦР электрофорез в агарозном геле показал однородность продуктов без следов неспецифического связывания (рис. 2).

Концентрация продуктов ПЦР была вычислена спектрофотометрически, спектры поглощения показаны на рисунке 3.

В результате секвенирования и бэйсколинга были получены нуклеотидные фрагменты длиной 678 п.н. с высокой степенью достоверности. Фрагмент электрофореграммы представлен на рисунке 4. Таксономический статус штамма IBSS-2 проверяли путем реконструкции филогенетических связей с использованием метода Байеса. Для анализа использовали нуклеотидную последовательность ITS1, 5,8 S рPHK и ITS2, полученное филогенетическое дерево представлено на рисунке 5.

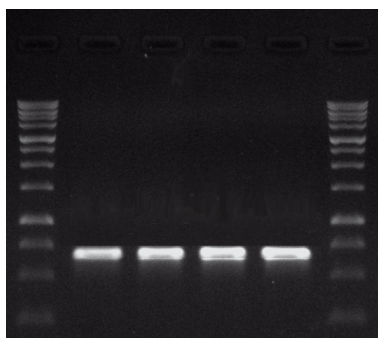


Рисунок 2. Визуализация электрофореза очищенных продуктов ПЦР *Dunaliella salina* IBSS-2 участка ITS в четырех технических повторностях

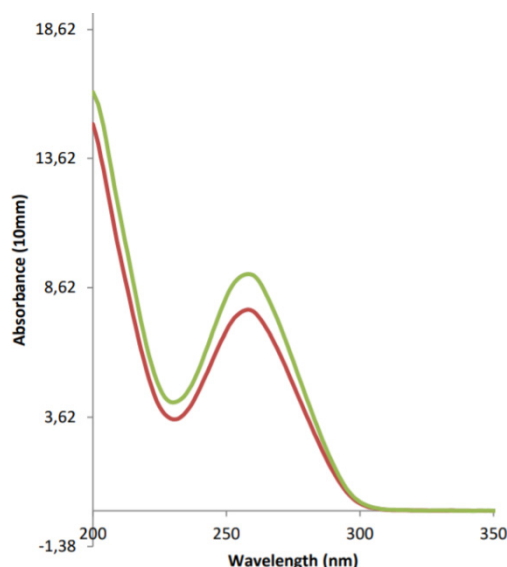


Рисунок 3. Спектр поглощения очищенных продуктов ПЦР *D. salina* IBSS-2

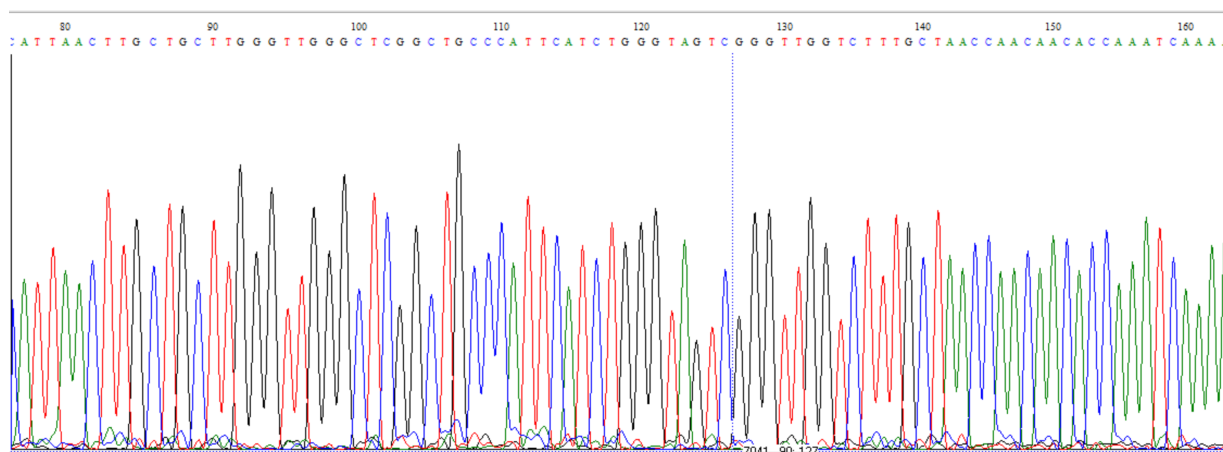


Рисунок 4. Фрагмент электрофореграммы секвенированного участка последовательности ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2 штамма *Dunaliella Salina* IBSS-2

Исследованный в данной работе штамм IBSS-2 образует кладу с группой, в которой находятся несколько разных видов *Dunaliella*, но вместе с тем имеющих идентичные ITS последовательности. Важно отметить, что в этой же клade находится *D. salina* CCAP 19/31 [6].

ОБСУЖДЕНИЕ

С точки зрения систематики в роде *Dunaliella* различают четыре секции: секция *Tertiolectae*, которые не накапливают каротины и растут при оптимальной солености <6% NaCl; секция *Dunaliella*, которые способны накапливать каротины; секция *Virides* – всегда зеленые и радиально симметричные; и *Peirceinae*, также всегда зеленые, но клетки двусторонне симметричны. В настоящее время в пределах секции *Dunaliella* различают виды: *D. salina*, *D. parva* и *D. pseudosalina*, а также *D. bardawil*. Было обнаружено, что *Dunaliella salina* способна переносить соленость примерно 5,5 M NaCl [7]. Важно отметить, что морфологическая идентификация вида может быть неоднозначна, поскольку форма клеток может значительно варьировать в зависимости от различных условий среды. Для идентификации этих видов водорослей был предложен ряд молекулярных маркеров: LSU rDNA, ITS, rbcL и tufA [3,4,8], однако большинство исследователей сходятся во мнении, что наиболее подходящим является внутренний транскрибируемый спейсер ITS. Поэтому для филогенетического анализа в данной работе использовалась последовательность ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2.

Исследованный штамм IBSS-2 вместе с *D. salina* CCAP 19/31 образует кладу с группой, в которую входят также и другие виды *Dunaliella*, однако имеющие идентичные ITS последовательности. Результаты филогенетического анализа, таким образом, не достаточно однозначны, но, данная ситуация является до сих пор не решенной научной проблемой в описании рода *Dunaliella*, на которую указывают многие исследователи [3,4,8]. Как отмечают авторы недавно вышедшего обзора [9], систематика видов в пределах рода *Dunaliella* все еще находится в движении, и вопрос о разграничении новых видов или даже подвидов до сих пор не решен. Один

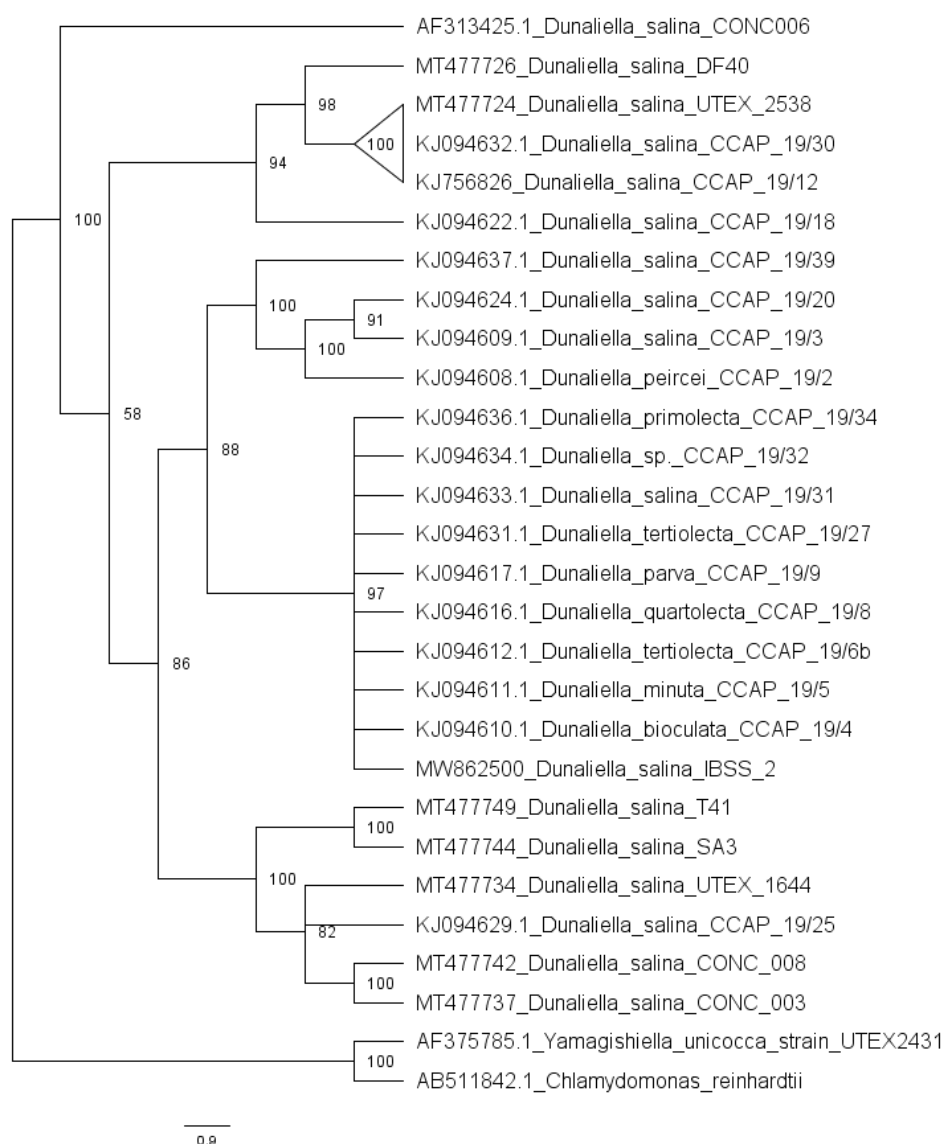


Рисунок 5. Филогенетическое дерево по эволюционной модели замещения GTR с гамма-распределенным изменением скорости между участками и долей неизменных участков моделированием цепи Маркова методом Монте-Карло на основании 200 тысяч генераций. Визуализация данных в FigTree v 1.4.4

из вариантов решения проблемы, используемый многими авторами [3,9] – комплексный подход, основанный на морфологическом, физиологическом и таксономическом анализе, который и был использован в данной работе. На протяжении последних десятилетий сотрудниками ИнБЮМ проводились многочисленные исследования морфологических и физиологических характеристик этого вида при культивировании в лабораторных фотобиореакторах и полупромышленных бассейнах в различных условиях среды [10,11]. Результаты по реакции на стрессовые воздействия, полученные в проведенных ранее исследованиях, в частности накопление каротиноидов до 8% ОВ, а также наличие в кладе исследованного штамма вида *D. salina* CCAP 19/31 (рис. 5) позволяют отнести исследованный штамм к виду *Dunaliella salina*.

Работа выполнена в рамках внутреннего гранта СевГУ на 2021 г. «Изучение молекулярно-генетических механизмов увеличения продуктивности промышленно значимых культур», идентификатор 30/06-31 и темы № 121030300149-0 ФИЦ ИнБЮМ «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса».

Список литературы / References:

1. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. К.: Наукова думка, 1973, 244 с. [Masyuk N.P. *Morphology, taxonomy, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella* Teod. K.: Naukova Dumka, 1973, 244 p. (In Russ.)]
2. Боровков А.Б. Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (обзор). *Экология моря*, 2005, т. 67, с. 5-17. [Borovkov A.B. Green microalgae *Dunaliella salina* Teod. (overview). *Ecology of the sea*, 2005, vol. 67, pp. 5-17. (In Russ.)]

3. Highfield A., Ward A., Pipe R., Schroeder D. Molecular and phylogenetic analysis reveals new diversity of *Dunaliella salina* from hypersaline environments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2021, vol. 101, no. 1, pp. 27-37. doi: 10.1017/S0025315420001319
4. Preetha K., John L., Subin C.S., Vijayan K.K. Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquat. Biosyst.*, 2012, vol. 8, no. 27. doi: 10.1186/2046-9063-8-27
5. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, pp. 754-755.
6. Emami K., Hack E., Nelson A., Brain C.M., Lyne F.M., Mesbahi E., Day J.G., Caldwell G.S. Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: *An example using Dunaliella*, 2015. doi: 10.1038/srep10036
7. Ben-Amotz A. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant. Physiol.*, 1987, vol. 131, pp. 479-487.
8. Assuncao P., Jaen-Molina R., Caujape-Castells J., de la Jara A., Carmona L., Freijanes K., Mendoza H. Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquat. Biosyst.*, 2012, vol. 8, no. 2. doi: 10.1186/2046-9063-8-2
9. Polle J.E.W., Jin E.S., Ben-Amotz A. The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. *Algal Res.*, 2020. doi: 10.1016/j.algal.2020.101948
10. Гудвиллович И.Н., Боровков А.Б. Апробация двухстадийного культивирования *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) в Севастопольском регионе. *Юг России: экология, развитие*, 2019, т. 14, № 2, с. 211-220. [Goodvilovich I.N., Borovkov A.B. Approbation of two-stage cultivation of *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) in the Sevastopol region. *South of Russia: ecology, development*, 2019, vol. 14, no. 2, pp. 211-220. (In Russ.)] doi: 10.18470/1992-1098-2019-2-211-220
11. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Avsiyan A.L. Scale-up of *Dunaliella salina* cultivation: from strain selection to open ponds. *Journal of Applied Phycology*, 2020, vol. 32, iss. 3, pp. 1545-1558.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF DUNALIELLA SALINA, STRAIN IBSS-2

Lantushenko A.O.¹, Meger Ya.V.¹, Shapovalova V.E.¹, Degtyar I.V.¹, Sinchenko A.V.¹, Borovkov A.B.²

¹ Sevastopol State University

Sevastopol, Russia; e-mail: lantushenko@mail.ru

² Federal Research Center "Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences" Sevastopol, Russia

Abstract. *Dunaliella* is a genus of microalgae that grows in hypersaline ponds. A high concentration of β -carotene and glycerol, which perform protective functions, allows them to exist in such conditions. The high accumulation of these biologically active substances determines the prospects of using *D. salina* in biotechnology. One of the most promising IBSS-2 strain from the common use center "World Ocean hydrobionts collection", was studied in order to clarify its taxonomic status. Phylogenetic analysis showed a high degree of homology with *D. salina* CCAP 19/31, which allows us to attribute the studied isolate to the species *Dunaliella salina*.

Key words: hydrobionts, molecular genetic analysis, phylogeny, *Dunaliella salina*.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА – ВОЗМОЖНЫЕ ГОРИЗОНТЫ РАЗВИТИЯ

Барцев С.И.^{1,2}, Дегерменджи А.Г.¹, Дегерменджи Н.Н.³, Салтыков М.Ю.^{1,2},
Сарангова А.Б.²¹ Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН

г. Красноярск, РФ; e-mail: BartsevSI@ibp.ru

² Сибирский федеральный университет

г. Красноярск, РФ

³ Красноярский государственный медицинский университет

г. Красноярск, РФ

Поступила в редакцию: 21.07.2021

Аннотация. В статье обсуждается специфика подхода экологической биофизики к исследованию экологических систем и земной биосферы в целом. Рассмотрены характерные для этого раздела биофизики проблемы и возможные подходы к их преодолению. В частности, проблема уникальности экологических систем может быть существенно ослаблена, если удастся разработать теорию экологического подобия. Проблема разнонаправленной зависимости устойчивости реальных экосистем и их моделей от количества входящих видов может быть снята путем перехода к моделям, так называемого, гибкого метаболизма. Необозримая сложность биосферы побуждает обращаться к концептуальным моделям, построенным по принципу наихудшего сценария, которые позволяют, хотя бы в общем виде, оценить действие и возможный вклад тех или иных механизмов в глобальную динамику.

Ключевые слова: экологическая биофизика, экосистема, аутостабилизация, биосфера.

Введение. Методы и подходы биофизики и экологической биофизики.

При знакомстве с термином "экологическая биофизика" может возникнуть естественный вопрос о том, какое отношение может иметь физика к экосистемам. Суть физического подхода к биологическим системам исчерпывающе выразил известный биофизик Н. Рашевский: "Мы начинаем с исследования в высшей степени **идеализированных систем**, которые могут не иметь никаких прямых аналогов в реальной природе... Тем не менее, именно этот подход применяли и всегда применяют в физике...". "...Физик занимается детальным математическим исследованием таких нереальных вещей, как "материальные точки", "абсолютно твердые тела", "идеальные жидкости" и т. п. **В природе подобных вещей не существует...**". "...Однако же физик не только изучает их, но и применяет свои выводы к *реальным вещам*. Все дело в том, что в известных пределах реальные вещи имеют свойства, общие с воображаемыми идеальными объектами!" [1].

Здесь Рашевский практически описал особенности мышления человека с фундаментальным физическим образованием, способ его работы с объектами живой природы. Биофизик отличается от биолога не применением физических теорий и физических приборов к исследованию живых систем, а тем, что он явно работает с **идеализированными системами, конструктами**. И в какой мере это удастся – в той же мере можно говорить о биофизическом подходе. На основе вышесказанного можно сформулировать рабочее определение биофизики: **"Биофизика – это наука, занимающаяся построением и исследованием идеализированных систем, моделирующих живое на различных уровнях его организации"**. Отсюда биофизические модели исходно должны быть предельно простыми, описывающими основные, сущностные свойства исследуемой системы. Тогда и модели экологической биофизики тоже должны быть достаточно простыми, описывающими ключевые механизмы, определяющие динамику экосистем, т.е. иметь **концептуальный** характер.

Перейдем к специфике теоретического исследования экологических систем. В отличие от молекулярной биофизики, где исследователи имеют дело с идентичными копиями ферментов, или клеточной биофизики, где у исследователей есть возможность работать с клеточными клонами, что обеспечивает воспроизводимость результатов экспериментов, каждый объект исследования экологической биофизики – экосистема – уникальна, т.е. единственна в своем роде. Эта уникальность экологических систем в сочетании с их сложностью приводят к тому, что необходимое требование естественнонаучного исследования – воспроизводимость результатов экспериментов и наблюдений – не может быть в полной мере выполнено. Тем самым уникальность экосистем порождает проблему обеспечения общенаучного базиса экологических исследований. Необходимо разработать приемы осознанной работы с уникальными системами, когда закономерности, выявленные на основе анализа результатов, полученных на одной уникальной системе, могут быть перенесены на другую уникальную систему.

Изучение уникальных систем предполагает отношение к ним, как к моделям друг друга. Содержательно задача здесь заключается в отработке формальных процедур, которые для любого выбранного свойства или функции системы могли бы устанавливать взаимно-однозначное соответствие между структурами подобных систем, обладающих данным свойством или функцией.

В исследовательском арсенале экологической биофизики помимо моделирования и полевых наблюдений имеются замкнутые по потоку вещества экспериментальные экологические системы, которые с практической точки зрения являются прототипами систем жизнеобеспечения космических миссий а, с фундаментальной, выступают, как простейшие модели земной биосферы. Эти модели в значительной мере соответствуют

ориентации экологической биофизики на концептуальные модели, которые здесь имеют материальное воплощение. Замкнутость по потоку вещества – это не экзотическое свойство экспериментальных замкнутых экологических систем – она является ключевым свойством земной биосферы [2]. Именно благодаря круговороту веществ, биосфера смогла просуществовать миллиарды лет. В то же время высокий уровень замкнутости по лимитирующим химическим элементам (азот, фосфор) характерен и для большинства локальных экосистем. На некоторые вопросы относительно будущего нашей биосферы вряд ли можно ответить, не прибегая к концептуальным математическим моделям. К вопросам предельной важности относится вопрос об устойчивости земной биосферы к нарастающему антропогенному воздействию.

Уникальность экосистем и экологическое подобие.

Как уже было отмечено выше уникальность, присущая экологической системе, приводит к тому, что необходимое требование научных исследований - воспроизводимость эксперимента - не может быть полностью удовлетворено при изучении экологических систем. Получение экспериментальных данных и интерпретация результатов всегда проводятся в рамках конкретного модельного представления системы. Поэтому, строго говоря, общее решение проблемы воспроизводимости экологических экспериментов и перенос полученных результатов в другие экосистемы стало бы возможным после разработки формальных процедур для установления подобия между моделями уникальных систем [3]. Принципиальная выполнимость формальной процедуры подобия была показана на примере очень абстрактной модели нейронной сети [4-6]. Введение понятий функциональной симметрии и функционально-инвариантных преобразований позволило показать, что структуры рассматриваемых нейронных сетей, выполняющие одну и ту же функцию, могут быть преобразованы друг в друга с помощью одного непрерывного и двух дискретных преобразований. В то время как дискретные преобразования тесно связаны со специфической организацией нейронных сетей, непрерывное преобразование, выполняемое инфинитезимальным оператором группы Ли, может применяться к моделям систем различной природы.

Процедуру применения локальной симметрии к уравнениям, описывающим экологическую систему, можно описать следующим образом. Критерий инвариантности системы уравнений $\Phi_k(x) = 0$ относительно группы, задаваемой инфинитезимальным оператором, имеет следующий вид:

$$\lambda_i \frac{\partial}{\partial x_i} \Phi_k(x) \Big|_M = 0, \quad k=1,2,\dots,S; \quad (S < N) \quad (1)$$

где M – это $(N - S)$ поверхность, задаваемая системой уравнений $\Phi_i(x) = 0$; λ_i – компонента вектора переноса, лежащего в плоскости касательной к поверхности M ; N – количество переменных; S – количество уравнений.

Рассмотрим подробнее процедуру поиска структур экосистем, сохраняющих заданное свойство, как инвариант. Пусть экосистема описывается системой уравнений общего вида: $\dot{X}_i = F_i(\bar{X}, \bar{a})$, где X_i – переменные системы; вектор a обозначает совокупность параметров системы уравнений. Если возникает задача поиска общих связей типа структура-функция, структура-свойство у различных экосистем, то требование совпадения решений систем дифференциальных уравнений (конкретных траекторий переменных экосистемы) представляется излишне жестким. Остановимся на отслеживании свойств стационарного состояния системы. Тогда система уравнений, задающих связь между параметрами системы и ее стационарным состоянием, имеет вид:

$$F_i(\bar{X}^*, \bar{a}) = 0. \quad (2)$$

Набор показателей, которые должны сохраняться неизменными при преобразованиях структуры системы (параметров $\{a_k\}$), задается следующей системой:

$$P_l(\bar{X}^*, \bar{a}) = \text{const} \quad (3)$$

где $l = 1, \dots, L$, и L – количество уравнений, описывающих набор показателей, которые должны сохраняться при преобразованиях структуры.

В качестве примера выберем в качестве инвариантных характеристик экологической модели набор собственных значений линеаризованной системы в окрестности стационарного состояния. Локальное преобразование, сохраняющее собственные значения в общем случае можно получить, применяя инфинитезимальный оператор к уравнениям на стационарные концентрации и к элементарным симметрическим функциям соответствующей степени. Для систем второго порядка этими функциями являются след и детерминант матрицы линейного приближения исследуемой модели. То есть для систем второго порядка неизменность одновременно и следа, и детерминанта матрицы означает неизменность собственных значений.

Поскольку для сложных нелинейных систем аналитическое вычисление стационарных состояний и собственных значений невозможно нужно применить инфинитезимальное преобразование не только к параметрам модели, но и стационарным значениям, рассматривая их как параметры. Применение критерия инвариантности (1) к системе уравнений (2) и (3) порождает систему уравнений, задающих инвариантное многообразие:

$$\begin{cases} \sum_{j=1}^N \lambda_j \frac{\partial F_i}{\partial X_j^*} + \sum_{k=1}^K \lambda_k \frac{\partial F_i}{\partial a_k} = 0, \\ \sum_{j=1}^N \lambda_j \frac{\partial P_l}{\partial X_j^*} + \sum_{k=1}^K \lambda_k \frac{\partial P_l}{\partial a_k} = 0 \end{cases} \quad (4)$$

где λ_i – компоненты вектора (малого по величине) переноса, сохраняющего неизменным выделенное свойство; N – количество переменных модели, а значит и количество уравнений (2); K – количество модельных параметров, которым разрешили меняться. Частные производные берутся в текущей стационарной точке и текущих значениях параметров модели.

Линейная система (4) состоит из $N+L$ уравнений и содержит $N+K$ переменных. Типичной является ситуация когда $K > L$, а система состоит из линейно независимых уравнений. В этом случае система имеет бесконечное множество нетривиальных решений, образующих базис размерностью $K-L$. То есть весь набор компонент вектора перемещений можно определить, произвольно задавая $K-L$ из них и вычисляя оставшиеся по формуле:

$$\lambda_m = f_m(\bar{X}^*, \bar{a}, \{\lambda_r\}), r = 1, \dots, K-L, \quad (5)$$

причем вид функций f_m можно определить всегда, в силу линейности системы (4).

Зная компоненты вектора малых приращений $\{\lambda_r\}$ можно организовать итерационный процесс, задавая желаемое направление изменения параметров. Эта итерационная процедура напоминает интегрирование систем обыкновенных дифференциальных уравнений, но применяемое по отношению к параметрам модели, а не к ее переменным. Процедура обеспечивает постепенное перемещение по инвариантному многообразию и формирование структур, сохраняющих выбранное свойство, в случае если такие структуры допустимы.

Продemonстрируем преобразование простой модели замкнутой экосистемы (6а) в еще более простую модель (6б) с сохранением собственных значений:

$$\begin{cases} \dot{X}_1 = a(A_0 - X_1 - X_2)X_1 - \frac{\mu X_1 X_2}{K + X_1} \\ \dot{X}_2 = \frac{\mu X_1 X_2}{K + X_1} - mX_2 \end{cases} \text{ а)} \quad \Rightarrow \quad \begin{cases} \dot{X}_1 = a(A_0 - X_1 - X_2)X_1 - X_1 X_2 \\ \dot{X}_2 = X_1 X_2 - mX_2 \end{cases} \text{ б)} \quad (6)$$

Из якобиана этой системы (из-за громоздкости не приводится) формируем выражения для следа и детерминанта матрицы линейных приращений. Важно отметить, что мы не вычисляем аналитически стационарные значения, а рассматриваем их как параметры, т.е. эта процедура может приводить к громоздким выражениям, но технически всегда осуществима.

Далее нам нужно конкретизировать модель, т.е. подставить определенные значения параметров (допустим известные из наблюдений), а стационарные значения тоже подставляем из данных наблюдений (проверка согласованности модели) и/или рассчитываем их или некоторую их часть численно. Допустим, для исходной модели выбраны следующие значения параметров: $\bar{X}_1 = 0.5$, $\bar{X}_2 = 0.1$, $a = 0.5$, $A_0 = 1$, $\mu = 2$, $K = 0.5$, $m = 1$.

Собственные значения этой модели, вычисленные не для процедуры, а для контроля качества инвариантного преобразования равны: $\lambda_{1,2} = -0.0750 \pm 0.3455i$. Допустим, мы хотим упростить модель и убрать трофическую функцию вида Моно из модели, т.е. изменить структуру модели. Для этого, применяя итерационную процедуру устремим параметры μ и K к большим значениям, допустим к 300. В ходе этих превращений получаем: $\bar{X}_1 = 1.0$, $\bar{X}_2 = 0.11$, $a = 0.15$, $A_0 = 1.84$, $\mu = 300$, $K = 300$, $m = 1$.

При этом собственные значения полученной модели равны: $\lambda_{1,2} = -0.0748 \pm 0.3455i$. Незначительное расхождение величин собственных значений отражает несовершенство вычислительной итерационной процедуры. Большие значения параметров μ и K приводят к тому, что вкладом переменной в знаменателе формулы Моно можно пренебречь и вместо дробно-рациональной зависимости подставить произведение переменных. Тем самым мы построили структурно отличную модель, но подобную исходной по устойчивости к малым возмущениям. Вычислительное интегрирование системы показало, что поведение системы в окрестности особой точки не претерпевает заметных изменений, не говоря уже о сохранении типа особой точки – устойчивого фокуса.

Отметим, что подобие по равенству собственных значений является только примером. В качестве показателя подобия может быть выбрана любая величина, характеризующая важные для исследователя свойства экосистем. Конечно, предлагаемое преобразование подобия не всегда возможно. Например, нельзя было бы перевести нелинейную систему второго порядка, описывающую замкнутую экосистему с колебательным режимом, в линейную систему, поскольку в линейной системе второго порядка без запаздывания предельного цикла не бывает [7].

Специфика моделирования замкнутых экосистем и биосферы. Модели гибкого метаболизма.

В современных условиях роста антропогенного давления на экосистемы и биосферу огромное значение имеет обеспечение прогноза и управления природными экологическими системами. Близко к этой задаче примыкает задача создания искусственных биосфер – замкнутых экологических систем жизнеобеспечения (ЗЭСЖО) космического применения. Огромное значение в достижении перечисленных задач имеет оценка устойчивости реальных экосистем. При этом, поскольку достоверную оценку устойчивости конкретной экосистемы можно получить только в экспериментах, приводящих к разрушению этой экосистемы, то очевидно, что экспериментальный подход бесполезен для достижения заявленной цели. Единственный способ оценки устойчивости экосистем – построение и исследование их теоретических моделей. Однако модельный подход к оценке устойчивости реальных экосистем сталкивается с рядом препятствий.

Одним из важнейших препятствий является противоположный ход зависимостей устойчивости экосистемы от числа входящих в нее видов в случае реальных экосистем и их классических математических моделей. Действительно, с одной стороны, в традиционных моделях экосистем при увеличении количества взаимодействующих видов уменьшается область устойчивости в пространстве параметров модели [8]. Кроме того, существует принцип конкурентного исключения Гаузе, гласящий, что число стационарно существующих на одном трофическом уровне видов не может превышать числа доступных им питательных субстратов [9]. В дальнейшем принцип конкурентного исключения был расширен. Показана возможность сосуществования нескольких видов на одном питательном субстрате, если их число не превышает количество плотностнозависимых контролирующих рост факторов (ПКРФ) в системе [10].

При поиске критерия сосуществования видов было открыто существенное парадоксальное свойство ПКРФ - **аутостабилизация**, заключающееся в независимости или малой изменчивости стационарных значений ПКРФ внутри системы (в культиваторе) при вариабельности их входных потоков [10]. В основе этого эффекта лежит механизм обратных метаболических связей отдельных видов микробного сообщества между собой, реализуемых через конкретные биохимические факторы среды – ПКРФ. Мерой независимости фоновой концентрации ПКРФ от входной (т.е. мерой аутостабилизации) служат коэффициенты чувствительности (K_j): $K_j \equiv \partial A_j / \partial A_j^0$. На большом числе экспериментов доказано, что эффект аутостабилизации присущ процессам периодического и непрерывного культивирования микроорганизмов, взаимодействующим популяциям одного трофического уровня, взаимодействиям "хищник-жертва" и некоторым водным экосистемам.

Доказана теорема [11], что сумма K_j по всем ПКРФ в точности равна **целому** (!) числу, которое есть разность числа ПКРФ (n) и числа сосуществующих популяций (m), т.е.

$$\sum_{j=1}^n \partial A_j / \partial A_j^0 = n - m \quad (7).$$

Доказано [11] следствие этой теоремы о «целочисленности» изменения стационарных уровней биомасс: $\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n a_{ji} \partial X_i / \partial A_j^0 = -n$. Эта теорема получила название «теорема квантования», поскольку сумма коэффициентов чувствительности K_j может меняться лишь **дискретно и целочисленно**.

Экспериментальная проверка этого утверждения на двух видовой дрожжевой системе показала ее полную справедливость. Теорема открывает путь к экспериментальному определению числа сосуществующих микробных популяций, не отличимых морфологически. Теорема квантования представляет собой редкий случай теоретически точно выведенного инварианта или "закона экологии" для целой экосистемы, полученного для сообщества, связанного достаточно общей и сложной сетью "плотностнозависимых" взаимодействий.

В то же время экспериментальные данные свидетельствуют, что в природных экосистемах принцип конкурентного исключения может не соблюдаться. Наиболее известный пример нарушения принципа конкурентного исключения – парадокс планктона, заключающийся в сосуществовании нескольких видов планктона, питающихся одним питательным субстратом [12]. Данное явление наблюдается не только в водных, но и в наземных экосистемах [13]. Возрастание устойчивости реальных экосистем с увеличением числа входящих в нее видов является типичным [14-17]. Это расхождение в зависимости устойчивости реальных экосистем и их моделей от численности видов является проблемой принципиальной важности, без разрешения которой нельзя ставить вопрос о практическом использовании моделей.

В дополнение к вышеперечисленным претензиям к традиционным математическим моделям экосистем, еще одной проблемой является их неспособность описывать замкнутые экологические системы [18]. Проиллюстрируем это ограничение на примере простой модели ЗЭС. В соответствии с задачей в дальнейшем будет рассматриваться только стационарное состояние ЗЭС:

$$\begin{cases} \dot{X}_i = \alpha_{ii} V_i - \sum_{j=1}^N \alpha_{ij} V_j \equiv 0 \\ \dot{S}_k = \sum_{l=1}^N \alpha_{kl} V_l - \sum_{r=1}^N \alpha_{kr} V_r \equiv 0 \end{cases} \quad \text{или} \quad \mathbf{A} \vec{V} = 0 \quad (8)$$

где $V_i = f_i(\vec{X}^*, \vec{S}^*) X_i^*$ и звездочкой помечены стационарные значения переменных ЗЭС. где скорости процессов трансформации веществ на единицу биомассы обозначены как $f_i(\vec{X}, \vec{S})$; N - количество видов; X_i - обозначают биомассу продуцентов и консументов; α_{ii} - равен экономическому коэффициенту по приросту биомассы.

Тем самым у нас имеется набор переменных V_i , количество которых равно числу видов N , существующих в замкнутой системе плюс 1. Кроме того, количество уравнений системы равно количеству видов N плюс количество биогенов M , участвующих в круговороте. В то же время количество независимых уравнений на два меньше числа уравнений, вследствие закона сохранения и нормировки. Нетривиальное решение возможно если ранг матрицы $\mathbf{A}$ меньше числа переменных, т.е. $N+1 > N+M-2$ или $M < 3$.

Можно сделать вывод, что причина нереализуемости стационарного состояния ЗЭС заключается в несогласованности фиксированных стехиометрических коэффициентов. Традиционные экологические модели типа Лотки-Вольтерра аналогичны моделям химических реакций в смысле использования постоянных стехиометрических коэффициентов. Такие модели можно назвать моделями с жестким метаболизмом – ЖМ-моделями. Пока учитывается только один биоген и переменные выражены в единицах массы лимитирующего

химического элемента (например, фосфорные или азотные единицы [7], принципиальных проблем нет. Однако в замкнутых условиях мы должны учитывать превращения всех задействованных химических соединений, чтобы предотвратить образование тупиков. Отсюда следует, что необходимо перейти к моделям, основанным на гипотезе о лабильности стехиометрических коэффициентов и которые могут быть названы моделями с гибким метаболизмом [19-22] – ГМ-моделями.

Мы можем привести один из самых простых примеров модификации ЖМ-модели в ГМ-модель. Рассмотрим модель простой замкнутой экосистемы с двумя трофическими уровнями – продуцентами и консументами (6а), где для простоты разложение мертвых консументов считается быстрым по сравнению с темпами роста организмов.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx_1}{dt} = \left(V_1 B - \frac{\mu_0 y}{K + x_1 + x_2} \right) x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} = \left(V_2 B - \frac{\mu_0 y}{K + x_1 + x_2} \right) x_2 \\ \frac{dy}{dt} = \left(\sum_{i=1}^2 \frac{\mu_0 x_i}{K + x_1 + x_2} - k_d \right) y \\ B = B_0 - x_1 - x_2 - y \end{array} \right. \quad \text{a)} \quad \Rightarrow \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dx_1}{dt} = \left(V_1 B - \frac{\mu_0 y}{K + x_1 + x_2} \left(\frac{x_1}{x_1 + x_2} \right) \right) x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} = \left(V_2 B - \frac{\mu_0 y}{K + x_1 + x_2} \left(\frac{x_2}{x_1 + x_2} \right) \right) x_2 \\ \frac{dy}{dt} = \left(\sum_{i=1}^2 \frac{\mu_0 x_i}{K + x_1 + x_2} \left(\frac{x_i}{x_1 + x_2} \right) - k_d \right) y \\ B = B_0 - x_1 - x_2 - y \end{array} \right. \quad \text{b)} \quad (9ab)$$

где x_i – продуценты; y – консумент; V_i – удельная скорость роста продуцента; B_0 – общее количество лимитирующего элемента в системе; μ_0 – максимальная удельная скорость поедания продуцента консументом; K – константа Моно; k_d – константа отмирания.

Простейшая модификация ЖМ-модели (6b) называется условно «Жадный хищник» и представляет собой исходную модель, в которой хищник потребляет преимущественно ту жертву, численность которой выше. Это можно интерпретировать, как некоторый принцип экономии – вероятность поймать жертву выше в тех местах, где больше ее численность. При тех же значениях параметров ГМ-модель демонстрирует кардинально отличающееся поведение. Качественно, и в какой-то мере количественно, различие в устойчивости модели можно видеть на параметрическом портрете системы (рис. 1), полученном прямым счетом.

Другая ГМ-модель в которой потребление того или иного субстрата с определенным стехиометрическим соотношением биогенов определяется наполненностью внутренних пулов биогенов (не приведена из-за громоздкости) позволяет моделировать замкнутые экосистемы с произвольным количеством учитываемых биогенов. Резюмируя можно утверждать, что экологические модели с гибким метаболизмом с одной стороны, предлагают возможное разрешение парадокса планктона и обеспечивают соответствие между реальными и модельными зависимостям устойчивости экосистем от количества видов, а с другой, могут быть использованы для моделирования замкнутых экологических систем.

Минимальная модель биосферы. Принцип наихудшего сценария.

На фоне продолжающихся споров о реальности глобального потепления и о его антропогенной природе появляются работы, из которых следует, что наблюдаемые сейчас глобальные тренды направлены в противоположную сторону от ожидаемых по естественной динамике климата [23]. Отмечено, что за последние 2000 лет только в двадцатом и двадцать первом веках наблюдается беспрецедентное когерентное (98% регионов земного шара) повышение глобальной температуры [24]. Обсуждается возможность резкого переключения системы «биосфера-климат» (СБК) в другое вероятнее всего более горячее состояние [25-27]. Однако следует отметить, что возможность такого переключения и возможные его механизмы были рассмотрены в ИБФ СО РАН 15 лет назад [28] на примере малоразмерных концептуальных моделей биосферы, а практическое обоснование

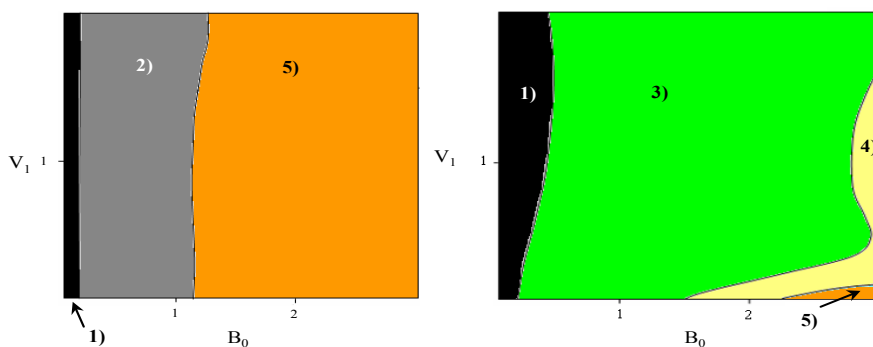


Рисунок 1. Параметрические портреты ЖМ (слева) и ГМ (справа) моделей при значениях параметров: $V_2=1.5$, $\mu_0=2$, $K=0.5$, $k_d=0.5$. Области параметрического портрета: 1 – полное вымирание; 2 – частичное отмирание; 3 – устойчивое стационарное сосуществование; 4 – сосуществование с колебаниями численности; 5 – частичное отмирание с колебаниями численности

построения таких моделей под названием «Принцип наихудшего сценария» было сформулировано в 2008 году [29].

Важно отметить, что любые вычисленные сценарии биосферной динамики могут быть только вероятностными. Причина заключается в том, что оценки почти всех параметров биосферы и климата имеют приближенный характер. Так, например, оценки количества углерода в атмосфере варьируют от 600 до 760 Гт; в биомассе - от 500 до 850 Гт; в почве - от 1080 до 2000 Гт, первичная продукция фотосинтеза варьирует в диапазоне 110-120 ГтС/год ([30-32]). Наиболее вероятное значение одного из важнейших параметров системы "биосфера-климат" - чувствительности климата, равного повышению глобальной температуры при удвоении атмосферной концентрации CO_2 равно 4.5°C (IPCC, Climate Change, 2007), однако по некоторым оценкам этот параметр может достигать 11°C ([33]). По это причине можно говорить о целом **всере** возможных вариантов динамики системы "биосфера-климат".

И тогда возникает вопрос, а на какой сценарий ориентироваться лицам принимающим решения, если забота о будущем земной биосферы и людей, живущих в ней, будет воплощаться не в словах, а в делах. Предполагается, что в отношении глобального потепления нужно поступать по аналогии с отношением человека к признакам возгорания – определить **наихудший сценарий** и оценить условия его осуществления при неблагоприятных условиях. Согласно **принципу наихудшего сценария** в случае неопределенности в оценке параметров мы должны выбирать наихудшее сочетание значений этих параметров, остающихся, тем не менее, внутри доверительных интервалов. Кроме того, если есть сомнения в эффективности того или иного природного компенсирующего негативную динамику механизма, то мы должны игнорировать этот механизм в создаваемых моделях. Тем самым последовательное применение принципа наихудшего сценария имеет своим результатом построение упрощенных моделей.

Поскольку СБК принципиально нелинейная система, то с точки зрения наихудшего сценария особое внимание нужно обращать на систему обратных связей, в первую очередь положительных, и на цепочки отрицательных обратных связей с четным количеством этих связей. Именно при наличии обратных связей возможны самые катастрофические сценарии – запуск глобальных самоускоряющихся процессов.

Даже предварительный, из общих соображений, анализ системы "биосфера-климат" на предмет наличия обратных связей приводит к следующей, достаточно сложной картине взаимодействий между главными процессами и событиями (рис. 2). Из рисунка видно, что даже на этом уровне моделирование столь сложной системы представляет собой нетривиальную задачу.

Продолжая следовать принципу наихудшего сценария, выделим обратные связи, имеющие самые малые характерные времена, т.е. способные вызвать быстрые изменения в СБК. Один из ключевых механизмов взаимодействий биосфера - климат - это положительная обратная связь "температура - концентрация двуокиси углерода". Повышение атмосферной концентрации CO_2 вызывает вследствие парникового эффекта повышение приземной температуры, которое, в свою очередь, может вести к увеличению почвенного дыхания и выделению большего количества CO_2 – это первая быстрая обратная связь.

В то же время, вопрос температурной зависимости почвенного дыхания является достаточно сложным. В некоторых исследованиях сообщалось, что повышение почвенной температуры не вызывает никакого увеличения эмиссии CO_2 из почвы [34,35]. С другой стороны, имеются исследования, которые доказывают положительную температурную зависимость почвенного дыхания [36-38]. Более того почва иногда может демонстрировать почти пороговую реакцию на повышение температуры [39]. В соответствии с принципом наихудшего сценария был выбран пессимистичный вариант. Вторая петля обратной связи включает уменьшение

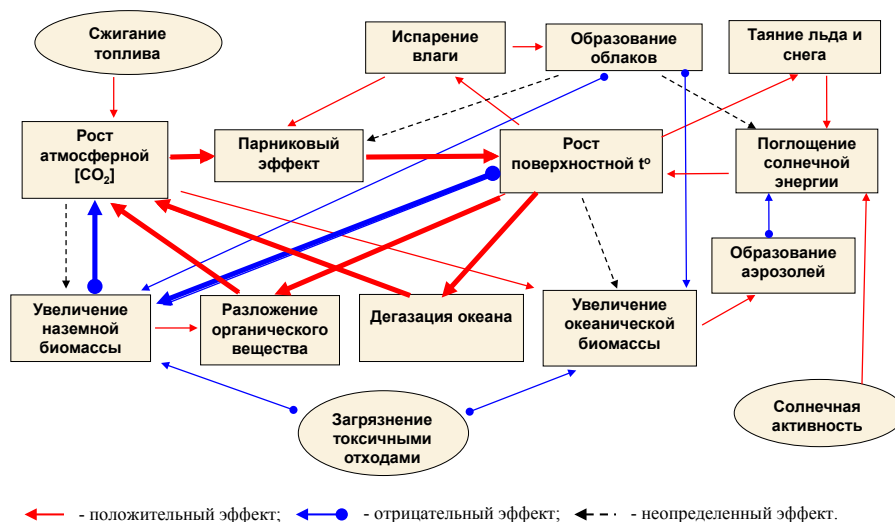


Рисунок 2. Диаграмма наиболее очевидных обратных связей в системе биосфера-климат. Толстыми стрелками выделены самые быстрые обратные связи и достоверная обратная связь через океан

скорости фотосинтеза наземных растений вследствие смещения температуры от оптимального для растений значения и как следствие, уменьшение в потреблении атмосферного CO₂, что приводит к его дальнейшему росту и в конечном счете дальнейшему повышению температуры.

В то же время для долгосрочного прогноза нельзя игнорировать вклад океана в глобальную динамику углерода. Принцип наихудшего сценария оправдывает игнорирование возможных компенсаторных механизмов, но он не дает оснований для игнорирования тех механизмов, чей компенсаторный эффект не вызывает сомнений, по крайней мере на современном уровне знаний. Таким физическим явлением является падение растворимости газа в жидкости при повышении температуры. Поскольку нас интересуют прежде всего обратные связи с малым характерным временем реакции, то растворимость CO₂ в океане нужно учитывать только в водах над термоклинном, поскольку обмен между водами над термоклинном и глубинными слоями океана является достаточно медленным.

Поскольку модель имеет нулевую размерность то важнейший параметр – температура может быть только усредненной. Такой показатель существует, это среднегодовая глобальная приповерхностная температура, близкая в настоящее время к 15°C. В модели предполагается, что глобальные изменения среднегодовой температуры ведут к такому же изменению в местной температуре. Кроме того, поскольку фотосинтез и почвенное дыхание зависят от температуры атмосферы и относительно тонкого слоя земной поверхности, то это дает основания не учитывать в базовой модели температурную инерцию системы.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{dt} = S(Y, T(A)) + C_{a_up} BM_{out}(A) - P(X, A, T(A)) - C_{a_down} AM_{in}(A) + e(t) \\ \frac{dX}{dt} = P(X, A, T(A)) - D(X) \\ \frac{dY}{dt} = D(X) - S(Y, T(A)) \\ \frac{dB}{dt} = C_{a_down} AM_{in}(A) - C_{a_up} BM_{out}(A) \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} P(X, A, T(A)) = v_p (X_{max} - X) f_p(T(A)) \frac{A}{K_A + A} \\ D(X) = v_d X \quad S(Y, T(A)) = v_s f_s(T(A)) Y \\ T(A) = T_0 + \Delta T \log_2 \left(\frac{A}{A_0} \right) \\ f_i(T) = \begin{cases} T^{-d} (T_{max} - T) & T < 0 \\ 0, & T < 0 \\ 0, & T > T_{max} \end{cases} \\ M_{in}(A) = e^{-0.03(T_0 - T(A))} \quad M_{out}(A) = e^{-0.03(T(A) - T_0)} \end{array} \quad (10)$$

где A – углерод в атмосфере; X – углерод в биомассе наземных растений; Y – углерод в органике почвы; B – углерод в верхних слоях океана; $T(A)$ – глобальная поверхностная температура; ΔT – равновесное приращение температуры при удвоении концентрации углекислого газа в атмосфере; $p(X, A, T(A))$ – функция скорости прироста биомассы; $e(t)$ – антропогенная эмиссия CO₂; T_0 – начальная температура почвы; X_{max} – предельное количество биомассы, зависящее от предельной допустимой плотности растительного покрытия (ГтС) ($X_{max} = X_0 G$, где X_0 – количество наземной биомассы растений в конце 1950-х, G – коэффициент, характеризующий возможность растений увеличить количество биомассы); v_i – масштабные множители.

Различные оценки углеродного пула в атмосфере и наземных компартментах и потоков между ними представлены в литературе [30-32,40]. В соответствии с принципом наихудшего сценария были выбраны следующие значения параметров модели: начальное количество углерода в растительной биомассе – 850 ГтС и в неживой органике – 1100 ГтС. Параметр K_A выбран равным 900 ГтС на основе экспериментальных данных [41,42]. Эмпирическая зависимость роста среднегодовой глобально приповерхностной температуры от концентрации CO₂ была взята из опубликованных данных [43].

Масштабные множители подбираются таким образом, чтобы скорость роста биомассы и интенсивность почвенного дыхания должны быть равны ранее опубликованной оценке в 55 ГтС/г. Причем в отсутствие антропогенного потока CO₂ модель находится в стационарном состоянии с параметрами, соответствующими глобальным значениям конца 1950-х. Коэффициенты, описывающие поглощение и испускание углекислого газа в зависимости от температуры, а в конечном счете от концентрации CO₂, получены путем эмпирической аппроксимации данных по концентрации CO₂ в воде при различной температуре [30]. Остальные параметры модели подстраивались с помощью фитинга. Данные по температуре взяты на <https://climexp.knmi.nl/>, данные по газам – <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/>, по эмиссии углекислого газа – <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/carbontracker/>.

Вычислительные эксперименты с моделью выявили наличие так называемой «даты необратимости», обозначающей момент времени, когда запускаются самоподдерживающиеся катастрофические процессы, которые невозможно остановить даже полным прекращением сжигания ископаемых топлив. Примеры глобальной динамики основных переменных при различных значениях чувствительности климата приведены на Рис.3. Резкие изломы на кривой, описывающей изменения температуры, однозначно определяемой концентрацией углекислого газа, соответствуют моменту полного прекращения эмиссии парниковых газов – нереализуемая в действительности возможность, но очень полезная для иллюстрации свойств модели. Можно видеть, что с ростом чувствительности климата эффект роста концентрации CO₂ становится все более заметным, а восстановление системы после прекращения эмиссии занимает больше времени. Для приведенных примеров с ΔT равной 2 и 4.5 °C сжигание топлив продолжалось до 2125 года и не привело к запуску необратимых изменений, однако при 6 °C необратимые изменения начинаются с 2073 года.

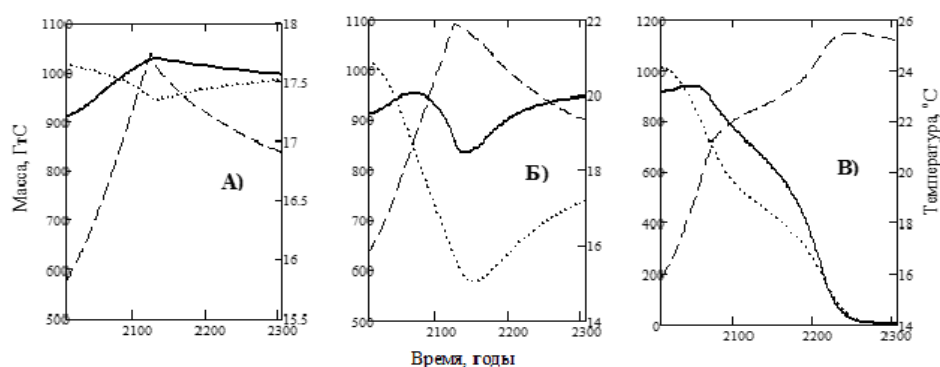


Рисунок 3. Варианты сценариев развития биосферы при различных значениях чувствительности климата ΔT . Графики соответствуют следующим значениям ΔT : (А) – 2°C; (Б) – 4.5°C; (В) – 6°C. В последнем случае дата необратимости (В) – 2073 г. На графике сплошная линия описывает динамику биомассы, пунктирная – мертвого органического вещества, штриховая – изменение температуры

В рассмотренной модели были учтены всего три из огромного числа положительных и цепочек из четного числа отрицательных обратных связей. Не исключено, что при расширении списка анализируемых обратных связей, дата необратимости может существенно приблизиться к нашим дням.

Закключение.

1. Как можно видеть из приведенных примеров, экологическая биофизика имеет общую методологическую базу с биофизикой, т.е. преимущественно использует предельно идеализированные описания, на основе которых строятся максимально простые, концептуальные модели. Но сами объекты исследования – экосистемы и биосфера в целом обладают рядом свойств, которые резко усложняют их исследование.

2. К этим свойствам нужно отнести принципиальную уникальность каждой экосистемы и невозможность проведения с ними «острых» экспериментов, «индивидуализм» каждого компонента экосистемы, который, например, в отличие от согласованной работы клеток многоклеточного организма, «тянет одеяло на себя», что приводит к почти постоянной конкуренции и сложным эволюционным путям, существенная нелинейность самих компонентов и связей между ними, порождающая сложную динамику и, наконец, принципиальная зависимость от небиологических условий внешней среды, т.е. погоды и климата, которые сами проявляют сложную динамику и, в то же время, демонстрируют зависимость от глобального и локального состояния биосферы.

Все это приводит к тому, что мы вынуждены при изучении экосистем и биосферы применять различные концептуальные модели, отражающие какое-то одно свойство объекта или небольшое их число. Для получения общезначимых экологических результатов обязательно нужно прописывать условия подобия, формализующие сходство между уникальными экосистемами. Разработка технологии подобию экологических систем позволила бы дополнить арсенал экологии настоящим экспериментом, осуществляемым на искусственных экосистемах. Поскольку взаимодействие между всеми организмами в принципе возможно только на основе единой биохимической базы, то простраивание сквозных связей между биохимией и физиологией организмов и их экологической ролью, выражаемое в частности, и через стехиометрические ограничения представляется необходимым для максимально адекватного описания экосистем.

Этот, далеко не полный перечень задач и направлений дает, тем не менее, представление о богатстве перспектив дальнейшего развития экологической биофизики.

Список литературы/References:

1. Моровиц Г. *Исторический очерк. Теоретическая и математическая биология*. М.: Мир, 1968, с. 34-48. [Morowitz G. *Historical sketch. Theoretical and mathematical biology*. М.: Mir, 1968, pp. 34-48. (In Russ.)]
2. Вернадский В.И. *Биосфера и ноосфера*. Айрис-пресс, 2012, 576 с. [Vernadsky V.I. *Biosphere and noosphere*. Iris press, 2012, 576 p. (In Russ.)]
3. Degermendzhi A.G. *New directions in biophysical ecology. Chapter 14 Ch 10. In: Global Climatology and Ecodynamics: Anthropogenic Changes to Planet Earth* (Springer Praxis Books/Environmental Sciences), 2009, pp. 379-396.
4. Барцев С.И., Барцева О.Д. Симметрии структуры и эквифинальность эволюционных исходов в простых нейросетевых моделях. *ДАН*, 2002, т. 386, № 1, с. 114-117. [Bartsev S.I., Bartseva O.D. Structure symmetries and equifinality of evolutionary outcomes in simple neural network models. *DAN*, 2002, vol. 386, no. 1, pp. 114-117. (In Russ.)]
5. Барцев С.И., Барцева О.Д. Функционально-инвариантный подход к проблеме уникальности биологических систем: простая нейросетевая модель. *ДАН*, 2005, т. 405, № 4, с. 1-4. [Bartsev S.I., Bartseva O.D. Functionally invariant approach to the problem of the uniqueness of biological systems: a simple neural network model. *DAN*, 2005, vol. 405, no. 4, pp. 1-4. (In Russ.)]
6. Барцев С.И., Барцева О.Д. *Эвристические нейросетевые модели в биофизике: приложение к проблеме структурно-функционального соответствия*. Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, 2010, 115 с.

- [Bartsev S.I., Bartseva O.D. *Heuristic neural network models in biophysics: application to the problem of structural and functional correspondence*. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2010, 115 p. (In Russ.)]
7. Свирежев Ю.М. *Нелинейные волны, диссипативные структуры и катастрофы в экологии*. М.: Наука, 1987, 386 с. [Svirezhev Yu.M. *Nonlinear waves, dissipative structures and catastrophes in ecology*. Moscow: Nauka, 1987, 386 p. (In Russ.)]
 8. Адамович В.В., Дегерменджи А.Г. Статистические закономерности организации маловидовых стационарных сообществ микроорганизмов. *Ж. Общей биологии*, 1985, т. XLVI, № 4, с. 527-532. [Adamovich V.V., Degermendzhi A.G. Statistical regularities of the organization of small-species stationary communities of microorganisms. *J. General Biology*, 1985, vol. XLVI, no. 4, pp. 527-532. (In Russ.)]
 9. Дегерменджи А.Г., Абакумов А.И. Принцип конкурентного исключения в двухвидовом сообществе с одним метаболическим фактором регуляции. *ДАН*, 2018, т. 480, № 4, с. 495-498. [Degermendzhi A.G., Abakumov A.I. The principle of competitive exclusion in a two-species community with one metabolic regulation factor. *DAN*, 2018, vol. 480, no. 4, pp. 495-498. (In Russ.)]
 10. Дегерменджи А.Г., Печуркин Н.С., Шкидченко А.Н. *Аутостабилизация факторов, контролирующих рост в биологических системах*. Новосибирск: Наука, 1979, 141 с. [Degermendzhi A.G., Pechurkin N.S., Shkidchenko A.N. *Autostabilization of factors that control growth in biological systems*. Novosibirsk: Science, 1979, 141 p. (In Russ.)]
 11. Адамович В.А., Терсков И.А., Дегерменджи А.Г. Эффект ауто стабилизации контролирующих рост факторов и взаимодействия в сообществе. *ДАН*, 1987, т. 235, № 5, с. 1236-1239. [Adamovich V.A., Terskov I.A., Degermendzhi A.G. The effect of self-stabilizing growth control factors and interactions in the community. *DAN*, 1987, vol. 235, no. 5, pp. 1236-1239. (In Russ.)]
 12. Hutchinson G.E. The paradox of the plankton. *The American Naturalist*, 1961, vol. 95, no. 882, pp. 137-145.
 13. Levine J.M., HilleRisLambers J. The importance of niches for the maintenance of species diversity. *Nature*, 2009, vol. 461, pp. 254-257.
 14. Свирежев Ю.М., Логофет Д.О. *Устойчивость биологических сообществ*. М.: Наука, 1978, 352 с. [Svirezhev Yu.M., Logofet D.O. *Sustainability of biological communities*. M.: Nauka, 1978, 352 p. (In Russ.)]
 15. Winemiller K.O. Spatial and temporal variation in tropical fish trophic networks. *Ecol.Monogr.*, 1990, vol. 60, pp. 331-367.
 16. Polis G.A. Complex trophic interactions in deserts: an empirical critique of food web theory. *The American Naturalist*, 1991, vol. 138, pp. 123-155.
 17. Ives A.R., Carpenter S.R. Stability and diversity of ecosystems. *Science*, 2007, vol. 317, pp. 58-62.
 18. Bartsev S.I. Stoichiometric constraints and complete closure of long-term life support systems. *Adv Space Res.*, 2004, vol. 34, no. 7, pp. 1509-1516.
 19. Салтыков М.Ю., Барцев С.И., Ланкин Ю.П. Зависимость устойчивости моделей замкнутых экосистем от числа видов. *Журнал СВУ серия «Биология 2»*, 2011, № 4, с. 197-208. [Saltykov M.Yu., Bartsev S.I., Lankin Yu.P. Dependence of the stability of models of closed ecosystems on the number of species. *SibFU journal series "Biology 2"*, 2011, no. 4, pp. 197-208. (In Russ.)]
 20. Saltykov M.Yu., Bartsev S.I., Lankin Yu.P. Stability of CELSS models as dependent upon the properties of metabolism of the described species. *Adv. Space Res.*, 2012, vol. 49, no. 2, pp. 229-223.
 21. Saltykov M.Yu., Bartsev S.I. Developing of discrimination experiment to find most adequate model of plant's multi-nutrient functional response. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, 2017, vol. 173, p. 012017. doi: 10.1088/1757-899X/173/1/012017
 22. Bartsev S.I., Degermendzhi A.G., Sarangova A.B. Closure of Earth's Biosphere: Evolution and Current State. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2019 vol. 12, no. 3, pp. 337-347.
 23. Marcott S.A., Shakun J.D., Clark P.U., Mix A.C. A Reconstruction of Regional and Global Temperature for the Past 11,300 Years. *Science*, 2013, vol. 339, pp. 1198-1201.
 24. Neukom R., Steiger N., Gómez-Navarro J.J., Wang J., Werner J.P. No evidence for globally coherent warm and cold periods over the preindustrial Common Era. *Nature*, 2019, vol. 571, pp.550-572.
 25. Drijfhout S. et al. Catalogue of abrupt shifts in Intergovernmental Panel on Climate Change climate models. *PNAS*, 2015, vol. 112, no. 43, pp. E5777-E5786.
 26. Lenton T.M. et al. Climate tipping points—Too risky to bet against. *Nature*, 2019, vol. 575, pp. 592-595.
 27. Steffen W. et al. Trajectories of the Earth System in the Anthropocene. *PNAS*, 2018, vol. 115, no. 33, pp. 8252-8259.
 28. Барцев С.И., Дегерменджи А.Г., Ерохин Д.В. Глобальная минимальная модель многолетней динамики углерода в биосфере. *ДАН*, 2005, т. 401, № 2, с. 233-237. [Bartsev S.I., Degermendzhi A.G., Erokhin D.V. Global minimum model of long-term dynamics of carbon in the biosphere. *DAN*, 2005, vol. 401, no. 2, pp. 233-237. (In Russ.)]
 29. Bartsev S.I., Degermendzhi A.G., Erokhin D.V. Principle of the worst scenario in the modelling past and future of biosphere dynamics. *Ecological Modelling*, 2008, vol. 216, no. 2, pp. 160-171.
 30. Кондратьев К.Я., Крапивин В.Ф. *Моделирование глобального круговорота углерода*. М.: Физматлит, 2004, 336 с. [Kondratyev K.Ya., Krapivin V.F. *Modeling the global carbon cycle*. Moscow: Fizmatlit, 2004, 336 p. (In Russ.)]
 31. IPCC, 2001. *Climate Change. 2001: Scientific aspects*, UNEP, 881 p.

32. Brovkin V., Sitch S., Bloh von W., Claussen M., Bauer E., Cramer W. Role of land cover changes for atmospheric CO₂ increase and climate change during the last 150 years. *Glob. Change Biol.*, 2004, vol. 10, pp. 1253-1266.
33. Stainforth D.A., Aina T., Christensen C. et al. Uncertainty in predictions of the climate response to rising levels of greenhouse gases. *Nature*, 2005, vol. 433, pp. 403-406.
34. Fitter A.H., Self G.K., Brown T.K., Bogie D.S., Graves J.D., Benham D., Ineson P. Root production and turnover in an upland grassland subjected to artificial soil warming respond to radiation flux and nutrients, not temperature. *Oecologia*, 1999, vol. 120, pp. 575-581.
35. Liski J., Ilvesniemi H., Makela A., Westman C.J. CO₂ emissions from soil in response to climatic warming are overestimated - The decomposition of old soil organic matter is tolerant of temperature. *Ambio*, 1999, vol. 28, pp. 171-174.
36. Rochette P., Angers D.A., Flanagan L.B. Maize Residue Decomposition Measurement Using Soil Surface Carbon Dioxide Fluxes and Natural Abundance of Carbon-13. *Soil Science Society of America Journal*, 1999, vol. 63, pp. 1385-1396.
37. Risk D., Kellman L., Beltrami H. Carbon dioxide in soil profiles: Production and temperature dependence. *Geophysical Research Letters*, 2002, vol. 29, no. 6, pp. 111-114.
38. Piao S., Ciais P., Friedlingstein P. et al. Net carbon dioxide losses of northern ecosystems in response to autumn warming. *Nature*, 2008, vol. 451, pp. 49-52.
39. Wang G., Li F., Peng Y. et al. Responses of soil respiration to experimental warming in an alpine steppe on the Tibetan Plateau. *Environ. Res. Lett.*, 2019, vol. 14, p. 10.
40. Brovkin V. Climate-vegetation interaction. *J. Phys. IV France*, 2002, vol. 12, pp. 52-57.
41. Pritchard S.G., Davis M.A., Mitchell R.J., Prior A.S., Boykin D.L., Rogers H.H., Runion G.B. Root dynamics in an artificially constructed regenerating longleaf pine ecosystem are affected by atmospheric CO₂ enrichment. *Environmental and Experimental Botany*, 2001, vol. 46, pp. 35-69.
42. Morgan J.A., LeCain D.R., Mosier A.R., Milchunas D.G. Elevated CO₂ enhances water relations and productivity and affects gas exchange in C3 and C4 grasses of the Colorado shortgrass steppe. *Global Change Biol.*, 2001, vol. 7, pp. 451-466.
43. Gifford R.M. *Implications of CO₂ effects on vegetation for the global carbon budget*. In: *The global carbon cycle* (ed. M. Heimann). Springer-Verlag, Berlin, 1993, pp. 159-199.

ECOLOGICAL BIOPHYSICS - POSSIBLE HORIZONS OF DEVELOPMENT

Bartsev S.I.^{1,2}, Degermendzhi A.G.¹, Degermendzhi N.N.³, Saltykov M.Yu.^{1,2}, Sarangova A.B.²

¹ Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center KSC SB RAS

Krasnoyarsk, Russia; e-mail: BartsevSI@ibp.ru

² Siberian Federal University

Krasnoyarsk, Russia

³ Krasnoyarsk State Medical University.

Krasnoyarsk, Russia

Abstract. The paper discusses the specificity of the approach of ecological biophysics to the study of ecological systems and the Earth's biosphere in general. The problems typical for this section of biophysics and possible approaches to their overcoming are considered. In particular, the problem of the uniqueness of ecological systems can be significantly weakened if it is possible to develop a theory of ecological similarity. The problem of the multidirectional dependence of the stability of real ecosystems and their models on the number of incoming species can be removed by switching to the models of the so-called flexible metabolism. The immense complexity of the biosphere prompts one to turn to conceptual models based on the principle of the worst-case scenario, which allow, at least in general terms, to assess the action and possible contribution of certain mechanisms to global dynamics.

Key words: *ecological biophysics, ecosystem, autostabilization, biosphere.*

ИЗМЕНЕНИЕ ДИФФУЗИОННЫХ РАССТОЯНИЙ И ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МОРСКИХ РЫБ НА ПРОТЯЖЕНИИ ГОДОВОГО ЦИКЛА

Солдатов А.А.^{1,2}

¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
проспект Нахимова д. 2, Севастополь 299011, РФ; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь 299053, РФ

Поступила в редакцию: 23.07.2021

Аннотация. Исследовали плотность капиллярной сети (N_c), степень капилляризации мышечной ткани (N_c/N_f), диффузионные расстояния (радиус Крога – R_K) и химический состав скелетных мышц (общий уровень липидов, содержание воды) у трех видов морских рыб: кефали-сингиля (*Liza aurata*, Risso 1810), бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus*, Pallas 1814) и камбалы-глоссы (*Platichthys flesus*, Linnaeus 1758), на протяжении годового цикла. Характер изменения диффузионных расстояний в скелетных мышцах в течение года у всех исследованных видов рыб был близким. Естественная динамика температуры определяла плотность функционирующих капилляров, эффективность капилляризации мышечной ткани, толщину диффузионного слоя. В летний период значения показателей были максимальны, а в зимний минимальны. Уровень липидов и степень гидратации мышечной ткани определялся в основном функциональным состоянием организма рыб (нагул, нерест, миграции, зимовка). Показано, что содержание данных соединений может усиливать или ослаблять температурную зависимость диффузионных свойств скелетных мышц в целом.

Ключевые слова: капиллярная сеть, диффузионные характеристики, скелетные мышцы, содержание липидов и воды, морские рыбы, годовой цикл.

ВВЕДЕНИЕ

Для сезонных явлений умеренного пояса Северного полушария характерны выраженные циклические изменения ряда абиотических факторов среды: фотопериода и температуры. Роль температурного фактора в жизни пойкилотермных организмов, к которым относятся и морские рыбы, хорошо известна [1,2]. Он оказывает существенное влияние на течение метаболических процессов в организме пойкилотермов и особенно энергетический обмен их тканей [3].

Полученные на сегодняшний день результаты свидетельствуют о том, что температура оказывает неоднозначное действие на энергетический обмен организма и тканей рыб. В одних экспериментах отмечена положительная корреляция между скоростью потребления кислорода и температурой [4,5], в других отрицательная [6]. Обнаружено, что процессы, определяющие тканевое дыхание, способны активно компенсировать действие низких температур [7]. Так, показано, что снижение температуры повышает скорость потребления кислорода митохондриями скелетных мышц у серебряного карася [8], увеличивает окислительную активность гомогенатов мозга карпа [9]. В то же время, для угря были получены прямо противоположные данные [10].

Наряду с абиотическими факторами среды на динамику функционального состояния организма оказывают существенное влияние и естественные состояния: нерест, нагул, зимовка, различные виды миграций [11,12]. Они направленно меняют течение метаболических процессов, химический состав тела, формируют величину кислородного запроса и т.д. Изучению влияния этих состояний на характер капилляризации скелетных мышц и особенности их химического состава посвящена настоящая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на трех видах морских рыб: кефали-сингиле (*Liza aurata*, Risso 1810), бычке-кругляке (*Neogobius melanostomus*, Pallas 1814) и камбале-глоссе (*Platichthys flesus*, Linnaeus 1758). Рыбу отлавливали на протяжении на протяжении годового цикла. После доставки в лабораторию рыбу выдерживали в проточных аквариумах в течение недели для снятия состояния стресса, вызванного отловом и транспортировкой. В этот период особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6-7% от массы тела. В исследованиях использовали только активных питающихся особей.

За 60-70 минут до отбора проб рыб наркотизировали. В качестве анестезирующего препарата применяли уретан [13]. Его растворяли в воде аквариума, где находились особи. Величины эффективных доз препарата определяли с учетом температуры, солености, концентрации кислорода в воде, экологических и систематических особенностей рыб.

При исследовании микроциркуляторного русла скелетных мышц морских рыб применяли инъекционные и безинъекционные методы. Первые позволяли судить о максимальной плотности капиллярной сети красных и белых мышц, а вторые – о числе функционирующих капиллярных единиц. На основании полученных значений рассчитывали величину капиллярного резерва.

Инъекционный метод. В работе использовали один из наиболее эффективных инъекционных методов разработанный Огневым [14,15]. Тушку умерщвленной рыбы помещали в горячую воду на 20-25 минут. Температура – 35-40°C. Это способствовало максимальному раскрытию сосудов микроциркуляторного русла. Затем через дорсальную аорту (*aorta dorsalis*) при помощи шприца типа “Рекорд” инъецировали горячую 50%-ную водную взвесь туши (температура 35-40°C). Место введения иглы шприца в дорсальную аорту хорошо показано в работе [16]. Инъекцию продолжали до появления туши в крупных венах: *vena cardinales anteriores*, *vena caudalis*.

Затем позади спинного плавника вычленили участки *musculus lateralis magnus*. Их фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина и рассекали на поперечные и продольные срезы (толщина 25-30 мкм) на замораживающем микротоме. Препараты просветляли в метиловом эфире салициловой кислоты и окрашивали гематоксилин-эозином [15].

На поперечном срезе подсчитывали число капиллярных и мышечных единиц при помощи окулярной сетки, а также определяли их диаметр, используя окуляр-микрометр. На продольных срезах измеряли длину капиллярных единиц.

Безинъекционный метод. Для выявления числа функционирующих (открытых) капиллярных единиц в скелетных мышцах рыб использовали безинъекционный метод Слонимского [15]. Он основан на реакции циркулирующих эритроцитов с бензидиновым реагентом: 2 г чистого бензидина, 20 мл раствора Рингера, 60 мл дистиллированной воды, 0,5 г активированного угля. Реагент после приготовления встряхивают, фильтруют и хранят без доступа света.

Кусочки *m. lateralis magnus* брали позади спинного плавника и помещали в бензидиновый реагент до появления окраски микрососудов. После этого их переносили в 3%-ный раствор перекиси водорода, а затем в 8%-ный раствор аммония молибденовокислого, который закрепляет окраску гемоглобина. Далее образцы тканей фиксировали в 80%-ном этаноле и рассекали на поперечные срезы (толщина 25-30 мкм) на замораживающем микротоме.

На срезах подсчитывали число мышечных и капиллярных единиц, а также измеряли их диаметр. На основании полученных значений определяли степень капилляризации мышечной ткани, используя индекс N_c/N_f и рассчитывали радиус Крога (R_K) [14]:

$$R_K = \sqrt{\frac{10^6}{N_c \cdot \pi}},$$

где

N_c – число капилляров на 1 мм²;

N_f – число мышечных волокон на 1 мм².

Вода и липиды. Суммарное содержание липидов в белых мышцах определяли фотометрически по реакции с фосфованилиновым реагентом [17]. Применяли стандартный набор реактивов фирмы “Lacheme” (Чехия). Экстракцию липидов из мышечной ткани проводили в хлороформ-метанольной смеси [18]. Содержание воды в образцах мышечной ткани определяли по разнице весов исходной и высушенной в термостате при 105°C до постоянного веса пробы.

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения выборочных совокупностей судили по значениям критерия Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Плотность капиллярной сети и диффузионные расстояния. У кефали-сингиля диффузионные расстояния в мышечной ткани имели максимальные значения в зимний период, а минимальные – в летний (табл. 1). Это нашло отражение в увеличении плотности капиллярной сети на 12,2 % (красные мышцы) и 31,3 % (белые мышцы) ($p < 0,001$) к лету при одновременном снижении толщины диффузионного слоя. Радиус Крога уменьшался на 5,6 и 12,7 % ($p < 0,001$) соответственно в красных и белых мышцах. Число капилляров на одно мышечное волокно (индекс N_c/N_f) повышалось в летний период на 21,9 % ($p < 0,01$) в красной мышечной ткани и на 43,9% ($p < 0,001$) в белой мышечной ткани.

Также как у кефали, у бычка мышечная ткань имела максимальные диффузионные характеристики летом, а минимальные зимой. Наиболее выраженные изменения происходили в белых мышцах. Плотность капиллярной сети в них повышалась на 23,5 % ($p < 0,01$), индекс N_c/N_f увеличивался на 50,0 % ($p < 0,001$), толщина диффузионного слоя (радиус Крога – R_K) снижалась на 10,3 % ($p < 0,01$). В красных мышцах изменения были менее выражены – 7,5 % ($p < 0,01$), 13,9 % ($p < 0,01$) и 3,8 % ($p < 0,001$) соответственно.

Сезонная динамика капилляризации мышечной ткани камбалы-гlossы была иной. Максимальные значения были отмечены в летний период, а минимальные – в весенний. Изменения были незначительны. Так, плотность функционирующей капиллярной сети к лету повышалась на 10,1 % (красные мышцы) и 20,2 % (белые мышцы) ($p < 0,001$). Индекс N_c/N_f увеличивался на 15,3 % ($p < 0,01$) и 27,1 % ($p < 0,05$), а толщина диффузионного слоя (R_K) понижалась на 4,7 и 9,3 % ($p < 0,001$).

Таблица 1. Характер капилляризации скелетных мышц морских рыб в течение годового цикла

Виды рыб (сезон)	n	N_c кол-во мм ⁻²		N_c/N_f		R_K мкм	
		г	w	г	w	г	w
<u>Сингиль</u>							
зима	6	703,4±9,0	77,9±2,0	1,51±0,04	0,66±0,03	21,3±0,1	64,0±0,8
весна	6	742,5±9,0	88,3±1,8	1,66±0,05	0,80±0,03	20,7±0,1	60,1±0,6
лето	8	789,2±12,5	102,3±2,3	1,84±0,07	0,95±0,04	20,1±0,2	55,9±0,6
осень	10	757,3±8,8	91,5±2,2	1,69±0,05	0,82±0,04	20,5±0,1	59,1±0,7
<u>Кругляк</u>							
зима	6	458,0±7,2	64,2±3,5	1,22±0,03	0,44±0,03	26,4±0,2	71,0±2,0
весна	5	471,6±4,6	68,7±4,1	1,27±0,02	0,52±0,04	26,0±0,1	68,8±2,1
лето	7	492,3±5,1	79,3±2,8	1,39±0,03	0,66±0,04	25,4±0,1	63,7±1,2
осень	7	480,4±4,6	72,4±2,5	1,30±0,02	0,54±0,03	25,8±0,1	66,6±1,1
<u>Глосса</u>							
зима	8	682,3±7,2	85,3±1,6	1,65±0,05	0,69±0,03	21,6±0,1	61,1±0,6
весна	7	645,2±7,9	76,4±1,0	1,50±0,04	0,59±0,03	22,2±0,1	64,6±0,4
лето	5	710,3±8,4	91,3±2,2	1,73±0,05	0,75±0,05	21,2±0,1	59,1±0,7
осень	6	654,7±9,0	77,3±1,9	1,55±0,04	0,62±0,03	22,1±0,2	64,3±0,8

Примечание: n – число особей; N_c – плотность капилляров; N_c/N_f – соотношение капилляров и мышечных волокон; R_K – радиус Крога; г – красные мышцы; w – белые мышцы

Химический состав мышечной ткани. Суммарное содержание липидов и уровень гидратации скелетных мышц у рыб на протяжении годового цикла также претерпевал ряд характерных изменений (табл. 2). У кефалей минимальные концентрации липидов были отмечены в весенний период, а максимальные в осенний. Различия для красных мышц составляли 34,6 % ($p < 0,05$), для белых – 71,6 % ($p < 0,001$). Изменение содержания воды в мышечной ткани было прямо противоположно. В весенний период оводненность красных мышц была на 7,8 % ($p < 0,05$), а белых – на 11,0 % ($p < 0,01$) выше.

У бычка-кругляка летом оводненность мышечной ткани бычка несколько повышалась (табл. 2). В сравнении с зимним периодом содержание воды увеличивалось на 9,0 и 12,2 % ($p < 0,01$) соответственно в красных и белых мышцах. Изменений концентрации липидов в мышцах данного вида на протяжении года не наблюдали. Имеющиеся различия были статистически не достоверны.

В сравнении с зимним периодом, у камбалы-глоссы летом отмечали рост содержания липидов в красных и белых мышцах соответственно на 28,4 % ($p < 0,001$) и 46,7 % ($p < 0,01$). Содержание воды при этом уменьшалось на 7,9 % ($p < 0,01$) и 9,9 % ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Из результатов, представленных в настоящей главе следует, что капилляризация скелетных мышц рыб проявляла положительную корреляцию с температурой среды. Число открытых капиллярных единиц в ткани равномерно повышалось от зимнего к летнему периоду. Это приводило соответственно к увеличению площади диффузионной поверхности, уменьшению толщины диффузионного слоя и, как следствие, должно определять рост диффузионной способности как красных, так и белых скелетных мышц в целом.

Известно, что растворимость кислорода в липидах выше, чем в воде [19]. В опытах, выполненных на полосатом окуне (*Perca fluviatilis*), были рассчитаны константы растворимости (βO_2) для красных мышц с различным содержанием липидов [20] ние содержания липидов и воды должно накладывать существенный отпечаток на характер диффузии кислорода и кислородный режим мышечной ткани.

Для морских рыб и особенно представителей пелагической ихтиофауны характерны значительные сезонные изменения содержания липидов и воды в тканях [11, 21]. При этом уровень высокой гидратации тканей совпадает с низким содержанием липидов в них и, наоборот, рост уровня липидов сочетается со снижением степени оводненности тканей [11]. Скелетные мышцы, в этой связи, не являются исключением. В течение нагула, нереста, миграций, зимовки содержание рассмотренных выше соединений в них претерпевает ряд характерных изменений на протяжении года, оказывая тем самым влияние на характер диффузии кислорода в мышечной ткани.

Исходя из рассмотренных публикаций, можно полагать, что диффузия кислорода в мышцах осенней группы кефалей должна протекать легче, в сравнении с весенней группировкой, так как уровень липидов у нее был существенно выше. Участие липидов в коррекции диффузионной способности скелетных мышц можно рассматривать и в отношении камбал. При этом повышенный уровень липидов у данного вида совпадал с низкой степенью гидратации мышечной ткани.

Таблица 2. Содержание липидов и воды в мышечной ткани морских рыб в течение годового цикла

Виды рыб (сезон)	n	Липиды мг г ⁻¹		Вода %	
		г	w	г	w
<u>Сингиль</u>					
зима	6	39,6±2,4	24,4±1,8	75,0±1,3	82,4±2,0
весна	6	33,8±2,4	17,6±2,0	79,5±1,9	87,0±2,1
лето	8	37,6±1,9	20,3±1,7	76,2±1,2	83,4±1,6
осень	10	45,5±2,0	30,2±1,5	73,3±1,3	77,4±1,2
<u>Кругляк</u>					
зима	5	37,0±3,9	16,3±1,0	70,3±1,5	74,6±2,0
весна	4	34,2±4,0	19,1±1,7	72,8±1,5	78,5±2,3
лето	7	28,9±3,8	17,3±1,3	76,6±0,8	83,7±1,6
осень	7	39,7±4,7	17,2±1,5	73,1±1,6	79,4±1,7
<u>Глосса</u>					
зима	8	31,7±1,5	15,2±1,1	81,8±1,1	87,9±1,2
весна	7	35,4±1,9	18,4±1,0	77,6±1,0	83,4±1,2
лето	5	40,7±1,3	22,3±1,6	75,3±1,2	79,2±1,3
осень	6	38,8±1,8	21,0±1,1	76,3±1,0	81,4±1,4

Примечание: n – число особей; г – красные мышцы; w – белые мышцы

Итак, на характер диффузии кислорода в мышечной ткани в течение годового цикла влияет изменение плотности функционирующей капиллярной сети, а также содержания в ней липидов и воды. Решающее значение имеет степень капилляризации скелетных мышц, которая положительно коррелирует с изменением температуры окружающей среды. Уровень липидов и степень оводненности мышечной ткани определяется в основном функциональным состоянием организма рыб (нагул, нерест, миграции, зимовка). Содержание данных соединений может усиливать или ослаблять температурную зависимость диффузионных свойств скелетных мышц в целом.

Работа выполнена в рамках государственной программы 121041400077-1 и при частичной поддержке проекта РФФИ 20-44-920001.

Список литературы/References:

1. Ивлева И.В. *Температура среды и скорость энергетического обмена у водных животных*. Киев: Наук. думка, 1981, 232 с. [Ivleva I.V. *Temperature of the environment and the rate of energy metabolism in aquatic animals*. Kiev: Nauk. dumka, 1981, 232 p. (In Russ.)]
2. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. *Механизмы температурной акклимации рыб*. К.: Наук. думка, 1991, 192 с. [Romanenko V.D., Arsan O.M., Solomatina V.D. *Mechanisms of temperature acclimation of fish*. K.: Nauk. dumka, 1991, 192 p. (In Russ.)]
3. Савина М.В. *Механизмы адаптации тканевого дыхания в эволюции позвоночных*. С.-Петербург: Наука, 1992, 200 с. [Savina M.V. *Adaptation mechanisms of tissue respiration in the evolution of vertebrates*. St. Petersburg: Nauka, 1992, 200 p. (In Russ.)]
4. Карамушко Л.И. Метаболические адаптации рыб высоких широт. *Докл. РАН*, 2001, т. 379, № 2, с. 279-284. [Karamushko L.I. Metabolic adaptations of fish at high latitudes. *Dokl. RAS*, 2001, vol. 379, no. 2, pp. 279-284. (In Russ.)]
5. Карамушко Л.И., Шатуновский М.И. Количественные закономерности влияния температуры на скорость энергетического обмена у *Gadus morhua morhua*, *Anarhichas lupus* и *Pleuronectes platessa*. *Вопр. ихтиол.*, 1993, т. 33, № 1, с. 111-120. [Karamushko L.I., Shatunovsky M.I. Quantitative regularities of the effect of temperature on the rate of energy metabolism in *Gadus morhua morhua*, *Anarhichas lupus*, and *Pleuronectes platessa*. *Vopr. ichthol.*, 1993, vol. 33, no. 1, pp. 111-120. (In Russ.)]
6. Пегель В.А., Реморов В.А. О роли внешней среды в формировании и особенностях проявления терморегуляторных реакций у рыб. *Обмен веществ и биохимия рыб*. М.: Наука, 1967, с. 198-205. [Pegel V.A., Remorov V.A. On the role of the external environment in the formation and features of the manifestation of thermoregulatory reactions in fish. *Metabolism and biochemistry of fish*. Moscow: Nauka, 1967, pp. 198-205. (In Russ.)]
7. Озернюк Н.Д., Булгакова Ю.В., Демин В.И., Андросова И.М., Стельмашук Е.В. Механизмы эволюционных и онтогенетических температурных адаптаций метаболизма у пойкилотермов. *Изв. АН СССР (серия биология)*, 1993, т. 5, с. 703-705. [Ozernyuk N.D., Bulgakova Yu.V., Demin V.I., Androsova I.M., Stelmashuk E.V. Mechanisms of evolutionary and ontogenetic temperature adaptations of metabolism in poikilotherms. *Izv. USSR Academy of Sciences (biology series)*, 1993, vol. 5, pp. 703-705. (In Russ.)]
8. Thillart G., Modderkolk J. The effect of acclimation temperature of the ansaturation of membrane lipids of goldfish mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1978, vol. 510, no 1, pp. 38-51.

9. Губин И.Е., Шкорбатов Г.Л., Васенко Л.Г. Окислительная активность гомогенатов мозга карпов при различных температурных воздействиях. *Энергетические аспекты роста и обмена водных животных*. Киев: Наук. думка, 1972, с. 44. [Gubin I.E., Shkorbatov G.L., Vasenko L.G. Oxidative activity of carp brain homogenates under various temperature influences. *Energy aspects of growth and exchange of aquatic animals*. Kiev: Nauk. dumka, 1972, p. 44. (In Russ.)]
10. Wodtke E. Effect of acclimation temperature on aerobic energy production in eel liver: oxydative phosphorylation in isolated mitochondria. *Effect temperature on ectothermic organisms*, Berlin, 1973, pp. 97-105.
11. Shulman G.E., Love R.M. The Biochemical Ecology and Marine Fishes. *Adv. Mar. Biol.*, vol. 36, London: Academic press, 1999, 347 p.
12. Soldatov A.A. Cytochrome System and Oxygen Tension in Muscle Tissue of Salt-Water Fish with Different Natural Activity. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 1996, vol. 32, no. 2, pp. 112-115.
13. Soldatov A.A. Physiological Aspects of Effects of Urethane Anesthesia on the Organism of Marine Fishes. *Hydrobiol. J.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 113-126.
14. Шошенко К.А., Баранов В.И., Брод В.И., Вязовой В.В., Голубь А.С., Иванова С.Ф., Нешумова Т.В. Органное кровоснабжение и особенности кислородного транспорта в мышцах. *Исследование энергетики движения рыб*, Новосибирск: Наука, 1984, с. 78-115. [Shoshenko K.A., Baranov V.I., Brod V.I., Vyazovoy V.V., Golub A.S., Ivanova S.F., Neshumova T.V. Organ blood supply and features of oxygen transport in muscles. *Investigation of the energy of fish movement*. Novosibirsk: Nauka, 1984, pp. 78-115. (In Russ.)]
15. Киселева А.Ф., Житников А.Я., Кейсевич Л.В. и др. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии. Киев: Здоров'я, 1983, 168 с. [Kiseleva A.F., Zhitnikov A.Ya., Keisevich L.V. et al. *Morphofunctional research methods in health and disease*. Kiev: Zdorov'ya, 1983, 168 p. (In Russ.)]
16. Houston A.H. Blood and circulation. *Methods for fish biology*, N-Y.: Amer. Fish. Society, 1990, pp. 273-334.
17. Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. Киев: Вища школа, 1985, 247 с. [Kucherenko N.E., Vasiliev A.N. *Lipids*. Kiev: Vishcha school, 1985, 247 p. (In Russ.)]
18. Соколова Г.П. Определение содержания и удельной радиоактивности общих липидов в тканях. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982, с. 55-58. [Sokolova G.P. Determination of the content and specific radioactivity of total lipids in tissues. *Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism)*. L.: Publishing house of Leningrad State University, 1982, pp. 55-58. (In Russ.)]
19. Березовский В.А., Колотило Н.Н. Биофизические характеристики тканей человека. Киев: Наук. думка, 1990, 224 с. [Berezovsky V.A., Kolotilov N.N. *Biophysical characteristics of human tissues*. Kiev: Nauk. dumka, 1990, 224 p. (In Russ.)]
20. Desaulniers N.T., Sidell B.D. High lipid content enhances the rate oxygen diffusion in fish skeletal muscle. *Amer. Zool.*, 1992, vol. 32, no. 5, pp. 55A.
21. Минюк Г.С., Шулман Г.Е., Щепкин В.Я., Юнева Т.В. Черноморский шпрот (связь динамики липидов с биологией и промыслом). Севастополь: Экопси-гидрофизика, 1997, 137 с. [Minyuk G.S., Shulman G.E., Schepkin V.Ya., Yuneva T.V. *Black Sea sprat (connection of lipid dynamics with biology and fishing)*. Sevastopol: Ecosi-hydrophysics, 1997, 137 p. (In Russ.)]

DIFFUSION DISTANCES AND CHEMICAL COMPOSITION OF SKELETAL MUSCLES OF MARINE FISH DURING THE ANNUAL CYCLE

Soldatov A.A.^{1,2}

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, Russian Academy of Sciences
2 Nakhimov Ave., Sevastopol 299011, Russia; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

² Sevastopol State University
33 Universitetskaya St., Sevastopol, 99053, Russia

Abstract. The density of the capillary network (N_c), the degree of capillarization of muscle tissue (N_c/N_f), diffusion distances (Krog radius – R_K) and the chemical composition of skeletal muscles (total lipid level, water content) were studied in three species of marine fish: *Liza aurata* (Risso 1810), *Neogobius melanostomus* (Pallas 1814) and *Platichthys flesus* (Linnaeus 1758), during the annual cycle. The pattern of changes in the diffusion distances in skeletal muscles during the year in all the studied fish species was similar. The natural temperature dynamics determined the density of functioning capillaries, the efficiency of capillarization of muscle tissue, the thickness of the diffusion layer. In the summer period, the values of the indicators were maximum, and in the winter they were minimal. The level of lipids and the degree of hydration of muscle tissue was determined mainly by the functional state of the fish body (feeding, spawning, migration, wintering). It is shown that the content of these compounds can increase or weaken the temperature dependence of the diffusion properties of skeletal muscles as a whole.

Key words: capillary network, diffusion characteristics, skeletal muscles, the content of lipids and water, marine fish, the annual cycle.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ГЕПАТОПАНКРЕАСА МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Скуратовская Е.Н.¹, Сербин А.Д.², Полевой Д.М.³

¹ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: skuratovskaya@ibss-ras.ru

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

³ Крымский федеральный университет
пр. Академика Вернадского, г. Симферополь, 4295007, РФ

Поступила в редакцию: 26.07.2021

Аннотация. К наиболее опасным загрязняющим веществам антропогенного происхождения, поступающим из различных источников в прибрежные морские акватории, относятся полихлорированные бифенилы (ПХБ). ПХБ даже в крайне малых дозах вызывают изменение физиолого-биохимических процессов в тканях гидробионтов, оказывают токсическое, мутагенное и канцерогенное действие. Изучение биохимического отклика в тканях двустворчатых моллюсков, обитающих в условиях повышенных концентраций ПХБ в эксперименте, необходимо для понимания механизмов реорганизации метаболизма и адаптивных реакций, возникающих в организме гидробионтов при воздействии токсикантов. В работе изучено влияние ПХБ на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы (активность супероксиддисумутазы, каталазы, уровень перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков) гепатопанкреаса черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в условиях острого токсикологического эксперимента. Установлено, что *M. galloprovincialis* обладает высокой токсикорезистентностью к ПХБ. В то же время при воздействии различных концентраций ПХБ в гепатопанкреасе моллюсков наблюдается развитие окислительного стресса путем смещения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону интенсификации процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков и повышение активности супероксиддисумутазы как адаптивной компенсаторной реакции организма на действие токсикантов.

Ключевые слова: полихлорированные бифенилы, мидия *Mytilus galloprovincialis*, прооксидантно-антиоксидантная система.

Ежегодно возрастающая антропогенная нагрузка на морские прибрежные акватории негативно влияет на состояние водных сообществ. Основным действующим фактором такого воздействия является химическое загрязнение. Различные токсиканты, попадающие в воду и грунты, губительно влияют на выживание, рост, репродукцию и здоровье гидробионтов. Одним из районов, подвергающихся значительному техногенному воздействию, является севастопольская морская акватория. К наиболее опасным загрязняющим веществам антропогенного происхождения, поступающим из различных источников в прибрежные морские воды Севастополя, относятся хлорорганические соединения, в том числе полихлорированные бифенилы (ПХБ) [1-4].

В течение нескольких десятилетий ПХБ во всем мире экстенсивно использовались как диэлектрики, теплоносители, добавки к клеям, маслам, лакам и др. В 1980-1990-х годах загрязненность черноморской акватории Крыма была настолько высока, что ПХБ обнаруживались во всех без исключения ее компонентах: планктоне, водорослях-макрофитах, моллюсках, рыбе и донных осадках. Обладая высокой липофильностью и стойкостью к действию физических и химических факторов, ПХБ способны к биоаккумуляции и накоплению по трофическим цепям [4]. Установлено, что ПХБ даже в крайне малых дозах вызывают изменение физиолого-биохимических процессов в тканях гидробионтов, оказывают токсическое, мутагенное и канцерогенное действие [1,2,5]. В то же время сведения о биохимических эффектах ПХБ на организм гидробионтов в научной литературе ограничены. Изменение биохимических показателей отражает состояние обмена веществ и зачастую свидетельствует о развитии компенсаторного ответа организма на воздействие загрязнителей. Биохимические параметры позволяют выявить механизмы воздействия токсикантов на конкретные звенья метаболизма, определить основную стратегию и особенности структурно-функциональных изменений в организме при адаптации к неблагоприятному воздействию [1,5-7].

При оценке токсического действия вещества на организм гидробионтов наиболее часто используют двустворчатого моллюска мидию *Mytilus galloprovincialis*. По показателю выживаемости мидия обладает высокой токсикорезистентностью ко многим типам загрязнения. Наряду с этим, пороговая чувствительность по некоторым показателям физиологической активности этого моллюска находится на уровне ПДК вещества для водных объектов рыбохозяйственного значения. Широкая распространенность и низкая смертность при изменении абиотических факторов позволяют легко добывать экспериментальный материал и содержать мидий в лабораторных условиях. В то же время повышенная чувствительность физиологических функций к действию токсикантов позволяет с большой точностью определять пригодность водной среды для жизнедеятельности моллюсков. Загрязняющие вещества в низких концентрациях практически не оказывают влияния на

выживаемость мидий, однако, способны вызывать изменение физиолого-биохимических процессов в организме [1,3,5,8].

Изучение биохимического отклика в тканях двусторчатых моллюсков, обитающих в условиях повышенных концентраций ПХБ в эксперименте, необходимо для понимания механизмов реорганизации метаболизма и адаптивных реакций, возникающих в организме гидробионтов при воздействии токсикантов.

На основании вышеизложенного было изучено влияние ПХБ на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы гепатопанкреаса черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в условиях острого токсикологического эксперимента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моллюсков собирали в июле 2020 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в акватории бух. Карантинная (г. Севастополь). В районе фермы суммарная концентрация ПХБ в воде не превышала 3 нг/л, что соответствовало среднему значению для открытых районов Чёрного моря [9]. Размер моллюсков варьировал от 50 до 60 мм. Мидий очищали от обрастаний и акклимировали к лабораторным условиям в течение 7 дней в аквариумах с очищенной водой, постоянной аэрацией при температуре 20 - 22°C. Животных содержали в аквариумах из расчета 5 л на одну особь. Ежедневно до эксперимента осуществлялась частичная смена воды. Кормление мидий не производилось, чтобы избежать специфического действия пищи [8].

В аквариумы объемом 40 л добавили раствор смеси ПХБ (Ароклор 1254, Supelco, США). Учитывая высокую устойчивость мидий к химическому загрязнению, для обнаружения биохимического отклика в эксперименте использовали широкий диапазон концентраций ПХБ. Воздействующая на мидий концентрация ПХБ в воде аквариумов составила 1 мкг/л (1-я экспериментальная группа), 100 мкг/л (2-я экспериментальная группа) и 1000 мкг/л (2-я экспериментальная группа). Контрольная группа моллюсков содержалась в воде без добавления токсиканта. Продолжительность эксперимента составила 5 суток. Отбор экспериментальных животных осуществлялся на 3-е и 5-е сутки. Гибели животных в ходе эксперимента не наблюдалось.

По окончании опыта проводили биологический анализ моллюсков. Для биохимических исследований использовали гепатопанкреас. Образцы тканей несколько раз промывали холодным 0,85% физраствором, гомогенизировали, центрифугировали при 8000 g 15 минут. В супернатанте анализировали показатели прооксидантно-антиоксидантной системы (ПАС): активность ключевых антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), показатели окислительного стресса – содержание ТБК-реактивных продуктов (ТБКРП), отражающих уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), и уровень окислительной модификации белков (ОМБ). Активность СОД определяли в системе нитросиний тетразолиевый - феназинметасульфат – никотинамиддинуклеотид [10], активность каталазы (КАТ) – по реакции взаимодействия перекиси водорода с молибдатом аммония [11], содержание ТБК-реактивных продуктов – по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой [12]. Уровень ОМБ анализировали на основе реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белка с 2,4-динитрофенилгидразином [13]. Оптическую плотность образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали при следующих длинах волн: 356 нм и 370 нм (альдегидные (D356) и кетонные (D370) продукты окислительной модификации нейтрального характера), а также при 430 нм и 530 нм (альдегидные (D430) и кетонные (D530) продукты окислительной модификации основного характера). Все определения проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Биохимические показатели пересчитывали на 1 мг белка сырой массы ткани, концентрацию которого определяли с использованием стандартного набора реагентов “ОЛБВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия). Достоверность различий между выборками оценивали с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание ТБК-реактивных продуктов в гепатопанкреасе мидий во всех экспериментальных группах было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). У мидий из 3-й экспериментальной группы (1000 мкг/л) на 5-е сутки содержание ТБКРП увеличилось более чем в два раза по сравнению с 3-ми сутками эксперимента ($p < 0,05$) и было достоверно выше, чем у экземпляров 1-й экспериментальной группы (1 мкг/л) ($p < 0,05$) (рис. 1).

Содержание окисленных форм белков в гепатопанкреасе мидий при воздействии ПХБ возрастало по сравнению с контролем. У моллюсков из 3-й экспериментальной группы (1000 мкг/л) на 5-е сутки содержание ОМБ значительно увеличилось ($p < 0,05$) и было достоверно выше, чем у экземпляров 1-й (1 мкг/л) и 2-й экспериментальных групп (100 мкг/л) ($p < 0,05$) (рис. 2).

Активность СОД в гепатопанкреасе мидий во всех экспериментальных группах была достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Для КАТ отмечено достоверное снижение активности на 5-е сутки в 3-й экспериментальной группе (1000 мкг/л) по сравнению с контролем и другими экспериментальными группами ($p < 0,05$) (рис. 3).

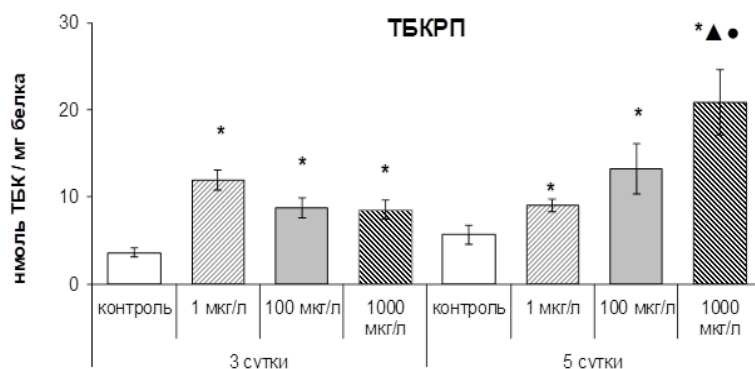


Рисунок 1. Содержание ТБК-реактивных продуктов в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента

Примечание: * - Различия достоверны по сравнению с контролем, ▲ – то же по сравнению с первой экспериментальной группой (1 мкг/л); ■ – то же по сравнению со второй экспериментальной группой (100 мкг/л), ● - то же по сравнению с 3-м днем эксперимента

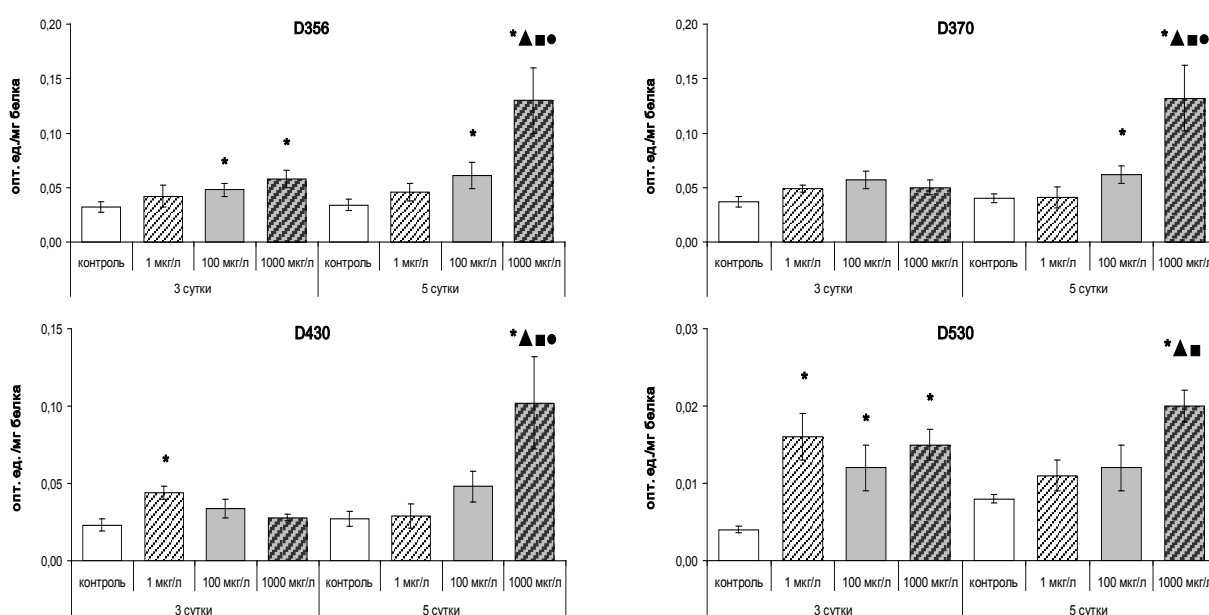


Рисунок 2. Уровень ОМБ в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента

Примечание: D 356 – альдегидные продукты нейтрального характера, D 370 – кетонные продукты нейтрального характера, D 430 – альдегидные продукты основного характера, D 530 – кетонные продукты основного характера; обозначения те же, что на рис. 1

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы токсических эффектов многих промышленных органических ксенобиотиков тесно связаны с изменением окислительно-восстановительного статуса клеток. Нарушение клеточного прооксидантно-антиоксидантного баланса и, как следствие, развитие окислительного стресса, является основным индуктором различных патологий от молекулярных окислительных и генотипических повреждений до снижения жизнеспособности и гибели организма. Окислительные повреждения биомолекул, в первую очередь – перекисное окисление мембранных липидов, окислительная модификация белков, повреждение ДНК, являются наиболее значимыми причинами клеточной и функциональной патологии, и, как следствие, снижения жизнеспособности организмов. Поэтому изучение и выявление молекулярных маркеров клеточных и функциональных нарушений водных организмов, обитающих в условиях техногенного загрязнения, является одним из приоритетных направлений исследований биологии гидробионтов [3,4,14-17].

В наших исследованиях установлено, что ПХБ инициируют развитие окислительного стресса путем интенсификации процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков. При этом достоверное повышение активности СОД в гепатопанкреасе мидий из всех экспериментальных групп по сравнению с контролем является адаптивной компенсаторной реакцией организма на действие токсикантов (стадия компенсации). Однако снижение активности КАТ у экзemplаров из 3-й экспериментальной группы на 5-й день эксперимента может быть следствием ингибирования фермента и/или снижения его буферной емкости в результате накопительного эффекта ПХБ.

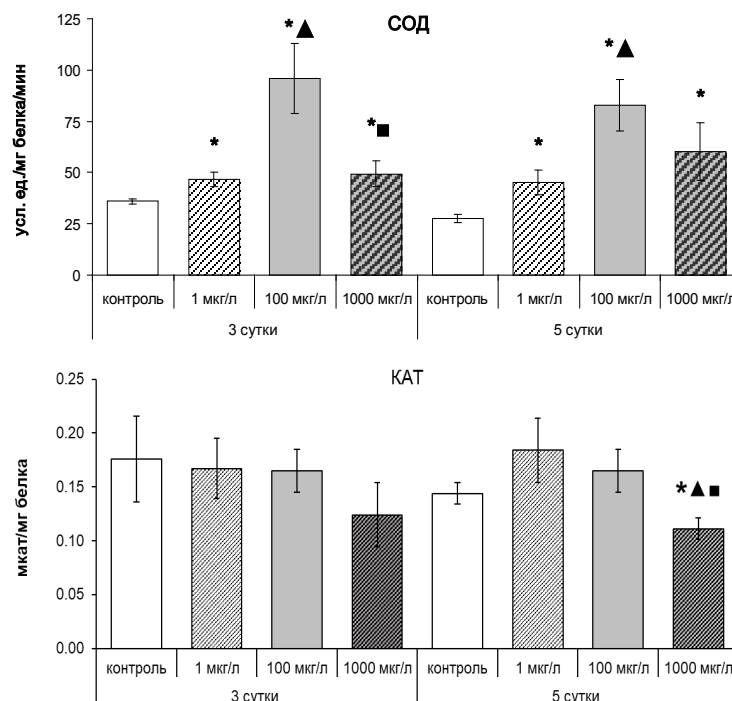


Рисунок 3. Активность антиоксидантных ферментов в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента
Примечание: обозначения те же, что на рис. 1

Литературные данные свидетельствуют о том, что техногенные загрязнители как в природных, так и в экспериментальных условиях вызывают изменение параметров ПАС гидробионтов. Однако следует отметить, что обнаруженные эффекты воздействия могут быть временными и зависят от химических свойств и концентрации токсикантов, времени экспозиции, видовой принадлежности тест-организма, типа ткани [1,3,5,6,8,14,16]. В результате экспериментальных исследований установлено, что основными тканями, аккумулирующими ПХБ в организме *M. galloprovincialis*, являются гепатопанкреас и нога [1]. В условиях хронического эксперимента показано, что ПХБ ингибируют активность глутатион-S-трансферазы и вызывают индукцию глутатионпероксидазной активности в жабрах мидий *M. galloprovincialis* [5]. При исследовании активности АО ферментов в гепатопанкреасе *M. galloprovincialis* в лабораторных и природных условиях установлено, что в присутствии полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) нефти значительно возрастает активность каталазы [18]. В то же время имеются данные, что каталазная активность *Mytilus edulis* повышается при воздействии ПХБ, но не ПАУ [19]. Обратный эффект выявлен у двустворчатых моллюсков *Adamussium colbecki* при воздействии ионов меди и ртути. Показано, что высокая дозовая нагрузка этих металлов вызывает снижение каталазной активности в тканях гидробионтов [20]. В результате эксперимента по воздействию продуктов переработки нефти установлено достоверное повышение уровня конечных продуктов перекисного окисления липидов и повышение активности СОД, и КАТ в тканях мидии *M. galloprovincialis*. Определены отличия показателей окислительного стресса и АО защиты в гепатопанкреасе и жабрах, свидетельствующие о более высокой чувствительности клеток гепатопанкреаса к действию органических поллютантов по сравнению с жабрами [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты эксперимента позволили установить, что черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* обладает высокой токсикорезистентностью к ПХБ. В то же время при воздействии различных концентраций ПХБ в гепатопанкреасе моллюсков наблюдалось развитие окислительного стресса путем смещения проокислительно-антиокислительного равновесия в сторону интенсификации процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков и повышение активности СОД как адаптивной компенсаторной реакции организма на действие токсикантов.

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ФИЦ ИнБЮМ № 121030100028-0, при поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-34-50005 («Наставник»).

Список литературы/References:

1. Солдатов А.А., Бочко О.Ю., Головина И.В., Щербань С.А., Вялова О.Ю. Биохимические эффекты полихлорированных бифенилов на организм черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. Морской

- экологический журнал, 2005, вып. 1, с. 105-112. [Soldatov A.A., Bochko O.Yu., Golovina I.V., Shcherban S.A., Vyalova O.Yu. Biochemical effects of polychlorinated biphenyls in organism of the Black Sea mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Marine Ecological Journal*, 2005, vol. 1, pp. 105-112. (In Russ.)]
2. Голованова И.Л., Кузьмина В.В., Чуйко Г.М., Ушакова Н.В., Филиппов А.А. влияние полихлорированных бифенилов на активность протеиназ и карбогидраз в кишечнике молоди плотвы *Rutilus rutilus* (L.). *Биология внутренних вод*, 2011, № 2, с. 97-103. [Golovanova I.L., Kuz'mina V.V., Chuiko G.M., Filippov A.A., Ushakova N.V. Effect of polychlorinated biphenyls on activities of intestinal proteinases and carbohydrases in young roach *Rutilus rutilus* (L.). *Biology of inland waters*, 2011, no 2, pp. 97-103. (In Russ.)]
 3. Sukharenko E.V., Nedzvetsky V.S., Kyrychenko S.V. Biomarkers of metabolism disturbance in bivalve molluscs induced by environmental pollution with processed by-products of oil. *Biosystem Diversity*, no. 25 (2), pp. 113-118. doi: 10.15421/011717
 4. Malakhova L.V., Skuratovskaya E.N., Malakhova T.V., Lobko V.V. The relationship between integrated biochemical index and content of organochlorine xenobiotics in the liver of the black scorpion fish Linnaeus, 1758, from Sevastopol Bays and coastal areas. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2020, no. 13 (4), pp. 387-409. doi: 10.17516/1997-1389-0335
 5. Vidal-Linan L., Bellas J., Soriano J.A., Concha-Grana E., Muniategui S., Beiras R. Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Environmental Pollution*, 2016, vol. 214, pp. 885-891. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.083
 6. Faria M., Carrasco L., Diez S., Riva M.K., Bayona J.M., Barata C. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2009, Part C 149, pp. 281-288.
 7. Немова Н.Н., Мещерякова О.В., Лысенко Л.А., Фокина Н.Н. Оценка состояния водных организмов по биохимическому статусу. *Труды Карельского научного центра РАН*, 2014, № 5, с. 18-29. [Nemova N.N., Meshcheryakova O.V., Lysenko L.A., Fokina N.N. The assessment of the fitness of aquatic organisms relying on the biochemical status. *Proceedings of the Karelian Scientific Center of RAS*, 2014, no. 5, pp. 18-29 (In Russ.)]
 8. Бахмет И.Н., Фокина Н.Н., Нефедова З.А., Руоколайнен Т.Р., Немова Н.Н. Мидия *Mytilus edulis* L. Белого моря как биоиндикатор при воздействии растворенных нефтепродуктов. *Труды Карельского научного центра РАН*, 2012, № 2, с. 38-46 [Bakhmet I.N., Fokina N.N., Nefyodova Z.A., Ruokolainen T.R., Nemova N.N. Blue mussels *Mytilus edulis* L. in the White Sea as bioindicators under diluted oil impact. *Proceedings of the Karelian Scientific Center of RAS*, 2012, no. 2, pp. 38-46 (In Russ.)]
 9. Kapranova L.L., Malakhova L.V., Nekhoroshev M.V., Lobko V.V., Ryabushko V.I. Fatty acid composition in trochophores of mussel *Mytilus galloprovincialis* grown under contamination with polychlorinated biphenyls. *Marine Biological Journal*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 38-49. DOI: 10.21072/mbj.2020.05.2.04
 10. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochim. Biophys. Res. Commun*, 1972, vol. 46, no. 2, pp. 849-854.
 11. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoye delo*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
 12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*. Москва: Медицина, 1977, с. 66-68. [Stal'naya I.D., Garishvili T.G. *Method for determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. Modern methods in biochemistry*. Moskva: Meditsina, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]
 13. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения. *Вопросы медицинской химии*, 1995, т. 41, № 1, с. 24-26. [Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. Oxidative modification of human serum proteins, method for its determination. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 1995, vol. 41, no. 1, pp. 24-26. (In Russ.)]
 14. Fernandez B., Campillo J.A., Martinez-Gomez C., Benedicto J. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology*, 2010, vol. 99, no. 2, pp. 186-197.
 15. Novitsky R.A., Sukharenko E.V., Nedzvetsky V.S. Molecular biomarkers of Al³⁺ ions effect on oxidative stress generation and cell reactivity in fish *Lepomis gibbosus* (Pisces: Centrarchidae). *Hydrobiological Journal*, 2013, vol. 49, no. 6, pp. 65-75.
 16. Ozkan D., Dagdeviren M., Katalay S., Guner A., Yavaşoğlu N.U. Multi-biomarker responses after exposure to pollution in the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) in the Aegean Coast of Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, vol. 98, pp. 46-52. DOI 10.1007/s00128-016-1988-z
 17. Franco L., Romero D., Garcia-Navarro J.A., Teles M., Tvarijonaviciute A. Esterase activity (EA), total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) in gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pollutants: Analytical validation and effects evaluation by single and mixed heavy metal exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, vol. 102, no. 1, pp. 30-35.
 18. Lacroix C., Richard G., Segueineau C., Guyomarch J., Moraga D., Auffret M. Active and passive biomonitoring suggest metabolic adaptation in blue mussels (*Mytilus spp.*) chronically exposed to a moderate contamination in Brest harbor (France). *Aquatic Toxicology*, 2015, vol. 162, p. 37-126.

19. Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loques F., Romeo M., Salbert V. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 2007, vol. 66, no. 3, pp. 574-583.

20. Orbea A., Ortiz-Zarragoitia M., Sole M., Porte C., Cajaraville M.P. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology*, 2002, vol. 58, pp. 75-98.

THE IMPACT OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN HEPATOPANCREAS OF MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Skuratovskaya E.N.¹, Serbin A.D.², Polevoy D.M.³

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: skuratovskaya@ibss-ras.ru

² Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

³ Crimean Federal University

Academician Vernadsky av., Simferopol, 4295007, Russia

Abstract. Polychlorinated biphenyls (PCBs) are amongst the most dangerous toxic substances of anthropogenic origin incoming into coastal marine waters from various polluting sources. Even extremely small doses of PCBs induce changes in the physiological and biochemical processes in hydrobionts tissues, exert toxic, mutagenic and carcinogenic influences. Investigations of the biochemical response in tissues of the bivalve mollusks, living in a high concentration conditions of PCBs created in the conducted experiment, are of importance to understand the reorganization metabolism mechanisms and adaptive reactions, occurring in the body of hydrobionts being exposed to toxicants. This article is aimed at studying the impact of PCBs on the prooxidant-antioxidant system parameters (activity of superoxide dimutase, catalase, the level of lipid peroxidation and oxidized proteins) in hepatopancreas of the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* in the acute toxicological experiment. It has been established that *M. galloprovincialis* has high toxicoresistance to PCBs. At the same time observations from our studies showed that, upon exposure to different concentrations of PCBs there was a development of oxidative stress carried out by shifting the prooxidant- antioxidant balance towards the intensification of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins also an increase in the SOD activity existing as the adaptive compensatory reaction of the organism to the toxic substances in the hepatopancreas of mollusks.

Key words: polychlorinated biphenyls, mussel *Mytilus galloprovincialis*, prooxidant-antioxidant system.

ПРИСВАИВАНИЕ ФУНКЦИЙ ОПСИНАМ ТРИХОПЛАКСОВ *TRICHOPLAX ADHAERENS* И *TRICHOPLAX* SP. H2

Хавронюк И.С.¹, Мамонтов А.А.¹, Булков В.А.¹, Воронин Д.П.¹, Кузнецов А.В.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: havronuk.1994@gmail.com

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию: 07.08.2021

Аннотация. В геноме трихопласа *Trichoplax* sp. H2 присутствует 10 генов, кодирующих светочувствительные белки-опсины, из них 7 аннотированы как светочувствительные опсины, от зелёного до ультрафиолетового. В свою очередь, в геноме трихопласа *Trichoplax adhaerens* также обнаружены 10 опсино-подобных генов. Для половины из этих полипептидов восстановлены полные аминокислотные последовательности. В силу того, что опсины *Trichoplax adhaerens* (гаплотип H1) охарактеризованы неполно, представляло интерес провести дополнительное исследование опсинов трихопласа гаплотипа H1. Для этого были осуществлены множественные выравнивания 20 аминокислотных последовательностей опсинов обоих штаммов трихопласа и построены деревья родства опсинов. С помощью гомологического сравнения были созданы структурные модели исследуемых протеинов и осуществлён докинг хромофора ретиналя. На основании проведённых расчётов 3 полным гипотетическим белкам: EDV19328.1 длиной 465 аа, EDV22726.1 длиной 365 аа и EDV22897.1 длиной 319 аа из *Trichoplax adhaerens* была присвоена функция чувствительности к голубому свету. С меньшим правдоподобием чувствительность к голубому свету может быть присвоена 4 неполным гомологичным белкам: EDV22727.1 длиной 287 аа, EDV19349.1 – 188 аа, EDV19891.1 – 161 аа и EDV18601.1 длиной 137 аа из штамма H1. Присутствие множественных генов опсинов в геномах трихопласов гаплотипов H1 и H2 позволяет предположить, что Placozoa способны различать оттенки голубого цвета, а это, возможно, позволяет им ориентироваться в тоще морской воды.

Ключевые слова: аннотация, биологические функции, гомология, структурное моделирование, опсины, Placozoa

ВВЕДЕНИЕ

Опсины – это функционально разнообразная группа белков массой около 35-55 кДа от светозависимых протонных насосов у микроорганизмов, как бактериородопсин (BRh), до фоторецепторов, обеспечивающих восприятие света в органах зрения у многоклеточных животных, в том числе включая меланопсин, который участвует в циркадных ритмах, но не в формировании изображения [1]. Встречается множество опсинов вне областей скопления зрительных фоторецепторов в сетчатке глаза, о которых известно очень мало. С трудом осознаётся, что многие новшества, такие как приписываемая хордовым фоторецепция, были сформированы очень давно, ещё у общего предка хоанофлагеллят, пластинчатых, губок, гребневиков и стрекательных [2-5]. В частности, опсины обнаружены в геноме трихопласов [6,7], которые являются простейшими многоклеточными животными и одновременно удобным базовым лабораторным объектом для изучения простых поведенческих реакций [8].

Белки-опсины подразделяют на два типа – первый и второй [9,10], т.е. опсины бактериального и животного происхождения, последние из которых делятся на два класса: «Rod» и «Cone» опсины. Опсины «R-типа» находятся в рабдомерных фоторецепторах, как глаза членистоногих и головоногих моллюсков. Опсины «R-типа» обычно бистабильны, сохраняя хромофор как в естественном (тёмном), так и в фотоактивированном (светлом) состоянии. Напротив, опсины «С-типа» находятся в цилиарных фоторецепторах, например, палочках и колбочках позвоночных, которые реагируют на свет гиперполяризацией. Опсины «С-типа» обесцвечиваются после фотоактивации, теряя связанный хромофор [11]. Следует отметить, что природное разнообразие опсинов намного больше и сложнее, чем описывается этими двумя группами [12]. Примечательно, что опсины способны участвовать не только в светорецепции, но иногда являются, например, сенсорами вкуса [13].

У человека имеется следующий набор зрительных белков: родопсин (Rh1, OPN2, RHO), который экспрессируется в палочках и участвует в ночном зрении, а также четыре типа фотопсинов, которые экспрессируются в колбочках и участвуют в цветовом зрении. К ним принадлежат опсины чувствительные к красному свету (LWS – Long Wavelength Sensitive), опсины функционирующие в зелёной части спектра (MWS – Middle Wavelength Sensitive), опсины работающие в синем диапазоне (SWS2 – Short Wavelength Sensitive 2), опсины работающие в фиолетовой и ультрафиолетовой части спектра (SWS1) [1]. Животные имеют другие наборы фоторецепторных белков. Их спектры поглощения отличаются от человеческих белков-опсинов. Поэтому восприятие света и изображений у человека и животных должно отличаться. Так, некоторые насекомые могут видеть в ультрафиолетовом диапазоне [14], а животные с одним типом опсинов, вероятно, видят окружающий мир монохромным.

Несмотря на огромное разнообразие белков-опсинов, встроенных в мембрану, все они состоят из семи трансмембранных α -спиралей, которые обычно связывают в качестве хромофора ретиналь – альдегидную форму витамина А. Взаимодействие происходит через конденсацию альдегидной группы ретиналя с ϵ -аминогруппой остатка лизина в седьмой α -спирали с образованием основания Шиффа [15]. Опсин, ковалентно связавший хромофор, приобретает светочувствительность. Поглощение фотона влечёт изменение конформации хромофора [16,17]. Фотоизомеризация вызывает конформационные изменения в опсине и активирует G-протеины, что приводит к фототрансдукции [18,19].

Таким образом, опсины имеют древнюю эволюционную историю и играют ключевую роль в зрении, выполняя функцию сенсоров фотонов и преобразуя свет в электрохимический сигнал для передачи зрительной информации между клетками [10]. Фундаментальное значение опсинов и фоторецепции, помогающих животным обнаруживать и использовать свет для разных биологических функций, привлекает пристальное внимание молекулярных биологов, физиков и инженеров, которые надеются применить знания о молекулярных биологических процессах в искусственных конструкциях, как например, биосенсоры, опторегуляторы, оптический компьютер, устройства оптической памяти и голографии [20-23].

Целью настоящей работы было детально охарактеризовать набор белков-опсинов из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 (гаплотип/штамм H2) и присвоить биологические функции гомологичным протеинам в трихоплаксе *Trichoplax adhaerens* (гаплотип/штамм H1). Для этого аннотированные аминокислотные последовательности опсинов из *Trichoplax* sp. H2 сравнивали с опсинами из *Trichoplax adhaerens* и строили направляющие деревья [24,25], потом методом гомологического выравнивания создавали пространственные структуры белков-опсинов [26] и путём стыковки/докинга определяли положение молекулы ретиналя в канале опсина [27], что в сумме позволяет теоретически предсказать функцию белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходные аминокислотные последовательности опсинов трихоплаксов *Trichoplax* sp. H2 и *Trichoplax adhaerens* были найдены в базе данных NCBI – National Center for Biotechnology Information [6,7].

Манипулирование последовательностями и парные выравнивания выполняли с помощью пакета программ SMS – Sequence Manipulation Suite [28].

Множественные выравнивания и построение деревьев гомологий аминокислотных последовательностей опсинов осуществляли на EMBL-EBI-сервере – European Bioinformatics Institute, в частности, использовали программу Clustal Omega (1.2.4) [29].

Построение пространственных моделей опсинов проводили на Phyre2-сервере методом сравнения гомологичных последовательностей с известными пространственными структурами белков. Оценивали достоверность и степень покрытия исследуемых аминокислотных последовательностей [26].

Стыковка лиганда с белками. Полученные 3D-модели опсинов и пространственные координаты ретиналя со всеми атомами водорода в формате mol2 загружали на SwissDock-сервер и исследовали стыковку. Для этого просматривали все возвращённые конформации связанного с белком лиганда и оценивали величину ΔG (ккал/моль), определяемую как разность свободной энергии Гиббса конечного состояния (в составе комплекса) и начального состояния (в свободном виде) [27].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программы RasMol [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В геноме трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 (гаплотип H2) присутствует десять генов, кодирующих опсины, из них семь аннотированы как светочувствительные опсины от зелёного до ультрафиолетового. В геноме трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (гаплотип H1) также обнаружено десять опсино-подобных генов, из них для половины белков восстановлены полные аминокислотные последовательности. Так как опсины трихоплакса *Trichoplax adhaerens* охарактеризованы лишь частично, имело смысл провести углублённую аннотацию опсинов данного штамма.

Для этого были осуществлены множественные выравнивания аминокислотных последовательностей двадцати предполагаемых опсинов обоих штаммов трихоплакса и построены направляющие деревья опсинов на основании которых трём полным белкам: EDV19328.1 (TRIADDRAFT_62230) длиной 465 аминокислотных остатка (aa), EDV22726.1 (TRIADDRAFT_58590) длиной 365 aa и EDV22897.1 (TRIADDRAFT_28157) длиной 319 aa из *Trichoplax adhaerens* была присвоена функция чувствительности к голубому свету. С меньшей долей уверенности чувствительность к голубому свету может быть присвоена ещё четырём неполным белкам: EDV22727.1 (TRIADDRAFT_951) длиной 287 aa, EDV19349.1 (TRIADDRAFT_5463) – 188 aa, EDV19891.1 (TRIADDRAFT_6397) – 161 aa и EDV18601.1 (TRIADDRAFT_9679) – 137 aa из штамма H1 (Рис. 1).

Кроме того, было обнаружено высокое сходство между родопсином 6 с идентификатором RDD35784.1 длиной 272 aa и древним опсином позвоночных RDD44611.1 – 352 aa (оценка выравнивания: 406), между чувствительным к голубому свету опсином RDD39212.1 – 265 aa и УФ-опсином RDD39214.1 – 354 aa (оценка выравнивания: 465), а также между чувствительным к фиолетовому свету опсином RDD38879.1 – 355 aa и

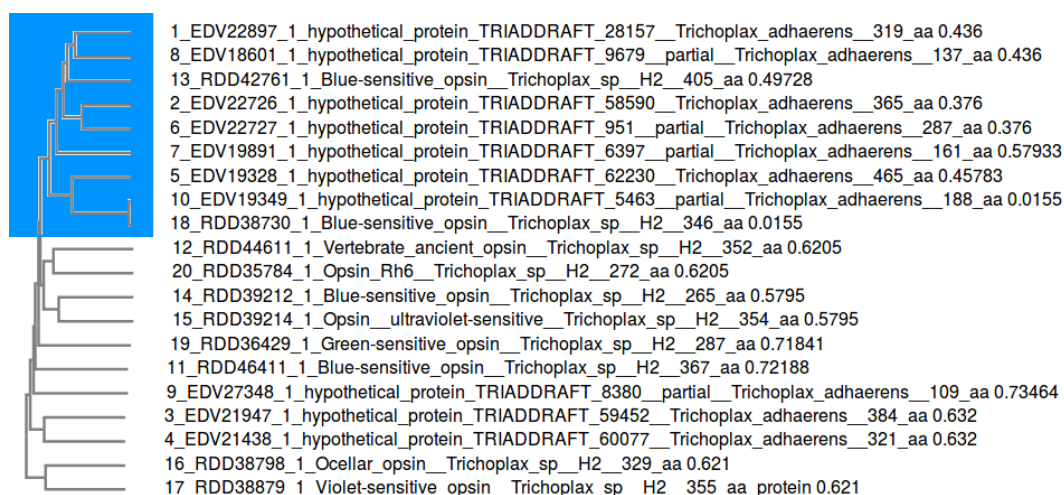


Рисунок 1. Направляющее дерево опсинов трихоплаксов *Trichoplax adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2, цифры обозначают порядковый номер и идентификаторы протеинов, а также длины аминокислотных последовательностей (aa) и редакционные расстояния между концами ветвей (парные расстояния между не выровненными последовательностями), голубое окрашивание указывает на кластер опсинов предположительно чувствительных к голубому свету

зрительным опсином RDD38798.1 – 329 aa (оценка выравнивания: 494) у *Trichoplax* sp. H2. Помимо этого, близкое родство установлено между гипотетическими опсинами EDV21947.1 и EDV21438.1 из *Trichoplax adhaerens* длиной 384 aa и 321 aa, соответственно (оценка выравнивания: 449).

С целью увеличить надёжность суждений, была проведена трёхмерная реконструкция всех двадцати исследуемых протеинов. Учитывались длина полипептида, достоверность модели и доля покрытия моделью аминокислотной последовательности (табл. 1, 2). Все полученные полные 3D-модели имели схожие структуры, включающие семь антипараллельных α -спиралей, которые образуют канал, что позволяет уверенно отнести их к классу белков-опсинов (рис. 2, 3). Доля неполных структурных моделей, т.е. моделей с числом α -спиралей менее семи, составила 2 из 10 для трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 (табл. 3) и половину для трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (табл. 4).

В следующей части исследования была предпринята попытка изучить взаимодействие опсинов с низкомолекулярным хромофором ретиналем. Для этого проводили стыковку изучаемых белков и низкомолекулярного лиганда на SwissDock-сервере [27], подсчитывали число областей связывания внутри канала и на поверхности белка, а также определяли максимальное значение $-\Delta G$ среди отдельных сайтов связывания внутри исследуемой области. Следует отметить, что под областью связывания мы понимаем компактный кластер из отдельных сайтов связывания низкомолекулярного лиганда, который выглядит как «облако» при суперпозиции отдельных конформаций лиганда (рис. 2б, 3б).

Таблица 1. Оценка качества 3D моделей опсинов *Trichoplax* sp. H2

Опсин	Аннотированная цветовая чувствительность	Длина, aa	Масса, кДа	Достоверность модели, %	Покрытие, %	Полнота модели
RDD36429.1	зелёный	287	32,34	100	94	да
RDD42761.1	голубой	405	46,50	100	70	да
RDD46411.1	голубой	367	41,30	100	95	да
RDD38730.1	голубой	346	39,07	100	92	да
RDD39212.1	голубой	265	30,64	100	86	нет
RDD38879.1	фиолетовый	355	40,69	100	83	да
RDD39214.1	УФ	354	40,80	100	90	да
RDD35784.1	родопсин 6	272	31,31	>90	96	нет
RDD38798.1	зрительный опсин	329	37,98	100	88	да
RDD44611.1	древний опсин позвоночных	352	41,44	100	88	да

Таблица 2. Оценка качества 3D моделей опсинов *Trichoplax adhaerens*

Опсин	Предполагаемая цветовая чувствительность	Длина, аа	Масса, кДа	Доверительность модели, %	Покрытие, %	Полнота модели
EDV19328.1	голубой	465	53,35	100	62	да
EDV21947.1	?	384	42,79	100	84	да
EDV22726.1	голубой	365	42,38	100	85	да
EDV21438.1	?	321	36,64	100	88	да
EDV22897.1	голубой	319	37,19	100	92	да
EDV22727.1	голубой	287	33,22	100	98	нет
EDV19349.1	голубой	188	21,25	100	93	нет
EDV19891.1	голубой	161	17,98	100	99	нет
EDV18601.1	голубой	137	15,42	100	99	нет
EDV27348.1	?	109	12,77	99.9	99	нет

Анализ взаимодействий ретиналя с полными моделями опсинов показал, что например, для зелёного (RDD36429.1) и одного голубого (RDD46411.1) опсинов из *Trichoplax* sp. H2 характерны как внутренние положения связывания ретиналя, так и внешние, а для одного голубого опсина (RDD38730.1), фиолетового (RDD38879.1) и УФ-опсина (RDD39214.1) только внешние положения молекулы хромофора (табл. 3), что объективно связано с качеством моделей. Наиболее интересным по результатам выравнивания с другими белками (рис. 1 и 4) следует считать полный голубой опсин RDD42761.1 длиной 405 аминокислотных остатка и массой 46,50 кДа с доверительностью модели 100% и покрытием 70% (табл. 1). В отличие от других белков-опсинов из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2, опсин RDD42761.1 связывал ретиналь только в одной компактной области внутри канала (рис. 2), причём с достаточно высоким значением $-\Delta G$ равным 8,54 ккал/моль (табл. 3).

Для полных опсинов из *Trichoplax adhaerens* (EDV19328.1, EDV21947.1, EDV22726.1, EDV21438.1 и EDV22897.1) выявлено более размытое распределение сайтов связывания ретиналя на поверхности белка-опсина по сравнению с полными опсинами из *Trichoplax* sp. H2 (рис. 3б, табл. 4). Отмечено много изолированных сайтов связывания, не принадлежащих компактным кластерам, что указывает на возможные вращения α -спиралей в моделях, приводящие к снижению эффективности связывания лиганда в канале макромолекулы. Подтверждением тому могут служить низкие индивидуальные и усреднённые показатели $-\Delta G$ для внешнего неспецифического связывания лиганда по сравнению с внутренним специфическим: $7,56 \pm 0,44$ ккал/моль против $8,33 \pm 0,21$ ккал/моль для штамма H2 (табл. 3) и $7,68 \pm 0,28$ ккал/моль против $8,17 \pm 0,33$ ккал/моль для штамма H1 (табл. 4). Интересно также незначительное ослабление связывания хромофора в канале опсинов трихоплакса



Рисунок 2. Положение ретиналя в пространственной модели голубого опсина RDD42761.1 из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2, а) единичная молекула хромофора в предпочтительной конформации с $\Delta G = -8,54$ ккал/моль внутри канала опсина, б) суперпозиция всех возможных положений хромофора в области связывания

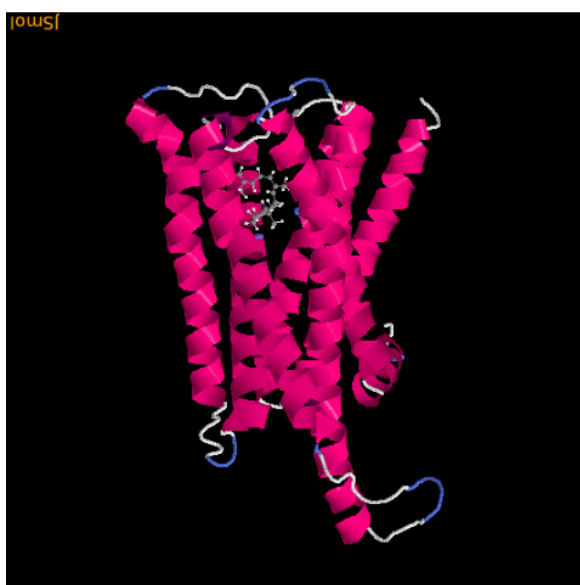
Таблица 3. Анализ взаимодействий ретиналя с моделями опсинов *Trichoplax* sp. H2

Опсин	Цвет	Модель	Связывание ретиналя			
			снаружи канала		внутри канала	
			число областей	-ΔG, ккал/моль	число областей	-ΔG, ккал/моль
RDD36429.1	зелёный	полная	6	7,41	2	8,33
RDD42761.1	голубой	полная	-	-	1	8,54
RDD46411.1	голубой	полная	4	7,51	2	8,15
RDD38730.1	голубой	полная	1	6,56	-	-
RDD39212.1	голубой	неполная	1	7,60	1	8,41
RDD38879.1	фиолетовый	полная	4	7,73	-	-
RDD39214.1	УФ	полная	3	7,52	-	-
RDD35784.1	родопсин 6	неполная	5	7,62	-	-
RDD38798.1	зрительный опсин	полная	3	8,04	1	8,03
RDD44611.1	древний опсин позвоночных	полная	1	8,04	1	8,54
Среднее значение			3,1±1,8	7,56±0,44	1,3±0,5	8,33±0,21

Trichoplax adhaerens (8,17±0,33 ккал/моль) по сравнению с опсинами *Trichoplax* sp. H2 (8,33±0,21 ккал/моль). Тем не менее, опираясь на анализ последовательностей белков-опсинов (рис. 1), изучение их структурных моделей и докинг ретиналя (рис. 3, табл. 4), можно с некоторой долей осторожности присвоить функции чувствительности к голубому свету опсином EDV19328.1, EDV22726.1 и EDV22897.1, созданные нами 3D-модели которых обладают полной структурой; а также весьма условно предположить аналогичную функцию для неполных опсинов EDV22727.1, EDV19349.1, EDV19891.1 и EDV18601.1 у *Trichoplax adhaerens* (табл. 4).

Учитывая все вышеперечисленные аргументы, имело смысл провести добавочные парные выравнивания между подходящими белками кандидатами на присвоение биологических функций. Оказалось, что достаточно высоким сходством обладают чувствительный к голубому свету опсин RDD42761.1 длиной 405 аа из *Trichoplax* sp. H2 (штамм H2) и предполагаемый белок EDV22897.1 длиной 319 аа из *Trichoplax adhaerens* (штамм H1) с величиной оценки выравнивания 515 (рис. 4). Следовательно, по аналогии с голубым опсином RDD42761.1 из *Trichoplax* sp. H2, функцию чувствительности к голубому свету можно достаточно надёжно присвоить гомологичному ему белку-опсину EDV22897.1 из *Trichoplax adhaerens*.

а



б



Рисунок 3. Положение ретиналя в пространственной модели гипотетического голубого опсина EDV22897.1 из трихоплакса *Trichoplax adhaerens*, а) единичная молекула хромофора в предпочтительной конформации с $\Delta G = -8,22$ ккал/моль внутри канала опсина, б) суперпозиция всех возможных положений хромофора внутри канала и на поверхности белка

Таблица 4. Анализ взаимодействий ретиналя с моделями опсинов *Trichoplax adhaerens*

Опсин	Цвет	Модель	Связывание ретиналя			
			снаружи канала		внутри канала	
			число областей	-ΔG, ккал/моль	число областей	-ΔG, ккал/моль
EDV19328.1	голубой	полная	4	7,69	1	7,80
EDV21947.1	?	полная	6	7,69	2	8,51
EDV22726.1	голубой	полная	3	7,36	1	8,04
EDV21438.1	?	полная	5	7,79	1	8,60
EDV22897.1	голубой	полная	2	7,45	1	8,22
EDV22727.1	голубой	неполная	4	8,24	1	7,86
EDV19349.1	голубой	неполная	4	7,59	-	-
EDV19891.1	голубой	неполная	3	7,87	-	-
EDV18601.1	голубой	неполная	2	7,80	-	-
EDV27348.1	?	неполная	3	7,29	-	-
Среднее значение			3,6±1,3	7,68±0,28	1,2±0,4	8,17±0,33

Наличие в геноме трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 генов, которые кодируют опсины чувствительные к зелёному (RDD36429.1), голубому (RDD38730.1, RDD39212.1, RDD42761.1 и RDD46411.1), фиолетовому (RDD38879.1) и УФ-свету (RDD39214.1) согласуется с недавно открытыми поведенческими реакциями трихоплакса штамм H2 на воздействие лазерами с разной длиной волны, такими как зелёный (532 нм, 1 Вт) и фиолетовый (405 нм, 5 мВт), а также на ультрафиолетовый и белый направленные источники света [31-33]. Таким образом, присутствие многообразных светочувствительных опсинов у трихоплакса позволяет ему реагировать на разные световые раздражители. В особенности, существование четырёх опсинов чувствительных к голубому свету (RDD38730.1, RDD39212.1, RDD42761.1 и RDD46411.1) связано с закономерностями проникновения солнечного света в морскую воду на глубину и, возможно, необходимо для ориентации животных по вертикали [32]. Тем не менее, полученные результаты не являются однозначными, а зависят от собственного биоритма животного [33]. Кроме того, кванты внешнего источника света могут восприниматься не только белками-опсинами, но и пока неизвестными светочувствительными системами.

RDD42761.1	---MNDSSNKTAPLSELL--VIGYICIMELTTIIFNVWTLFIFYRYPLRIPINYILNL	55
EDV22897.1	MADDHAIVNNSNLPLGNAIIRSSVYCLLFITGFFGNLIFLVIFAKCPYMRIPINYFLVNL	60
	: *: : ** : : *: : * : * : *,** : * :*****:*,**	
RDD42761.1	TINNLLYGFLILPFKIVSVLTQTWPFHPRICLLSGFINVVGFLVAVFSILAISVYRYLAI	115
EDV22897.1	AIVDITATIFRELALIIGYFNCQWLYNYHTCNLFGFMRNICCAVTIFTLAISVCRYLVI	120
	:* : : :*: . . * : : * * ** : : **: :***** **,*	
RDD42761.1	VRSQKRAISKRRVLFSIGFIWFGSAISAMLPLVGVSYVYIPSAYMCMPDPYYNLFITLF	175
EDV22897.1	CQHKGRMRTRHAVLCIIAFVWFYITLVCLCPIFGWNRYIYHQNQYVCSIDWSYQPSYIRY	180
	: : * : : : ** *,*:** : : . :*:*, .*:*, .*:*, * * : : :	
RDD42761.1	FSTTSFILPVIFSGVLNWRLLVTVNKHSKRMQVT-----HQSCSFVRKDKGLTKAIL	227
EDV22897.1	IIIVDVFLPTIITIICYTFIYIVVHRHSRRIQDILRMGSLSSAQYNRIAREKKVTKIMF	240
	: . . :*,*: : : : :*: :*:** : . . : : * :** : :	
RDD42761.1	SIYVGFFICFMPIGIVAYILLPLYVPVPRSVIIISSFMITIHSTTFPLICGLMHEKFKIC	287
EDV22897.1	AVYINFLICYLPFSIITAILIPSGIKPPAELFFVGTFMIDLNSSINPMLYPFIYRRCKEA	300
	:*: .*:**::*:*: **,* : * . : : : :*:** :*: * : : : : * .	
RDD42761.1	YKQCLSDLVGGKLYRRSGSLKSKSSFIRRTSTIRDRCPDIQVHQASENHRSNYFMRSPM	347
EDV22897.1	YCEVLC-----CHRSQTSPTSNCY-----	319
	* : *, :** : : . . :	
RDD42761.1	SMDNITSLLSKRRHSTNIWRHKTFPVVQSPLPLDRAKKYSIPNTELELEDLTPSTVS	405
EDV22897.1	-----	319

Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей RDD42761.1 и EDV22897.1, которые являются опсинами из трихоплаксов штаммов H2 и H1, соответственно. Clustal Omega (1.2.4)

В дополнение к предыдущим исследованиям, нами было проведено сравнение опсинов трихоплаксов с тремя опсинами гребневика *Mnemiopsis leidyi*: опсином 1 (MleiOpsin1, ML13055a, AFK83788.1,) длиной 345 аа и массой 38.97 кДа, опсином 2 (MleiOpsin2, ML12047a, AFK83789.1) длиной 399 аа и массой 43.96 кДа, а также опсином 3 (MleiOpsin3, ML215412a, AFK83790.1) длиной 404 аа и массой 45.97 кДа [35]. Мы обнаружили парное родство опсина 3 из *Mnemiopsis leidyi* с голубым опсином RDD39212.1, УФ-опсином RDD39214.1, древним опсином позвоночных RDD44611.1 и родопсином 6 RDD35784.1 из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 (оценки выравнивания: 261, 342, 368 и 260, соответственно). Филогенетическое родство установлено между аннотированным нами неполным голубым опсином EDV19891.1 длиной 161 аа из трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (Таб. 4) с опсинами 1 и 2 гребневика (оценка выравнивания: 271 и 241, соответственно). Теоретическое предсказание существования у *Mnemiopsis leidyi* опсинов чувствительных к голубому свету согласуется с данными по пикам поглощения клонированного опсина 2 при 500 нм или 380 нм [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая близость редакционного расстояния со значением 0,49728 (рис. 1) и высокую оценку выравнивания со значением 515 (рис. 4) между голубым опсином RDD42761.1 длиной 405 аа из *Trichoplax* sp. H2 (штамм H2) и предполагаемым белком EDV22897.1 длиной 319 аа из *Trichoplax adhaerens* (штамм H1), полноты построения структурных моделей, достоверности 100% и существенного покрытия аминокислотных последовательностей (70% и 92%, соответственно), а также высоких значений связывания $-\Delta G$ ретиналя внутри каналов (8,54 ккал/моль и 8,22 ккал/моль, соответственно), можно с достаточной степенью уверенности предположить, что гипотетический протеин EDV22897.1 выполняет функцию чувствительности к голубому свету у трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (штамм H1). Практическая проверка данного теоретического предсказания может быть осуществлена в прямых опытах на культуре *Trichoplax adhaerens*.

Наличие большого числа генов опсинов в геномах трихоплаксов гаплотипов H1 и H2 позволяет сделать предположение, что Placozoa обладают развитой системой восприятия световых сигналов и способны различать оттенки голубого цвета, что позволяет им ориентироваться в тоще морской воды. Остаются открытыми вопросы – к какому типу принадлежат опсины трихоплакса, какова молекулярная динамика взаимодействия ретиналя с каналом опсинов, какова функция внешних полипептидных петель, полностью исключённых из настоящего исследования. Полученные данные демонстрируют изначальную сложность «простейшего» многоклеточного организма трихоплакса и являются вызовом для молекулярных биологов и специалистов по молекулярной бионике, ориентированных на конструирование функциональных наносистем будущего.

Список литературы / References:

1. Terakita A. *The opsins*. *Genome Biol.*, 2005, vol. 6, no. 3, 213 p.
2. Schierwater B., Eitel M., Jakob W., Osigus H.J., Hadrys H., Dellaporta S.L., Kolokotronis S.O., Desalle R. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. *PLoS Biol.*, 2009, vol. 7, no. 1, p. e20.
3. Feuda R., Hamilton S.C., McInerney J.O., Pisani D. Metazoan opsin evolution reveals a simple route to animal vision. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2012, vol. 109, no. 46, pp. 18868-72.
4. Erwin D.H. Early metazoan life: divergence, environment and ecology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2015, vol. 370, no. 1684, p. 20150036.
5. Paps J., Holland P.W.H. Reconstruction of the ancestral metazoan genome reveals an increase in genomic novelty. *Nat Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1, p. 1730.
6. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955-960.
7. Kamm K., Osigus H.J., Stadler P.F., DeSalle R., Schierwater B. *Trichoplax* genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Sci Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 11168.
8. Kuznetsov A.V., Halaimova A.V., Ufimtseva M.A., Chelebieva E.S. Blocking a chemical communication between *Trichoplax* organisms leads to their disorderly movement. *International Journal of Parallel, Emergent and Distributed Systems*, 2020, vol. 35, no. 4, pp. 473-482.
9. Fernald R.D. Casting a genetic light on the evolution of eyes. *Science*, 2006, vol. 313, no. 5795, pp. 1914-1918.
10. Oakley T.H., Plachetzki D.C. The Evolution of Opsins. *Encyclopedia of the Eye*, 2010, pp 82-88.
11. Porter M.L., Blasic J.R., Bok M.J., Cameron E.G., Pringle T., Cronin T.W., Robinson P.R. Shedding new light on opsin evolution. *Proc Biol Sci.*, 2012, vol. 279, no. 1726, pp. 3-14.
12. Leung N.Y., Montell C. Unconventional roles of opsins. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2017, vol. 33, pp. 241-264.
13. Leung N.Y., Thakur D.P., Gurav A.S., Kim S.H., Di Pizio A., Niv M.Y., Montell C. Functions of Opsins in *Drosophila* Taste. *Curr Biol.*, 2020, vol. 30, no. 8, pp. 1367-1379.
14. Henze M.J., Dannenhauer K., Kohler M., Labhart T., Gesemann M. Opsin evolution and expression in arthropod compound eyes and ocelli: insights from the cricket *Gryllus bimaculatus*. *BMC Evol Biol.*, 2012, vol. 12, p. 163.
15. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Чупин В.В., Демина О.В. Исследование селективности окружения хромофор-связывающего сайта молекулы бактериородопсина с помощью аналогов

- ретиноидов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 1, с. 91-100. [Khodonov A.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Petrovskaya L.E., Chupin V.V., Demina O.V. Investigation of the selectivity of the environment of the chromophore-binding site of the bacteriorhodopsin molecule using retinoid analogs. *Topical issues of biological physics and chemistry*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 91-100. (In Russ.)]
16. Wanko M., Hoffmann M., Frauenheim T., Elstner M.J. Computational photochemistry of retinal proteins. *Comput Aided Mol Des.*, 2006, vol. 20, no. (7-8), pp. 511-8.
17. Rupenyan A., van Stokkum I.H., Arents J.C., van Grondelle R., Hellingwerf K., Groot M.L. Characterization of the primary photochemistry of proteorhodopsin with femtosecond spectroscopy. *Biophys J.*, 2008, vol. 94, no. 10, pp. 4020-4030.
18. Scheerer P., Park J.H., Hildebrand P.W., Kim Y.J., Krauss N., Choe H.W., Hofmann K.P., Ernst O.P. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7212, pp. 497-502.
19. Wang T., Duan Y. Retinal release from opsin in molecular dynamics simulations. *J Mol Recognit.*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 350-8.
20. Li Y.T., Tian Y., Tian H., Tu T., Gou G.Y., Wang Q., Qiao Y.C., Yang Y., Ren T.L. A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices. *Sensors (Basel)*, 2018, vol. 18, no. 5, p. 1368.
21. Simon C.J., Sahel J.A., Duebel J., Herlitze S., Dalkara D. Opsins for vision restoration. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2020, vol. 527, no. 2, pp. 325-330.
22. Xu X., Mee T., Jia X. New era of optogenetics: from the central to peripheral nervous system. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 2020, vol. 55, no. 1, pp. 1-16.
23. Berglund K., Stern M.A., Gross R.E. Bioluminescence-Optogenetics. Berglund K, Stern MA, Gross RE. *Adv Exp Med Biol.*, 2021, vol. 1293, pp. 281-293.
24. Nelesen S., Liu K., Zhao D., Linder C.R., Warnow T. The effect of the guide tree on multiple sequence alignments and subsequent phylogenetic analyses. *Pac Symp Biocomput.*, 2008, pp. 25-36.
25. Sievers F., Hughes G.M., Higgins D.G. Systematic exploration of guide-tree topology effects for small protein alignments. *BMC Bioinformatics*, 2014, vol. 15, no. 1, p. 338.
26. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.*, 2015, vol. 10, no. 6, pp. 845-58.
27. Bitencourt-Ferreira G., de Azevedo W.F. Jr. Docking with SwissDock. *Methods Mol Biol.*, 2019, vol. 2053, pp. 189-202.
28. Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 2000, vol. 28, pp. 1102-1104.
29. Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, (W1), pp. W636-W641.
30. Sayle R., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.*, 1995, vol. 20, no. 9, p. 374.
31. Капцов В.А., Дейного В.Н., Козырицкий Д.В. Rgb-таксис trichoplax (placozoa), как новый метод гигиенических исследований. *Медицина труда и экология человека*, 2021, т. 1, с.6-22. [Kaptsov V.A., Deinogo V.N., Kozyrtsky D.V. Rgb taxis trichoplax (placozoa) as a new method of hygienic research. *Occupational medicine and human ecology*, 2021, vol. 1, pp. 6-22. (In Russ.)]
32. Мамонтов А.А., Хавронюк И.С., Рыбакова К.А., Кузнецов А.В. Поведение трихоплакса в зависимости от действия света на опсины в соответствии с глубиной обитания животного: анализ и модельные опыты. *Материалы XVI Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021»*, Севастополь, 2021, с. 217-218. [Mamontov A.A., Khavronyuk I.S., Rybakova K.A., Kuznetsov A.V. Trichoplax behavior depending on the effect of light on opsins in accordance with the depth of the animal's habitat: analysis and model experiments. *Proceedings of XVI International Scientific Conference «Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2021»*, Sevastopol, 2021, pp. 217-218. (In Russ.)]
33. Хавронюк И.С., Воронин Д.П., Кузнецов А.В. Поведенческий ритм Trichoplax sp. H2: реакции на световое излучение различной длины волны. *Материалы XVI Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021»*, Севастополь, 2021, с. 226-228. [Khavronyuk I.S., Voronin D.P., Kuznetsov A.V. Behavioral rhythm of Trichoplax sp. H2: reactions to light radiation of different wavelengths. *Proceedings of XVI International Scientific Conference «Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2021»*, Sevastopol, 2021, pp. 226-228. (In Russ.)]
34. Schnitzler C.E., Pang K., Powers M.L., Reitzel A.M., Ryan J.F., Simmons D., Tada T., Park M., Gupta J., Brooks S.Y., Blakesley R.W., Yokoyama S., Haddock S.H., Martindale M.Q., Baxevanis A.D. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in Mnemiopsis leidyi: a new view of ctenophore photocytes. *BMC Biol.*, 2012, vol. 10, p. 107.

ASSIGNMENT OF FUNCTIONS TO OPSINS OF *TRICHOPLAX ADHAERENS* AND *TRICHOPLAX* SP. H2Khavronyuk I.S.¹, Mamontov A.A.¹, Bulkov V.A.¹, Voronin D.P.¹, Kuznetsov A.V.²¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: havronuk.1994@gmail.com

Abstract. The genome of *Trichoplax* sp. H2 has 10 genes encoding opsin, of which 7 ones are annotated as color-sensitive opsins, from green to ultraviolet. In turn, 10 opsin-like genes were also found in the genome of *Trichoplax adhaerens*. Full amino acid sequences were inferred for a half of these proteins. Due to the opsins of *Trichoplax adhaerens* haplotype H1 have been incompletely characterized, it was of special interest to investigate those opsins. For this purpose, multiple sequence alignments of the all 20 opsins from both trichoplax strains were performed, and guide trees were constructed. Structural models of the 20 proteins were created using homologous comparison and then the docking of retinal chromophore was performed. Based on these calculations, 3 complete hypothetical proteins, such as EDV19328.1 of length 465 aa, EDV22726.1 of length 365 aa, and EDV22897.1 of length 319 aa from *Trichoplax adhaerens* were assigned a blue light sensitivity function. With less chance, the blue light sensitivity could be assigned to 4 incomplete homologous proteins, such as EDV22727.1 (287 aa), EDV19349.1 (188 aa), EDV19891.1 (161 aa), and EDV18601.1 (137 aa) from strain H1. The being of multiple opsin genes in the genomes of haplotypes H1 and H2 suggests that Placozoa are capable of distinguishing shades of blue, and this possibly allows them to navigate in the seawater.

Key words: annotation, biological functions, homology, structural modeling, opsins, Placozoa.

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ РАЗЛОЖЕНИЯ ПЛАСТИКА НА МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ГЕМОЦИТОВ *MYTILUS GALLOPROVINCII*

Кальпа В.А.^{1,2}, Воронин Д.П.², Лантушенко А.О.²

¹ ФИЦ Морской гидрофизический институт РАН

ул. Капитанская, 2, 299011, г. Севастополь, РФ; e-mail: vel.kalpa@gmail.com

² Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, 299053, г. Севастополь, РФ

Поступила в редакцию: 26.08.2021

Аннотация. На данный момент наиболее актуальным является изучение продуктов разложения пластика и их влияния на живые организмы, так как пластик является неотъемлемой частью нашей жизни, но также пока слабо исследовано его поведение при физической диградации. Фталаты по химической структуре являются производными фталевых кислот, по физико-химическим свойствам представляют собой, в основном, малолетучие, высококипящие жидкости, малорастворимые в воде. Они используются в качестве пластификаторов, но также встречаются в косметике, парфюмерии, медицине и т.д., такое широкое использование фталатов обуславливает необходимость оценки их опасности для живых существ на основе анализа и обобщения их воздействия на организмы. В ходе эксперимента было исследовано воздействие фталатов на клетки гемоцитов двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincii*. В работе был сделан вывод о влиянии продуктов разложения пластика на живой организм.

Ключевые слова: фталаты, двустворчатый моллюск, пластик, гемоциты.

Средиземноморская мидия (*Mytilus galloprovincialis*) — двустворчатый моллюск из семейства митилид. В настоящее время этот вид распространён на мелководьях морей Атлантического, Индийского и Тихого океанов [1, 2]. Как и другие виды мидий, этот вид склонен к образованию плотных поселений (мидиевых друз), в которых моллюски прикрепляются к твёрдым субстратам (в том числе к раковинам особей того же вида) с помощью биссусных нитей.

Известно, что гемолимфа двустворчатых моллюсков представляет собой защитную транспортную систему кровообращения во внутренней тканевой среде, которая в значительной степени отвечает за поддержание гомеостаза и формирование физиологической адаптации моллюсков к изменяющимся условиям окружающей среды [3].

Изучение физиологических и иммунологических свойств гемолимфы двустворчатых моллюсков имеет большой научный и практический интерес, так как многие из этих моллюсков являются целевыми видами рыбного хозяйства и аквакультуры, широко используются в биоиндикации и экологическом мониторинге, а также могут служить в природе в качестве переносчиков болезней, поражающих, среди прочего, позвоночных животных. Исследования последних десятилетий показали, что состав и динамика популяции гемоцитов двустворчатых моллюсков, а также функциональные свойства циркулирующих клеток очень динамичны и зависят от внутренних (генетических, онтогенетических и физиологических) и внешних (экологические) факторов [3].

Осмотическая стойкость гемоцитов.

По особенностям стратегии адаптации к соленосному стрессу гидробионты подразделяют на осмоконформеров и осморегуляторов. К организмам - осморегуляторам относится большинство видов костистых рыб. Независимо от солёности окружающей среды осмолярность жидких сред организма осморегуляторов остается постоянной, приблизительно на уровне 300–400 мОсмоль/кг. К осмоконформерам относятся миксины, акулы, скаты и двустворчатые моллюски [4].

Среди осмоконформеров особый интерес на данный момент представляют двустворчатые моллюски. Единственный механизм адаптации к соленосному стрессу на организменном уровне у них — изоляция мягких тканей. Кроме этого, осмолярность плазмы моллюсков изменяется вслед за изменением солёности морской воды. Из этого можно сделать вывод, что широкий диапазон солёностной толерантности моллюсков должен обеспечиваться за счет клеточных механизмов адаптации. В качестве модельного объекта для проведения исследований в области клеточной осморегуляции моллюсков целесообразно использовать гемоциты. Данный тип клеток выполняет функцию транспорта, заживления тканей, пищеварения и иммунного ответа [4].



Рисунок 1. *Mytilus galloprovincialis*, 1819

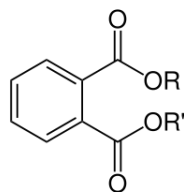


Рисунок 2. Структурная формула фталевой кислоты

Фталаты и их влияние на гидробионтов.

По химической структуре фталаты – производные от фталевых кислот, по физико-химическим свойствам они представляют собой, малолетучие, высококипящие жидкости, малорастворимые в воде [5]. Вследствие уникальных эксплуатационных характеристик, эти вещества широко применяются в различных отраслях хозяйства в качестве пластификаторов в составе разнообразных полимерных материалов (в косметике, медицине, в производстве игрушек, обуви, строительных материалов и др.). Столь широкое использование фталатов определяет необходимость оценки их опасности для живых существ на основе анализа и обобщения весьма разрозненных данных о токсическом действии этих соединений [5].

Также известно, что фталаты с числом атомов углерода до 6 являются более токсичными по сравнению с соединениями, содержащими более 6 атомов углерода в молекуле. Параметры острой ингаляционной токсичности для большинства соединений фталевых кислот не установлены в связи с их низкой летучестью. В условиях длительного воздействия на организм, фталаты способны накапливаться и вызывать хроническую интоксикацию, иногда с летальным исходом [5]. Общетоксическое действие этих веществ характеризуется политропностью: нарушаются трофические процессы, функции печени, почек, системы крови, ЦНС. Некоторые из них хорошо проникают через неповрежденную кожу. Среди производных фталевых кислот наиболее выраженным токсическим действием обладают диметилфталат и диметилтерефталат (первые члены ряда фталатов с 2 атомами углерода в молекуле).

На сегодняшний день очевидно, что с момента появления пластика в 1950-х годах 20 века мировое производство пластмасс быстро растет. В настоящее время пластмассы составляют в среднем 75% морского мусора [6]. Пластиковые отходы перемещаются на большие расстояния за счет океанических течений, распадаются на мелкие кусочки (микропластик) и накапливаются. Пластмассовые отходы распространены во всех водах Мирового океана в силу своих универсальных свойств и повсеместного использования в хозяйственной деятельности. Распадающиеся пластмассовые отходы наносят не только физический, но и токсикологический вред живым организмам всех уровней трофической цепи [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на базе ФИЦ ИнБЮМ им. Ковалевского и ЦКП «Молекулярная структура вещества» СевГУ. В течение 7 дней моллюски содержались в десятилитровых аквариумах с проточной морской водой, по 15 штук в каждом. После акклиматизации к лабораторным условиям мидии использовались в эксперименте. В первом аквариуме концентрация фталатов была 0,4 мг/л, данная концентрация уже встречается в природе; во втором аквариуме концентрация фталатов была в 10 раз больше, то есть 4 мг/л. Отбор гемолимфы осуществлялся после суточного пребывания моллюсков в аквариумах с добавлением фталатов.

Важно отметить, что параллельно с данным исследованием по осмотической стойкости было проведено исследование жизнестойкости гемоцитов с помощью проточного цитометра на базе ФИЦ ИнБЮМ, результаты которого коррелируют с данным исследованием [7].

Эксперимент по осмотической стойкости проводился с помощью лазерного анализатора частиц «Ласка-ТМ» (Биомедицинские системы, Россия) в ЦКП «Молекулярная структура вещества». Для оценки объема клеток использовался метод малоуглового светорассеяния.



Рисунок 3. Используемые в исследование мидии в экспериментальных аквариумах

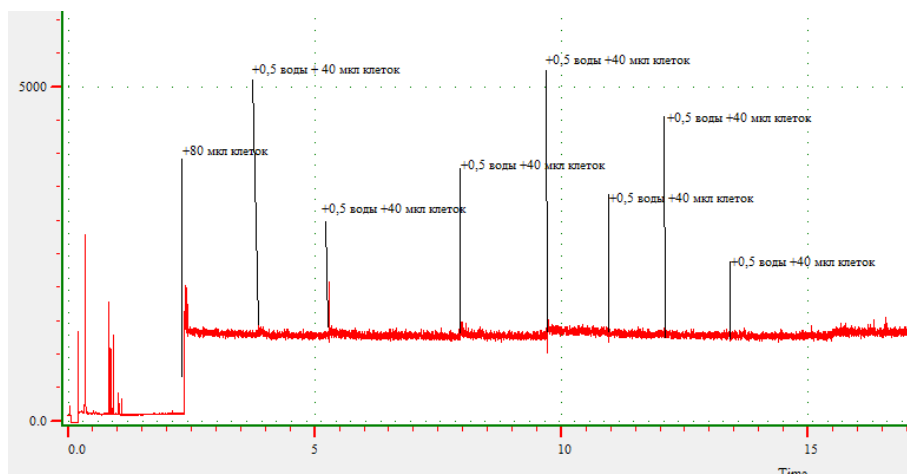


Рисунок 4. Светорассеяние суспензии гемоцитов при изменении осмолярности среды

На второй день эксперимента в аквариуме с меньшей концентрацией фталатов около половины моллюсков погибло, в аквариуме с большей концентрацией выживших не было. В ходе исследований осмотической стойкости гемоцитов выживших моллюсков было выявлено, что данные клетки не изменяли свой объем при повышении осмотического давления, и, по-видимому, воздействие фталатов привело к их гибели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБУЖДЕНИЕ

В рамках данного исследования был проведен осмотест при помощи лазерного анализатора «Ласка-ТМ». К раствору гемоцитов, изначально находящихся в морской воде, постепенно добавлялась дистиллированная вода и клеточная суспензия. При этом концентрация клеток поддерживалась постоянной, а внутриклеточное осмотическое давление возрастало. Объем клеток при этом не изменялся (рис. 4), что свидетельствовало о потере упругих свойств клеточных мембран и гибели гемоцитов. Данный вывод коррелирует с результатами, полученными при анализе жизнестойкости гемоцитов моллюсков методами проточной цитометрии.

Таким образом, благодаря проведённому эксперименту, можно сделать вывод о губительном воздействии фталатов на гемоциты мидий *Mytilus galloprovincialis*, которые являются природными фильтратами.

Список литературы / References:

1. Супрунович А.В., Макаров Ю.Н. *Культивируемые беспозвоночные. Пищевые беспозвоночные: мидии, устрицы, гребешки, раки, креветки*. Киев: Наукова Думка, 1990. [Suprunovich A.V., Makarov Yu.N. *Cultivated invertebrates. Food invertebrates: mussels, oysters, scallops, crayfish, shrimps*. Kiev: Naukova Dumka, 1990. (In Russ.)]
2. Гаевская А.В. *Паразиты, болезни и вредители мидий*. Ч. I, II. Севастополь, 2006. [Gaevskaya A.V. *Parasites, diseases and pests of mussels*. Part I, II. Sevastopol, 2006. (In Russ.)]
3. Анисимова А.А. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков. *Биология моря*, 2013, т. 39, № 6, с. 389-399. [Anisimova A.A. Morphofunctional parameters of hemocytes in the assessment of the physiological state of bivalve molluscs. *Biology of the Sea*, 2013, vol. 39, no. 6, pp. 389-399. (In Russ.)]
4. Кладченко Е.С., Андреева А.Ю. Осмотическая стойкость гемоцитов двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis* (Bruguiere, 1789). *Современная гидробиология: глобальные проблемы Мирового океана: материалы XI Всерос. онлайн-школы-семинара для молодых ученых, студентов и аспирантов*, г. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ, 2020, с. 14-15. [Kladchenko E.S., Andreeva A.Yu. Osmotic resistance of hemocytes of the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Bruguiere, 1789). *Modern hydrobiology: global problems of the World Ocean: materials of the XI All-Russian. online school-seminar for young scientists, students and graduate students*, Sevastopol: FITs InBYuM, 2020, pp. 14-15. (In Russ.)]
5. Шкаева И.Е., Солнцева С.А., Никулина О.С., Николаев А.И., Дулов С.А., Земляной А.В. Токсичность и опасность фталатов. *Токсикологический вестник*, 2019, т. 6, № 159, с. 3-9. [Shkayeva I.E., Solntseva S.A., Nikulina O.S., Nikolaev A.I., Dulov S.A., Zemlyanoy A.V. Toxicity and hazard of phthalates. *Toxicological Bulletin*, 2019, vol. 6, no. 159, pp. 3-9. (In Russ.)]
6. Данишевский С.Л. *Сложные эфиры*. В кн.: Лазарев Н.В., ред. *Вредные вещества в промышленности*. Л.: Химия; 1971; т. 1, с. 480-482. [Danishevsky S.L. *Esters*. In the book: Lazarev N.V., ed. *Harmful substances in industry*. L.: Chemistry; 1971; vol. 1, pp. 480-482. (In Russ.)]
7. Ткачук А.А., Андреева А.Ю., Кладченко Е.С. Влияние продуктов разложения пластика в океане (фталатов) на функциональные показатели черноморской мидии (*Mytilus Galloprovincialis*). Конференция: *Современная гидробиология: глобальные проблемы мирового океана*, Севастополь, 28 сентября - 02 2020 года. [Tkachuk A.A., Andreeva A.Yu., Kladchenko E.S. Influence of plastic decomposition products in the ocean (phthalates)

on the functional parameters of the Black Sea mussel (*Mytilus Galloprovincialis*). Conference: *Modern Hydrobiology: Global Problems of the World Ocean*, Sevastopol, September 28 - 02 2020. (In Russ.)]

THE EFFECT OF PLASTIC DECOMPOSITION PRODUCTS ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF HEMOCYTE MEMBRANES OF MYTILUS GALLOPROVINCII

Kalpa V.A.^{1,2}, Voronin D.P.², Lantushenko A.O.²

¹ Marine Hydrophysical Institute of RAS

st. Kapitan, 2, 299011, Sevastopol, Russia; e-mail: vel.kalpa@gmail.com

² Sevastopol State University

st. Universitetskaya, 33, 299053, Sevastopol, Russia

Abstract. At the moment, the most relevant is the study of plastic decomposition products and their impact on living organisms, since plastic is an integral part of our life, but its behavior during physical degradation has also been poorly studied. Phthalates by their chemical structure are derivatives of phthalic acids, by their physico-chemical properties they are mainly low-volatile, high-boiling liquids, poorly soluble in water. They are used as plasticizers, but are also found in cosmetics, perfumes, medicine, etc., Such a wide use of phthalates makes it necessary to assess their danger to living beings based on the analysis and generalization of their effects on organisms. During the experiment, the effect of phthalates on the hemocyte cells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovinci* was clearly shown. The conclusion was made about the effect of plastic decomposition products on a living organism.

Key words: *phthalates, bivalve mollusk, plastic, hemocytes.*

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2021 ГОД

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Аббасова Г.Д., Гаджиева Л.С. Изучение комплекса глюкозы и ди-глюкозы с оксидом железа Fe_2O_3 № 1, с. 9-14
- Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Сопоставление конформационных свойств ангио-пертензивного пептида IRW и его изомера LRW № 1, с. 15-19
- Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М. Конформационное поведение молекулы гиламба-тина и его фрагмента (5-12) № 1, с. 20-25
- Апашева Л.М., Дмитриев А.С., Лобанов А.В., Михайлова И.А., Рубцова Н.А., Савранс-кий В.В. Суспензия графена в качестве регулятора роста растений № 3, с. 381-384
- Беловолова Л.В., Беловолов М.М., Глушков М.В. Роль активных форм кислорода в прояв-лении ритмических процессов в сильно разбавленных водных системах № 1, с. 35-41
- Ганиева Р.А., Атакишиева С.А., Гасанов Р.А. Эффект НА-аскорбата в защите активности ФС II в условиях одновременного действия CO_2^+ и фотоингибирования № 2, с. 222-225
- Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Уваров И.П. Гидрокарбонат натрия как источник углерода для интенсивного культивирования *Porphyridium Purpureum (Bory) Drew et Ross*. В про-мышленных масштабах № 4, с. 554-558
- Геворгиз Р.Г., Уваров И.П., Репков А.П., Железнова С.Н. Вихревое перемешивание культур микроводорослей № 4, с. 559-563
- Горячев Н.С., Иванов П.О. Физические причины чередования хиральности в иерархической организации биологических структур № 3, с. 385-388
- Дадашева С.Б., Курбанова И.М. Растительные экстракты в защите фотосинтетических пиг-ментов при окислительном стрессе № 2, с. 235-238
- Железнова С.Н., Ключкова В.С., Геворгиз Р.Г. Оценка плотности культуры *Porphyridium Purpureum (Bory) Drew et Ross* по рассеянию света суспензией клеток № 4, с. 548-553
- Истомин Д.С., Демурин Я.Н., Золотавина М.Л. Метод тонкослойной хроматографии как аль-тернатива методу высокоэффективной жидкостной хроматографии при определении токо-ферольного состава семян подсолнечника в генетике и селекции № 1, с. 42-45
- Кальпа В.А., Гаджи А.В., Лантушенко А.О. Влияние наночастиц на механические свойства мембран эритроцитов *Scorpena Porcus* № 4, с. 564-569
- Ключкова В.С., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Ширяев А.В., Бучельников А.С., Шупо-ва Е.В. Изменение спектра оптической плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) Platensis* № 4, с. 543-547
- Кораблев Г.А. S-кривые и энтропийные условия стабилизации систем № 1, с. 46-52
- Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Влияние γ -излучения на люцигенинзависимую хемилюми-несценцию и дыхание клеток дрожжей № 2, с. 212-216
- Меджитов Р.А., Шупова Е.В., Бучельникова В.А., Бучельников А.С. Агрегация раститель-ного алкалоида берберина с кофеином и фуллереном C_{60} в водном растворе № 4, с. 570-575
- Орехова Д.Д., Каримова Е.Д. Ритмическая активность мозга при восприятии медиа-контента и созерцании природы № 2, с. 239-244
- Охрименко Г.С., Каримова Е.Д. Решение обратной задачи ЭЭГ и интегральная оценка мощ-ности в задаче анализа ритмов покоя № 3, с. 371-376
- Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. О возможной внешней обусловленности спектра околоча-совых периодов № 3, с. 393-399
- Петронюк Ю.С., Храмцова Е.А., Трофимова Н.Н., Андрюхина О.М., Рябцева А.А., Гурье-ва Т.С., Дадашева О.А., Левин В.М., Зак П.П. Анализ динамики развития структур глаза

- японского перепела (*Coturnix Coturnix Japonica Dom.*) ультразвуковыми высокочастотными методами № 3, с. 389-391
- Рощина В.В., Сергиевич Л.А., Джалалян Л.А.** Определение биогенных аминов флуоресцентным методом у живых объектов после экспозиции в озоне № 2, с. 207-211
- Суслов М.А.** Техника исследования скорости роста растительных клеток под воздействием внешнего повышенного давления № 3, с. 377-380
- Хохлов А.А., Рогачевская О.А.** Наблюдение секреции АТФ вкусовыми клетками *ex vivo* № 2, с. 226-229
- Чантурия А.Н.** Роль латерального натяжения в кальций-зависимом слиянии фосфолипидных мембран № 2, с. 230-234
- Чернышев Д.Н., Ключкова В.С.** Разделение нативного спектра поглощения культуры *Arthrospira (Spirulina) Platensis* № 2, с. 217-221
- Чукова Ю.П.** Энергетика биосферы как основа для прогноза судьбы нашей цивилизации № 1, с. 26-34

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.** Пространственная структура молекулы цитохрофина 4 № 1, с. 57-61
- Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.** Моделирование нейронной сети гиппокампа с различными типами рецепторов NMDA № 2, с. 265-268
- Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.** Трёхмерная структура молекулы казоксина А № 1, с. 62-68
- Бабков Л.М., Москвитин М.Д., Давыдова Н.А., Баран Я.** Структурно-динамическая ангармоническая модель и ИК спектр 2-Бензилфенола № 2, с. 275-279
- Брильков А.В., Логинов Ю.Ю., Брилькова Е.В., Ганусов В.В., Жабрун И.В., Шуваев А.Н.** Математическое моделирование экспериментальной эволюции трансгенных бактерий (ГМО) в модельных и природных экосистемах № 4, с. 580-585
- Велиева Л.И., Алиев Р.Э.** Изучение электронной структуры и динамических свойств молекул аллатостатинов № 1, с. 83-87
- Геворгиз Р.Г., Лелеков А.С.** Пути фиксации неорганического углерода у цианобактерий № 4, с. 576-579
- Глебов А.А., Колесникова Е.А., Бугай А.Н.** Моделирование нарушения нейрогенеза после острого облучения мышей рентгеновскими лучами № 2, с. 280-284
- Жулидин П.А., Филин П.Д., Пластун И.Л.** Молекулярное моделирование процесса синтеза наночастиц сульфида цинка в присутствии молекул флагеллина № 3, с. 409-412
- Захаров Н.А., Коваль Е.М., Орлов М.А., Шелехов Е.В., Алиев А.Д., Захарова Т.В., Киселёв М.Р., Матвеев В.В.** Особенности влияния гиалуроновой кислоты (ГК) на биоминерализацию биосовместимого гидроксипатита кальция в системе $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4\text{)}_2\text{HPO}_4\text{-ГК-H}_2\text{O}$ № 1, с. 69-74
- Зубова К.В., Кузнецова В.А., Аль-Альвани А.Ж., Глинская Е.В., Каневский М.В., Глуховской Е.Г.** Характеристика лентгюровских монослоев фосфолипидов, выделенных из клеточных мембран тест-культуры *E. coli K-12* № 2, с. 285-288
- Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.** Структурная организация молекулы GLY-PRO-ARG-PRO № 1, с. 53-56
- Капцов В.А., Дейнего В.Н., Козырицкий Д.В.** Селективная поведенческая реакция *Trichoplax* (Placozoa) на RGB – световые стимулы № 3, с. 400-408
- Ключков Б.Н.** Моделирование динамики волнового транспорта в биосистемах № 2, с. 245-250
- Костюкова Л.О., Воронин Д.П., Рыбакова К.А., Савченко Е.В., Костюков В.В.** Фотовозбуждение красителя лазурного с в водном растворе: теоретический анализ № 1, с. 75-81
- Костюкова Л.О., Воронин Д.П., Рыбакова К.А., Савченко Е.В., Костюков В.В.** Взаимодействие возбужденной молекулы красителя лазурного А с водным окружением: теоретическое исследование № 2, с. 256-264

- Костюкова Л.О., Воронин Д.П., Рыбакова К.А., Савченко Е.В., Костюков В.В.** Влияние сильно связанных молекул воды на фотовозбуждение красителя тионина в растворе: квантовохимический анализ № 3, с. 424-433
- Луценко А.О., Шпигун Д.К., Сидорова А.Э.** Методика оценки хиральности суперспиральных структур белков № 3, с. 413-417
- Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Криштоп В.В., Шипко М.Н., Степович М.А., Ленчер О.С.** Исследование эффективности транспорта ионов K^+ по каналам ионных обменников в присутствии лекарственных средств – активаторов калиевых каналов № 2, с. 269-274
- Судоргин С.А.** Электротранспортные свойства однослойного германена в квазиклассическом приближении № 4, с. 586-590
- Тренкеншу Р.П., Ширяев А.В., Горбунова С.Ю.** Моделирование пред-экспоненциальной фазы роста в культуре микроводорослей № 2, с. 251-255
- Чекушкин А.А., Лелеков А.С.** Продуктивность культуры *Phaeodactylum Tricornutum* в условиях естественного освещения № 4, с. 591-596
- Шпигун Д.К., Луценко А.О., Сидорова А.Э.** Методика оценки хиральности спиральных структур белков № 3, с. 418-423
- Lima Navarro G., Arzola Flores J.A., Maldonado Garcia A., Guarneros Bejarano G., Vidal Robles E., Hernandez Santiago A.A.** Multilayer perceptron neural network to predict the surface plasmon resonance of gold nanospheres using their morphological characteristics № 4, с. 597-601

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Беликов Н.Е., Демина О.В., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Складнев Д.А., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А.** Исследование технологии селективного маркирования рекомбинатных белков-мишеней и разработка путей синтеза модифицированных квантовых точек CdTe в водных растворах № 1, с. 88-96
- Бехбудова Г.М.** Условие формирования одиночных полиионовых ионных каналов и изучение их свойств в зависимости от субстратного окружения мембран № 1, с. 97-104
- Богачева Е.А., Ажишева М.В., Сыровец А.А., Лантушенко А.О.** Анализ противовоспалительных свойств зубного порошка при заболеваниях полости рта с использованием микроядерного теста № 4, с. 647-650
- Бурлаков А.Б., Титов С.А., Зыкова Л.А.** Высокочастотная сонография сердечно сосудистой системы в раннем развитии низших позвоночных № 3, с. 454-459
- Васильева А.А., Золотавина М.Л., Комаренко А.А.** Применение современных методов оценки показателей антикоагулянтной системы у беременных № 1, с. 169-174
- Верлов Н.А., Ланда С.Б., Эмануэль В.Л.** Олигомеры уромодулина в растворах различной ионной силы и pH № 4, с. 607-611
- Гайдабура Е.А., Золотавина М.Л., Братова А.В.** Биохимические методы маркеров воспаления крови как альтернатива методов компьютерной томографии для определения степени поражения легочной ткани при новой коронавирусной инфекции № 2, с. 311-314
- Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В.** Окислительный стресс в системе внутриклеточной цинковой сигнализации: *in vitro* исследование на эритроцитах человека № 4, с. 640-646
- Грачёв Д.И., Шумаев К.Б., Медведева В.А., Фейлер А.С., Космачевская О.В., Рууге Э.К.** Взаимодействие различных нитрозильных комплексов гемоглобина с активными формами кислорода и азота № 3, с. 477-481
- Евтина А.А., Булдаков М.А., Нехорошев В.О., Ландль Н.В., Чердынцева Н.В., Королев Ю.Д.** Влияние низкотемпературных плазменных струй на пролиферацию опухолевых клеток № 3, с. 464-471
- Емельянова А.Ю., Игнатьева М.М., Черенков И.А., Кривилев М.Д.** Диффузия толуидинового синего в гидрогелевых средах: данные электрохимических экспериментов и задачи для численного моделирования № 2, с. 315-320
- Зарубин В.Н.** Аппарат хронофизиотерапии для лечения заболеваний путём устранения десинхроноза № 2, с. 296-299

- Ивлиева (Перетокина) И.В., Мещерякова А.А., Бабков Л.М., Сорокин В.В.** ИК спектры и структура хромопиридинкарбонитрильных систем..... № 3, с. 447-453
- Казаринов К.Д., Полников И.Г., Власова И.И., Михальчик Е.В., Гусев А.А., Баранова О.А., Щелконогов В.А., Чеканов А.В.** Изучение радикал-генерирующей способности активированных нейтрофилов в эксперименте *in vitro* в условиях микроволнового облучения № 1, с. 137-141
- Каримова Е.Д., Катермин Н.С., Буркитбаев С.Е.** Анализ сенсомоторного мю-ритма пациентов с эпилепсией методом независимых компонент № 3, с. 487-493
- Киселева Д.А., Сидорин Е.В.** Изучение шаперонной активности Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* при разных значениях pH среды № 2, с. 306-310
- Кравченко Е.М., Кучина Е.С., Лаптева Е.А., Одарюк И.Д.** Использование стабильных радикалов для изучения кинетики ферментативного окисления фенолов № 2, с. 325-329
- Кулагина Т.П., Гапеев А.Б., Ариповский А.В., Жукова Е.С., Щербатюк Т.Г.** Жирнокислотный состав и активность антиоксидантных ферментов в тканях крыс при опухолевом росте в условиях воздействия озона № 3, с. 482-486
- Лавриненко И.А., Семёнов Д.А., Лагуткин Д.А., Зайцева А.Ю., Генералов Е.А., Матвеева О.В., Егоров Е.Е., Нечипуренко Ю.Д.** Ацидоз и эффект Вериге-Бора при развитии COVID-19..... № 3, с. 505-510
- Ланда С.Б., Верлов Н.А., Филатов М.В., Бурдаков В.С., Эмануэль В.Л.** Внеклеточные везикулы как носители холестерина, не связанного с липопротеинами № 1, с. 124-132
- Лантушенко А.О., Мегер Я.В., Шаповалова В.Е., Дегтяр И.В., Синченко А.В., Боровков А.Б.** Молекулярно-генетический анализ микроводоросли *Dunaliella Salina*, штамм IBSS-2..... № 4, с. 660-664
- Масимов Э.А., Багирова С.Р., Гасанова Х.Т.** Реологическое исследование водных растворов молекулярно-массовых фракций (ПВП) поливинилпирролидона № 1, с. 111-114
- Мельническая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Диклофенак модулирует трансэпителиальный транспорт Na^+ в коже лягушки № 1, с. 133-136
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И., Симонян А.О.** Ингибиторы липоксигеназ подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые трифлуоперазином в перитонеальных макрофагах крысы № 1, с. 105-110
- Милютин Н.П., Сидоров Р.В., Долтмурзиева Н.С., Ананиян А.А., Внуков В.В.** Оценка состояния пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование № 2, с. 300-305
- Морозова Г.И., Корнилова Г.В., Гринкевич О.М., Аскарова К.З., Лопатина О.А., Фирсова Е.Л.** Трансмембранные потенциалы и митохондриальная активность онкоклеток культуры HeLa в процессе размораживания и при инфицировании аденовирусом № 4, с. 630-635
- Нечипоренко А.П., Везо О.С., Нечипоренко У.Ю., Плотникова Л.В., Ситникова В.Е., Плотников П.П.** Влияние природных сахаридов на фурье-спектр плазмы крови человека № 1, с. 154-164
- Нечипуренко Ю.Д., Касерес Х.Л.** Гипотеза контаминации мембран при эпилепсии № 3, с. 520-524
- Погорелов А.Г., Ипатов Л.Г., Панаит А.И., Погорелова М.А., Гулин А.А., Погорелова В.Н.** Спектрометрия растительных полисахаридов в растворе электрохимически активированной воды..... № 3, с. 511-515
- Рожков С.П.** Возможная роль полиморф глобулярного белка, индуцируемых взаимодействием с ионами солей, в фазовых переходах типа жидкость-жидкость..... № 2, с. 330-339
- Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Михлина Е.В., Симунин М.М., Рыжков И.И., Бондарь В.С.** Каталитический эффект композита нановолокна оксида алюминия – наноалмазы при функционализации Fe^{2+} и Cu^{2+} № 2, с. 321-324
- Садовничук М.Д., Скоробогатова А.С.** Оценка элементного статуса периферической крови женщин в зависимости от возраста № 3, с. 434-438
- Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Нехаев И.С., Артюхов В.Г.** *In silico* исследование аминокислотного состава участков связывания папаина с ингибиторами различной природы..... № 4, с. 612-615

- Самцов М.П., Тарасов Д.С., Малюшкова Е.В., Хлудеев И.И., Луговский А.П., Семак И.В.** Анализ свойств комплексов полиметиновых красителей с белками сыворотки крови методом гель-электрофореза..... № 3, с. 499-504
- Семенова Е.В., Малышко Е.В., Твердислов В.А.** Взаимосвязь хиральности лекарственных препаратов и их биоактивности..... № 1, с. 142-147
- Слободжанина Е.И., Зубрицкая Г.П., Скоробогатова А.С., Белевич Е.И., Венская Е.И., Лукьяненко Л.М.** Механизмы действия лития на эритроциты человека № 4, с. 616-623
- Сологуб Т.В., Мастерова О.А., Ермолаев Ю.Л., Овсянников В.А.** Комплексная терапия вирусных заболеваний..... № 4, с. 624-629
- Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Федуро Н.А., Пасюков В.В.** Окислительно-восстановительный баланс в качестве критерия для персонифицированного учета ответа на терапию клеток пациентов с острым лимфобластным лейкозом..... № 4, с. 651-659
- Телегина Д.И., Васильева С.В.** Сероводород выступает медиатором NO-сигнальной активности, тем самым стимулируя дисперсию биопленок..... № 3, с. 439-446
- Титов В.Ю., Осипов А.Н., Кочиш И.И.** Предполагаемый механизм регуляции физиологических эффектов оксида азота № 2, с. 289-295
- Трушкова Е.И., Золотавина М.Л., Братова А.В.** Оценка аналитической надежности биохимических методов в диагностике новой коронавирусной инфекции..... № 1, с. 165-168
- Федорова Н.Д., Сумбатян Д.А., Стукова М.А., Иванов А.В., Семенова Е.В., Филатов М.В., Варфоломеева Е.Ю.** Вирусные инфекции влияют на функциональную активность нейтрофилов периферической крови № 1, с. 115-123
- Филиппова Е.М., Несвижский Ю.В., Титов С.А., Глухов А.И.** Исследование физико-химических свойств клеточной стенки *Candida albicans* методом атомно-силовой микроскопии № 2, с. 340-345
- Финашкин Д.С., Бабков Л.М.** Структура и колебательные спектры изомеров дигидроксibenзойной кислоты. Теория, эксперимент..... № 3, с. 472-476
- Храмцова Е.А., Куликова О.Р., Ушмаров Д.И., Антипова К.Г., Луканина К.И., Гумменюк С.Е., Левин В.М., Григорьев Т.Е.** Оценка скорости деградации каркасных губок на основе хитозана *in situ* по данным акустической микроскопии № 3, с. 460-463
- Шишкина Л.Н., Смирнова А.Н., Мазалецкая Л.И., Дубовик А.С., Швыдкий В.О.** Взаимосвязь физико-химических свойств с составом липидов из листьев и сока алоэ древовидного № 1, с. 148-153
- Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Насыбуллина Э.И., Мартусевич А.К., Рууге Э.К.** Влияние различных доноров оксида азота на неферментативное гликирование биомолекул..... № 3, с. 494-498
- Gonzalez F.M., Moreno A., Cervantes T. A.M., Italo J., Hernandez-Apam M.A., Lima R.** Significance test to a data matrix of nanoreservoirs of tannins extracted from *tenuiflora mimosa* (tepezcohuite) encapsulated in tio2 anoreservoirs № 3, с. 516-519
- Ramos Esparaza S., Arzola Flores J.A., Maldonado Garcia A., Guarneros Bejarano G., Vidal Robles E., Hernandez Santiago A.A.** Machine learning for predicting the surface plasmon resonance of silver nanospheres № 4, с. 636-639
- Rodriguez-Meza M.A., Morales M.A., Cervantes-Tavera A.M., Zenteno-Mateo B., Hernandez-Santiago A.A.** Glioblastoma growth computational simulation: a minimal model of multiscale angiogenesis..... № 4, с. 602-606

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- Аббасова М.Т.** Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения дециметрового диапазона на активность церулоплазмينا и на перекисное окисление липидов в сыворотке крови у крыс № 3, с. 529-532
- Апашева Л.М., Будник М.И., Лобанов А.В., Овчаренко Е.Н., Розанцев М.В., Турбин, Сергеев А.И., Стребков Д.С.** Экологически чистый пероксид водорода: получение, рострегулирующие свойства..... № 2, с. 358-361

- Барцев С.И., Дегерменджи А.Г., Дегерменджи Н.Н., Салтыков М.Ю., Сарангова А.Б.** Экологическая биофизика – возможные горизонты развития № 4, с. 665-674
- Гулин А.С., Тренкеншу Р.П.** Разработка автономной экспедиционной установки для исследования микроводорослей в естественных условиях № 1, с. 192-196
- Гурова Н.Н., Дигурова И.И., Гусев С.Д.** Сравнительный анализ морфометрических показателей листовых пластин березы и осины при длительном техногенном воздействии № 1, с. 186-191
- Даллакян Г.А.** Влияние фуллерена на рост и развитие водных организмов..... № 1, с. 175-178
- Дегерменджи А.Г., Дегерменджи Н.Н.** New directions in biophysics of aquatic ecosystems № 2, с. 346-351
- Дегерменджи Н.Н.** Математическое моделирование динамики бактериопланктона на органических почвенных экстрактах берегов Красноярского водохранилища..... № 2, с. 352-357
- Иванова Э.А.** Супермолекулярная реорганизация протеомных ансамблей супрамолекулярных структур хроматина растений в стрессовых условиях окружающей среды..... № 1, с. 179-185
- Кальпа В.А., Воронин Д.П., Лантушенко А.О.** Влияние продуктов разложения пластика на механические свойства мембран гемоцитов *Mytilus Galloprovinci* № 4, с. 695-698
- Кулиева А.Т.** Влияние электромагнитного поля дециметрового диапазона на концентрацию общего белка и гемоглобина в крови у крыс, облученных в пренатальном периоде № 3, с. 525-528
- Скуратовская Е.Н., Сербин А.Д., Полевой Д.М.** Влияние полихлорированных бифенилов на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы гепатопанкреаса мидии *Mytilus Galloprovincialis* № 4, с. 680-685
- Солдатов А.А.** Изменение диффузионных расстояний и химического состава скелетных мышц морских рыб на протяжении годового цикла № 4, с. 675-679
- Хавронюк И.С., Мамонтов А.А., Булков В.А., Воронин Д.П., Кузнецов А.В.** Присваивание функций опсином трихопласов *Trichoplax Adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2..... № 4, с. 686-694