

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 7, № 4
2022**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 7, № 4
2022**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 7, No. 4, 2022**

Севастополь
2022

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 7, № 4, 2022

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Р.М. Багиров, Е.Ю. Боброва, Х.О. Гафарова, О.Ш. Багирова**
Комплексообразование ионов железа с грибными меланинами 525
- М.А. Суслов**
Применение метода ЯМР с парамагнитным допингом для оценки апопластного переноса воды в корнях интактных растений при действии абиотических стрессов 530
- В.С. Клочкова, А.С. Лелеков, И.Н. Гудвилович**
Динамика концентрации хлорофилла а и В-фикоэритрина в культуре *Porphyridium purpureum* в условиях светового и углеродного лимитирования.....534
- Н.Н. Тимченко, И.В. Головченко**
Влияние замораживания-оттаивания на температурное поведение гемоглобина..... 541
- Т.Э. Кулешова, П.В. Желначева, З.А. Гасиева, А.С. Галушко, Г.Г. Панова**
Зависимость биоэлектрического потенциала в корнеобитаемой среде от формы азота в питательном растворе 546
- В.А. Твердислов**
Нарушение симметрии – физическая основа совершения «полезной работы» биологическими молекулярными машинами.....552

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- М.А. Васильева, А.Н. Бугай, Э.Б. Душанов**
Моделирование репарации повреждений ДНК, индуцированных тяжелыми ионами в клетках млекопитающих 557
- Н.А. Колтовая, Э.Б. Душанов**
Мутационный анализ структуры дрожжевой аргинин пермиазы Can1 565
- Н.А. Марнаутов, А.Б. Елфимов, Л.Х. Комиссарова**
Исследование возможности выявления различий в развитии опухолевого процесса путем кластеризации с использованием алгоритма kMeans 570
- М.Б. Стригин**
Экологическая ниша как потенциальная яма, определяющая собственные значения волновой функции живого 574

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Ю.М. Чудакова, Г.В. Шмарина, Е.С. Ершова, А.В. Мартынов, С.Г. Никитина, С.В. Костюк

Усиление окислительного стресса, уровня апоптоза и изменение в уровне экспрессии генов *BCL* и *BAX* у детей с тяжелой формой РАС..... 583

А.А. Пастухов

Термодинамическое моделирование систем с бензойной кислотой как “модельных систем” для фармацевтики.....587

А.Г. Погорелов, Л.Г. Ипатова, А.А. Гулин, А.Л. Кузнецов, А.А. Станкевич, В.Н. Погорелова

Спектрометрия раствора альбумина в электрохимически активированной воде 593

Д.И. Грачев, В.А. Медведева, К.Б. Шумаев, В.З. Ланкин, Э.К. Рууге

Динитрозильные комплексы железа как ингибиторы перекисного окисления липидов 600

Е.М. Бакурова

Особенности метаболизма эпителиальной опухоли при её мезенхимальном переходе..... 604

О.И. Гуценко, И.В. Корниенко, А.А. Ананян, Н.П. Милютин, В.В. Внуков

Митохондриально-направленный антиоксидант *skq1* регулирует сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE и апоптоз в лейкоцитах крови при окислительном стрессе..... 608

Е.А. Генералов, Е.Ю. Симоненко, Л.В. Яковенко

Возможные молекулярные механизмы действия полисахаридов при вирусных заболеваниях 613

И.И. Шошина, И.С. Зеленская, М.П. Бекренева, С.И. Ляпунов,

И.С. Ляпунов, Д.А. Котова, Е.С. Томиловская

Контрастная чувствительность и микродвижения глаз как маркеры адаптации и реадаптации в модельном эксперименте по изучению влияния изменений гравитации 619

К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов, Д.И. Грачев,

Э.И. Насыбуллина, И.С. Пугаченко, Э.К. Рууге

Новые варианты динитрозильных комплексов железа. Антиоксидантное и антирадикальное действие 624

Д.К. Баушева, Н.Ю. Шилягина, В.А. Воденеев, С.М. Деев, А.В. Звягин,

Е.Л. Гурьев

Получение люминесцентных тераностических наноконструкций на основе антистоксовых нанофосфоров и рекомбинантных белков 628

М.Ю. Раваева, Е.Н. Чуян, И.В. Черетаев

Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на показатели тканевого окислительного метаболизма 634

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

М.А. Уфимцева, А.В. Кузнецов

Экспресс-оценка размерных фракций планктона в акватории г. Севастополь зимой 2021-2022 гг: модельные исследования 640

Ю.В. Дорошенко

Микробиологическая характеристика гидротехнических сооружений некоторых бухт
г. Севастополя.....645

Е.Н. Скуратовская, А.С. Алемова

Влияние нефтяных углеводородов на биохимические показатели черноморской мидии
Mytilus galloprovincialis 650

А.А. Солдатов

Респираторные свойства крови *Planiliza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) и
Zosterisessor ophiocephalus (Pallas, 1814) 657

В.Е. Шаповалова, В.П. Евстигнеев, А.В. Гаджи, А.О. Лантушенко

Сравнительный анализ морфометрических характеристик микроводорослей рода
Dunaliella из гиперсоленых озер Крыма 662

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2022 ГОД 666

CONTENTS

Volume 7, No. 4, 2022

GENERAL BIOPHYSICS

- R.M. Bagirov, E.Yu. Bobrova, H.O. Gafarova, O.Sh. Bagirova**
Complex formation of iron ions with fungal melanins 525
- M.A. Suslov**
Application of the NMR method with paramagnetic doping to estimation the apoplastic water transfer in the roots of intact plants under impact of abiotic stresses 530
- V.S. Klochkova, A.S. Lelekov, I.N. Gudvilovich**
Dynamics of the concentration of chlorophyll a and B-phycoerythrin in culture *Porphyridium purpureum* in conditions of light and carbon limitation 534
- N.N. Timchenko, I.V. Golovchenko**
Influence of freezing-thawing on the hemoglobin temperature behavior 541
- T.E. Kuleshova, P.V. Zhelnacheva, Z.A. Gasieva, A.S. Galushko, G.G. Panova**
Dependence of the bioelectric potential in the root environment on the nitrogen form in the nutrient solution 546
- V.A. Tverdislov**
Symmetry breaking is the physical basis for the performance of "useful work" by biological molecular machines 552

MODELLING IN BIOPHYSICS

- M.A. Vasileva, A.N. Bugay, E.B. Dushanov**
Modeling of DNA damage repair induced by heavy ions in mammalian cells 557
- N.A. Koltovaya, E.B. Dushanov**
Mutational analysis of structure of yeast arginine permease Can1 565
- N.A. Marnautov, A.B. Elfimov, L.Kh. Komissarova**
A study of the possibility of detecting differences in dynamics of tumor growth by clustering using k-Means algorithm 570
- M.B. Strigin**
Ecological niche as a potential pit determining the eigenvalues of the wave function of a living ...574

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

Y.M. Chudakova, G.V. Shmarina, E.S. Ershova, A.V. Martynov, S.G. Nikitina, S.V. Kostyuk

Increased oxidative stress and changes in the level of expression of the BCL and BAX genes in children with severe ASD.....583

A.A. Pastukhov

Thermodynamic modeling of systems with benzoic acid as model systems for pharmaceuticals 587

A.G. Pogorelov, L.G. Ipatova, A.A. Gulin, A.L. Kuznetsov, A.A. Stankevich, V.N. Pogorelova

Spectrometry of serum albumin solution in electrochemically activated water 593

D.I. Grachev, V.A. Medvedeva, K.B. Shumaev, V.Z. Lankin, E.K. Ruuge

Dinitrosyl iron complexes as lipid peroxidation inhibitors.....600

E.M. Bakurova

The epithelial tumor metabolism features during its mesenchymal transition 604

O.I. Gutsenko, I.V. Kornienko, A.A. Ananyan, N.P. Milutina, V.V. Vnukov

Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 regulates of signal system Keap1/Nrf2/ARE and apoptosis in the leukocytes of blood under oxidative stress 608

E.A. Generalov, E.Yu. Simonenko, L.V. Yakovenko

Possible molecular mechanisms of polysaccharides action in viral diseases 613

I.I. Shoshina, I.S. Zelenskaya, M.P. Bekreneva, S.I. Lyapunov, I.S. Lyapunov, D.A. Kotova, E.S. Tomilovskaya

Contrast sensitivity and eye microtremor as markers of adaptation and readaptation in a model experiment to study the influence of gravity changes 619

K.B. Shumaev, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, D.I. Grachev, E.I. Nasybullina, I.S. Pugachenko, E.K. Ruuge

New variants of dinitrosyl iron complexes. Antioxidant and antiradical effect 624

D.K. Bausheva, N.Yu. Shilyagina, V.A. Vodeneev, S.M. Deev, A.V. Zvyagin, E.L. Guryev

Synthesis of luminescent theranostic nanocomplexes based on upconversion nanoparticles and recombinant proteins 628

M.Yu. Ravaeva, E.N. Chuyan, I.V. Cheretaev

The effect of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency on the indicators of tissue oxidative metabolism..... 634

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

M.A. Ufimtseva, A.V. Kuznetsov

Express estimation of plankton size fractions in the water area of Sevastopol in winter 2021-2022: model studies..... 640

Yu.V. Doroshenko

Microbiological characteristics of the hydraulic structures of some Sevastopol bays 645

E.N. Skuratovskaya, A.S. Alyomova

The impact of petroleum hydrocarbons on the biochemical parameters in hepatopancreas of the black sea mussel *Mytilus galloprovincialis*..... 650

A.A. Soldatov

Respiratory properties of blood *Planiliza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) and *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1814) 657

V.E. Shapovalova, V.P. Evstigneev, A.V. Gadzhi, A.O. Lantushenko

Comparative study on morphometrics of microalgae of the genus *Dunaliella* from hypersalted lakes of Crimea..... 662

INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2022 666

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА С ГРИБНЫМИ МЕЛАНИНАМИ

Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Багирова О.Ш.

Бакинский государственный университет

Ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0554

Аннотация. В работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами, выделенными из чаги бука лесного (*faqus sylvatica*) и из чаги березы (*betula*), которые проявляют высокую антиоксидантную активность. Меланины выделены методом щелочной экстракции и осаждением в кислой среде. Для идентификации выделенных пигментов зарегистрировали их ИК- и ЭПР-спектры. Комплексообразование ионов железа с данными меланинами изучено методом гамма – резонансной спектроскопии (ГРС). Установлено, что грибные меланины способны эффективно связывать ионы железа как в его двух, так и в трех – валентном состоянии. Существенно, что грибные меланины, подобно меланинам животного и растительного происхождения, способны непосредственно связывать прооксидантные ионы Fe^{2+} и окислять их до Fe^{3+} неактивного в прооксидантном отношении с последующим комплексообразованием. Активность этих процессов растет по мере увеличения pH реакционной среды и освещении суспензии видимым светом.

Ключевые слова: меланин, чага, комплексообразование с ионами железа, гамма – резонансная спектроскопия.

В наших ранних работах было изучено комплексообразование прооксидантных ионов Fe^{2+} с синтетическим L-ДОФА-меланином, с меланинами животного и растительного происхождения [1-3]. Пигменты меланинового ряда играют важную роль и в микробном мире, где их функции связаны, главным образом, с защитой клеток от различных повреждающих факторов внешней среды и, в первую очередь, солнечной радиации. Как и в случае меланинов животного и растительного происхождения, защитное действие меланиновых пигментов грибного происхождения связано как с пассивным экранированием от солнечной радиации, так и с активным подавлением фотоиндуцированного перекисного окисления липидов. Как было показано нами, в случае меланинов животного и растительного происхождения подавление ими процесса перекисного окисления липидов связано, в первую очередь, со связыванием ионов Fe^{2+} , являющихся катализаторами перекисного окисления липидов [4]. Можно полагать, что этот механизм является существенным и в случае пигментов грибного происхождения.

В представленной работе приводятся и обсуждаются результаты экспериментальных исследований комплексообразования ионов железа с меланинами, выделенными из чаги бука лесного (*faqus sylvatica*) и из чаги березы (*betula*) которые проявляют высокую антиоксидантную активность. Меланины из чаги бука лесного (ГМ 1) и из чаги березы (ГМ 2) выделяли по методике, приведенной в работе [5] с небольшой модификацией. Комплексы ионов железа с меланинами получали инкубированием свежесделанного меланина (18 мг сухого веса) в 10 мл $^{57}Fe SO_4$ концентрацией $c = 0,2$ мг/мл при комнатной температуре по ранее описанной методике [5]. Время инкубирования варьировали от 5 мин. до 2-х часов. Освещение суспензии проводили лампой накаливания (КГМ 24) с использованием водяного фильтра. Освещенность поверхности составляла $7 \cdot 10^4$ лк. Во избежание окисления ионов Fe^{2+} в слабокислой среде в исходный раствор добавляли гидроксиламин $((NH_2 OH)_2 H_2SO_4)$, сильно препятствующего агента образования окислов или гидроокислов железа. Предварительные опыты показали, что гидроксиламин не восстанавливает меланин. ГР – спектры изученных образцов регистрировали на установке, работающей в режиме постоянных ускорений. Источником резонансных гамма – квантов служил изотоп ^{57}Co в матрице Cr. Спектрометр откалибровали по ГР – спектрам α -Fe при комнатной температуре.

С целью идентификации полученных пигментов, регистрировали их ИК – и ЭПР – спектры. Анализ параметров ИК – и ЭПР – спектров показал, что они хорошо согласуются с имеющимися в литературе аналогичными данными [5]. Это дает основание полагать, что выделенные нами пигменты являются меланинами.

ГР – спектры изученных образцов при температуре 80 К, представлены на рисунке 1. В таблице 1 приведены параметры их ГР – спектров, а распределение ионов железа по формам в изученных системах в предположении равенства f' при 80 К представлены в таблице 2. Исходный раствор ($^{57}Fe SO_4$) и супернатанты имеют аналогичные ГР – спектры, представляющие собой четкий дублет с параметрами, характерными для аквакомплексов высокоспиновых (ВС) ионов Fe^{2+} . ГР – спектры осадков (комплексов), идентичны по формам. Это сложный ГР – спектр, состоящий, по крайней мере, из четырех парциальных спектров: двух дублетов и двух секстетов с уширенными линиями релаксационной природы. Более интенсивный широкий дублет, доля которого составляет 11–34% от общей площади спектра в зависимости от типа меланинов, характерен для ВС комплексов Fe^{2+} . Отличие их параметров, главным образом ΔE_Q , от параметров ГР -спектров исходного раствора указывает на связывание ионов Fe^{2+} грибными меланинами. Центральный узкий дублет по величине параметров характерен для парамагнитных ВС комплексов Fe^{3+} . Величины параметров секстетных парциальных спектров также характерны для ВС комплексов ионов Fe^{3+} .

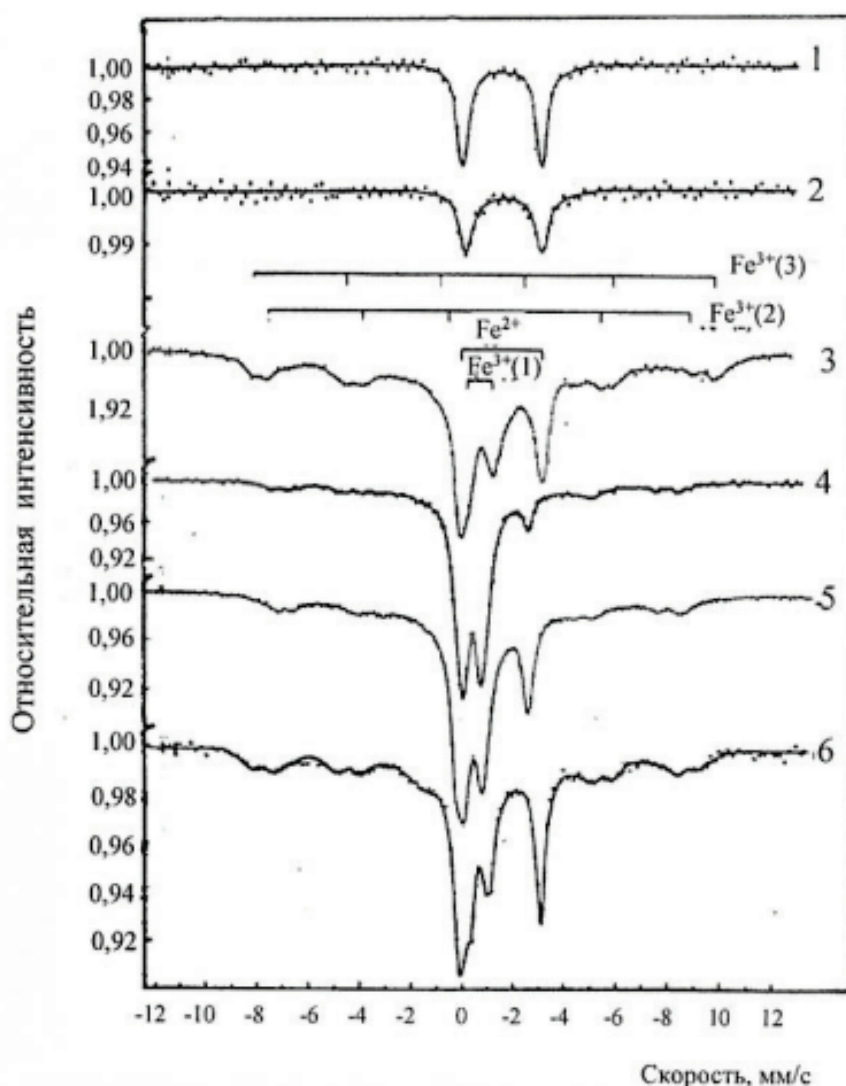


Рисунок 1. ГР – спектры излученных образцов (рН 5,7) при 80 К. 1 – исходный раствор $^{57}\text{FeSO}_4$, 2 – Супернатант после осаждения, 3 – комплекс $^{57}\text{FeSO}_4$ + L – ДОФА-меланин, 4 – $^{57}\text{FeSO}_4$ + МПГ, 5 – $^{57}\text{FeSO}_4$ + ГМ1, 6 – $^{57}\text{FeSO}_4$ + ГМ2. МПГ – меланопротеиновая гранула пигментной эпителии глаза

Как уже отмечалось, для дополнительного исключения возможного образования высокодисперсных окислов или гидроокислов Fe^{3+} , которые тоже могли бы дать размытый секстетный ГР – спектр, в исходный раствор добавляли гидроксилламин. Отмывка осадков (комплексов) и полученных в идентичных условиях окислов и гидроокислов ионов Fe^{3+} в растворе H_2SO_4 показала, что окислы и гидроокислы Fe^{3+} хорошо растворяются в H_2SO_4 при рН 2,5, в то время, как ионы Fe^{3+} в осадке не отмываются даже при значении рН 1,7. Наконец, сравнение параметров ГР – спектров осадков и образцов из высокодисперсных частиц окислов и гидроокислов ионов Fe^{3+} (суперпарамагнетизм) показало, что они достаточно отличаются [6,7]. Это позволяет полагать, что наблюдаемые секстетные парциальные спектры действительно относятся к комплексу ионов железа с грибными меланинами. Таким образом, грибные меланины подобно синтетическому L – ДОФА – меланину и меланинам животного и растительного происхождения способны образовывать комплексы с ионами железа как в двух, так и в трехвалентном состоянии. Причем, при взаимодействии с ионами Fe^{2+} грибные меланины частично окисляют их до Fe^{3+} с последующим комплексованием Fe^{2+} и Fe^{3+} . Величины параметров всех парциальных ГР – спектров указывают на октаэдрическое лигандное окружение ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в комплексе $^{57}\text{FeSO}_4$ + грибные меланины. Другими словами, в изученных комплексах меланины выступают как лиганды слабого поля.

Связывание ионов железа грибными меланинами, как и в случае синтетических меланинов, а также меланинов животного и растительного происхождения происходит, в основном, за первые 5 мин. инкубации. При дальнейшем инкубировании доля связанных ионов железа с грибными меланинами увеличивается незначительно.

Освещение суспензии видимым светом привело к незначительному дополнительному связыванию ионов железа. Сравнительный анализ параметров ГР – спектров изученных образцов, полученных в темноте и на свету, показал, что они почти одинаковы. Следовательно, можно полагать, что освещение суспензии видимым светом не приводит к сколь-нибудь существенному изменению способа координации ионов железа с меланинами и

искажению хелатного узла. Также следует отметить, что параметры парциальных ГР – спектров в комплексе ионов железа с грибными меланинами ГМ1 и ГМ2 заметно не отличается. Однако существенные различия обнаружены в способностях к связыванию ионов железа и соотношениях различных форм комплексов железа в образцах (табл. 2). ГМ2 по сравнению с ГМ1 в меньшей степени связывает ионы железа, а также в меньшей степени окисляет Fe до Fe.

Таблица 1. Параметры ГР – спектров замороженных растворов изученных образцов при температуре 80 К. (А – исходный раствор, В – супернатант после осаждения, С – комплекс (осадок))

№	образец	Fe ²⁺		Fe ³⁺ (1)		Fe ³⁺ (2)			Fe ³⁺ (3)		
		δI, мм/с	ΔE _{O₂} , мм/с	δI, мм/с	ΔE _{O₂} , мм/с	δI, мм/с	ΔE _{O₂} , мм/с	B _{ef} , T/	δI мм/с	ΔE _{O₂} , мм/с	B _{ef} , T/
⁵⁷ FeSO ₄ + L – ДОФА - меланин , pH 5 , 6											
1	A	1,27	3,38	-	-	-	-	-	-	-	-
2	B	1,29	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
3	C	1,34	3,14	0,54	0,82	0,68	0,19	50,0	0,53	0,38	54,8
⁵⁷ FeSO ₄ + МПГ , pH 5 , 8											
4	A	1,30	3,40	-	-	-	-	-	-	-	-
5	B	1,33	3,41	-	-	-	-	-	-	-	-
6	C	1,32	3,09	0,51	0,83	0,68	0,21	50,1	0,51	0,36	55,0
⁵⁷ FeSO ₄ + ГМ 1 , pH 5 , 7											
7	A	1,29	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B	1,27	3,35	-	-	-	-	-	-	-	-
9	C	1,31	3,11	0,50	0,88	0,65	0,22	50,7	0,53	0,34	55,1
⁵⁷ FeSO ₄ + ГМ 2 , pH 5 , 7											
10	A	1,29	3,39	-	-	-	-	-	-	-	-
11	B	1,26	3,33	-	-	-	-	-	-	-	-
12	C	1,32	3,08	0,52	0,86	0,64	0,24	50,2	0,52	0,32	55,4

*МПГ – меланопротеиновые гранулы пигментного эпителия глаза быка

Таблица 2. Распределение железа по формам в изученных системах по данным ГРС (А – исходный раствор ⁵⁷Fe SO₄; В – ⁵⁷Fe SO₄ + L – ДОФА – меланин, pH 5,6; С – ⁵⁷FeSO₄ + МПГ, pH 5,8; D – ⁵⁷FeSO₄ + ГМ 1, pH 5,7; E – ⁵⁷FeSO₄ + ГМ 2, pH 5,7)

№	образец	В системе			В растворе			В осадке				
		$\sum Fe$	$\sum Fe^{2+}$	$\sum Fe^{3+}$	$\sum Fe$	Fe ²⁺	Fe ³⁺	$\sum Fe$	Fe ²⁺	$\sum Fe^{3+}$	Fe ³⁺ (II)	Fe ³⁺ (M)
В темноте												
1	A	1,00	0,99	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
2	B	1,00	0,52	0,48	0,52	0,51	0,01	0,48	0,16	0,32	0,10	0,22
3	C	1,00	0,55	0,45	0,50	0,49	0,01	0,50	0,06	0,44	0,26	0,18
4	D	1,00	0,57	0,43	0,40	0,39	0,01	0,60	0,18	0,42	0,13	0,29
5	E	1,00	0,58	0,42	0,41	0,40	0,01	0,59	0,18	0,41	0,08	0,33
При освещении												
6	A	1,00	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B	1,00	0,53	0,47	0,39	0,38	0,01	0,61	0,15	0,46	0,22	0,24
8	C	1,00	0,53	0,47	0,43	0,42	0,01	0,57	0,09	0,45	0,12	0,31
9	D	1,00	0,54	0,46	0,38	0,37	0,01	0,62	0,17	0,45	0,13	0,32
10	E	1,00	0,55	0,45	0,39	0,38	1,01	0,61	0,17	0,44	0,09	0,35

Как известно, грибные меланины подобно меланинам животного и растительного происхождения являются сложным полимерным образованием, состоящим из мономерных единиц различной структуры. Они содержат в своем составе орто – хиноидные, орто – гидрохиноидные группы, amino- и имино-группы, а также карбоксильные – и карбонильные – группы, каждая из которых может участвовать в связывании ионов железа полимером [8].

Одновременное присутствие магнитной и дублетной парциальных ГР-спектров в образце, по-видимому, связано с неоднородным распределением железосвязывающих центров в полимере меланина. Для двух или более близкорасположенных ионов Fe^{3+} (например, они могут входить в состав полиядерных ($n \geq 2$) кластеров), благодаря быстрой релаксации, обусловленной эффективным спин-спиновым взаимодействием, будут наблюдаться дублетные парциальные ГР-спектры. В случае достаточно разделенных в пространстве ионов Fe^{3+} спин-спиновое взаимодействие сильно ослабится, и для таких структур будут наблюдаться релаксационные ГР-спектры с размытой сверхтонкой структурой. Секстет с эффективным магнитным полем ~ 55 Тл, по-видимому, соответствует ионам Fe^{3+} связанным с карбоксильными группами. Секстет с меньшим полем (~ 50 Тл) соответствует структурам, где в координации Fe^{3+} , наряду с COO^- группами полимера участвуют также amino- или имино-группы меланина.

Исходя из полученных данных, можно полагать, что все эти меланины содержат в своем составе аналогичные функциональные группы по отношению к связыванию ионов железа. Наблюдаемые отличия в ГР – спектрах комплексов ионов железа с этими лигандами, по – видимому, связаны со структурными особенностями меланинов. Так как в молекулах меланинов животного происхождения преобладают обычно индольные мономерные единицы, а в молекулах меланинов растительного и грибного происхождения – пирокатехиновые [9].

Таким образом, из полученных результатов следует, что грибные меланины способны эффективно связывать ионы железа как в его двух-, так и трехвалентном состоянии. Существенно, что грибные меланины подобно меланинам животного и растительного происхождения способны непосредственно связывать прооксидантные ионы Fe^{2+} и окислять их до Fe^{3+} неактивного в прооксидантном отношении с последующим комплексообразованием. Активность обоих этих процессов растет по мере увеличения pH реакционной среды и освещении суспензии видимым светом

Список литературы / References:

1. Багиров Р. М., Багирова О. Ш., Турабова Г.А. Комплексообразование ионов железа с фитомеланинами. *Proc. International Conf. "Modern trends in physics"*, Baku, 2017, с. 84-86. [Bagirov R.M., Bagirova O.Sh., Turabova G.A. Complex formation of iron ions with fitomelanins. *Proc. International Conf. "Modern trends in physics"*, Baku, 2017, pp. 84-86. (In Russ.)]
2. Рамазанов М.А., Багиров Р.М., Багирова О.Ш., Турабова Г.А. Изучение методом гамма – резонансной спектроскопии (ГРС) связывания ионов железа с растительными меланинами. *Journal of Radiation Researches*, 2018, т. 6, № 2, с. 219-224. [Ramazanov M.A., Bagirov R.M., Bagirova O.Sh., Turabova G.A. Gamma – resonance spectroscopic (GRS) study of iron ions binding by vegetable melanins. *Journal of Radiation Researches*, 2018, vol. 6, no. 2, pp. 219-224. (In Russ.)]
3. Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Турабова Г.А., Багирова О.Ш. Связывание ионов железа с меланинами растительного происхождения. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 2, с. 190-194. [Bagirov R.M., Bobrova E.Yu., Gafarova H.O., Turabova G.A., Bagirova O.Sh. The binding of iron ions with melanins of plant origin. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 2, pp.190-194. (In Russ.)]
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биохимических мембранах*. М.: Наука, 1972. [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Lipid peroxidation in biochemical membranes*. M.: Nauka, 1972. (In Russ.)]
5. Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф. Способ получения меланина из лузги подсолнечника и исследование его антиоксидантной активности. *Вестник Казанского технол. университета*, 2016, т. 19, № 15, с. 154-157. [Gracheva N.V., Zheltobryukhov V.F. Method of producing melanin from sunflower husk and the study of its antioxidant activity. *Vestnik of Kazan Technology University*, 2016, vol. 19, no. 15, pp. 154-157. (In Russ.)]
6. Фабричный П.Б., Похолок К.В. *Мессбауэровская спектроскопия и её применение для химической диагностики неорганических материалов*. М.: МГУ, 2012, 142 с. [Fabrichniy P.B., Pokholok K.V. *Mossbauer spectroscopy and its application for the chemical diagnosis of inorganic materials*. Moscow: MSU, 2012, 142 p. (In Russ.)]
7. Vertes A., Korecz L., Burger K. *Mossbauer spectroscopy*. Budapest: Akad. Kiado, 1979, 432 p.
8. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов. *Вопросы медицинской химии*, 1999, т. 45, № 1, с. 13-23. [Borschevskaya M.I., Vasilieva S.M. The development of ideas on biochemistry and pharmacology of melanin pigments. *Questions of Medical Chemistry*, 1999, vol. 45, no. 1, pp. 13-23. (In Russ.)]
9. Abbas M., Amico F.D., Morresi L. et al. Struktural, electrical and optical properties of melanin films. *European Physical Journal E*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 285-291.

COMPLEX FORMATION OF IRON IONS WITH FUNGAL MELANINS

Bagirov R.M., Bobrova E.Yu., Gafarova H.O., Bagirova O.Sh.

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: rafiqbagirov@list.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0554

Abstract. The paper presents and discusses the results of experimental studies of the complex formation of iron ions with melanins isolated from forest beech chaga (*faqus sylvatica*) and birch chaga (*betula*), which exhibit high antioxidant activity. Melanins were isolated by alkaline extraction and precipitation in an acidic medium. To identify the isolated pigments, their IR and EPR spectra were recorded. The complex formation of iron ions with these melanins was studied by the method of gamma-resonance spectroscopy (GRS). It has been established that fungal melanins are able to effectively bind iron ions both in their two- and three-valence states. It is significant that fungal melanins, like melanins of animal and plant origin, are able to directly bind prooxidant Fe^{2+} ions and oxidize them to prooxidant inactive Fe^{3+} with subsequent complexation. The activity of these processes increases as the pH of the reaction medium increases and the suspension is illuminated with visible light.

Key words: melanin, chaga, complexation with iron ions, gamma-resonance spectroscopy.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЯМР С ПАРАМАГНИТНЫМ ДОПИНГОМ ДЛЯ ОЦЕНКИ АПОПЛАСТНОГО ПЕРЕНОСА ВОДЫ В КОРНЯХ ИНТАКТНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

Суслов М.А.

Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН

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

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0555

Аннотация. В настоящей работе предложен методический подход на базе низкочастотного ЯМР с применением парамагнитного комплекса GdDTPA (соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты) для качественной оценки транспорта воды по апопластному (внеклеточному) пути в корнях интактных растений пшеницы. Данный подход заключается в измерении времён спин-спиновой релаксации намагниченности воды в корнях при одновременном инкубировании корней в растворе парамагнитного комплекса GdDTPA и воздействии на растения стрессового фактора. В ходе инкубирования корней данный комплекс распространяется только по апопластной системе корня и укорачивает времена релаксации воды апопласта, но при этом GdDTPA не проникает внутрь клеток и, соответственно, не изменяет времена релаксации внутриклеточной воды. Таким образом, по скорости снижения времён релаксации намагниченности апопластной воды, которая прямо зависит от интенсивности водного переноса по апопласту, можно определить относительный вклад водного переноса по апопласту корня в ходе стрессового воздействия. В качестве абиотического фактора, предположительно влияющего на перенос воды по апопласту корня, было использовано двукратное повышение концентрации углекислого газа в надземной части растений. С использованием данного методического подхода было показано, что повышение концентрации CO₂ в зоне листьев растений пшеницы до 800 ppm приводит к снижению скорости водного переноса по апопласту корня в 2-2,5 раза по сравнению с контролем при концентрации CO₂ 400 ppm.

Ключевые слова: транспорт воды в растениях, ядерный магнитный резонанс, время спин-спиновой релаксации, апопластный путь водного переноса, парамагнитный допинг.

Транспорт воды в растениях является одним из ключевых биофизических процессов, определяющих рост и продуктивность. Задача исследования транспорта воды в растениях относится к сложному классу задач изучения массопереноса, так как здесь необходимо учитывать параллельность протекания водных растворов, а также функционирование различных движущих сил, каналов и барьеров водного переноса. Согласно композитной модели транспорта воды в корне растений, имеются три параллельных пути транспорта воды и растворенных в ней веществ: апопластный, симпластный и трансмембранный [1]. Апопластный путь обеспечивает перенос воды по внеклеточному пространству объема ткани. Симпластный перенос из клетки в клетку обеспечивается через плазмодесмы без выхода молекул воды по внеклеточное пространство ткани. И, наконец, перенос трансмембранным путем связан с пересечением молекулами воды объема клеток с выходом через мембраны во внеклеточное пространство с последующим входом в другие клетки. Симпластный и трансмембранный пути, из-за сложности экспериментального разделения, зачастую объединяют в путь из клетки в клетку (cell-to-cell) [1]. Предполагается, что в ходе адаптации растений к изменению условий внешней среды и действию абиотических стрессов вклад этих путей в суммарный водный перенос может изменяться. Считается, что в условиях хорошей оводнённости и при высокой скорости транспирации преобладает апопластный путь радиального переноса воды в корне, обеспечивающий пассивный перенос воды по градиенту водного потенциала. Несмотря на малую объёмную долю (около 15%) вклад апопластного пути в суммарный водный перенос в корне может составлять более 50%. При изменении условий окружающей среды основным регуляторным компонентом на уровне водного переноса в корне является трансклеточный путь водного переноса через мембраны клеток, опосредованный, главным образом, аквапоринами.

В подавляющем большинстве работ исследование водного переноса в корнях сводится, в основном, к измерению гидравлической проводимости, отражающей суммарный водный перенос по тканям корня. Однако данный метод предполагает отсечение частей и органов растений и приводит к нарушению функционирования гидравлики всего растения. Недостаточность методов неразрушающего контроля является одной из главных причин торможения в решении проблемы транспорта воды. В связи с вышесказанным актуальной задачей внутри проблемы исследования транспорта воды в растениях является поиск методов и подходов для неинвазивной оценки вклада путей водного переноса в корне непосредственно при воздействии абиотических стрессов. В настоящей работе предложен методический подход на базе ЯМР с применением парамагнитного комплекса GdDTPA (соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты) для качественной оценки транспорта воды по апопластному (внеклеточному) пути в корнях интактных растений. Отличительной особенностью данной работы является использование техники низкочастотного ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и оригинальных климатических камер роста растений (рис. 1), сопряжённых с ЯМР оборудованием.



Рисунок 1. Климатические камеры роста растений с контролем температуры, относительной влажности воздуха и концентрации углекислого газа. Камеры имеют возможность сопряжения с ЯМР оборудованием и газовой системой для непрерывного исследования параметров водного переноса при одновременном воздействии на растения стрессовых факторов

Преимущество данного подхода по сравнению с имеющимися методами оценки гидравлической проводимости корня [2] заключается в том, что он позволяет в динамике исследовать параметры радиального водного переноса и вклад апопластного пути водного переноса в зоне всасывания корней интактных растений при контролируемых параметрах окружающей среды и внешнем воздействии. В качестве абиотического фактора, предположительно влияющего на перенос воды по апопласту корня, было использовано двукратное (до 800 ppm) повышение концентрации углекислого газа в надземной части растений. Оценка изменения интенсивности радиального водного переноса по апопласту корня была основана на измерении динамики магнитной релаксации внеклеточной (апопластной) воды в процессе проникновения во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA (парамагнитный допинг). Парамагнитный комплекс GdDTPA имеет широкое применение в качестве контрастанта в магнитно-резонансной томографии. Будучи парамагнетиком с высокой релаксационной способностью, данный комплекс достаточно хорошо проникает во внеклеточное пространство тканей корня и приводит к укорочению времён магнитной релаксации внеклеточной воды [3]. При этом цитоплазматическая мембрана не проницаема для GdDTPA, что ограничивает проникновение GdDTPA в клетки, и, следовательно, времена магнитной релаксации внутриклеточной воды остаются неизменными. Таким образом, по скорости снижения времён магнитной релаксации, в частности времени спин-спиновой релаксации апопластной воды вследствие распространения парамагнетика, можно качественно судить о скорости транспорта воды по апопласту корня. Для чистой воды затухание сигнала намагниченности является однокомпонентным, в то время как для корней затухание имеет как минимум два ярко выраженных компонента – быстроспадающий и медленноспадающий [3,4]. Инкубация корней в растворе парамагнетика, который не проникает внутрь клеток, приводит к изменению скорости затухания только начального, быстроспадающего участка затухания, что позволяет отнести этот участок затухания к внеклеточной (апопластной) воде. Соответственно медленно-затухающий участок релаксационной кривой, имеющий большую населённость и «не реагирующий» на парамагнетик, относится к внутриклеточной воде, где основную долю в сигнал вносит вакуолярная вода [4].

Для проведения эксперимента пробирку с контрольными или опытными растениями помещали в ЯМР зонд, не извлекая растения из климатической камеры и, соответственно, не нарушая параметров внешней среды. При этом в центре ЯМР зонда размещали зону всасывания корней. Далее, через отверстие в нижней части пробирки с помощью шприца в корневую среду вводили водный раствор парамагнетика (GdDTPA 20mM, pH 7). Сразу после этого в течение 20 минут регистрировали релаксационные затухания намагниченности воды от образца с шагом в 2 минуты. Затухания намагниченности воды в образце получали с использованием импульсной последовательности Карр-Парселла. Измерения проводили через сутки после повышения концентрации CO₂.

На рисунке 2 приведена динамика изменения времён спин-спиновой релаксации внутриклеточной (вакуолярной) и внеклеточной (апопластной) воды в ходе инкубации корней интактных растений пшеницы в контрольных условиях и в условиях повышенной концентрации атмосферного углекислого газа. В течение всего времени инкубации, которое составляло примерно 20 минут, времена релаксации внутриклеточной воды в корнях контрольных и опытных растений практически не изменялись (рис. 2, а). Это свидетельствует о том, что парамагнитный комплекс не проникает внутрь растительных клеток, по крайней мере, в течение приведённого времени инкубации. Для апопластной воды, напротив, времена релаксации начали снижаться практически сразу после начала инкубации корней растений в растворе парамагнетика, при этом скорость снижения в растениях под действием повышенной концентрации CO₂ была примерно в 2-2,5 раза ниже по сравнению с контролем (рис. 2, б).

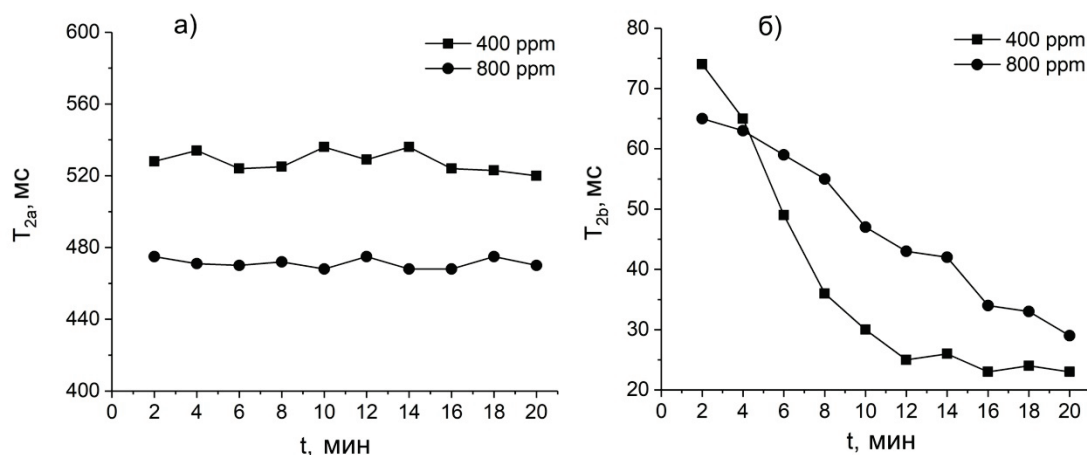


Рисунок 2. Динамика изменения времени спин-спиновой релаксации T_{2a} внутриклеточной воды (а) и времени спин-спиновой релаксации T_{2b} внеклеточной (апопластной) воды (б) в корнях интактных растений пшеницы в ходе инкубации корней в водном растворе парамагнитного комплекса GdDTPA в условиях нормальной (400 ppm) и повышенной (800 ppm) концентрации атмосферного углекислого газа

Объяснением этого может быть то, что повышение концентрации углекислого газа в атмосфере приводит к снижению скорости испарения воды с поверхности листьев за счёт закрытия устьиц (специализированных пор на поверхности листьев). В результате потребность растений в водопоглощении снижается, и, соответственно, снижается пассивный перенос воды и растворённого в ней парамагнетика по апопластной системе корня. Стоит обратить внимание на то, что значения времён релаксации внутриклеточной воды для контрольных растений при нормальной концентрации CO_2 400 ppm в течение всего времени инкубации в растворе парамагнетика были выше, чем для растений, подвергнутых воздействию повышенной концентрации CO_2 (рис. 2, а). Это может свидетельствовать о замедлении под действием повышенной концентрации CO_2 водного переноса также и по трансклеточному пути, так как более высокие значения времён спин-спиновой релаксации соответствуют более интенсивному межклеточному водообмену [4].

Таким образом, с использованием приведённого в работе методического подхода было показано, что повышение концентрации углекислого газа в зоне листьев растений пшеницы до 800 ppm приводит к снижению скорости водного переноса по апопласту корня приблизительно в 2-2,5 раза по сравнению с контролем при 400 ppm. Очевидным преимуществом представленного в работе методического подхода является то, что данный подход не предполагает повреждение растений, позволяет проводить измерения в динамике непосредственно при действии абиотических стрессов и при этом является менее трудоёмким, например, по сравнению с использованием флуоресцентных красителей [5]. В дополнение к этому метод позволяет осуществлять параллельное измерение физиологических параметров в листовой зоне растений, например, скорости транспирации и фотосинтеза, что может представлять ценность при исследовании координации корней и листьев растений в ходе адаптации к абиотическим стрессам. К недостаткам метода следует отнести невозможность полного и быстрого выведения парамагнетика из тканей растений и соответственно исключается возможность проведения повторных экспериментов на одних и тех же растениях.

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

Список литературы / References:

1. Kim Y.X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, no. 193, doi: 10.3389/fpls.2018.00193.
2. Sarker B., Hara M. Effects of elevated CO_2 and water stress on root structure and hydraulic conductance of *solanum melongena* l. *Bangladesh J. Bot.*, 2009, vol. 38, no. 1, pp. 55-63.
3. Anisimov A.V., Suslov M.A. Estimating the MRI contrasting agents effect on water permeability of plant cell membranes using the 1H NMR gradient technique. *Applied Magnetic Resonance*, 2021, vol. 52, no. 3, pp. 235-246, doi: 10.1007/s00723-021-01313-6.
4. Anisimov A.V., Suslov M.A. The effect of external gas pressure on the magnetic relaxation of water in plant cells. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 67-72, doi: 10.1134/S0006350916010024.
5. Vitali V., Sutka M., Ojeda L., Aroca R., Amodeo G. Root hydraulics adjustment is governed by a dominant cell-to-cell pathway in *Beta vulgaris* seedlings exposed to salt stress. *Plant Science*, 2021, vol. 306, doi: 10.1016/j.plantsci.2021.110873.

APPLICATION OF THE NMR METHOD WITH PARAMAGNETIC DOPING TO ESTIMATION THE
APOPLASTIC WATER TRANSFER IN THE ROOTS OF INTACT PLANTS UNDER IMPACT OF ABIOTIC
STRESSES

Suslov M.A.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS

Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0555

Abstract. In this work, the methodological approach based on low-field NMR using the GdDTPA paramagnetic complex for the qualitative assessment of water transport along the apoplastic (extracellular) pathway in the roots of intact wheat plants is proposed. This approach consists in measuring the spin-spin relaxation times of the water magnetization in the roots during simultaneous incubation of the roots in a solution of the paramagnetic Gd-DTPA complex and the impact of a stress factor on the plants. During root incubation, this complex spreads only along the root apoplast system and shortens the apoplast water relaxation times. GdDTPA does not penetrate into the cells and, accordingly, does not change the intracellular water relaxation times. Thus, the rate of decrease in the relaxation times of the magnetization of apoplast water, which directly depends on the intensity of water transfer through the apoplast, can be used to determine the relative contribution of water transfer through the root apoplast during stress exposure. A twofold increase in the concentration of carbon dioxide in the aerial parts of plants was used as an abiotic factor presumably influencing the transfer of water along the root apoplast. Using this methodological approach, it was shown that increase in the CO₂ concentration in the leaf zone of wheat plants to 800 ppm leads to decrease in the rate of water transfer through the root apoplast by 2–2.5 times compared with the control at ambient CO₂ concentration of 400 ppm.

Key words: water transport in plants, nuclear magnetic resonance, spin-spin relaxation time, apoplastic water transport pathway, paramagnetic doping.

ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* И В-ФИКОЭРИТРИНА В КУЛЬТУРЕ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* В УСЛОВИЯХ СВЕТОВОГО И УГЛЕРОДНОГО ЛИМИТИРОВАНИЯ

Ключкова В.С.¹, Лелеков А.С.², Гудвилович И.Н.²

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»

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

Поступила в редакцию 30.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0556

Аннотация. Исследовано влияние интенсивности света и потока углерода на продукцию хлорофилла *a* и В-фикоэритрина, а также их соотношения в накопительной культуре *Porphyridium purpureum*. Показано, что с увеличением интенсивности света (в 2 раза) и скорости подачи воздуха (в 2 раза) значение максимальной продуктивности возрастает почти в 2 раза, концентрации хл *a* – в 1,8 раз, а В-ФЭ – в 1,6 раз. Содержание хлорофилла *a* и В-фикоэритрина во всех опытных вариантах на 3–4 сутки эксперимента (начало линейной фазы роста) достигло максимального значения. При световом лимитировании содержания хл *a* и В-ФЭ в биомассе не изменяется, однако при высокой интенсивности света на линейной фазе роста наблюдается уменьшение. Соотношение В-ФЭ/хл *a* при различном световом и углеродном обеспечении в проведенном эксперименте практически не изменяется и в среднем составляет 12,8.

Ключевые слова: порфиридиум, хлорофилл *a*, В-фикоэритрин, концентрация, соотношение пигментов, интенсивность света, углекислый газ.

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли – это водные организмы, которые производят сложные органические соединения из неорганических молекул, используя углекислый газ в качестве источника углерода и солнечный свет для получения энергии. Свет является единственным источником энергии для их роста, а световые условия, в которых находятся микроводоросли, определяют все процессы биосинтеза, которые протекают в клетках. У микроводорослей выявлено три группы светособирающих и фотозащитных пигментов: хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеины (ФБП). Хлорофиллы – пигменты, которые улавливают энергию солнечного света и передают её на реакционные центры фотосинтеза. Каротиноиды могут передавать поглощенную энергию на хлорофилл и, кроме того, обладают фотопротекторными свойствами. Фикобилипротеины входят в состав фикобилисом и участвуют в чрезвычайно эффективной цепи передачи энергии на реакционный центр ФСII [1]. Известно, что вся поглощённая энергия передаётся на реакционные центры фотосинтеза, являющимися молекулами хлорофилла *a* (хл *a*). Например, у цианобактерии *A. platensis* хлорофилл *a* входит в структуру светособирающего комплекса (ССК): на одну молекулу реакционного центра в накопительной культуре в среднем приходится 120–180 молекул антенного хлорофилла *a*, при этом 95% хлорофилла связано с первой фотосистемой [2]. В состав фикобилисом красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* входят: В-фикоэритрин (В-ФЭ), R-фикоцианин (R-ФИЦ) и аллофикоцианин (АФИЦ). В прикладном аспекте наибольший интерес вызывает красный пигмент В-ФЭ, количество которого составляет около 85% от общей суммы ФБП. Относительное содержание В-ФЭ и его продукция варьируют в достаточно широком диапазоне в зависимости от условий культивирования *P. purpureum*, а скорость синтеза В-ФЭ может достигать 40–50 мг·л⁻¹·сут⁻¹ [3].

В литературе приводятся данные о влиянии концентрации углерода в среде (как в виде углекислого газа, так и в виде бикарбоната натрия) и интенсивности света на скорость роста, а также концентрацию и продукцию пигментов в культуре микроводорослей [1,4–6]. Однако для накопительной культуры *P. purpureum* в условиях углеродного и светового лимитирования, такого рода исследования немногочисленны и являются весьма актуальными, поскольку управление процессами её роста и синтеза пигментов является основой биотехнологии получения биологически ценных веществ.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось исследование влияния интенсивности света и потока углерода на продукцию хлорофилла *a* и В-ФЭ, а также их соотношения в накопительной культуре *P. purpureum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполняли на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь). Объектом исследования являлась красная морская микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross (*Rhodophyta*) из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ “Коллекция гидробионтов Мирового океана”.

Выращивание культуры *P. purpureum* проводили в накопительном режиме в культиваторах плоскопараллельного типа объёмом 1 л и толщиной слоя 2 см, используя среду для красных морских водорослей

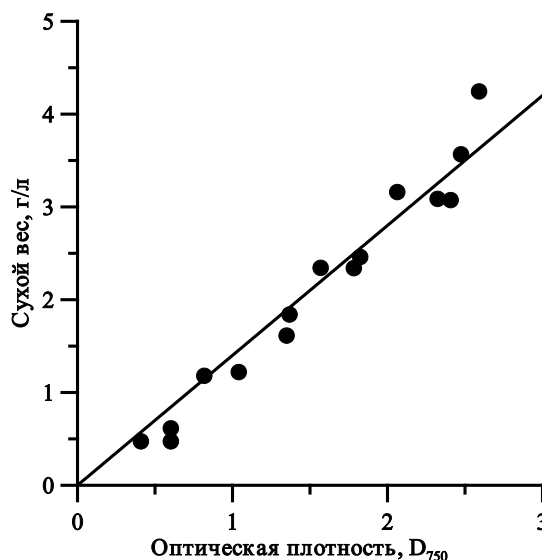


Рисунок 1. Зависимость сухого веса от оптической плотности накопительной культуры *P. purpureum*

[7]. В качестве источника освещения использовали световую решётку из холодных люминесцентных ламп Philips Daylight TL-D 54-765 6G мощностью 18 Вт. В трёх опытных вариантах (далее А, В, С) температуру культуры стабилизировали на уровне 25 ± 1 °С. Для варианта А средняя облучённость составляла $33 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$, а скорость подачи воздуха $1 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры в минуту; для В – $17 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ и $1 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры в минуту, для С – $17 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ и $0,5 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры в минуту. Барботаж осуществляли аквариумным компрессором Hailea ACO-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0,1 мм. Дополнительного введения углекислого газа не производилось.

Отбор проб для определения оптической плотности проводили с помощью дозатора Biohit 1 – 5 мл с разных точек внутри фотобиореактора: 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 определяли на фотометре Unicо-2100 при длине волны 750 нм. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. Кюветы (5 мм) располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить погрешность измерения оптической плотности культуры, связанную с светорассеянием. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (от 30 до 70% пропускания), пробу разбавляли дистиллированной водой. Для определения сухого веса 5 – 10 мл суспензии центрифугировали в течение 10 минут при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$, сливали надосадочную жидкость, осадок промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали и сушили в течение суток при 60 °С. На рисунке 1 представлена линейная зависимость сухого веса от оптической плотности D_{750} , коэффициент пропорциональности составил $k = 1,4 \text{ г} \cdot \text{СВ} \text{ л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. плг}^{-1}$ ($R^2 = 0,99$).

Пробы для определения содержания В-фикоэритрина и хлорофилла *a* отбирали ежедневно на различных фазах роста накопительной культуры после тщательного перемешивания. Образцы центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, помещали в морозильную камеру при – 18 °С. Содержание В-фикоэритрина и хлорофилла *a* определяли спектрофотометрическим методом согласно [8]. Для этого проводили экстракцию фосфатным буфером (0,05 М; pH = 7–7,5) для В-ФЭ и 100% раствором ацетона в воде для хл *a*. Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400 – 800 нм с шагом 0,1 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-фикоэритрина (545 нм) и хлорофилла *a* (680 нм), а также при 750 нм (для учёта неспецифического поглощения раствора). Концентрацию В-ФЭ определяли по [9], а хл *a* [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке 2 представлены накопительные кривые роста *P. purpureum*. Начальная плотность культуры во всех опытных вариантах в среднем составляла $0,4 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$. Через 9 суток для всех вариантов эксперимента биомасса достигла максимальных значений: для варианта А она увеличилась в 11 раз, для варианта В – в 9,5 раза, а для варианта С – в 7 раз.

Через 8 суток для варианта А биомасса достигла максимального значения $4,5 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$; для В – $3,8 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$; для С – $2,9 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$.

Используемая питательная среда рассчитана на получение 4 г биомассы микроводоросли *P. purpureum* с 1 л культуры [7,11]. Таким образом, в вариантах А и В минеральные элементы питания среды были близки к исчерпанию.

Для определения влияния интенсивности света и потока углерода на скорость накопления биомассы и основных фотосинтетических пигментов удобно использовать продукционные характеристики роста: максимальную удельную скорость – в экспоненциальной фазе, а также максимальную продуктивность – на

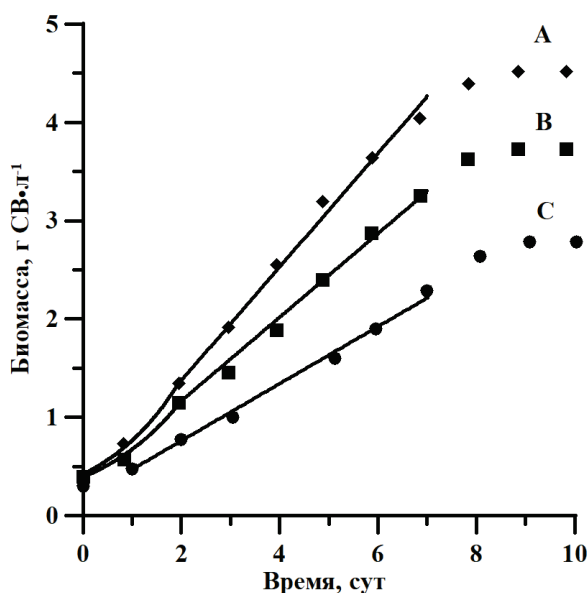


Рисунок 2. Накопительные кривые роста культуры *P. purpureum*: ♦ – 33 Вт·м⁻², продувка – 1 л/л·мин⁻¹; ■ – 17 Вт·м⁻², продувка – 1 л/л·мин⁻¹; ● – 17 Вт·м⁻², продувка – 0,5 л/л·мин⁻¹. Сплошные линии – аппроксимации экспоненциальной (0–2 сутки) и линейной (2–7 сутки) фаз. Значения коэффициентов в таблице 1

линейном участке накопительной кривой. Чтобы определить данные параметры, была проведена аппроксимация соответствующих фаз роста (рис. 2) следующими уравнениями [12]:

$$B = B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t},$$

$$B = B_l + P_m \cdot (t - t_l),$$

где B_0 – начальная плотность культуры, г СВ·л⁻¹; μ_m – максимальная удельная скорость роста, сут⁻¹; B_l – плотность культуры момент начала линейного роста; P_m – максимальная продуктивность, г СВ·(л·сут)⁻¹.

Анализируя данные, представленные в таблице 1, можно сделать вывод о том, что поток CO₂, а также количество световой энергии, приходящейся на освещаемую поверхность культиватора, оказывают влияние на продукционные характеристики *P. purpureum*. Значение μ_m для варианта В составило 0,55 сут⁻¹. С ростом облучённости в 2 раза эта величина достигла 0,59 сут⁻¹. Согласно [12], в экспоненциальной фазе роста единственным лимитирующим фактором является световой поток, так как минерального и газового субстрата ещё достаточно для роста клеток. По-видимому, в варианте С, при 17 Вт·м⁻² и 0,5 л·(л·мин)⁻¹ потока CO₂ было недостаточно для достоверного экспоненциального роста культуры, линейная фаза начиналась с первых суток эксперимента. Следует отметить, что по [13], насыщающая облучённость, при которой удельная скорость роста достигает максимума 0,08 – 0,09 ч⁻¹, составляет около 50 Вт·м⁻² для *P. purpureum*. В проведённом эксперименте для варианта А поверхностная облучённость была в 1,5 раза меньше, чем насыщающая, однако полученное значение μ_m , равное 0,02 ч⁻¹ в 4 раза меньше, чем указано в [13]. Отметим, что максимальные скорости могут быть реализованы только при условии стабилизации биохимического состава клеток в плотностате. Для накопительной культуры с ростом плотности микроводорослей происходит изменение пигментного и биохимического состава клеток. Эти изменения вызваны метаболическим [14], либо энергетическим лимитированием продуктивности [15].

В линейной фазе роста лимитирующими факторами являются свет или углекислый газ [12]. Так в варианте С, при 17 Вт·м⁻², максимальная скорость роста культуры была ограничена потоком углерода, её значение составило 0,29 г СВ·(л·сут)⁻¹. С увеличением интенсивности света (в 2 раза) и скорости продувки воздуха (в 2 раза) в варианте А значение максимальной продуктивности возросло почти в 2 раза до 0,57 г СВ·(л·сут)⁻¹. Наблюдаемое увеличение может быть объяснено как увеличением концентрации углерода в среде (в результате увеличения объёма подаваемого воздуха), так и повышенным поглощением CO₂ культурой с ростом

Таблица 1. Продукционные характеристики накопительной культуры *P. purpureum* при различном световом и углеродном обеспечении

Варианты	μ_m , сут ⁻¹	P_m , г СВ·(л·сут) ⁻¹
А	0,59	0,57
В	0,55	0,42
С	–	0,29

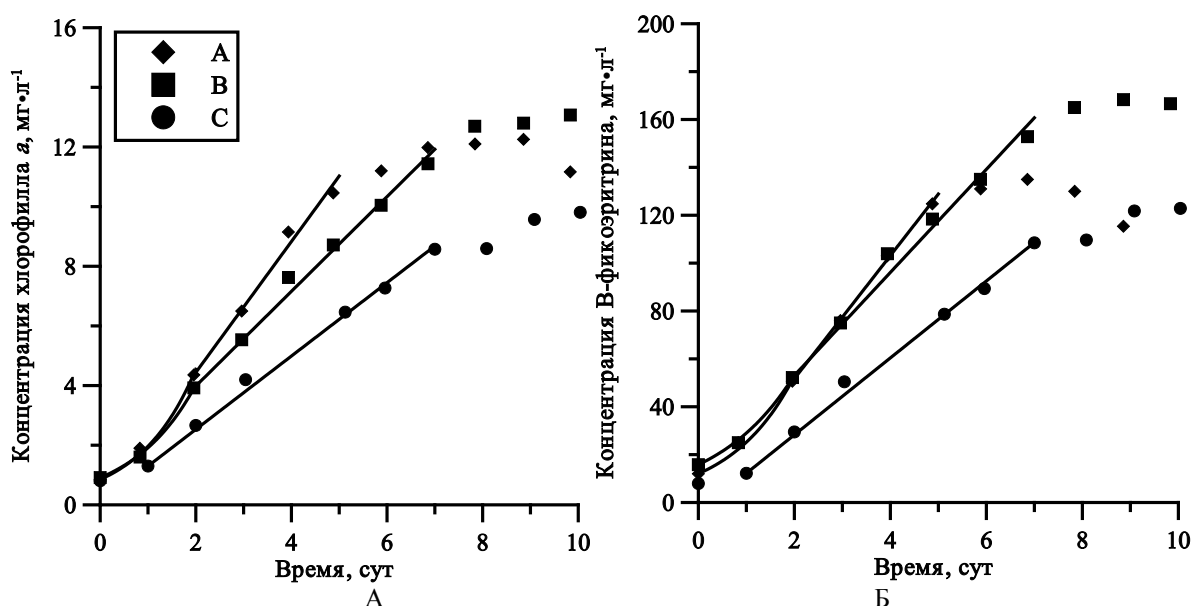


Рисунок 3. Динамика концентрации хлорофилла *a* (А) и В-фикоэритрина (Б) накопительной культуры *P. purpureum*. Сплошные линии – аппроксимации экспоненциальной (0 – 2 сутки) и линейной (2 – 7 сутки) фаз. Значения коэффициентов в таблице 2

интенсивности света. Известно, что некоторые виды микроводорослей [16] накапливают биогенные элементы в избытке (фосфор, углерод и т.д.) в своих внутриклеточных пулах для их последующего использования в период лимитирования. Однако при более высокой концентрации углекислого газа скорость биофиксации CO₂ снижается, поскольку среда для культивирования становится более кислой и неблагоприятной для роста микроводорослей, что приводит к тому, что микроводоросли оказываются в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Согласно предложенным ранее базовым принципам моделирования роста культур микроводорослей [17], скорость синтеза биомассы в простейшем случае прямолинейно зависит от количества квантов света, поступающих на одну молекулу ключевого комплекса за время его оборота. Это обусловлено тем, что при увеличении концентрации клеток в фотобиореакторе происходит затенение одних клеток другими, что приводит к уменьшению количества поглощаемой световой энергии на клетку. Таким образом, скорость роста будет определяться поверхностной освещённостью культуры, её оптической плотностью и коэффициентом поглощения света. В свою очередь коэффициент поглощения определяется спектральными свойствами источника света и концентрацией светопоглощающих пигментов. На рисунке 3 представлена динамика концентрации фотосинтетических пигментов накопительной культуры *P. purpureum*. Начальная концентрация хлорофилла *a* во всех опытных вариантах составляла примерно 0,8 мг·л⁻¹, В-фикоэритрина – 7,9 мг·л⁻¹.

По данным таблицы 2 можно сказать, что характер изменения концентрации хлорофилла *a* и В-фикоэритрина при варьировании света и потока CO₂ аналогичен изменению биомассы *P. purpureum*. В случае варианта С, где скорость потока CO₂ была минимальна, продукция хл *a* и В-ФЭ была также минимальна: 1,23 и 16,06 мг·(л·сут)⁻¹ соответственно. При увеличении интенсивности света и потока углекислого газа в 2 раза, P_m для хл *a* в варианте А увеличилась в 1,8 раз, а для В-ФЭ – в 1,6 раз. Следует отметить, что на 5 сутки эксперимента в варианте А концентрация обоих пигментов начала уменьшаться, в то время как, в В и С после 6 суток концентрация пигментов не изменялась, что соответствует стационарной фазе. Это может быть связано с тем, что из-за большей интенсивности света (33 Вт·м⁻²) и скорости подачи углерода (1 л·л⁻¹ культуры в минуту) запас азота в среде был уже исчерпан, что подтверждается литературными данными [6].

Относительное содержание пигментов в клетках или биомассе микроводорослей является не только непостоянной величиной и может изменяться в десятки раз, но и характеризуется значительной нелинейностью в процессе роста культуры. Кроме того, постоянство продуктивности культуры обусловлено гиперболическим уменьшением содержания хлорофилла *a* [18]. На рисунке 4 представлена динамика содержания хлорофилла *a* и В-фикоэритрина для разных опытных вариантов. Содержание хлорофилла *a* (рис. 4А) во всех опытных вариантах

Таблица 2. Максимальная удельная скорость синтеза и продукция фотосинтетических пигментов культуры *P. purpureum* при различном световом и углеродном обеспечении

Вариант	Хлорофилл <i>a</i>		В-фикоэритрин	
	μ_m , сут ⁻¹	P_m , мг·(л·сут) ⁻¹	μ_m , сут ⁻¹	P_m , мг·(л·сут) ⁻¹
А	0,83	2,20	0,74	25,71
В	0,74	1,58	0,60	21,52
С	–	1,23	–	16,06

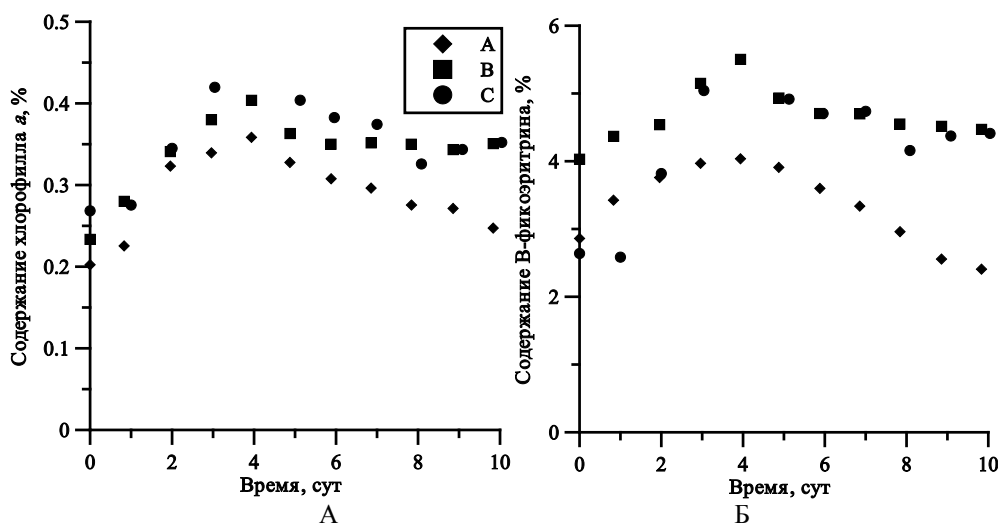


Рисунок 4. Динамика относительного содержания хлорофилла *a* и В-фикоэритрина в накопительной культуре *P. purpureum*

на 3–4 сутки эксперимента (начало линейной фазы роста) достигло максимального значения: в варианте А – 0,36%; в В – 0,40%; в С – 0,42%. В случае В и С, доля хлорофилла *a* от сухой биомассы далее стабилизировалась на уровне 0,35%, а в варианте А при 33 Вт·м⁻² наблюдается резкое снижение до значения 0,25%. В случае варианта С на 0–3 сутки наблюдается резкий скачок содержания В-фикоэритрина с 2,58 до 5,04% (рис. 4Б). В вариантах В и А максимум наступил на 4 сутки и составил 5,50% и 4,04% соответственно. При 33 Вт·м⁻² (А) наблюдается резкое снижение доли В-фикоэритрина с 4,04 до 2,41%. Это связано с переходом культуры на стадию замедления роста и стационарную, где концентрация основных биогенных элементов в питательной среде, по-видимому, была исчерпана. То есть, можно сказать, что при большом количестве света (33 Вт·м⁻²), а также при наличии потока углерода, значения содержания хлорофилла *a* и В-фикоэритрина меньше, чем при 17 Вт·м⁻², и при достижении своего максимума идёт на постепенное снижение. Также следует отметить, что при световом лимитировании наличие СО₂ не оказывает существенного влияния на содержание хл *a* и В-ФЭ. Признано, что содержание в клетках *P. purpureum* фотосинтетических пигментов, особенно В-ФЭ, ввиду его локализации в антеннах, может являться чувствительным индикатором уровня освещённости клеток [19,20]. Снижение содержания В-ФЭ, входящего в светособирающие комплексы ФС II, в клетках *P. purpureum* к 4-м суткам в варианте А с повышенной интенсивностью света до крайне низких величин на фоне остановки роста культуры, указывает на серьёзные нарушения процессов биосинтеза в клетках, что может приводить даже к гибели культуры. Повышение освещённости вместе с лимитом азота вызывает снижение относительного содержания светособирающего пигмента-белка.

Изменение световых условий и углеродного обеспечения в культуре *P. purpureum* отражалось не только на содержании фотосинтетических пигментов в биомассе, но и соотношении В-фикоэритрина и хлорофилла *a* (рис. 5).

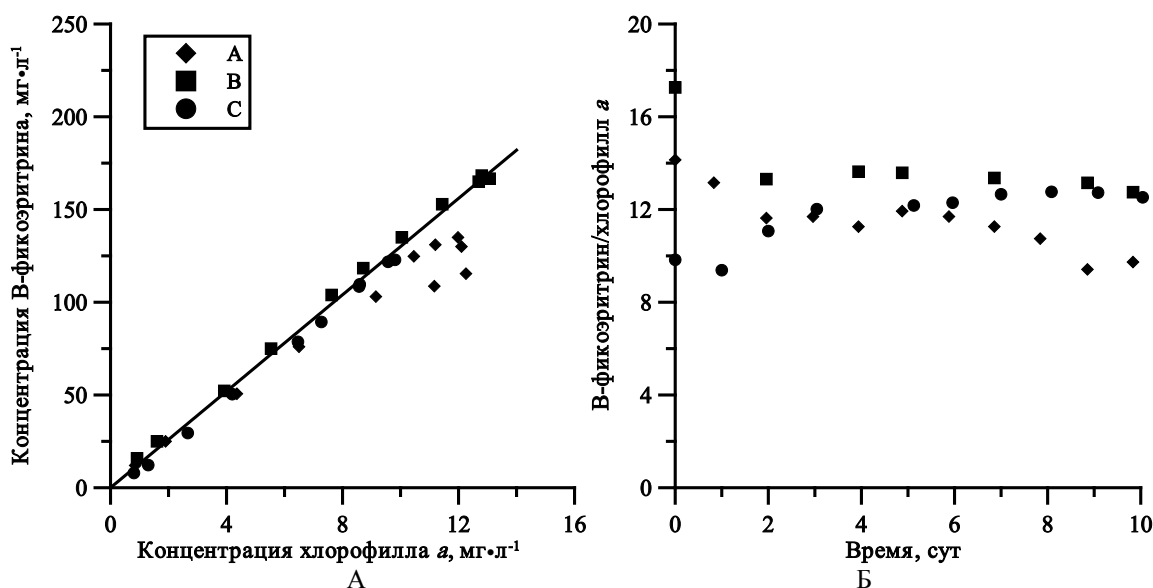


Рисунок 5. А – Зависимость концентрации В-фикоэритрина от хлорофилла *a*; Б – динамика соотношений В-ФЭ/хл *a* накопительной культуры *P. purpureum*

Показано, что в проведённом эксперименте зависимости содержания В-ФЭ от концентрации хл *a* культуре *P. purpureum* имеют линейный характер для всех вариантов. Анализируя рисунок 5Б, можно отметить, что в области линейной фазы роста (2–8 сутки) в опытных вариантах В и С, т. е. при 17 Вт·м⁻², соотношение В-ФЭ/хл *a* существенно не изменяется. В варианте С эта величина составляет 12,27, а при увеличении потока углекислого газа в 2 раза (вариант В) – 13,30. С увеличением освещённости до 33 Вт·м⁻² (вариант А) наблюдается постепенное понижение соотношения В-ФЭ/хл *a* после 6-х суток эксперимента, что совпадало с переходом культуры на стационарную фазу роста и исчерпанием нитратов в среде. Полученные результаты подтверждают сведения о том, что В-ФЭ у *P. purpureum* является более чувствительным к изменяющимся условиям среды, особенно к содержанию азота, по сравнению с более стабильным хл *a*, а увеличение концентрации углерода в среде приводит к повышению уровня данного пигмента [19,21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовано влияние интенсивности света и скорости потока углекислого газа на концентрацию хлорофилла *a* и В-фикоэритрина в накопительной культуре *P. purpureum*. Показано, что при 17 Вт·м⁻² и скорости подачи воздуха 1 л·л⁻¹ культуры в минуту наблюдается более высокая скорость синтеза и продукция пигментов, по сравнению с другими опытными вариантами. При высокой интенсивности света на линейной фазе роста наблюдается уменьшение содержания хл *a* и В-ФЭ в биомассе в то время, как при световом лимитировании эта величина практически не изменяется. Следует отметить, что соотношение В-ФЭ/хл *a* при различном световом и углеродном обеспечении в проведённом эксперименте практически не изменяется и в среднем составляет 12,8.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме "Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса" № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Cunningham F.X., Dennenberg R.J., Mustardy L., Jursinic P.A., Gantt E. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1179-1187, doi: 10.1104/pp.91.3.1179.
2. Lestari Retno A.S., Nurlaili E.P., Priyono K. The effect of carbon dioxide concentration and the dimension of photobioreactor on the growth of microalgae *Nannochloropsis sp.* *AIP Conference*, 2019, vol. 2097, p. 030109, doi: 10.1063/1.5098284.
3. Боровков А.Б., Гудвиллович И.Н., Новикова Т.М., Климова Е.В. Продукционные характеристики полупроточной культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross при низкой освещённости. *Морской биологический журнал*, 2022, т. 7, № 1, с. 3-13. [Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Novikova T.M., Klimova E.V. Production characteristics of the semi-flowing culture *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross under normal illumination. *Marine Biological Journal*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 3-13, doi: 10.21072/mbj.2022.07.1.01. (In Russ.)]
4. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011, 152 с. [Zavorueva E.N., Zavoruev V.V., Krum S.P. *Lability of the first photosystem of phototrophs under various environmental conditions*. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2011, 152 p. (In Russ.)]
5. Xu Y., Shanshan W., Shengxin N., Jinglong L. A study on the synthesis and accumulation of phycoerythrin in *Porphyridium purpureum*. *AIP Conference*, 2019, vol. 2110, p. 020028, doi: 10.1063/1.5110822.
6. Гудвиллович И.Н., Лелеков А.С., Мальцев Е.И., Куликовский М.С., Боровков А.Б. Рост культуры *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) и продукция В-фикоэритрина при различной освещённости. *Физиология растений*, 2021, т. 68, № 1, с. 103-112. [Gudvilovich I. N., Lelekov A. S., Maltsev E. I., Kulikovskiy M. S., Borovkov A. B. Growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) culture and production of B-phycoerythrin under different illumination. *Physiology of plants*, 2021, vol. 68, no. 1, pp. 103-112, doi: 10.31857/S0015330320060056. (In Russ.)]
7. 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. *Proceedings of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. Biological Sciences Series*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 75-82. (In Russ.)]
8. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975, 247 с. [Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice. Kyiv: Nauk. Dumka, 1975, 247 p. (In Russ.)]
9. Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. *Биологическая химия*. М.: Мир, 1990, 196 с. [Stadnichuk I.N. *Phycobiliproteins. Biological chemistry*. M.: Mir, 1990, 196 p. (In Russ.)]
10. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, UNESCO, 1997, 661 p.
11. Упитис В.В., Пакалне Д.С., Шульце И.Ф. Оптимизация минерального питания красной морской водоросли *Porphyridium cruentum*. *Известия АН Латвийской ССР*, 1989, т. 505, № 8, с. 95-104. [Upitis V.V.,

- Pakalne D.S., Schulce I.F. Optimization of the mineral nutrition of the red seaweed *Porphyridium cruentum*. *Proceedings of the Academy of Sciences of the Latvian SSR*, 1989, vol. 505, no. 8, pp. 95-104. (In Russ.)]
12. 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.)]
 13. Беянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. *Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей*. Новосибирск: Наука, 1980, с. 136. [Belyanin V.N., Sidko F.Ya., Trenkenshu A.P. *Energy of photosynthetic microalgae culture*. Novosibirsk: Science, 1980, 136 p. (In Russ.)]
 14. Sanchez-Saavedra M.P., Castro-Ochoa F.Y., Nava-Ruiz V.M. et al. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Phycol*, 2017, doi: 10.1007/s10811-017-1284-2.
 15. Sathong S., Saego K., Kitrunloadjanaporn P., Nuttavut N. Modeling the effects of light sources on the growth of algae. *Sathong et al. Advances in Difference Equations*, 2019, doi: 10.1186/s13662-019-2112-6.
 16. Liang Y., Sarkany N., Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 2009, vol. 31, pp. 1043-1049, doi: 10.1007/s10529-009-9975-7.
 17. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 1, с. 53-60. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Marine biological journal*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 53-60. (In Russ.)]
 18. Лелеков А.С., Чернышев Д.Н., Ключкова В.С. Количественные закономерности роста накопительной культуры *Arthrospira platensis*. *Математическая биология и биоинформатика*, 2022, т. 17, № 1, с. 156-170. [Lelekov A.S., Chernyshev D.N., Klochkova V.S. Quantitative patterns of growth of the accumulative culture *Arthrospira platensis*. *Mathematical biology and bioinformatics*, 2022, vol. 17, no. 1, pp. 156-170. (In Russ.)]
 19. Velea S., Ilie L., Filipescu L. Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: light and sodium bicarbonate. *U.P.B. Sci. Bull. Univ. "Politeh." Bucharest, Ser. B*, 2011, vol. 73, p. 81.
 20. Algarra P., Ruediger W. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell Environ*, 1993, vol. 16, p. 149, doi: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00856.x.
 21. 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. *Mar. Drugs*, 2019, vol. 17, p. 124, doi: 10.3390/md17020124.

DYNAMICS OF THE CONCENTRATION OF CHLOROPHYLL A AND B-PHYCOERYTHRIN IN CULTURE *PORPHYRIDIMUM PURPUREUM* IN CONDITIONS OF LIGHT AND CARBON LIMITATION

Klochkova V.S.¹, Lelekov A.S.², Gudvilovich I.N.²

¹ Sevastopol State University

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

² Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

Received 30.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0556

Abstract. The effect of light intensity and carbon flux on the production of chlorophyll a and B-phycoerythrin, as well as their ratios in the batch culture of *Porphyridium purpureum*, has been studied. It is shown that with an increase in light intensity (by 2 times) and air supply speed (by 2 times), the value of maximum productivity increases by almost 2 times, the concentration of chl a – by 1.8 times, and B-PE – by 1.6 times. The content of chlorophyll a and B-phycoerythrin in all experimental variants on the 3rd – 4th day of the experiment (the beginning of the linear growth phase) reached the maximum value. With light limiting, the content of chl a and B-PE in the biomass does not change, however, with high light intensity, a decrease is observed in the linear growth phase. The ratio of B-PE/chl a with different light and carbon support in the experiment practically does not change and averages 12.8.

Key words: *porphyridium, chlorophyll a, B-phycoerythrin, concentration, ratio of pigments, light intensity, carbon dioxide.*

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ НА ТЕМПЕРАТУРНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

Тимченко Н.Н., Головченко И.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 07.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0557

Аннотация. Использование в медицинской практике методов консервирования крови при низких температурах обуславливает необходимость исследований влияния температуры на гемоглобин. Исследовано влияние замораживания-оттаивания до температуры жидкого азота -196°C и последующего оттаивания на гемоглобин А, при этом использовали методы температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа первых производных спектров поглощения. После замораживания-оттаивания раствора гемоглобина А наблюдается сглаживание изломов на S-образной температурной зависимости интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров при 286 нм. Вероятно, это означает, что сглаживаются, становятся менее заметны температурно-зависимые конформационные изменения в молекуле гемоглобина А. Следует отметить, что после замораживания-оттаивания сохраняется S-образная форма этой зависимости, т.е. конформационные изменения имеют место, но они менее выражены, чем до замораживания-оттаивания. С одной стороны, замораживание раствора гемоглобина А приводит к конформационным изменениям молекулы гемоглобина А, затрагивающим полярные области, а именно, к увеличению доступности растворителю полярных областей, что согласуется с данными о частичном разворачивании глобулы белка, сопровождающемся экспонированием ароматических аминокислот глобина в растворитель и с данными о том, что процесс замораживания-оттаивания ведёт в большинстве случаев к конформационным изменениям белка, которые состоят в ослаблении молекулы и увеличении доступности активных участков белка. С другой стороны, замораживание растворов гемоглобина А приводит к компактизации субъединиц молекулы гемоглобина А. Вероятно, это можно объяснить тем, что предположительно, увеличение доступности растворителю поглощающих хромофоров молекулы гемоглобина А, располагающихся в полярных областях, приводит к тому, что компактизуются другие части молекулы гемоглобина А, не участвующие в увеличении доступности аминокислотных остатков растворителю. То есть одни части молекулы гемоглобина А становятся более доступными растворителю, а другие при этом компактизуются.

Ключевые слова: гемоглобин, конформационные изменения, температура.

Температурное поведение Hb можно рассматривать в отдельных температурных областях, при отрицательных и низких и высоких положительных температурах. При низкотемпературном воздействии одним из повреждающих факторов является концентрирование солей. Имеются данные о том, что белки диссоциируют в растворах солей. В литературе описаны результаты исследования влияния солей на состояние выделенного и внутриэритроцитарного гемоглобина. В работе при исследовании раствора выделенного гемоглобина методами светорассеяния и седиментации было обнаружено, что в концентрированных растворах солей (2М цитрат натрия, К-фосфатный буфер, хлорид калия, хлорид натрия, pH 6,8) молекула гемоглобина человека диссоциирует – распадается на димеры. Этими же авторами в работе было изучено (при pH 6,9, исходной ионной силе растворов гемоглобина $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$) влияние солей на сродство гемоглобина к кислороду и степень кооперативности взаимодействия субъединиц тетрамера гемоглобина (n). Показано, что при всех исследованных концентрациях различных солей ($1 \cdot 10^{-4}$ –2М) n увеличивалось и не зависело от ионного состава среды. Определено, что при концентрациях от меньших до сравнительно близких к физиологической ($1 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-1}\text{M}$), сродство гемоглобина к кислороду уменьшается с увеличением концентрации соли и зависит от ионного состава соли. Расположение в ряду цитрат натрия > хлорид калия – К-фосфатный буфер > сульфат натрия > хлорид натрия > трис-HCl буфер означает, что трис-HCl буфер меньше всех, а цитрат натрия наиболее уменьшает сродство гемоглобина к кислороду при увеличении концентрации солей в указанном диапазоне. При концентрациях, больших, чем $3 \cdot 10^{-4}$ сродство гемоглобина к кислороду еще сильнее зависит от ионного состава соли и может либо увеличиваться, либо уменьшаться с увеличением ионной силы. Так, например, при увеличении концентрации К-фосфатного буфера от 0,3 до 2М сродство гемоглобина к кислороду увеличивается. Авторами делается предположение, что эти результаты связаны с данными работы о диссоциации гемоглобина на димеры в концентрированных растворах солей и поэтому считают, что явление диссоциации гемоглобина на димеры может существовать и при низких концентрациях соли, хотя при этом ситуация осложняется различными факторами.

В работе показано, что степень кооперативности взаимодействия субъединиц эмбриональных гемоглобинов Portland, Gower I (zeta 2 gamma) и Gower II (alpha 2 epsilon 2) существенно не зависит от концентрации ионов хлора. Каждый из этих трех эмбриональных гемоглобинов имеют индивидуальную зависимость сродства к кислороду от концентрации ионов хлора. Гемоглобин Portland полностью не чувствителен к концентрации ионов хлора, гемоглобин Gower I проявляет небольшую концентрационную зависимость, в то время как гемоглобин

Gower II проявляет зависимость от концентрации ионов хлора близкую к той, что имеет гемоглобин А. В работе даны сведения о том, что при концентрациях, меньших физиологической, фетальный гемоглобин по сравнению с гемоглобином А обладает сниженным сродством к ионам хлора.

Авторы работы изучали влияние натрия хлорида на свойства гемоглобина в эритроцитах кошек, кроликов и крыс. Было обнаружено, что даже при использовании для отмывки эритроцитов изотонической 0,85% концентрации натрия хлорида уменьшается величина рН гемолизата и сродства гемоглобина к кислороду, отмечены непараллельность этих изменений, повышение эффекта Бора. Показано, что сила влияния ионов хлора на сродство гемоглобина к кислороду почти на порядок больше силы влияния на рН. Высказано предположение, что к стандартному влиянию рН дополняется действие ионов хлора. В работе было продолжено изучение влияния ионов на свойства гемоглобина крыс и показано, что при отмывке эритроцитов растворами хлорида кальция, сульфата магния и глюкозы изменяется рН, а в растворе глюкозы снижается сродство гемоглобина к кислороду до уровня, близкого к полученному в эксперименте с натрием хлоридом. Авторами делается вывод об опосредованном и неспецифическом влиянии электролитов через мембрану эритроцитов на кислородсвязывающую способность гемоглобина путем изменения его буферных свойств.

В работе при исследовании спектров ЭПР гемоглобина, ковалентно меченого радикалом I, показано, что добавление соли Na_2CO_3 к раствору гемоглобина при комнатной температуре приводит к значительному увеличению подвижности спиновой метки, что связано с расхождением субъединиц при крайне щелочных значениях рН раствора; при добавлении NaCl и NaH_2PO_4 происходит заметная иммобилизация метки (связанная, по-видимому, с электростатическими эффектами), что говорит о компактизации субъединиц белка при таком солевом составе.

В процессе определения влияния различных концентраций натрия хлорида на состояние внутриэритроцитарного гемоглобина человека методом дифференциальной спектрофотометрии установлено, что в концентрированных растворах натрия хлорида изменяется конформация гемоглобина в результате как влияния концентрации солей, так и изменения состава внутриклеточной среды, и, вероятно, концентрирования самих молекул гемоглобина. Вследствие этого при определенных концентрациях натрия хлорида происходят длинноволновые или коротковолновые сдвиги отрицательных максимумов первых производных спектров поглощения внутриэритроцитарного гемоглобина и структурирование этих максимумов в гипертонических растворах.

Исследовано действие температуры на структуру молекулы гемоглобина мышей. Гемоглобин выделяли в 0,1M NaCl , рН 6,4 и методом гель-фильтрации получали одни фракции гемоглобина, близкие по структуре к димерам, другие - к тетрамерам. Этот факт может иметь отношение к высказанному в работе предположению, что не только в концентрированных солях гемоглобин диссоциирует на димеры, но и низкие концентрации соли могут приводить к расхождению субъединиц гемоглобина. Показано, что замораживание до -8°C полученных димеров гемоглобина приводит к разворачиванию молекулы белка (увеличивается оптическая плотность в максимумах спектров поглощения в ультрафиолетовой области и уменьшается оптическая плотность в видимой области спектра, и при этом увеличивается "кажущаяся" молекулярная масса после гель-фильтрации), обусловленному, как и предполагают авторы, ослаблением гидрофобных взаимодействий и разрывом водородных связей и экспонированием ароматических аминокислот в растворитель. Авторы считают, что замораживание до -8°C тетрамеров гемоглобинов приводит к образованию более компактных по размерам белковых молекул. Это происходит в результате появления дополнительных связей между аминокислотными остатками полипептидной цепи и этим объясняется то, что объем выхода элюата оказался больше, чем у контрольных растворов, и соответственно, в элюате получены молекулы гемоглобина с меньшей "кажущейся" молекулярной массой. При этом уменьшается поглощение и в ультрафиолетовой, и в видимой области спектра. Замораживание до -8°C приводит также к структурным изменениям отдельных фракций гемоглобина мышей (изменению соотношения полуосей молекулы, характерного для нативного гемоглобина). В данной работе также отмечено, что в целом действие температурных факторов (в диапазоне от -8°C до $+50^\circ\text{C}$) на исходный раствор оксигемоглобина приводило к постепенному нарастанию величин молекулярных масс выделенных фракций. Увеличение молекулярных масс фракций оксигемоглобина наблюдалось и после воздействия ультрафиолетового облучения на растворы кристаллического гемоглобина из крови крупного рогатого скота. Авторы делают вывод о том, что это подтверждает предположение о стереотипности изменений в структуре гемоглобина при воздействии на него разных по своей природе физических и химических факторов.

При исследовании температурных параметров вращательной диффузии спиновых меток I и II, ковалентно присоединенных к макромолекуле гемоглобина, в диапазоне температур от $+33^\circ\text{C}$ до -20°C было определено, что понижение температуры приводит к монотонному уменьшению значения экспериментального параметра R, связанного с подвижностью меток. Это свидетельствует о компактизации субъединиц макромолекулы белка в процессе охлаждения. Эти данные, возможно, связаны с результатами, полученными в упомянутой выше работе, и, вероятно, компактизация, относится к тетрамерной структуре гемоглобина. В работе также отмечено, что в процессе медленного понижения температуры обнаруживаются структурные переходы в связанной с гемоглобином воде - при -60°C , свидетельствующие об уменьшении жесткости системы в результате плавления некоторых слоев связанной с белком воды, и при -110°C , обусловленные изменением диффузионных свойств связанной с белком воды. При температуре -120°C и ниже происходит замерзание прочно связанной с белком воды. Также в работе показано, что добавление концентрированных растворов солей к предварительно охлажденному до 0°C и -10°C раствору гемоглобина не приводит к существенным изменениям в спектре ЭПР, и

сделан вывод о том, что температура в качестве физического фактора оказывает стабилизирующее влияние на гемоглобин, повышая его устойчивость к действию гиперконцентраций солей.

По нашим экспериментальным данным, полученным с помощью метода спектрофотометрии, в результате замораживания до температуры жидкого азота (-196°C) и последующего оттаивания растворов HbA, максимум спектра поглощения («ноль» первой производной спектра поглощения) смещается в коротковолновую область, что свидетельствует об увеличении полярности окружения поглощающих хромофоров, т.е. увеличении их доступности растворителю [1], а именно, тирозиновых аминокислотных остатков, т.к. изменения в первой производной спектра поглощения происходят в области 277 нм, соответствующей поглощению тирозиновых аминокислотных остатков, располагающихся в полярных областях [1]. Таким образом, замораживание-оттаивание растворов HbA приводит к конформационным изменениям, затрагивающим полярные области белковых глобул. С помощью метода сканирующей микрокалориметрии получены данные о действии температуры -196°C на процесс тепловой денатурации гемоглобина из донорской крови (содержащей HbA) [2]. Деконволюция кривых теплопоглощения показала, что процесс термоденатурации Hb из донорской крови в нативном состоянии может быть представлен в виде двух гауссовых составляющих с максимумами при температурах 71.3°C и 74.5°C . Низкотемпературное воздействие приводит к уменьшению термостабильности Hb из донорской крови [2]. Кроме того, из параметров процесса термоденатурации Hb из донорской крови до и после охлаждения-нагрева видно, что после низкотемпературного воздействия термостабильность Hb из донорской крови уменьшается ($T_{\text{макс}}$ до охлаждения 72.7°C , после охлаждения 72.2°C ; ΔH_{cal} до охлаждения 238.0 кДж/моль, после охлаждения 183.4 кДж/моль – уменьшение температуры составило 0.5°C и уменьшение ΔH_{cal} составило 54.6 кДж/моль) [2]. Наличие изменений в температурном поведении Hb человека (HbA) было обнаружено с помощью метода некогерентного нейтронного рассеяния при исследовании конфигурационных движений и внутренних сил Hb человека (HbA) при охлаждении до -263°C (10 K) [3]. При различных температурах белковую гибкость определяли среднеквадратичным отклонением (MSD), $\langle u^2 \rangle$, зависящим от измеренной эластичной интенсивности $I(q)$ и модуля вектора рассеяния q ; при различных температурах белковую эластичность (упругость) определяли константой эффективной средней силы, $\langle k \rangle$, зависящей от среднеквадратичного отклонения. В соответствие с представленными табличными данными констант силы и корня MSD, полученных из нейтронного рассеяния, константа эффективной средней силы при температурах 10-100 K, 6.8 ± 1.2 Н/м; при 100-200 K, 1.0 ± 0.1 Н/м; при 252-292 K, 0.21 ± 0.02 Н/м; при температуре тела, 0.15 ± 0.02 Н/м [3]. Таким образом, константа эффективной средней силы уменьшается с ростом температуры, это свидетельствует, что молекула HbA становится менее жёсткой. В соответствие с представленными графическими данными зависимости MSD от температуры для гидратированных порошковых образцов Hb, MSD увеличивается с ростом температуры от 10 K до 292 K [3], следовательно, молекула HbA становится при этом более гибкой. Таким образом, с увеличением температуры от 10 K до 292 K, молекула HbA становится менее жёсткой и более гибкой. Хотя, исходя из полученных данных о том, что более жёсткие Hb солёноводного крокодила и курицы более гибкие, чем более мягкий Hb человека, авторы [3] отмечают, что упругость и гибкость – это независимые параметры и общее предположение, что более жёсткий белок всегда менее гибкий, чем мягкий белок, недействительно. Также наличие изменений в молекуле Hb при действии низкой температуры обнаружено и при исследовании спектров электронного парамагнитного резонанса гемоглобина, ковалентно меченого радикалом, по изменению температурных параметров вращательной диффузии спиновых меток I и II, ковалентно присоединённых к макромолекуле Hb, в области температур от 33°C до -20°C [4]. Было определено, что понижение температуры приводит к монотонному уменьшению значения экспериментального параметра R, связанного с подвижностью меток, что свидетельствует о компактизации субъединиц макромолекулы белка в процессе охлаждения [4]. Также для Hb мышей методом гель-фильтрации на сефадексе обнаружено изменение пространственной организации молекулы Hb после замораживания до -8°C ; были получены результаты для двух фракций Hb: кажущаяся молекулярная масса Hb первой фракции уменьшилась, вероятно, замораживание растворов Hb этой фракции приводит к образованию дополнительных связей между аминокислотными остатками полипептидных цепей, что может сопровождаться экранированием гема и части ароматических аминокислот глобина, образованием более компактных по размерам белковых глобул, тогда как кажущаяся молекулярная масса Hb второй фракции, наоборот увеличилась, что вероятно, связано с ослаблением и разрывом нековалентных связей (гидрофобные взаимодействия и водородные связи) и с частичным разворачиванием глобулы белка, сопровождающимся экспонированием ароматических аминокислот глобина в растворитель [5], что согласуется с нашими данными об увеличении доступности растворителю поглощающих хромофоров HbA после замораживания до температуры жидкого азота. Также об изменениях в молекуле HbA после замораживания свидетельствуют и данные, полученные нами при замораживании альгинатных микросфер, нагруженных Hb человека (HbA): после замораживания их до -20°C они частично теряли гемоглобин, что может быть связано с изменением неионных взаимодействий между Hb и Ca^{2+} -альгинатным матриксом; после замораживания до -20°C Hb-нагруженных альгинатных микросфер уменьшалась антирадикальная активность Hb, что регистрировалось по обесцвечиванию АБТС⁺-радикала, что может быть результатом либо частичного освобождения Hb из микросфер, либо потери белковой стабильности из-за конформационных изменений [6] т.к. известно, что процесс замораживания-оттаивания ведёт в большинстве случаев к конформационным изменениям белка, которые состоят в ослаблении молекулы и увеличении доступности активных участков белка, что может способствовать последующей агрегации и понижению активности [7].

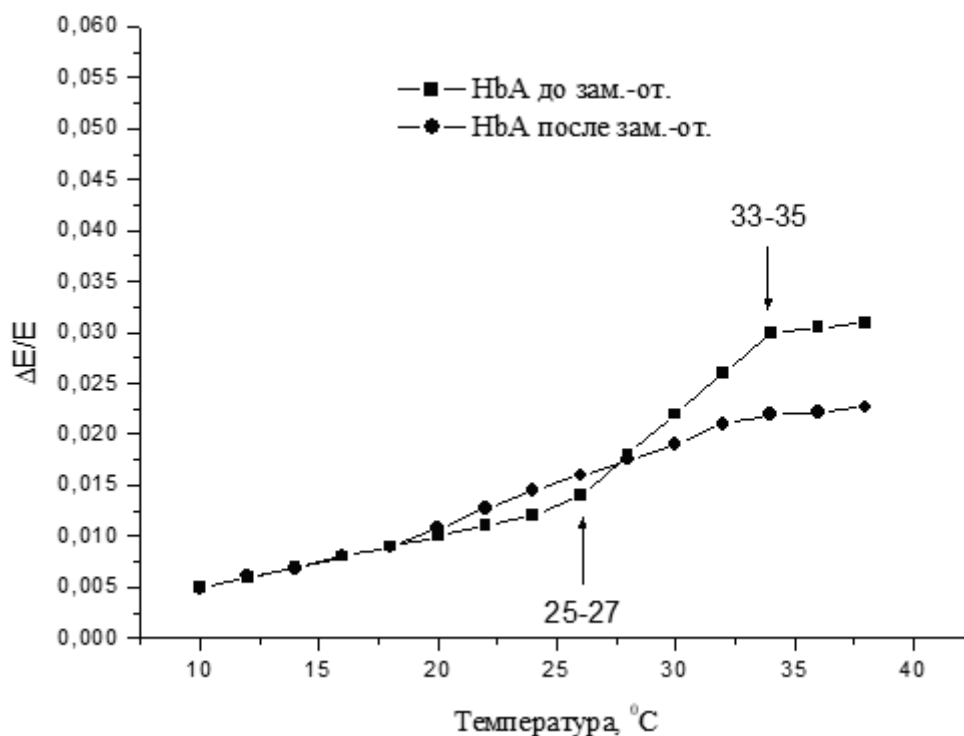


Рисунок 1. Зависимость интенсивности в максимуме ТПДС при 286 нм раствора HbA (температура сравнения +10°C), пронормированной на интенсивность СП при +10°C, от температуры; ■ – до, • – после замораживания-оттаивания

Было также исследовано влияние замораживания до -196°C и последующее влияние температур в области 6-38°C на раствор HbA методом температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии. После замораживания-оттаивания раствора HbA наблюдается сглаживание изломов на S-образной температурной зависимости интенсивности в максимуме температурно-пертурбационных дифференциальных спектров при 286 нм (рис. 1), вероятно, это означает, что сглаживаются, становятся менее заметны температурно-зависимые конформационные изменения в молекуле HbA. Следует отметить, что после замораживания-оттаивания сохраняется S-образная форма этой зависимости, т.е. конформационные изменения имеют место, но они менее выражены, чем до замораживания-оттаивания. При изучении методом ультрафиолетовой спектрофотометрии и гель-фильтрации влияния различных режимов замораживания на структуру бычьего сывороточного альбумина (БСА), было определено, что низкие температуры сами делают вклад в изменение структуры БСА, который может быть обусловлен ослаблением гидрофобных взаимодействий.

Таким образом, с одной стороны, замораживание раствора HbA приводит к конформационным изменениям молекулы HbA, затрагивающим полярные области, а именно, к увеличению доступности растворителю полярных областей, что согласуется с данными о частичном разворачивании глобулы белка, сопровождающемся экспонированием ароматических аминокислот глобина в растворитель [5] и с данными [7] о том, что процесс замораживания-оттаивания ведёт в большинстве случаев к конформационным изменениям белка, которые состоят в ослаблении молекулы и увеличении доступности активных участков белка. С другой стороны, замораживание растворов HbA приводит к компактизации субъединиц молекулы HbA [2,4,5]. Вероятно, это можно объяснить тем, что предположительно, увеличение доступности растворителю поглощающих хромофоров молекулы HbA, располагающихся в полярных областях, приводит к тому, что компактизуются другие части молекулы HbA, не участвующие в увеличении доступности аминокислотных остатков растворителю. То есть одни части молекулы HbA становятся более доступными растворителю, а другие при этом компактизуются. Это наше предположение, вероятно, можно рассматривать совместно с данными исследования конфигурационных движений и внутренних сил Hb человека (HbA) методом некогерентного нейтронного рассеяния, которое показало, что уменьшается константа эффективной средней силы с ростом температуры от 10 K до 292 K [3], это свидетельствует, что молекула HbA становится менее жёсткой, также увеличивается среднеквадратичное отклонение для гидратированных порошковых образцов Hb с ростом температуры от 10 K до 292 K [3], что указывает на то, что молекула HbA становится при этом более гибкой. Таким образом, при увеличении температуры от 10 K и выше уменьшается жёсткость и увеличивается гибкость молекулы HbA, что может быть в согласии с тем, что после замораживания до -196°C одни части молекулы HbA становятся более доступными растворителю, а другие при этом компактизуются, что возможно при нежёсткой и гибкой структуре молекулы гемоглобина А.

Список литературы / References:

1. Демченко А.П. *Ультрафиолетовая спектрофотометрия белков*. К.: Наукова думка, 1981, 208 с. [Demchenko A.P. *Ultra-violet spectrophotometry of proteins*. K.: Naukova dumka, 1981, 208 p. (In Russ.)]
2. Соловьёва А.С., Зинченко А.В. Сравнительное микрокалориметрическое исследование плавления гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия. *Проблемы криобиологии*, 2000, № 1, с. 32-35. [Solov'yova A.S., Zinchenko A.V. Comparative microcalorimetric investigation of melting of hemoglobin from donor and cord blood before and after low-temperature influence. *Problemy criobiologii*, 2000, no. 1, pp. 32-35. (In Russ.)]
3. Stadler A.M., Garvey C.J., Bocahut A., Sacquin-Mora S., Digel I., Schneider G.J., Natali F., Artmann G.M., Zaccari G. Thermal fluctuations of haemoglobin from different species: adaptation to temperature via conformational dynamics. *Journal of the royal society interface*, 2012, doi: 10.1098/rsif.2012.0364.
4. Гаврилова И.И. *Изучение влияния низкой температуры и криопротекторов на структурно-конформационные переходы в некоторых белках и мембранах эритроцитов*. Дис. канд. биол. наук, Харьков, 1982, 146 с. [Gavrilova I.I. *The study of influence of low temperature and cryoprotectors on the structure-conformational transitions in some proteins and erythrocyte membrane*. Dis. doct. phyl. in biology, Kharkov, 1982, 146 p. (In Russ.)]
5. Артюхов В.Г., Путинцева О.В. Влияние температуры на структуру молекулы гемоглобина и его функции. *Известия АН Молдавской ССР. Серия биол. и хим. наук*, 1981, № 1, с. 56-61. [Artyuhov V.G., Putintseva O.V. Influence of temperature on the structure of hemoglobin molecule and its functions. *Izvestiya AN Moldavskoj SSR. Seriya biol. i him. nauk*, 1981, no. 1, pp. 56-61. (In Russ.)]
6. Rozanova S., Timchenko N., Rozanova K., Nardid O. Freezing of hemoglobin-loaded sodium alginate microspheres. *Journal of experimental and integrative medicine*, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 81-84.
7. Cao E., Foster P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of protein in aqueous solutions. *Biotechnol bioeng.*, 2003, vol. 82, no. 6, pp. 684-690.

INFLUENCE OF FREEZING-THAWING ON THE HEMOGLOBIN TEMPERATURE BEHAVIOR**Timchenko N.N., Golovchenko I.V.**

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: timchenko_n@list.ru

Received 07.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0557

Abstract. The use of blood preservation at low temperatures methods in medical practice makes it necessary to study the temperature effect on hemoglobin. The effect of freezing-thawing to a liquid nitrogen temperature of -196°C and subsequent thawing on hemoglobin A was studied, using the methods of temperature-perturbation differential spectrophotometry and analysis of absorption spectra first derivatives. After the hemoglobin A solution freezing-thawing, a smoothing of the breaks in the S-shaped temperature intensity dependence at the maximum of the temperature-perturbation differential spectra at 286 nm is noted. This probably means that temperature-dependent conformational changes in the hemoglobin A molecule are smoothed out and become less noticeable. It should be noted that after freezing-thawing, this dependence S-shaped form is preserved, i.e. conformational changes take place, but they are less pronounced than before freezing-thawing. Thus, on the one hand, freezing the hemoglobin A solution leads to conformational changes in the hemoglobin A molecule affecting the polar regions, namely, to an increase in the polar regions availability to the solvent, which is consistent with the data on the protein globule partial unfolding, accompanied by the globin aromatic amino acids exposure to the solvent, and with the data that the freezing-thawing process leads in most cases to conformational changes in the protein, which consist in the molecule weakening and increasing the protein active sites accessibility. On the other hand, freezing of hemoglobin A solutions leads to compaction of the hemoglobin A molecule subunits. This can probably be explained by the fact that, presumably, an increase in the availability of the hemoglobin A molecule absorbing chromophores located in the polar regions to the solvent leads to the compaction of the hemoglobin molecule A other parts, not involved in increasing the amino acid residues availability to the solvent. That is, some parts of the hemoglobin A molecule become more accessible to the solvent, while others become compact.

Key words: hemoglobin, conformational changes, temperature.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА В КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЕ ОТ ФОРМЫ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОМ РАСТВОРЕ

Кулешова Т.Э., Желначева П.В., Гасиева З.А., Галушко А.С., Панова Г.Г.

Агрофизический научно-исследовательский институт

просп. Гражданский, 14, г. Санкт-Петербург, 195220, РФ; e-mail: www.piter.ru@bk.ru

Поступила в редакцию 07.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0558

Аннотация. В работе проведено исследование влияния формы азота (нитратная, амидная, нитратно-аммонийная) в составе питательного раствора на электрические характеристики биоэлектрохимической системы, базирующейся на электрогенных свойствах растений салата. Зарегистрирована динамика биоэлектрического потенциала (БЭП) в системе корнеобитаемая среда-растения, биометрические и биохимические показатели растительной продукции при использовании различных питательных растворов в ходе выращивания салата методом панопоники в интенсивной светокультуре. Среднее значение БЭП составило 243 мВ при использовании нитратной формы азота в питательном растворе, 147 мВ для амидной формы и 178 мВ для нитратно-аммонийной формы. Максимально наблюдаемая разность потенциалов была характерна для варианта, содержащего азот в нитратной форме, что, вероятно, указывает на потенциалобразующую роль NO_3^- . Отмечено увеличение концентрации положительных ионов (Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+) на нижнем электроде и отрицательных (NO_3^-) на верхнем, что соответствует наблюдаемой в БЭС полярности – верхний электрод электроотрицателен относительно нижнего. Показано, что лучшим по величине и стабильности из исследованных вариантов был питательный раствор, содержащий азот в нитратной форме. Перемещение ионов в корнеобитаемой среде в процессе жизнедеятельности растений может стать новым альтернативным источником зеленой электроэнергии.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, растительно-микробный топливный элемент, светокультура, салат, панопоника, электрогенные свойства.

ВВЕДЕНИЕ

Возобновляемая энергия рассматривается как один из способов облегчения топливных потребностей будущего, преодоления кризиса глобального потепления и снижения выбросов углекислого газа. На данный момент к регенеративным источникам энергии относят солнечный свет, водные потоки, ветер, приливы, геотермальную теплоту, биотопливо (древесины, растительные масла, этанол). Еще одним перспективным альтернативным источником электричества являются растительные организмы, биоэнергия которых генерируется в результате физико-химических превращений энергии света и биохимических реакций в корнеобитаемой среде.

В корнеобитаемых средах наблюдается наличие электрических полей, связанных с протеканием окислительно-восстановительных реакций и формированием различных плотностей подвижных зарядов [1,2]. Градиент концентраций в корнеобитаемой среде наряду с электроактивностью растений и сопутствующей им микрофлоры могут быть положены в основу биоэлектрохимической системы (БЭС) – устройства, преобразующего химическую энергию в электрическую с помощью живых организмов [3]. Потенциал использования электрогенных свойств микроорганизмов и растений, объединенных в растительно-микробном топливном элементе (РМТЭ), впервые был показан Strik D.P. с соавторами в 2008 году [4]. Зарегистрированное напряжение в РМТЭ на основе манника (*Glyceria maxima*) составило 256 мВ на 72 день вегетационного периода, максимальная плотность мощности достигла 67 мВт/м². БЭС имеют большие перспективы в связи с распространенностью, легкостью получения и комбинированными свойствами, однако механизмы их действия, электрические параметры и генеративные возможности еще предстоит исследовать.

В основе электрогенных свойств БЭС лежат окислительно-восстановительные реакции в корнеобитаемой среде, сопутствующие жизнедеятельности растений и окружающей их микрофлоры. В связи с этим ключевым для понимания механизма формирования биоэлектрического потенциала является выявление потенциалобразующих ионов. В качестве таковых рассматривается нитрат, который, однако, также может выступать акцептором электронов и восстанавливаться до N_2 с последующим его удалением из раствора в результате реакции денитрификации [5] или до NH_4^+ , который используется растениями для биосинтеза [6]. Данные процессы могут приводить к конкуренции за электроны в окислительно-восстановительных реакциях [7]. В литературе существуют неоднозначные данные по влиянию форм азота в растворе на электрические характеристики биоэлектрохимических систем. Например, в работе [8] показано, что присутствие нитрата не влияло на величину выходной мощности микробного топливного элемента. При использовании безнитратного, с высоким содержанием аммония модифицированного раствора Хогланда отмечается увеличение силы тока в 2,5 раза в РМТЭ на основе спарты (*Spartina anglica*) [9], а в [10] показано, что еженедельное добавление нитрата аммония NH_4NO_3 в РМТЭ, содержащий кактусы (*Opuntia joconostle*), повысило выработку энергии почти в 13 раз.

Таким образом, целью данной работы являлось выявление влияния формы азота в питательном растворе на формировании разности потенциалов в системе корнеобитаемая среда-растения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве фитотест-объекта был выбран листовой салат (*Lactuca sativa* L.) сорта Тайфун производства ООО «Сортсеемвош» (Россия), имеющий развитую корневую систему стержневого типа с множеством боковых ответвлений.

Для изучения электрических явлений, возникающих в корнеобитаемой среде, лучшим объектом являются искусственные среды на основе питательных растворов за счет меньшего количества влияющих внешних факторов (в первую очередь влажность) и большей управляемости параметрами (составом) среды обитания. Растения выращивали по технологии тонкослойной паноупоники [11] в условиях интенсивной светокультуры на биополигоне ФГБНУ АФИ в вегетационной установке с лампами ДНАТ-400 в качестве источников света. Облученность составляла $70\text{--}75 \text{ Вт/м}^2$ в области фотосинтетически активной радиации (ФАР), световой период – 14 часов в сутки, температура воздуха $+20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ днем и $+18\text{--}20 \text{ }^\circ\text{C}$ – ночью, относительная влажность воздуха – 65–70%.

Экспериментальная БЭС представляла собой ячейку площадью $187 \times 137 \text{ мм}^2$ и высотой 36 мм, в которой размещали и выращивали пророщенные семена салата в количестве 2 растений (рис. 1). Измеряемой характеристикой, отражающей биоэлектрическую активность корневой системы и сопутствующих микроорганизмов и протекание метаболических процессов в корнеобитаемой среде, служил биоэлектрический потенциал (БЭП) – разность потенциалов, измеряемая в нашем случае между корневой шейкой и дном емкости для выращивания. Для регистрации БЭП, формируемых в корнеобитаемой среде, в системы для культивирования устанавливали коррозионностойкие биосовместимые электроды из графитового войлока толщиной 5 мм с большой удельной поверхностью, обеспечивающие поверхностный электрический контакт с корневой системой [12]. Мониторинг изменения разности потенциалов осуществляли с помощью аппаратной платформы Arduino каждые 15 минут в течение всего вегетационного периода. Также в процессе эксперимента проводили измерение показателей электропроводности питательных растворов с помощью кондуктометра COM-80 (HM Digital, США).

В работе были исследованы следующие варианты питательного раствора Кнопа [13], модифицированные по форме азота:

- 1) вариант 1 (классический раствор Кнопа) содержал нитратную форму азота ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, KNO_3);
- 2) вариант 2 – амидную форму азота $((\text{NH}_2)_2\text{CO})$;
- 3) вариант 3 – смешанную нитратно-аммонийную форму азота (NH_4NO_3 , KNO_3).

В каждый вариант были дополнительно добавлены микроэлементы по Чеснокову с соавторами [13]. Исследуемые растворы были максимально выровнены по концентрациям элементов питания.

Вегетационный опыт проводили дважды, с 3х-кратной повторностью исследуемых вариантов в каждом эксперименте. Уборку осуществляли на 35 суток от посева семян. При уборке учитывали сырую массу надземной части и корней, высоту растений. Биохимический анализ содержания сухого вещества и нитрата в листьях проводили в аккредитованной Испытательной лаборатории ФГБНУ АФИ. Концентрацию ионов на электродах в конце эксперимента, определяли готовя водную вытяжку и применяя соответствующие ионоселективные электроды, подключенные к анализатору Экотест-120 (Эконикс, Россия).

Статистическую обработку данных проводили с применением программ Excel 2010. Определяли средние значения изучаемых показателей, доверительные интервалы. Достоверность различий между вариантами оценивали методами параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики. Различия между вариантами считали достоверными при $p \leq 0,05$.

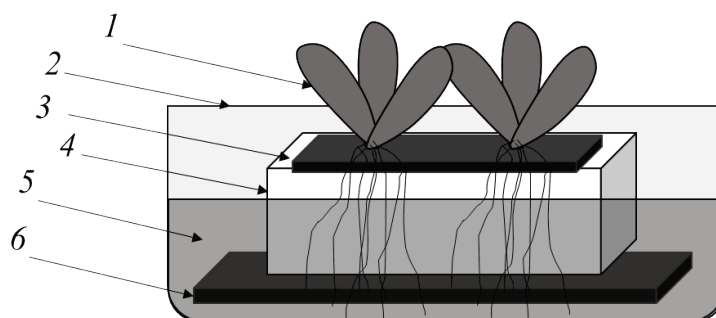


Рисунок 1. Схематичное изображение экспериментальной установки, включающей: 1 – растительный объект, 2 – емкость для выращивания, 3 – верхний электрод, 4 – платформу для растений, покрытую влагопроводящим элементом, 5 – питательный раствор, 6 – нижний электрод

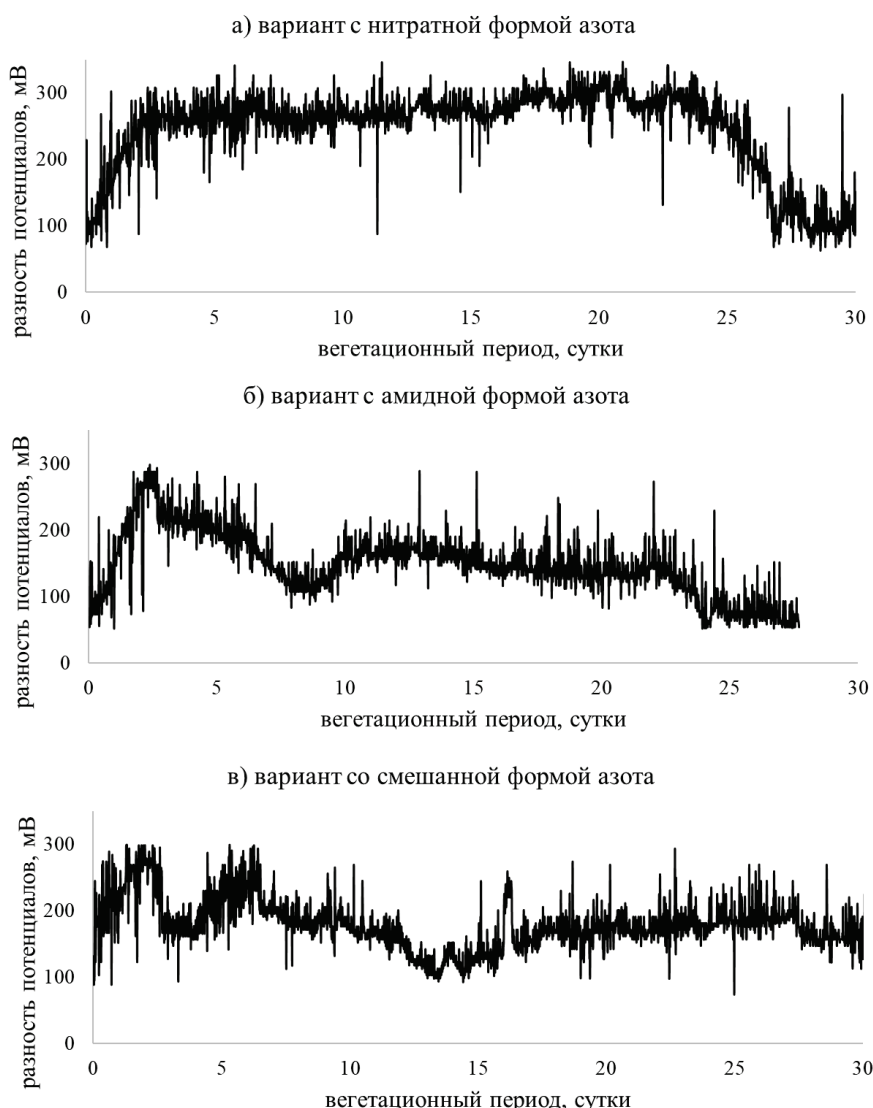


Рисунок 2. Динамики разности потенциалов, генерируемых в корнеобитаемой среде при выращивании растений салата методом панопоники с использованием питательных растворов, различающихся по форме азота: а) вариант с нитратной формой азота, б) вариант с амидной формой азота, в) вариант со смешанной нитратно-аммонийной формой азота

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученная динамика разности потенциалов, формируемых в ходе развития растений в корнеобитаемой среде на основе питательных растворов, различающихся по форме азота, представлена на рис. 2. Для варианта, содержащего азот в нитратной форме, характерна более стабильная генерация разности потенциалов на уровне ~270 мВ на протяжении вегетационного периода. Уменьшение напряжения до начальных 100 мВ отмечается лишь в конце эксперимента и, вероятно, связано со снижением интенсивности ростовых процессов. Для вариантов, содержащих амидную и нитратно-аммонийную формы азота в первые 3 дня также наблюдается рост биоэлектрического потенциала до 270-280 мВ, однако затем напряжение падает и остается в пределах 100-200 мВ.

Максимально полученный биопотенциал составил 347 мВ для варианта с питательным раствором, содержащим азот в нитратной форме, и 298 мВ для вариантов с амидной и смешанной формами азота (табл. 1).

Таблица 1. Электрические параметры растительных БЭС, содержащих питательный раствор с различными формами азота

Форма азота в БЭС	Средний БЭП, мВ	Максимальный БЭП, мВ
Нитратная	243±64	347
Амидная	147±48	298
Нитратно-аммонийная	178±38	298

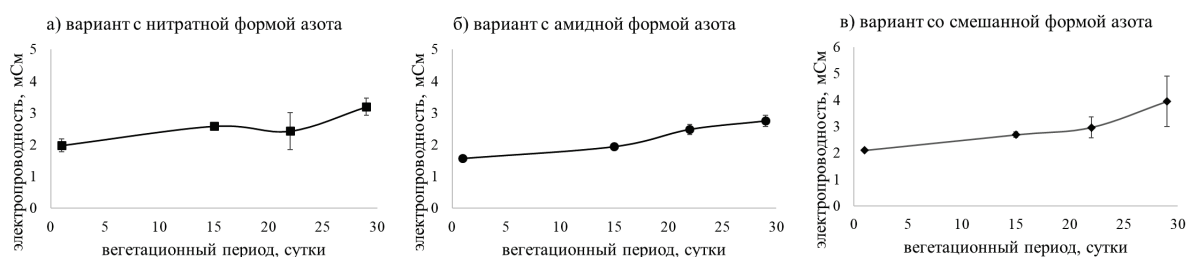


Рисунок 3. Изменение в ходе вегетационного периода электропроводности питательных растворов, модифицированных по форме азота: а) нитратная, б) амидная, в) нитратно-аммонийная

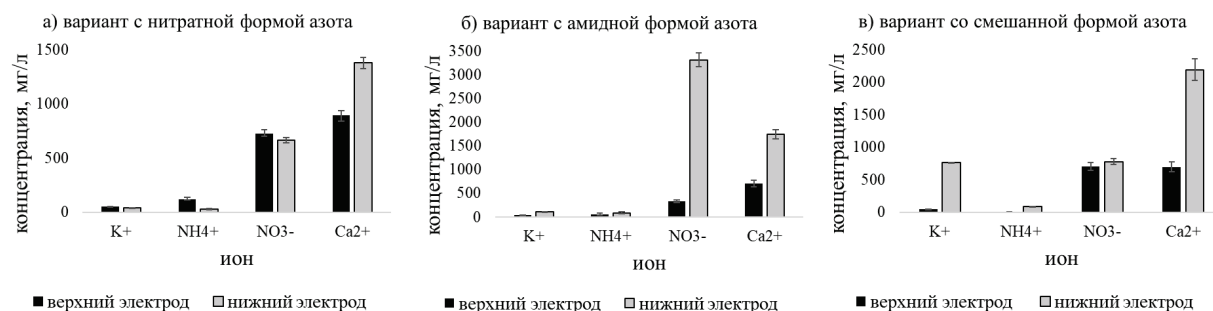


Рисунок 4. Содержание ионов K^+ , NH_4^+ , NO_3^- , Ca^{2+} на верхнем и нижнем электродах растительных БЭС, содержащих питательные растворы, различающиеся по форме азота: а) нитратная, б) амидная, в) нитратно-аммонийная

Наименьшее среднее значение БЭП ~ 150 мВ было характерно для варианта 2, а наибольшее 243 мВ для варианта 1.

В ходе вегетационного периода были проведены измерения электропроводности исследованных питательных растворов, потенциально влияющей на электрические характеристики БЭС (рис. 3). В целом, в оцениваемых трех вариантах растворов наблюдается схожая динамика увеличения показателей на более чем 60 % к концу эксперимента. Скорее всего, это связано с накоплением не использованных растениями ионов минеральных элементов. Интересно отметить, что возрастание способности питательного раствора проводить электрический ток напрямую не коррелирует с электрическими характеристиками БЭС – разность потенциалов в конце вегетационного периода наоборот снижается. Вероятно, решающее значение имеет интенсивность метаболических реакций и концентрационный градиент в корнеобитаемой среде.

Для выявления потенциалообразующих ионов были измерены концентрации ионов K^+ , NH_4^+ , NO_3^- , Ca^{2+} на верхнем и нижнем электродах (рис. 4). Во всех вариантах, разработанных нами, БЭС верхний электрод был электроотрицателен относительно нижнего электрода, что коррелирует с полученным содержанием ионов на них – на нижнем электроде больше положительных ионов Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+ , а на верхнем электроде отрицательных ионов NO_3^- .

Нитратная и аммонийная формы азота быстро усваиваются растениями и имеют близкую подвижность ионов – $7,4 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ для NO_3^- и $7,6 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ для NH_4^+ , при этом поглощение аммонийной формы является более энергетически выгодным. Амидная же форма усваивается в основном через листовую поверхность, что отразилось на биомассе растений [14]. В табл. 2 приведены показатели роста растений салата и безопасности его растительной продукции. По полученным данным можно предположить, что величина БЭП связана с массой корневой системы и напрямую не зависит от массы надземной части. Следует также отметить, что, судя по содержанию нитратов в полученной растительной продукции, она соответствует санитарно-гигиеническим нормативам РФ.

Таблица 2. Основные показатели роста и безопасности растительной продукции при выращивании растений салата в регулируемых условиях методом панопоники в БЭС, содержащих питательный раствор с различными формами азота

Форма азота в БЭС	Масса надземной части одного растения, г	Высота растений, см	Сухое вещество в надземной части, %	Масса корней, г	Сухое вещество в корнях, %	Содержание нитрата в листьях, мг/кг н.в.
Нитратная	21,1 $\pm$ 4,3	13 $\pm$ 2,5	6,5 $\pm$ 1,0	8,2 $\pm$ 2,3	6,1 $\pm$ 1,2	940
Амидная	12,1* $\pm$ 2,2	11,5* $\pm$ 3,4	8,4* $\pm$ 0,9	3,3* $\pm$ 3,1	6,5* $\pm$ 1,1	247*
Нитратно-аммонийная	22,9* $\pm$ 2,2	13 $\pm$ 3,1	9,4* $\pm$ 0,2	6,8* $\pm$ 2,3	8,6* $\pm$ 0,7	1157*

Примечание: * – значение достоверно отличается от такового в варианте 1 (раствор Кнопа с нитратной формой азота) на 5%-ном уровне значимости

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных данных можно сказать, что лучшим по величине и стабильности генерации биоэлектрического потенциала из исследованных вариантов был питательный раствор, содержащий азот в нитратной форме, – разность потенциалов достигала ~300 мВ и была стационарной на протяжении вегетационного периода.

Таким образом, перемещение ионов в корнеобитаемой среде в процессе жизнедеятельности растений может стать новым альтернативным источником электроэнергии. Создание БЭС с наиболее управляемыми потоками ионов является одной из перспективных задач зеленой биоэнергетики.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-4397.2022.5).

Список литературы / References:

1. Поздняков А.И., Позднякова А.Д. *Электрофизика почв*. Москва-Дмитров: ВНИИМЗ, МГУ, 2004, 48 с. [Pozdnyakov A.I., Pozdnyakova A.D. *Elektrofizika pochv*. Moskva-Dmitrov: VNIIMZ, MGU, 2004, 48 p. (In Russ.)]
2. Поздняков А.И., Позднякова Л.А., Позднякова А.Д. *Стационарные электрические поля в почвах*. М: KMK Scientific Press Ltd., 1996, 358 с. [Pozdnyakov A.I., Pozdnyakova L.A., Pozdnyakova A.D. *Stationary electric fields in soils*. M: KMK Scientific Press Ltd., 1996, 358 p. (In Russ.)]
3. Кулешова Т.Э., Панова Г.Г., Галль Н.Р., Галушко А.С. Концентрационный элемент на основе электрогенных процессов в корнеобитаемой среде. *ПЖТФ*, 2022, № 8. [Kuleshova T.E., Panova G.G., Gall N.R., Galushko A.S. Concentration cell based on electrogenic processes in the root environment. *Technical Physics Letters*, 2022, vol. 48, no. 4, doi: 10.21883/PJTF.2022.08.52363.19066. (In Russ.)]
4. Strik D.P.B.T.B., Hamelers H.V.M., Snel J.F., Buisman C.J. Green electricity production with living plants and bacteria in a fuel cell. *International Journal of Energy Research*, 2008, vol. 32, no. 9.
5. Knowles R. Denitrification. *Microbiological reviews*, 1982, vol. 46, no. 1, doi: 10.1128/mr.46.1.43-70.1982.
6. Johnson R.S., Uriu K. *Mineral nutrition. Peach, Plum and Nectarine: Growing and Handling for Fresh Market*. Oakland, University of California, 1989, p. 68.
7. Pan Y., Ni B.J., Bond P.L., Ye L., Yuan Z. Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment. *Water research*, 2013, vol. 47, no. 10, doi: 10.1016/j.watres.2013.02.054.
8. Morris J.M., Jin S. Influence of NO₃ and SO₄ on power generation from microbial fuel cells. *Chemical Engineering Journal*, 2009, vol. 153, no. 1-3, doi: 10.1016/j.cej.2009.06.023.
9. Helder M., Strik D.P.B.T.B., Hamelers H.V.M., Kuijken R.C.P., Buisman C.J.N. New plant-growth medium for increased power output of the Plant-Microbial Fuel Cell. *Bioresource technology*, 2012, vol. 104, doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.005.
10. Apollon W., Valera-Montero L.L., Perales-Segovia C., Maldonado-Ruelas V.A., Ortiz-Medina R.A., Gomez-Leyva J.F., Vazquez-Gutiérrez M.A., Flores-Benitez S., Kamaraj S.K., Effect of ammonium nitrate on novel cactus pear genotypes aided by biobattery in a semi-arid ecosystem. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 2022, vol. 49, doi: 10.1016/j.seta.2021.101730.
11. Панова Г.Г., Удалова О.Р., Канаш Е.В., Галушко А.С., Кочетов А.А., Прияткин Н.С., Архипов М.В., Черноусов И.Н. Основы физического моделирования «идеальных» агроэкосистем. *Журнал технической физики*, 2020, т. 90, № 10, doi: 10.21883/JTF.2020.10.49792.429-19. [Panova G.G., Udalova O.R., Kanash E.V., Galushko A.S., Kochetov A.A., Priyatkin N.S., Arkhipov M.V., Chernousov I.N. Fundamentals of Physical Modeling of “Ideal” Agroecosystems. *Technical Physics*, 2020, vol. 65, no. 10, doi: 10.1134/S1063784220100163. (In Russ.)]
12. Кулешова Т.Э., Бушлякова А.В., Галль Н.Р. Неинвазивное измерение биоэлектрических потенциалов растений. *Письма в Журнал технической физики*, 2019, т. 45, № 5, doi: 10.21883/PJTF.2019.05.47387.17541. [Kuleshova T.E., Bushlyakova A.V., Gall N.R. Noninvasive measurement of bioelectric potentials of plants. *Technical Physics Letters*, vol. 45, no. 3, doi: 10.1134/S1063785019030106. (In Russ.)]
13. Чесноков В.А., Базырина Е.Н., Бушуева Т.М. *Выращивание растений без почвы*. Изд. ЛГУ, 1960. [Chesnokov V.A., Bazyrina E.N., Bushueva T.M. *Vyrashchivanie rastenij bez pochvy*. Izd. LGU, 1960.]
14. Битюцкий Н.П. *Минеральное питание растений*. Изд. СПбГУ, 2020. [Bityuckij N.P. *Mineral'noe pitanie rastenij*. Izd. SPGU, 2020. (In Russ.)]

DEPENDENCE OF THE BIOELECTRIC POTENTIAL IN THE ROOT ENVIRONMENT ON THE NITROGEN FORM IN THE NUTRIENT SOLUTION**Kuleshova T.E., Zhelnacheva P.V., Gasieva Z.A., Galushko A.S., Panova G.G.**

Agrophysical Research Institute

Grazhdansky pr., 14, St. Petersburg, 195220, Russia; e-mail: www.piter.ru/bk.ru

Received 07.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0558

Abstract. The influence of the nitrogen form (nitrate, amide, nitrate-ammonium) in the composition of the nutrient solution on the electrical characteristics of a bioelectrochemical system based on the electrogenic properties of lettuce was studied. The dynamics of the bioelectric potential (BEP) in the root environment-plants system, biometric and biochemical parameters of plant production using various nutrient solutions during the cultivation of lettuce by the panoponic method in intensive artificial lightculture have been registered. The average BEP value was 243 mV when using the nitrate form of nitrogen in the nutrient solution, 147 mV for the amide form and 178 mV for the nitrate-ammonium form. The maximum observed potential difference was characteristic of the variant containing nitrogen in the nitrate form, which probably indicates the potential-forming role of NO_3^- . An increase in the concentration of positive ions (Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+) on the lower electrode and negative (NO_3^-) on the upper one was noted, which corresponds to the polarity observed in the BES – the upper electrode is electronegative relative to the lower one. It is shown that the nutrient solution containing nitrogen in the nitrate form was the best in terms of size and stability of the studied options. The diffusion of ions in the root environment during the life of plants can become a new alternative source of electricity.

Key words: *bioelectrochemical system, plant-microbial fuel cell, lightculture, lettuce, panoponics, electrogenic properties.*

НАРУШЕНИЕ СИММЕТРИИ – ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА СОВЕРШЕНИЯ «ПОЛЕЗНОЙ РАБОТЫ» БИОЛОГИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МАШИНАМИ

Твердислов В.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: tverdislov@mail.ru
Поступила в редакцию 09.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0559

Аннотация. Физической основой функционирования живых систем являются молекулярные машины. Выполнение «полезной работы» составляет существо их биологических функций. Молекулярные машины являются хиральными иерархически организованными устройствами (конструкциями). Они циклически осуществляют преобразование формы энергии за счет смены или переключений симметрий в её хиральных структурных элементах, которые как раз и реализуют в них выделенные «квазимеханические» степени свободы. Феномен хиральности позволяет формировать дискретные хирально знакопеременные иерархии структур в макромолекулярных машинах в процессе фолдинга: начиная с уровня асимметричного углерода в дезоксирибозе и аминокислотах. Ранее нами была выявлена и проанализирована тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней D-L-D-L для ДНК и L-D-L-D для белков. Проявлениями хиральности выступают также спиральность и суперспиральность внутримолекулярных и надмолекулярных структур. Также, в рамках развиваемых представлений, хиральное расщепление свойств элементов структур обеспечивает однонаправленное движение машин по энергетическому циклу за счет нелинейных вентильных свойств спиральных структур. Спиральные структуры могут служить несимметричными, нелинейными, механическими, в том числе переключающими, элементами конструкций молекулярных машин (подобно устройству «храповик-собачка») по вращательным степеням свободы.

Ключевые слова: молекулярные машины, белки, термодинамика, симметрии, хиральность, самоорганизация, нелинейность, фолдинг, спирали, суперспирали, вентильность.

Со времён утверждения классической физики в биологии складывалось мнение о том, что в основе развития живых систем, включая биологическую эволюцию в целом, лежит, в первую очередь, энергетический фактор, поддерживающий процессы самоорганизации [1]. По-видимому, это не вся истина. Сами процессы самоорганизации, включающие упорядочивание в системе, с необходимостью включают обратные связи, пространственно канализирующие процессы диссипации энергии. Потоки и преобразования форм энергии неразрывно связаны с другим фундаментальным физическим фактором, геометрически характеризуемым особым качеством материи – симметрией.

В последнее время в научном сообществе всё более укрепляется мнение, ранее утвердившееся в современной физике, о том, что понятие симметрии является значимым не столько в её проявлениях в структурах неживой и живой природы, сколько в фундаментальных представлениях о формировании и эволюции неживой и живой материи. Как известно, максимальной симметрией обладает изотропное бесконечное пространство, не способное выполнять функции машины, поскольку, в принципе, не обладает свойствами создавать «конструкции» [2]. Понижение энтропии в развивающихся сложных системах в ходе эволюции сопровождается понижением ранга симметрии специализированных, эволюционно отбираемых и фиксируемых элементов. Фактор симметрий в конечном счете определяет движение системы по «координате реакции», особенно на уровне супрамолекулярных конструкций, выполняющих функции молекулярных машин в живых системах.

Живое можно охарактеризовать как системную совокупность физических принципов, реализуемых химическим инструментарием и проявляющуюся в единстве биологических структур и функций, способных к устойчивой эволюции земных форм жизни. Основным биологическим признаком живого на Земле является клетка, основным физическим признаком – молекулярная машина. Принципы живого во Вселенной, по-видимому, универсальны, формы живого на Земле – уникальны.

Наряду с преобразованием форм энергии, присущим синергетическим процессам самоорганизации, существенную роль в живых системах выполняют симметричные факторы – явления нарушения симметрии при эволюционном развитии систем. Живая природа базируется на двух фундаментальных асимметриях: клеточной – ионной и молекулярной – хиральной. Клеточным системам свойственна ионная асимметрия между внутриклеточной и внеклеточной средой, обеспечивающая термодинамическую неравновесность клеток, электрические явления и возбудимость. Для молекулярного уровня живого свойственна базовая гомохиральность и череда нарушений симметрии – смена знака хиральности при формировании внутримолекулярных и надмолекулярных клеточных структур.

О природе и сущности макроскопических и молекулярных машин. В неживой природе машин не существует, имеются лишь естественные преобразователи энергии и вещества, которые не могут совершать «полезной работы». Полезная работа – как раз и есть биологическая функция машин-ферментов, насосов, сократительных систем, рецепторов и пр. Следует отметить, что одними из первых разработок проблемы молекулярных биологических машин были работы наших соотечественников Ю.И. Хургина, С.Э. Шноля, Л.А.

Блюменфельда, Д.С. Чернавского и других [2-4]. Для современного состояния общих представлений о биологических молекулярных машинах характерно разрозненное описание их структурных, термодинамических и кинетических характеристик [5-7]. Вместе с тем, рассмотрение симметричных особенностей системы позволяет связать воедино означенные аспекты.

Самые общие представления о молекулярных биологических машинах можно сформулировать следующим образом. Во-первых, это принципиально не тепловые, а изотермические электромеханохимические машины, характеризующиеся на уровне своих моторов КПД до 80% и выше, что по понятным причинам недостижимо для биополимерных устройств, будь они тепловыми машинами (разность температур между холодильником и нагревателем должна бы была составить многие сотни градусов). Во-вторых, имея молекулярные размеры, биологические машины находятся в условиях теплового шума, что принципиально затрудняет прецезирование (отслеживание) позиционного состояния деталей их конструкций в ходе движения по координате механохимической реакции в ходе машинного цикла [2,8]. По этой причине молекулярные машины работают, в отличие от макроскопических машин, в релаксационном режиме, фиксируя начальную фазу цикла по «правильному» присоединению к ним всех участников процесса и конечное состояние системы по завершении цикла. Траектория перехода между крайними состояниями определяется конструкцией устройства. Перманентное прецезирование системы в условиях тепловых флуктуаций в молекулярном устройстве потребовало бы подключения внешнего резервуара свободной энергии, существенно превышающего масштабы собственных преобразований энергии молекулярной машиной. Макроскопические же машины контролируют прохождение машиной рабочего цикла или непрерывно, или по многим позициям, что возможно в макромашинах, поскольку процессы контроля и управления в них по энергетической стоимости существенно ниже, чем реализуемые ими преобразования энергии, вещества и информации.

Молекулярные моторы – энергетические преобразователи, двигатели машин – являются ключевым элементом конструкции молекулярных машин. В молекулярных машинах, в отличие от макроскопических, «рабочее тело», передающее и преобразующее формы энергии в соответствии с конструкцией устройства, идентично их конструктивным элементам [9]. Более того, в них не локализованы, а структурно сопряжены управляющий (регулирующий) и исполнительный уровни функционирования. По-видимому, из-за того, что в молекулярных машинах на микроуровне в условиях теплового шума, как мы говорили, энергетически не реализуем режим прецезирования, то система запуска цикла функционирует в «ждущем режиме», а сам цикл осуществляется как релаксационный процесс [2,7]. Запуск, например, ферментативного цикла, осуществляется при присоединении полного числа участников процесса – субстрата и эффекторов. Так, для запуска транспортного цикла мембранного Na-насоса (Na,K-АТФазы) к ферменту должны «правильно» и в нужном порядке присоединиться MgАТФ, 3 иона Na, 2 иона K, только после чего насос-машина проведет весь белковый комплекс по «координате реакции» – сложной релаксационной последовательности структурных (конформационных) перестроек и переходов [10].

Цикличность как принципиальная характеристика машины с необходимостью предполагает обязательное наличие симметрий в конструкции, а для движения по циклу в «правильном» направлении – несимметричного элемента, обладающего свойством «вентилья», то есть конструкции типа «храповик – собачка» [8]. Спиральные конструкции, по нашим представлениям, способны быть нелинейными вентильными устройствами по вращательным степеням свободы. Простейшее механическое соображение: плотно завитая пружинка легко раскручивается в одну сторону, но резко тормозит закручивание в другую. В макромолекулах они должны представлять собой макроскопические конструкции, поскольку должны характеризоваться долгоживущими состояниями по сравнению с тепловыми.

Молекулярные машины являются иерархическими динамическими устройствами, циклически сопрягающими преобразование формы энергии, необходимое для совершения полезной работы, и череду преобразований симметрии в конструктивных элементах («рабочем теле»), составляющих «выделенные (квази)механическими степенями свободы» при самосборке и переключающих их при функционировании. Ранее нами была сформулирована и обоснована концепция, согласно которой, физической основой молекулярной биологии и молекулярных машин является периодическая система связанных симметричными соотношениями знакопеременных хиральных структур во внутри- и надмолекулярных иерархиях структур важнейших классов биомacroмолекул. Выявлена общая закономерность: начиная с уровня асимметричного углерода в дезоксирибозе и аминокислотах, прослежена тенденция чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней D-L-D-L для ДНК и L-D-L-D для белков [11-13]. Проявлениями хиральности выступают также спиральность и суперспиральность структур. Составленное этими иерархиями ядро молекулярной биологии интегрально составляет уже ахиральный инвариант, а сами эти структуры непосредственно реализуют выделенные механические степени свободы молекулярных машин.

Кстати, напомним, что описанное явление чередования хиральных уровней при структурообразовании в гомохиральных системах есть общее их свойство, характерное и для искусственных полимерных систем, а не только биополимерных [11-13].

Левинталь перешел от двумерной потенциальной ямы, принятой как образ в представлениях квантовой механики, к трехмерной модели [11-14]. Но, по существу, потенциальная ловушка Левинталя – многомерное понятие, т.к. многие физические факторы определяют её характеристики. Один из них – хиральность, дополненная электрическими несимметриями. В физической трактовке ловушки Левинталя имеется заведомая двоякость: есть стохастическая компонента движения по воронке за счет флуктуаций и блужданий, а есть

детерминированная, которую задаёт симметричность. Случайные блуждания характерны для неупорядоченных элементов пептидной цепи, а макроскопические структурированные элементы в своих движениях детерминированы, поскольку, в наших представлениях, есть конструктивно заданное релаксационное движение при фолдинге и при работе машины. В одном случае – к нативной квазистационарной структуре при самоукладке – фолдинге, а во втором случае – от «возбужденного» состояния из неравновесных конформаций – к тому же уровню, но уже с другой стороны, по координате химической реакции. Это уже не химия, а механохимия.

Ранее мы высказывали соображение о том, что формирование α -спиралей и суперспиралей, образованных их взаимным скручиванием, с физической точки зрения можно рассматривать как процесс автоволновой самоорганизации в активных средах [11,15,16]. Распределенный ресурс энергии по энтропийной компоненте создаётся исходной гомохиральностью первичной аминокислотной структуры – пептидной цепи, созданной с затратой энергии (АТФ) т-РНК при отборе левых аминокислот из присутствующей в клеточной среде смеси левых и правых аминокислот. Понижая свободную энергию системы и повышая энтропию, левая аминокислотная цепочка скручивается в правую α -спираль. Водородные же связи стабилизируют правую спиральную структуру (энтальпийный компонент). Далее процесс скручивания продолжается, уже на уровне суперспиралей, уже с правым знаком, что ещё более понижает уровень энергии и повышает энтропию. В этом примере наглядно видно, как явления смены/нарушения типа симметрии напрямую связаны с преобразованием энергии. Важно отметить, что формирование регулярных структур в белковых цепях существенным образом связано с их движением в вязкой среде в процессе фолдинга при выходе из рибосомного туннеля [17]. В принципе, подобный подход может быть использован и для описания функционирования нуклеиновых кислот, иерархически также хирально знакопеременных [11], но в данной работе мы не предполагаем обсуждать данный аспект их фолдинга и функционирования.

Сейчас речь шла о фолдинге. Но ещё более впечатляющим представляется соображение о важности симметричного фактора уже в работе белковых молекул в качестве молекулярных машин. Чуть более 100 лет назад в 1918 году Эмми Нётер доказала систему теорем о том, что законам сохранения соответствуют различного рода симметрии (см. [18]). На сегодняшний день это стало целым направлением теоретической физики. Вместе с тем, нам не известны случаи применения этих соображений к работе машин вообще, начиная с тепловых, и вплоть до молекулярных. Другое дело, что, к примеру, наш великий соотечественник физик Н.А. Умов, обсуждая работу паровоза, отмечал, что машина «умеет» понижать энтропию в системе за счет сторонних сил (энергии). Молекулы пара движутся хаотично, а конструкция цилиндров и поршней переводит движение в направленное. Теперь в теории машин можно перейти к формулировкам Нётер – машины понижают ранг симметрии. Хаотическое движение молекул пара – высшая симметрия, а движение паровоза есть вектор. В целом же о машинах, в частности о молекулярных машинах, которые для производства любой полезной работы обязательно преобразуют форму энергии, можно сказать, что они с необходимостью делают это сопряженно с последовательным нарушением типа симметрии. Применительно к молекулярным машинам мы можем привязать последовательное преобразование форм энергии к цепочке нарушений симметрии посредством смены типа симметрии и знака хиральности при движении по машинному циклу. Сразу подчеркнём, что любая машина – хиральный объект, поскольку цикл должен быть однопольным.

Феномен хиральности позволяет формировать дискретные хирально знакопеременные иерархии структур в макромолекулярных машинах в процессе фолдинга, а также, в рамках развиваемых представлений, обеспечивает однопольное движение машин по энергетическому циклу за счет нелинейных вентильных свойств спиральных внутри- и надмолекулярных структур. Нелинейность вентиль- α -спирали не только в том, что несимметричны правые и левые вращения относительно хиральной спирали, но разнятся и физические причины нарушения симметрии: переключается механизм: водородные связи держат в одном направлении, а «механика» – в обратном. На данный момент актуален теоретический анализ вентильных свойств спиральных и суперспиральных структур белковых макромолекул. А сами белки-машины в силу их структурной неоднородности и иерархичности как механические системы следует отнести к неголономным системам, в которых, кроме геометрических, накладываются и кинематические связи, которые нельзя свести к геометрическим. Как известно, математическое описание динамики подобных систем вызывает значительные сложности, даже в относительно простых случаях.

Наподобие того как скелет млекопитающих имеет подвижные нежесткие связи между костями, что в целом обеспечивает сложно организованное движение организма в пространстве, так и жесткими деталями конструкций молекулярных машин (α -спиралями, суперспиралями и β -структурами), соединёнными нерегулярными фрагментами пептидной цепи, обеспечивается скоординированная в пространстве и времени работа молекулярных машин. В этой связи представляются реальными представления о коллективном поведении квазикристаллической белковой глобулы или фибриллы в ходе фолдинга или машинного цикла («аперриодический кристалл» в представлениях Э. Шредингера [19]). Аминокислотная гомохиральность первичной структуры создаёт распределённую в пространстве термодинамическую неравновесность за счет нарушения симметрии (энтропийный компонент запаса свободной энергии), а связывание лиганда, субстрата или лекарства с макромолекулой создаёт «энтальпийное возмущение» в ней и запускает релаксационный механизм машинного цикла.

Рецепторы-мишени лекарственных препаратов также можно отнести к классу макромолекул-машин. Среди используемых в настоящее время лекарственных средств больше половины составляют хиральные препараты, а, в свою очередь, большая часть этих хиральных лекарств представляет собой рацемат. Более половины

разрабатываемых за последние годы лекарств также состоят из хиральных молекул. Хиральные препараты используют в лечении широкого спектра заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных. Получение оптически чистых форм вещества является сложной и дорогостоящей задачей, однако их использование во многих случаях могло бы уменьшить дозировку и количество побочных действий препарата. Стереоспецифичность взаимодействия лекарства и молекулы-мишени важно учитывать при создании лекарственных препаратов, так как одна хиральная форма лекарственного препарата может обладать терапевтическим эффектом, а другая не усваиваться, быть менее активной или даже вызывать серьезные осложнения, являться токсичной.

Заключение. До сих пор остаётся без внятного общепринятого ответа давний вопрос, зачем природа сделала белки-ферменты и другие белки большими, тогда как биохимиками и молекулярными биологами принято считать достаточными комплементарные взаимодействия в активных центрах. Однако, ответ на этот вопрос имеется, причем ответ вразумительный и четкий. Универсальный принцип молекулярной биологии – комплементарность взаимодействий, обеспечивающая специфичность функционирования биомакромолекул, реально обеспечивает стадию распознавания («ключ – замок»), а функциональные стадии, к примеру, ферментативного цикла реализуются всей белковой макромолекулой – квазимеханическими внутри- и межмолекулярными конструкциями молекулярных машин, о которых шла речь в настоящей работе. В качестве одного из обоснований существования внутримолекулярных дальних взаимодействий в белковой глобуле имеет смысл вспомнить об аллостерической регуляции в ферментах [20] и о важности её взаимодействия с водным и ионным окружением [21].

С учетом высказанных выше соображений приведём следующее определение молекулярной машины. **Молекулярная машина есть иерархическое устройство, циклически сопрягающее преобразование формы энергии, необходимое для совершения полезной работы, и череду преобразований или переключений симметрии в её регулярных структурных хиральных элементах, реализующих выделенные «квазимеханические» степени свободы и контролирующих движение системы по заданному направлению цикла.**

Можно полагать, что с использованием новейших экспериментальных возможностей и новейшей вычислительной техники, новых моделей, алгоритмов и программ появляется возможность уже в скором времени изучить и понять тонкие детали внутримолекулярной динамики конкретных молекулярных машин – ферментов разных классов, мембранных насосов, сократительных систем, рецепторов-мишеней лекарств и пр.

Список литературы / References:

1. Пригожин И., Кондепуди Д. *Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур*. М.: УРСС, 2002, 461 с. [Prigogine I., Kondepudi D. *Modern thermodynamics. From heat engines to dissipative structures*. M.: URSS, 2002, 461 p. (In Russ.)]
2. Блюменфельд Л.А. *Проблемы биологической физики*. Изд. 2-е. М.: Гл. ред. физ.-мат. лит. изд-ва «Наука», 1977, 336 с. [Blumenfeld L.A. *Problems of biological physics*. Ed. 2nd. M.: Ch. ed. Phys.-Math. lit. izd-va "Nauka", 1977, 336 p. (In Russ.)]
3. Шноль С.Э., Чернавский, Д.С., Хургин Ю.И. Молекула белка-фермента как механическая система. В сб. *Колебательные процессы в биол. и хим. системах*. М.: Наука, 1967, с. 42-50. [Shnol S.E., Chernavsky D.S., Khurgin Yu.I. The protein-enzyme molecule as a mechanical system. In comp. *Oscillatory processes in biol. and chem. systems*. M.: Nauka, 1967, pp. 42-50. (In Russ.)]
4. Чернавский Д.С., Чернавская Н.М. *Белок - машина. Биологические макромолекулярные конструкции*. М.: Янус-К, 1999, 256 с. [Chernavsky D.S., Chernavskaya N.M. *Protein is a machine. Biological macromolecular structures*. Moscow: Janus-K, 1999, 256 p. (In Russ.)]
5. Drexler K. Eric Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology. *Anchor Books*, New York, 1986.
6. Kolomeisky A.B. *Motor Proteins and Molecular Motors* CRC Press Taylor & Francis Group 2015 by Taylor & Francis Group, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business, 195 p.
7. Блюменфельд Л.А. Молекулярные машины живой клетки. *Природа*, 1981, № 6, с. 66-73. [Blumenfeld L.A. Molecular machines of the living cell. *Nature*, 1981, no. 6, pp. 66-73. (In Russ.)]
8. Фейнман Р., Лейтон Р., Сэндс М. *Фейнмановские лекции по физике*. Librocom, 2017, т. 4, 264 с. [Feynman R., Layton R., Sands M. *Feynman Lectures on Physics*. Librocom, 2017, vol. 4, 264 p. (In Russ.)]
9. Аветисов В.А. Молекулярные машины, и как их делать. [Avetisov V.A. *Molecular machines and how to make them*. <https://www.youtube.com/watch?v=NWP1eaR9Zj4> (In Russ.)]
10. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. *Физические механизмы функционирования биологических мембран*. Изд. МГУ, М.: 1987, 189 с. [Tverdislov V.A., Tikhonov A.N., Yakovenko L.V. *Physical mechanisms of functioning of biological membranes*. Ed. Moscow State University, Moscow: 1987, 189 p. (In Russ.)]
11. Твердислов В.А., Малышко Е.В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы. *Успехи физических наук*, 2019, т. 189, № 4, с. 375-385. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V. On the patterns of spontaneous formation of structural hierarchies in chiral systems of inanimate and living nature. *Uspekhi fizicheskikh nauk*, 2019, vol. 189, no. 4, pp. 375-385. (In Russ.)]
12. Tverdislov V.A., Malyshko E.V. Chiral dualism as an instrument of hierarchical structure formation in molecular biology. *Symmetry*, 2020, vol. 12, no. 4, p. 587.

13. Малышко Е.В., Муртазина А.Р., Твердислов В.А. Хиральность как физическая основа иерархической периодизации структур биомакромолекул. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 2, с. 213-218. [Malyshko E.V., Murtazina A.R., Tverdislov V.A. Chirality as a physical basis for hierarchical periodization of biomacromolecule structures. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 213-218. (In Russ.)]
14. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами*. М.: КДУ, 2012, 524 с. [Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. *Protein Physics: A course of lectures with color and stereoscopic illustrations and tasks*. M.: KDU, 2012, 524 p. (In Russ.)]
15. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам. *Известия Российской академии наук. Серия физическая*, 2015, т. 79, № 3, с. 1728-1732. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Ilchenko S.A. From autowave mechanisms of self-organization to molecular machines. *News of the Russian Academy of Sciences. Physical series*, 2015, vol. 79, no. 3, pp. 1728-1732. (In Russ.)]
16. Сидорова А.Э., Левашова Н.Т., Малышко Е.В., Твердислов В.А. Автоволновая самоорганизация в фолдинге белков. *ВМУ*, 2019, № 3, с. 3-14. [Sidorova A.E., Levashova N.T., Malyshko E.V., Tverdislov V.A. Autowave self-organization in protein folding. *VMU*, 2019, no. 3, pp. 3-14. (In Russ.)]
17. Шайтан К.В. Эффекты скрытой симметрии в динамике линейных полимеров и биополимеров. *Биофизика*, 2022, т. 67, № 3, с. 492-515. [Shaitan K.V. Effects of hidden symmetry in the dynamics of linear polymers and biopolymers. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 492-515. (In Russ.)]
18. Левин А. Великой теореме Эмми Нётер - 100 лет. *Элементы*. [Levin A. Emmy Noether's Great Theorem - 100 years. *Elements*. https://elementy.ru/novosti_nauki/433257/Velikoy_teoreme_Emmi_Nyoter_100 лет (In Russ.)]
19. Шрёдингер Э. Что такое жизнь? *Физический аспект живой клетки*, 3-е изд., Ижевск: ПХД, 2002, 176 с. [Schrodinger E. What is life? *Cambridge: University Press*, 1944, 176 p. (In Russ.)]
20. Корниш-Боуден Э. *Основы ферментативной кинетики*. М.: Мир, 1979, 280 с. [Cornish-Bowden E. *Fundamentals of enzymatic kinetics*. M.: Mir, 1979, 280 p. (In Russ.)]
21. Уэй Т. *Физические основы молекулярной биологии*. Учебное пособие, Долгопрудный: Издательский дом «Интеллект», 2010, 363 с. [Way T. *Physical foundations of molecular biology*. Textbook, Dolgoprudny: Intellect Publishing House, 2010, 363 p. (In Russ.)]

SYMMETRY BREAKING IS THE PHYSICAL BASIS FOR THE PERFORMANCE OF "USEFUL WORK" BY BIOLOGICAL MOLECULAR MACHINES

Tverdislov V.A.

M.V. Lomonosov Moscow State University

st. Leninskie Gory, 1, building 2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: tverdislov@mail.ru

Received 09.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0559

Abstract. The physical basis for the functioning of living systems are molecular machines. The performance of "useful work" is the essence of their biological functions. Molecular machines are chiral hierarchically organized devices (constructions). They cyclically transform the form of energy by changing or switching symmetries in its chiral structural elements, which just realize the selected "quasi-mechanical" degrees of freedom in them. The phenomenon of chirality allows the formation of discrete chirally sign-alternating hierarchies of structures in macromolecular machines in the process of folding: starting from the level of asymmetric carbon in deoxyribose and amino acids. Previously, we have identified and analyzed the tendency of alternation of the sign of chirality of the intramolecular structural levels D-L-D-L for DNA and L-D-L-D for proteins. Helicity and superhelicity of intramolecular and supramolecular structures are also manifestations of chirality. Also, within the framework of the developed ideas, the chiral splitting of the properties of the elements of the structures ensures the unidirectional movement of machines along the energy cycle due to the nonlinear valve properties of the spiral structures. Spiral structures can serve as asymmetric, non-linear, mechanical, including switching, structural elements of molecular machines (like a ratchet-pawl device) in terms of rotational degrees of freedom.

Key words: molecular machines, proteins, thermodynamics, symmetries, chirality, self-organization, nonlinearity, folding, helices, supercoils, ventilarity.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ ИОНАМИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Васильева М.А., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований

ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: mal2008@jinr.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0560

Аннотация. В настоящей работе предложено математическое описание основных путей репарации односторонних разрывов (ОР) ДНК, повреждений оснований (ПО), двусторонних разрывов (ДР) ДНК в клетках млекопитающих и человека. Модельный подход отражает ключевые молекулярные механизмы восстановления ДНК путем репарации односторонних разрывов ДНК, эксцизионной репарации оснований (BER), нехомологичного воссоединения концов (NHEJ). Для формализации молекулярных механизмов составлена динамическая система из дифференциальных уравнений, описывающая химическую кинетику белковых взаимодействий в соответствии с современными представлениями молекулярной биологии. Учет всех трех репарационных механизмов позволяет более полно описать ответ клетки на облучение тяжелыми заряженными частицами. Предложенная модель корректно описывает основные процессы, протекающие в ходе репарации ОР, BER и NHEJ. В ходе работы рассчитана временная динамика формирования и репарации ключевых типов повреждений ДНК (ПО, ОР, ДР) в клетках человека при действии ионов ^{56}Fe ($E = 600$ Мэв/нукл). Проведен сравнительный анализ выхода и репарации повреждений ДНК при действии ионов ^{12}C ($E = 270$ Мэв/нукл) и ^{56}Fe ($E = 600$ Мэв/нукл) в дозе 1 Гр.

Ключевые слова: односторонние разрывы ДНК, двусторонние разрывы ДНК, повреждения оснований, кластерные разрывы ДНК, ЛПЭ, репарация, моделирование.

Тяжелые заряженные частицы при воздействии на клетку способны индуцировать повреждения ДНК разной степени сложности, включая односторонние (ОР) и двусторонние (ДР) разрывы ДНК, повреждения оснований (ПО), а также труднорепазируемые кластерные разрывы ДНК. Причем характер повреждений ДНК изменяется в зависимости от величины линейной передачи энергии (ЛПЭ) различных заряженных частиц. Так, в работе [1] было показано, что ростом ЛПЭ выход ОР и ПО уменьшается, а выход ДР и кластерных двусторонних разрывов (кДР) наоборот возрастает. Образование тяжелых повреждений ДНК влечет за собой нарушения генетических структур, что приводит к гибели клеток, а также появлению мутантных форм белков, являющихся основной причиной онкогенеза. Для поддержания целостности ДНК в процессе эволюции в клетках сформировалась сложная система восстановления структуры ДНК, которая распознает различные типы повреждений и активирует специфические пути репараций поврежденной ДНК [2]. Поэтому изучение систем репарации повреждений ДНК, механизмов активации и взаимодействия ключевых репаративных белков, действие которых направлено на восстановление возникающих повреждений ДНК, является актуальной задачей современной радиобиологии.

Наличие в клетках живых организмов целого ряда систем репарации ДНК обусловлено широким спектром повреждений структуры ДНК, образующихся при действии факторов внешней и внутренней среды. Клетки млекопитающих могут использовать различные пути восстановления ДНК в зависимости от типа повреждения, распределения повреждения и фазы клеточного цикла. При действии ионизирующего излучения (ИИ) наиболее частыми повреждениями структуры ДНК являются поврежденные (модифицированные) основания, которые восстанавливаются в ходе эксцизионной репарации оснований (BER) [3]. Такие повреждения не приводят к нарушению репликации, но являются источником мутаций. Односторонние разрывы ДНК в клетках про- и эукариот представлены в виде: прямых ОР, образующихся в результате разрыва сахарофосфатного остова ДНК при действии ИИ, и энзиматических ОР, возникающих в процессе энзиматического расщепления фосфодиэфирной связи в ходе BER. Восстановление таких повреждений осуществляется посредством репарации односторонних разрывов ДНК и эксцизионной репарации оснований, соответственно [4]. В клетках млекопитающих для удаления наиболее тяжелых структурных повреждений ДНК, представляющих собой двусторонние разрывы, применяются гомологичная рекомбинация (HR), нехомологичное воссоединение концов (NHEJ) [5-7]. Считается, что HR является точным путем репарации, в то время как в ходе работы NHEJ возможны делеции и вставки нескольких пар нуклеотидов [8,9]. В клетках млекопитающих и человека NHEJ является основным репаративным процессом, способным восстанавливать повреждения ДНК в любой фазе клеточного цикла. Напротив, работа HR ограничена поздней S и G2 фазами, т.к. для ее реализации требуется наличие сестринской хромосомы [10].

В последние годы молекулярная биология выявила значительное число качественной и количественной информации о механизмах действия репаративных белков на различные типы повреждений, вызванных ионизирующим излучением. Однако полноценное изучение данного явления представляется крайне затруднительным без применения методов математического моделирования, которые позволяют систематизировать экспериментальные данные и более полно описать закономерности молекулярных

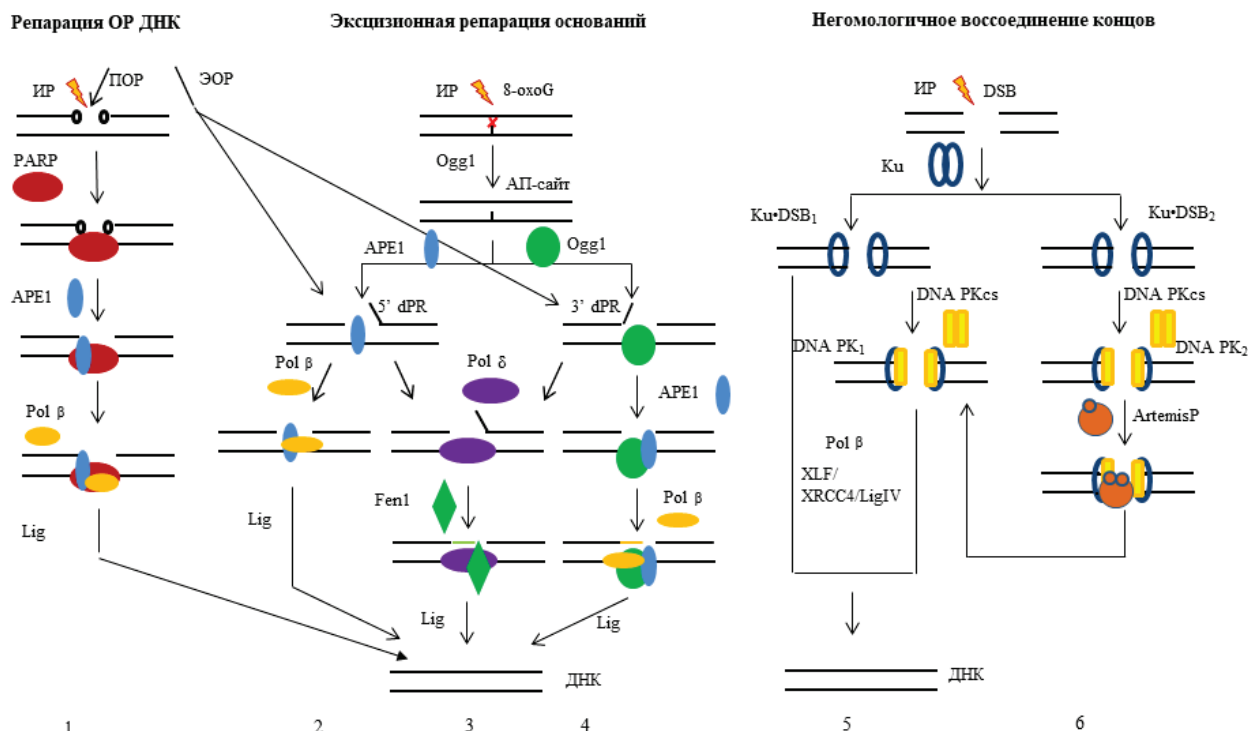


Рисунок 1. Схема механизмов репарации ДНК в клетках млекопитающих и человека

взаимодействий, ответственных за восстановление поврежденной ДНК. Большинство существующих в настоящее время работ по математическому моделированию в области репарации ДНК в клетках млекопитающих и человека представляют собой модели отдельных путей восстановления повреждений ДНК и в них не рассматриваются возможные взаимодействия между различными путями репарации [11-15]. В рамках настоящего исследования предложено математическое описание основных путей репарации повреждений ДНК: репарация одонитевых разрывов ДНК, эксцизионная репарация оснований, негомологичное воссоединение концов.

Математическая модель. На основании современных экспериментальных данных выделены ключевые пути процессов репарации ДНК, вносящие наибольший вклад в эффективность репарации ОР, BER, NHEJ (рис. 1). Формализация молекулярных механизмов выполнена с использованием подхода, основанного на классическом описании ферментативных взаимодействий посредством кинетических уравнений. Наряду с моделированием взаимодействий основных регуляторных белков и белковых комплексов было учтено наличие метастабильных состояний ДНК, формирующихся на разных стадиях репарации.

Экцизионная репарация оснований. Экцизионная репарация оснований представляет собой сложную систему скоординированных последовательных ферментативных реакций, направленных на удаление ряда повреждений ДНК: модифицированные основания, АП-сайты, одонитевые разрывы ДНК. Одним из наиболее изученных и часто встречающихся типов поврежденных оснований ДНК, в ходе опосредованного действия ИИ на клетки, является 8-оксогуанин (8-охоG). ДНК-гликозилаза (Ogg1) распознает и удаляет сайт, содержащий 8-охоG, путем гидролиза N-гликозильной связи между сахарофосфатным остовом и поврежденным основанием, инициируя таким образом BER [16]. В результате удаления модифицированного основания в молекуле ДНК образуется АП-сайт. В некоторых случаях Ogg1, проявляя активность АП-лиазы, способна расщеплять нить ДНК с 3' конца от АП-сайта, и формировать одонитевой разрыв (рис. 1₄). Затем АП-эндонуклеаза (Ape1), обладающая 3'-фосфодиэстеразной активностью, удаляет 3'-обструктивный конец, который препятствует репаративному синтезу. После удаления 3'-блокирующей группы ДНК-полимераза β (Polβ) заполняет брешь ДНК, которая в последствии восстанавливается с помощью ДНК-лигазы 1 (Lig1).

В большинстве случаев разрыв фосфодиэфирной связи ДНК с 5' конца от АП-сайта осуществляется Ape1 эндонуклеазой (рис. 1₂). При этом образуются нормальная 3'-гидроксильная группа и 5'-дезоксирибозофосфатный (dRp) фрагмент. Белок Polβ, обладая полимеразной и dRp-лиазной активностями, синтезирует образовавшийся разрыв цепи ДНК длиной 1 бп и удаляет 5' dRp фрагмент ДНК. Завершается репарационный синтез лигированием посредством комплекса XRCC1/Lig3.

Существует также альтернативный путь BER (рис. 1₃), который включает синтез участка ДНК длиной более одного нуклеотида PCNA-зависимыми полимеразми Pol δ или Pol ε. В ходе работы Pol δ происходит вытеснение участка ДНК, содержащей нуклеотид с поврежденным 5'-концом (flap structure), который удаляется с помощью эндонуклеазы FEN1, а конечный разрыв восстанавливается ДНК-лигазой 1 или XRCC1/Lig3 комплексом.

Имеющиеся экспериментальные данные показывают, что в клетках млекопитающих ежедневно образуются спонтанные повреждения оснований. Их число варьирует в пределах 100-500 сайтов 8-охоG в день [17], и примерно 10000 АП-сайтов в день [18]. Учитывая этот факт, кинетические изменения белков и белковых комплексов BER (рис. 1₂₋₄) можно описать в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений, где, согласно основному уравнению ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментена, k_i – константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса, K_i – коэффициент Михаэлиса для реакции типа i , значения вида $[A]$ – внутриклеточные концентрации белков и белковых комплексов системы BER:

$$\begin{aligned}\frac{d[8\text{-охоG}]}{dt} &= 10^{-3} - \frac{k_1 \cdot [\text{Ogg1}] \cdot [8\text{-охоG}]}{[8\text{-охоG}] + K_1}, \\ \frac{d[\text{AP}]}{dt} &= 0.12 + \frac{k_1 \cdot [\text{Ogg1}] \cdot [8\text{-охоG}]}{[8\text{-охоG}] + K_1} - k_2 \cdot [\text{AP}] - \frac{k_3 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[\text{AP}] + K_3}, \\ \frac{d[3'\text{dPR}]}{dt} &= k_2 \cdot [\text{AP}] - \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_4} - \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_7}, \\ \frac{d[\text{SSBe}]}{dt} &= \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_4} - \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSBe}]}{[\text{SSBe}] + K_5}, \\ \frac{d[\text{SSBe} + \text{Pol}\beta]}{dt} &= \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSBe}]}{[\text{SSBe}] + K_5} - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSBe} + \text{Pol}\beta]}{[\text{SSBe} + \text{Pol}\beta] + K_6}, \\ \frac{d[5'\text{dPR}]}{dt} &= \frac{k_3 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[\text{AP}] + K_3} - \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_5} - \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_7}, \\ \frac{d[5'\text{dPR} - \text{Pol}\beta]}{dt} &= \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_5} - k_8 \cdot [5'\text{dPR} - \text{Pol}\beta], \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{dt} &= k_8 \cdot [5'\text{dPR} - \text{Pol}\beta] - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\delta]}{dt} &= \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_7} + \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_7} - \frac{k_9 \cdot [\text{Fen1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta] + K_9}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}]}{dt} &= \frac{k_9 \cdot [\text{Fen1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta] + K_9} - \frac{k_6 \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}] \cdot [\text{Lig1}]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}] + K_6}, \\ \frac{d[\text{DNA}]}{dt} &= \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSBe} + \text{Pol}\beta]}{[\text{SSBe} + \text{Pol}\beta] + K_6} + \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6} + \frac{k_6 \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}] \cdot [\text{Lig1}]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}] + K_6} + \frac{k_6 \cdot [\text{Lig3}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6}.\end{aligned}$$

Репарация ор ДНК. Однонитевые разрывы представляют собой нарушение целостности одной из двух нитей ДНК. Репарация энзиматических ОР, продуцируемых APE1 эндонуклеазой, осуществляется в ходе работы ферментов BER [4]. Напротив, прямые ОР, как результат непосредственного действия ИИ на фрагменты ДНК, являются субстратом для белка PARP1 (рис. 1₁). Белок PARP – ключевой белок системы репарации однонитевых разрывов ДНК. Связываясь с ДНК, он активирует синтез других ферментов репарации, участвует в синтезе АТФ при осуществлении заключительной стадии репарации – лигировании концевых групп ДНК, и ингибирует нежелательную рекомбинацию. Большинство ОР ДНК имеют 3'- и 5'-концы, препятствующие нормальному синтезу нити ДНК. Для завершения репарации эти концы должны быть восстановлены до 3'-ОН и 5'-РО₄ фрагментов. Прямые ОР содержат 3' -фосфатный которые удаляются посредством эстеразной активности APE1 эндонуклеазы. Большая роль в этом процессе отводится белку XRCC1, способному рекрутировать и стимулировать работу полипептидов в ходе репарации ОР. Затем ДНК-полимераза β синтезирует обработанный ОР, и завершается репарационный процесс лигированием концов ДНК лигазой 1.

Описанный выше процесс схематически изображен на (рис. 1₁), и представлен в виде следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{SSB}]}{dt} &= - \frac{k_{10} \cdot [\text{PARP}] \cdot [\text{SSB}]}{[\text{SSB}] + K_{10}}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{PARP}]}{dt} &= \frac{k_{10} \cdot [\text{PARP}] \cdot [\text{SSB}]}{[\text{SSB}] + K_{10}} - \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [\text{SSB} - \text{PARP}]}{[\text{SSB} - \text{PARP}] + K_4}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{APE1}]}{dt} &= \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [\text{SSB} - \text{PARP}]}{[\text{SSB} - \text{PARP}] + K_4} - \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSB} - \text{APE1}]}{[\text{SSB} - \text{APE1}] + K_5}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{dt} &= \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSB} - \text{APE1}]}{[\text{SSB} - \text{APE1}] + K_5} - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig3}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6}.\end{aligned}$$

Негомологичное воссоединение концов (NHEJ). Двунитевые разрывы ДНК представляют собой наиболее опасный тип повреждений ДНК, который часто приводит к индукции структурных генных мутаций, хромосомных aberrаций и к гибели клеток в целом [20]. Репарация ДР ДНК в клетках млекопитающих осуществляется в ходе негомологичного воссоединения концов на протяжении всех фаз клеточного цикла. В ходе NHEJ комплекс белков Ku70 и Ku80 распознает и образует кольцо вокруг поврежденных концов ДНК, обладая высоким сродством к ним [21]. Затем Ku присоединяет ДНК-зависимую каталитическую субъединицу протеинкиназы (DNA-PKcs), образуя комплекс ДНК-ПК (молекула ДНК, Ku, и ДНК-ПКcs) [22]. Находясь внутри комплекса ДНК-ПК, белок ДНК-ПКcs становится активным и фосфорилирует несколько мишеней, в том числе и себя. Предполагается, что это аутофосфорилирование необходимо для диссоциации молекул ДНК-ПКcs с поврежденных концов ДНК [23]. Ku и ДНК-ПК способны связывать комплекс, состоящий из XRCC4-подобного фактора (XLF), XRCC4 и ДНК лигазы IV (комплекс XXL). XLF и XRCC4 повышают стабильность и активность ДНК лигазы IV, которая необходима для соединения поврежденных концов [24-26].

Репарация ДР ДНК состоит из быстрой и медленной фаз. Быстрая фаза репарации осуществляется механизмом, описанном выше (рис. 1₅). На ее долю приходится 80-90% двунитевых повреждений ДНК. Однако примерно 10 - 20% ДР ДНК восстанавливаются в ходе медленной фазы (рис. 1₆). Имеются данные, что такие повреждения носят комплексный характер, определяющийся наличием вблизи двунитевого разрыва ДНК поврежденного основания, одноститевого разрыва, двух или более ДР ДНК в пределах одного - двух спиральных витков ДНК [26,28]. Медленный тип репарации зависит от белков ataxia telangiectasia mutated (ATM) и Artemis, помимо основных компонентов NHEJ. Предполагается, что белки ATM и Artemis необходимы для обработки концов поврежденной ДНК перед лигированием [29,30]. Несмотря на то, что во время медленной фазы NHEJ восстанавливается небольшое количество ДР, сбой в функции ATM и Artemis значительно снижает выживаемость клеток в фазе G1 клеточного цикла.

Схематическое описание кинетической модели NHEJ представлено на рисунке 1₅₋₆. В модели белки Ku70 и Ku80 объединены в один белковый комплекс Ku, который представляет собой димер, обладающий высоким сродством к концевому участку ДР ДНК. С другой стороны, на заключающем этапе NHEJ в лигировании свободных двунитевых концов ДНК участвует комплекс связанных белков – XLF-XRCC4/ligase IV, объединенных в гомодимер XXL.

Учитывая существование двух фаз репарации NHEJ, можно разделить белковые комплексы, образующиеся при связывании димера Ku с ДР ДНК, на две группы: Ku-DSB₁ и Ku-DSB₂. Ku-DSB₁ и Ku-DSB₂ участвуют в восстановлении двунитевых разрывов ДНК в ходе быстрой и медленной фаз репарации, соответственно. Их выход в работе представлен в следующем долевым соотношении: 0,85 молекул Ku-DSB₁ и 0,15 молекул Ku-DSB₂.

Математическое описание представленных этапов NHEJ можно записать в виде следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{DSB}]}{dt} &= -v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2, \\ \frac{d[\text{Ku}]}{dt} &= -2 \cdot v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2 + 2 \cdot \frac{k_{15} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{Ku-DSB1}] + K_{15}} + 2 \cdot \frac{k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}}, \\ \frac{d[\text{Ku-DSB1}]}{dt} &= 0.85 \cdot v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2 - v_{12} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{DNA-PKcs}]^2 - \frac{k_{15} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{Ku-DSB1}] + K_{15}}, \\ \frac{d[\text{Ku-DSB2}]}{dt} &= 0.15 \cdot v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2 - v_{13} \cdot [\text{Ku-DSB2}] \cdot [\text{DNA-PKcs}]^2, \\ \frac{d[\text{DNA-PKcs}]}{dt} &= -2 \cdot v_{12} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{DNA-PKcs}]^2 - 2 \cdot v_{13} \cdot [\text{Ku-DSB2}] \cdot [\text{DNA-PKcs}]^2 + \frac{2 \cdot k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}}, \\ \frac{d[\text{DNA PK1}]}{dt} &= v_{12} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{DNA-PKcs}]^2 - \frac{k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}} + \frac{k_{18} \cdot 2 \cdot [\text{DNA PK2}] \cdot [\text{ArtemisPP}]}{2 \cdot [\text{DNA PK2}] + K_{18}}, \\ \frac{d[\text{Artemis}]}{dt} &= -\frac{k_{16} \cdot [\text{Artemis}] \cdot [\text{ATM}]}{[\text{Artemis}] + K_{16}}, \\ \frac{d[\text{ArtemisP}]}{dt} &= \frac{k_{16} \cdot [\text{Artemis}] \cdot [\text{ATM}]}{[\text{Artemis}] + K_{16}} - \frac{k_{17} \cdot 2 \cdot ([\text{DNA PK1}] + [\text{DNA PK2}]) \cdot [\text{ArtemisP}]}{[\text{ArtemisP}] + K_{17}}, \\ \frac{d[\text{ArtemisPP}]}{dt} &= \frac{k_{17} \cdot 2 \cdot ([\text{DNA PK1}] + [\text{DNA PK2}]) \cdot [\text{ArtemisP}]}{[\text{ArtemisP}] + K_{17}}, \\ \frac{d[\text{DNA PK2}]}{dt} &= v_{13} \cdot [\text{Ku-DSB2}] \cdot [\text{DNA-PKcs}]^2 - \frac{k_{18} \cdot 2 \cdot [\text{DNA PK2}] \cdot [\text{ArtemisPP}]}{2 \cdot [\text{DNA PK2}] + K_{18}}, \end{aligned}$$

$$\frac{d[\text{Repaired DSB}]}{dt} = \frac{k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}} + \frac{k_{15} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{Ku-DSB1}] + K_{15}}.$$

Параметры модели. В рамках настоящего исследования предложено математическое описание основных путей репарации повреждений ДНК (репарация односторонних разрывов ДНК, эксцизионная репарация оснований (BER), нехомологичное воссоединение концов (NHEJ)). Для формализации молекулярных механизмов составлена динамическая система из дифференциальных уравнений, описывающая химическую кинетику белковых взаимодействий. Параметры модели, представленные в таблице 1, были получены из экспериментальных данных.

Начальные концентрации белков каждого вида определяются как количество молекул этого вида на ядро клетки. Значения начальных концентраций ключевых белков репаративных систем представлены в таблице 2. Значения концентраций промежуточных белковых комплексов в начальный момент времени приняты равными 0.

Значения, характеризующие выход начальных повреждений ДНК на 1 Гр поглощенной дозы при воздействии на ядро клетки тяжелых ядер железа и углерода (табл. 3), взяты из работы [1].

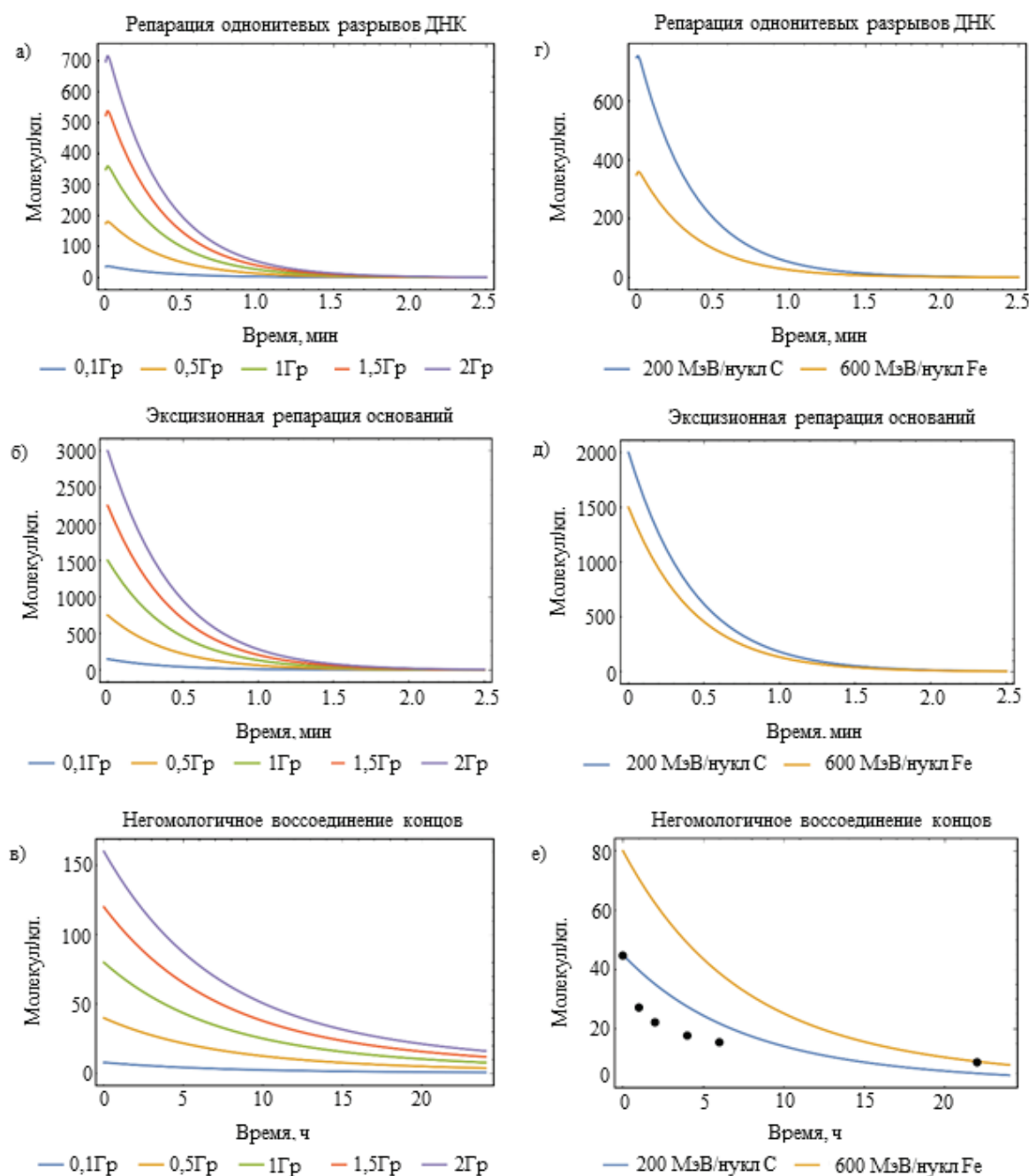


Рисунок 2. Модельный расчет динамики процессов репарации ОР ДНК, ПО и ДР ДНК в клетках человека при действии ионов: (а-в) ^{56}Fe с ЛПЭ = 170 кэВ/мкм в дозах 0,1 Гр, 0,5 Гр, 1 Гр, 1,5 Гр, 2 Гр; (г-е) ^{12}C с ЛПЭ = 16 кэВ/мкм и ^{56}Fe с ЛПЭ = 170 кэВ/мкм в дозе 1 Гр. Экспериментальные данные по репарации ДР в фибробластах кожи человека, индуцируемые ионами ^{12}C представлены в работе [30]

Таблица 1. Значения параметров модели

Параметр	Значение, ед.	Параметр	Значение, ед.	Параметр	Значение, ед.
k_1	$7,55 \cdot 10^{-3}$, сек ⁻¹	k_{15}	$6,67 \cdot 10^{-4}$, сек ⁻¹	K_{10}	7183, молек/кл
k_2	$1,335 \cdot 10^{-4}$, сек ⁻¹	k_{16}	$1,9 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_{14}	10000, молек/кл
k_3	3,08, сек ⁻¹	k_{17}	$1,9 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_{15}	48000, молек/кл
k_4	$5,0 \cdot 10^{-2}$, сек ⁻¹	k_{18}	$3,0 \cdot 10^{-5}$, сек ⁻¹	K_{16}	10000, молек/кл
k_5	$6,25 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_1	22432, молек/кл	K_{17}	10000, молек/кл
k_6	$4,0 \cdot 10^{-2}$, сек ⁻¹	K_3	81933, молек/кл	K_{18}	240, молек/кл
k_7	$2,2 \cdot 10^{-3}$, сек ⁻¹	K_4	327731, молек/кл	v_{11}	$9,6 \cdot 10^{-5}$, молек ⁻² · сек ⁻¹
k_8	$7,5 \cdot 10^{-2}$, сек ⁻¹	K_5	757576, молек/кл	v_{12}	$5,8 \cdot 10^{-4}$, молек ⁻² · сек ⁻¹
k_9	$7,8 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_6	3937, молек/кл	v_{13}	$5,8 \cdot 10^{-4}$, молек ⁻² · сек ⁻¹
k_{10}	$1,51 \cdot 10^{-9}$, сек ⁻¹	K_7	169192, молек/кл		
k_{14}	$6,67 \cdot 10^{-4}$, сек ⁻¹	K_9	98485, молек/кл		

Таблица 2. Начальные значения концентрации белков репарации

Фермент	Начальное значение, молек/кл	Фермент	Начальное значение, молек/кл
Ogg1	123000	PARP	500000
APE1	300000	Ku	400000
Pol β	50000	DNA-PKcs	80000
Pol δ	50000	XXL	3000
Fen1	50000	ATM	140
Lig1	5000	Artemis	50
Lig3	5000		

Таблица 3. Выход повреждений в зависимости от ЛПЭ заряженных частиц на 1 поглощенной дозы [1]

	ПО	ОР	ДР	кДР
¹² C ($E = 200$ МэВ/нукл), ЛПЭ = 16 кэВ/мкм)	2000	750	45	2
⁵⁶ Fe ($E = 600$ МэВ/нукл, ЛПЭ = 170 кэВ/мкм)	1500	350	80	25

Численное интегрирование полученных нелинейных дифференциальных уравнений произведено в программном пакете Wolfram Mathematica, который также был использован для анализа и визуализации полученных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате численного решения уравнений настоящей модели были построены кривые (рис. 2), описывающие динамику систем репарации основных повреждений молекулы ДНК при облучении ее ядрами тяжелых заряженных частиц ¹²C и ⁵⁶Fe. Видно, что кривые, описывающие кинетику репарации при этих воздействиях, имеют экспоненциальный вид. При моделировании дозовой зависимости ответа клеток на повреждающее действия ядер железа были рассмотрены следующие значения поглощенной дозы: 0,1 Гр, 0,5 Гр, 1 Гр, 1,5 Гр, 2 Гр (рис. 2 а-в). С ростом дозы происходит значительное увеличение выхода повреждений оснований. Выход повреждений оснований примерно в 20 раз выше, чем выход ДР ДНК, и примерно в 4 раза выше, чем выход ОР ДНК. ПО и ОР восстанавливаются достаточно быстро (1,5–2 минуты) в ходе эксцизионной репарации оснований и репарации однонитевых разрывов ДНК. Репарация двунитевых разрывов ДНК – более сложный процесс. На восстановление клеток требуется больше 20 часов.

Анализ кривых, представленных на рисунке 2 г-е, показывает, что с ростом ЛПЭ выход ОР ДНК и ПО уменьшается, в то же время происходит увеличение выхода ДР ДНК. Представленные на рисунке 2е экспериментальные данные были получены в работе [30]. Для анализа повреждений ДНК в фибробластах кожи человека, находящихся в интерфазе, был применен метод преждевременной конденсации хромосом (РСС, premature chromosome condensation), позволяющий определить начальное число ДР почти сразу после облучения. Облучение клеток проводилось ионами ¹²C с $E = 200$ МэВ/нукл (ЛПЭ = 16 кэВ/мкм). Полученные в ходе моделирования репарационных систем кривые согласуются с экспериментом.

Таким образом можно заключить, что предложенный нами модельный подход демонстрирует возможность механического описания трех основных систем репарации, способных восстанавливать повреждения ДНК в клетках млекопитающих и человека, при воздействии на них тяжелых заряженных ионов. Математическое описание этих систем осуществлялось в соответствии с концепциями современной системной биологии и методами моделирования сложных биологических взаимодействий. Модель адекватно описывает основные процессы, протекающие в ходе репарации ОР, BER и NHEJ.

Список литературы / References:

1. Батмунх М., Баярчимэг Л., Бугай А.Н., Лхагва О. Компьютерное моделирование формирования повреждений ДНК в нервных клетках при воздействии тяжелых заряженных частиц. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 2, с. 214-219. [Batmunkh M., Bayarchimeg L., Bugay A.N., Lkhagva O. Computer simulation of the DNA damage formation in neural cells under exposure to heavy charged particles. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 214-219. (In Russ.)]
2. Zhou B.B., Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, vol. 408, pp. 433-439.
3. Memisloglu A., Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.*, 2000, vol. 451, pp. 39-51.
4. Caldecott K.W. DNA Single-Strand Break Repair and Spinocerebellar Ataxia. *Cell*, 2003, vol. 112, pp. 7-10.
5. Kanaar R., Hoeijmakers J.H.J., van Gent D.C. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol.*, 1998, vol. 8, pp. 483-489.
6. Symington L.S., Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.*, 2011, vol. 45, pp. 247-271.
7. Neal J.A., Meek K. Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.*, 2011, vol. 711, pp. 73-86.
8. Robberecht C., Voet T., Esteki M.Z., Nowakowska B.A., Vermeesch J.R. Nonallelic homologous recombination between retrotransposable elements is a driver of de novo unbalanced translocations. *Genome Res.*, 2013, vol. 23, pp. 411-418.
9. McVey M., Lee S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.*, 2008, vol. 24, pp. 529-538.
10. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 2010, vol. 44, pp. 113-139.
11. Sokhansanj B.A., Rodrigue G.R., Fitch J.P., Wilson III D.M. A quantitative model of human DNA base excision repair. I. Mechanistic insights. *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30, no. 8, pp. 1817-1825.
12. Kessler K.J., Kaufmann W.K., Reardon J.T., Elston T.C., Sancar A. A mathematical model for human nucleotide excision repair: damage recognition by random order assembly and kinetic proofreading. *J. Theor. Biol.*, 2007, vol. 249, no. 2, pp. 361-375.
13. Cucinotta F.A., Pluth J.M., Anderson J.A., Harper J.V., O'Neill P. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end joining. *Radiat. Res.*, 2008, vol. 169, no. 2, pp. 214-222.
14. Taleei R., Nikjoo H. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. *Mutation Research*, 2013, vol. 756, no. 1-2, pp. 206-212.
15. Rouhani M. Modeling the interplay between DNA-PK, Artemis, and ATM in non-homologous end-joining repair in G1 phase of the cell cycle. *J Biol Phys*, 2019, vol. 45, no. 2, pp. 127-146.
16. Wilson III D.M., Sofinowski T.M., McNeill D.R. Repair mechanisms for oxidative damage. *Front Biosci.*, 2003, vol. 8, pp. 963-981.
17. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, vol. 362, pp. 709-715.
18. Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B., Chiang S.Y., Kow Y.W., Swenberg J.A. Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physical conditions. *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, pp. 222-225.
19. Hill J.W., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, pp. 430-438.
20. Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 134-147.
21. Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 2001, vol. 412, no. 6847, pp. 607-614.
22. Yoo S., Dynan W.S. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.*, 1999, vol. 27, no. 24, pp. 4679-4686.
23. Uematsu N., Weterings E., Yano K., Morotomi-Yano K., Jakob B., Taucher-Scholz G., Mari P.O., van Gent D.C., Chen B.P., Chen D.J. Autophosphorylation of DNA-PKcs regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.*, 2007, vol. 177, no. 2, pp. 219-229.
24. Ahnesorg P., Smith P., Jackson S.P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 2, pp. 301-313.
25. Grawunder U., Wilm M., Wu X., Kulesza P., Wilson T.E., Mann M., Lieber M.R. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6641, pp. 492-495.
26. Tsai C.J., Kim S.A., Chu G. Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, vol. 104, no. 19, pp. 7851-7856.
27. Riballo E., Kuhne M., Rief N., Doherty A., Smith G.C., Recio M.J., Reis C., Dahm K., Fricke A., Kremppler A., Parker A.R., Jackson S.P., Gennery A., Jeggo P.A., Lobrich M. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell*, 2004, vol. 16, no. 5, pp. 715-724.

28. Goodarzi A.A., Noon A.T., Deckbar D., Ziv Y., Shiloh Y., Lobrich M., Jeggo P.A. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell*, 2008, vol. 31, no. 2, pp. 167-177.
29. Darroudi F., Wiegant W., Meijers M., Friedl A.A., van der Burg M., Fomina J., van Dongen J.J., van Gent D.C., Zdzienicka M.Z. Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutat. Res.*, 2007, vol. 615, no. 1-2, pp. 111-124.
30. Ritter S., Berger S., Groesser T., Gudowska-Novak E., Hessel P., Kehr E., Nasonova E., Kraft G. High LET Induced Chromosomal Damage in Human Fibroblasts. *GSI-Report 1999-1*, 1999, pp. 134-135.

MODELING OF DNA DAMAGE REPAIR INDUCED BY HEAVY IONS IN MAMMALIAN CELLS

Vasileva M.A., Bugay A.N., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

Joliot Curie str, 6, 141980, Dubna, Russia; e-mail: mal2008@jinr.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0560

Abstract. In this paper the mathematical description of main DNA repair pathways of single-strand break (SSB), base damage (BD), and double-strand break (DSB) in mammalian and human cells are proposed. The model shows key molecular mechanisms of DNA recovery through the single-strand DNA repair, base excision repair (BER), nonhomologous end-joining (NHEJ). To formalize the molecular mechanisms the dynamic system of differential equations describing the chemical kinetics of protein interactions according the modern concepts of molecular biology is constructed. Taking into account three repair pathways it makes possible to describe the cell's response to heavy charged particles influence. The proposed model is validated for main mechanisms of SSB repair, BER, NHEJ. In the course of the work, the time-dependent dynamics of formations and repairs of key DNA damage types (BD, SSB, DSB, cluster damages) in human cells under ^{56}Fe ions ($E = 600 \text{ MeV/u}$) exposure are calculated. A comparative analysis of the DNA damages and theirs repair under ^{12}C ($E = 270 \text{ MeV/u}$) and ^{56}Fe ($E = 600 \text{ MeV/u}$) ions exposure at 1 Gy was carried out.

Key words: single-strand breaks, double-strand breaks, base damages, LET, repair, modeling.

МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНИН ПЕРМИАЗЫ CAN1

Колтовая Н.А., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований

ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: koltovaya@jinr.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0561

Аннотация. В настоящее время интенсивно изучается структура и функционирование транспортеров, насчитывающих более 250 членов в разных организмах и обеспечивающих поддержание pH и осмоса, транспорт аминокислот и нейромедиаторов, например, серотонина. Для этого класса белков характерна низкая гомология нуклеотидной последовательности, но схожая структура. Ферменты имеют цилиндрическую форму, образованную трансмембранными элементами, состоящими из α -спиралей. Хорошей моделью для изучения структуры и механизма транспорта может служить дрожжевая аргинин пермиаза Can1. Включение аргинина зависит от протонного насоса, таким образом Can1 катализирует H^+ /аргинин симпорт. Инактивация Can1 приводит к устойчивости к аналогу аргинина канаванину. Широкое использование Can1^R - мутационной системы позволило отобрать среди нескольких тысяч мутаций одиночные missense мутации, инактивирующие пермиазу. На 3Д структуре фермента (590 а.о.) определены позиции 184 отобранных мутантных аминокислотных остатка. Построена стабильная динамическая модель пермиазы и распределение поверхностных зарядов. Анализ crucial аминокислотных остатков, любая замена которых вызывала инактивацию фермента, позволил расширить список наиболее существенных аминокислотных остатков, участвующих в транспорте аргинина. В дальнейшем планируется продолжить анализ отобранных аминокислотных остатков для более детального понимания механизма транспорта субстрата.

Ключевые слова: динамическая модель, распределение зарядов, локализация crucial аминокислот.

В настоящее время интенсивно изучается структура и функционирование транспортеров, насчитывающих более 250 членов в разных организмах и обеспечивающих поддержание pH [1,2] и осмоса [3], транспорт аминокислот [2] и нейромедиаторов, например, серотонина [4]. Для этого класса белков характерна низкая гомология нуклеотидной последовательности, но схожая структура. Ферменты имеют цилиндрическую форму, образованную α -спиралями, так называемыми трансмембранными элементами (ТМ).

Включение аминокислот опосредуются плазмо-мембранными пермиазами, принадлежащими к семейству транспортеров, найденных во всех живых организмах. Дрожжевая аргининовая пермиаза – гомодимер, состоящий из 590 а.о. организованных в 12 трансмембранных спиралей, фланкирующих гидрофильный хвост, направленный в цитоплазму. Пермиазы проявляют разный субстратный диапазон, так Can1 транспортирует аргинин и менее эффективно лизин. Включение аргинина зависит от протонного насоса. Can1 катализирует H^+ /аргинин симпорт. Кроме аргинина и лизина, пермиаза транспортирует также аналог аргинина – канаванин. У дрожжей нарушения гена аргинин пермиазы CAN1 вызывают устойчивость к канаванину. Поскольку мутанты легко отбирать на среде с канаванином, то ген CAN1 в течение многих лет используется для изучения закономерностей мутагенеза.

В базе данных PDB имеется несколько структур пермиаз для разных организмов: 1PV6, 1PV7, 3L1L. Используя их, мы построили модельную структуру дрожжевой пермиазы Can1 [5]. C- и N-концы молекулы направлены в цитоплазму. Молекулярная динамика показала устойчивость построенной структуры в течение 40 нс. Как видно из рис. 1 структура пермиазы (CanP) стабилизируется примерно через 5 нс ($RMSD[N, C_A, C, O] \sim 5,5$ Å). Лиганд канаванин и его части (CanB) изначально стабильны и далее в течение моделирования сохраняют стабильность ($RMSD[N, C_A, C, O] \sim 0,1-0,4$ Å), радикал канаванина CanR ($RMSD[N_E, OXT, C_Z, NH_1, NH_2] \sim 0,7-0,9$ Å) и весь комплекс CanA ($RMSD[N, C_A, C, O, N_E, OXT, C_Z, NH_1, NH_2] \sim 1,3$ Å).

Таким образом, структура молекулы пермиазы при моделировании изменилась (рис. 2, А), в распределении поверхностного заряда также наблюдаются изменения (рис. 2, Б). Поверхность, направленная в периплазму, отрицательно заряжена, а цитоплазматическая поверхность – положительно заряжена. В центре молекулы пермиазы располагается «пещера», открытая в сторону периплазмы. Это вход лиганда. Основная аминокислота аргинин имеет два основных центра: аминогруппу в α -положении и гуанидиновую в δ -положении. Гуанидиновая группа при протонировании становится сильно основной и способна образовывать множественные водородные связи. В молекулу канаванина по сравнению с аргинином добавлен атом кислорода в боковом радикале и снижено количество CH_2 -групп. Из-за наличия дополнительного атома кислорода канаванин несет значительно меньший положительный заряд, чем аргинин. Таким образом, при взаимодействии субстрата с пермиазой существенную роль играет заряд периплазматической поверхности. В кристаллической структуре пермиазы вход лиганда сильно отрицательный, но при моделировании заряд снижается (рис. 2, Б).

Огромное количество накопленных мутаций позволяет провести детальный функциональный анализ пермиазы. Среди ~3000 мутаций выделили missense мутации. К инактивации фермента приводили 308 единичных несинонимических мутаций (SNPs – single nucleotide polymorphisms), вызывающих

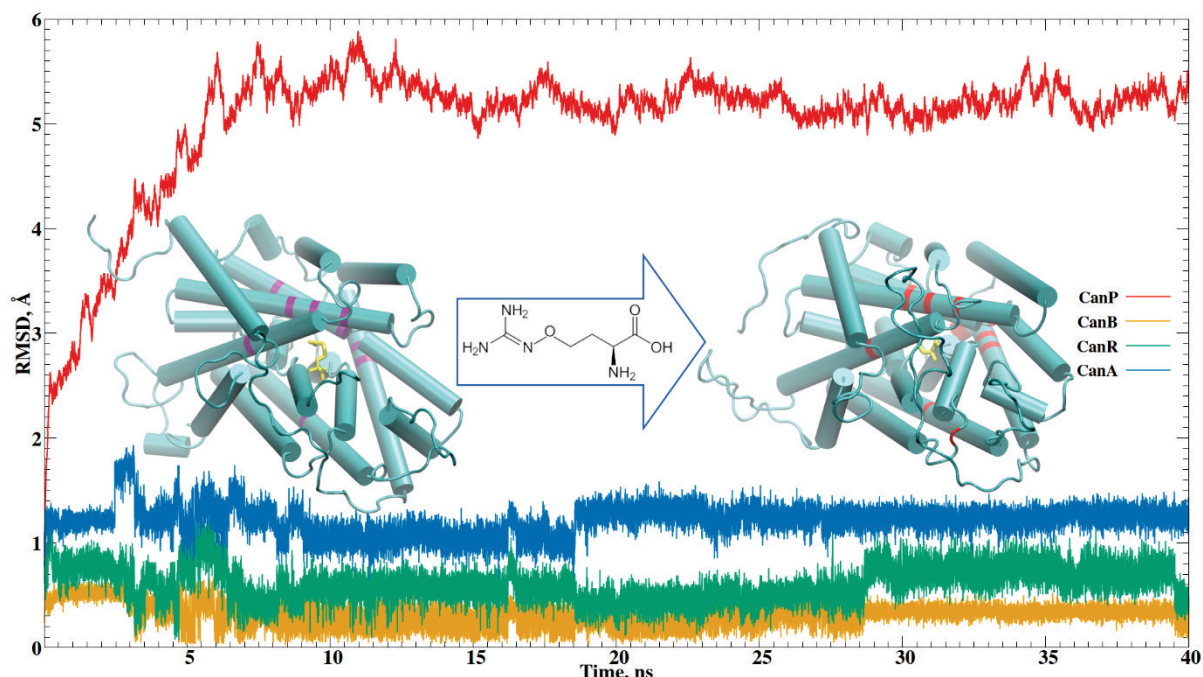


Рисунок 1. Молекулярно-динамические расчёты аргининовой пермиазы Can1: структура белка CanP, канаванина CanB, радикала CanR и всей молекулы CanA. Внутри схематической стрелки изображена молекула канаванина. Красным (после моделирования) и фиолетовым (до моделирования) цветами в трехмерном изображении пермиазы указаны локализация special аминокислотных остатков

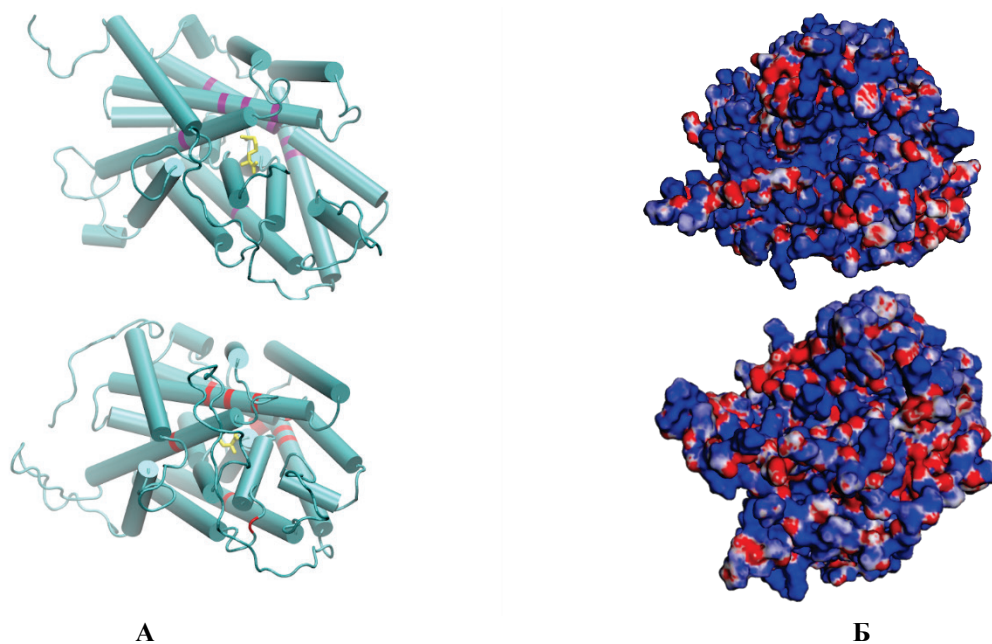


Рисунок 2. Молекулярная динамика аргининовой пермиазы: А – кристаллическая структура молекулы пермиазы и 40 нс-модель. Б - распределения поверхностного заряда в кристаллической структуре и в 40-нс-модели

замену 154 из 590 а.о. Локализация отобранных мутаций на 3Д-структуре представлена на рисунке 3, А. Она удивительным образом напоминает картину локализации консервативных остатков бактериального антипортера AdiC [1] (рис. 3, Б). В работах китайских коллег [1,2] подробно изучена структура и механизм функционирования аминокислотного антипортера AdiC, определены аминокислотные остатки ответственные за формирование канала и связывающие лиганд. Эти данные облегчают нам анализ структуры и функционирования симпортера Can1.

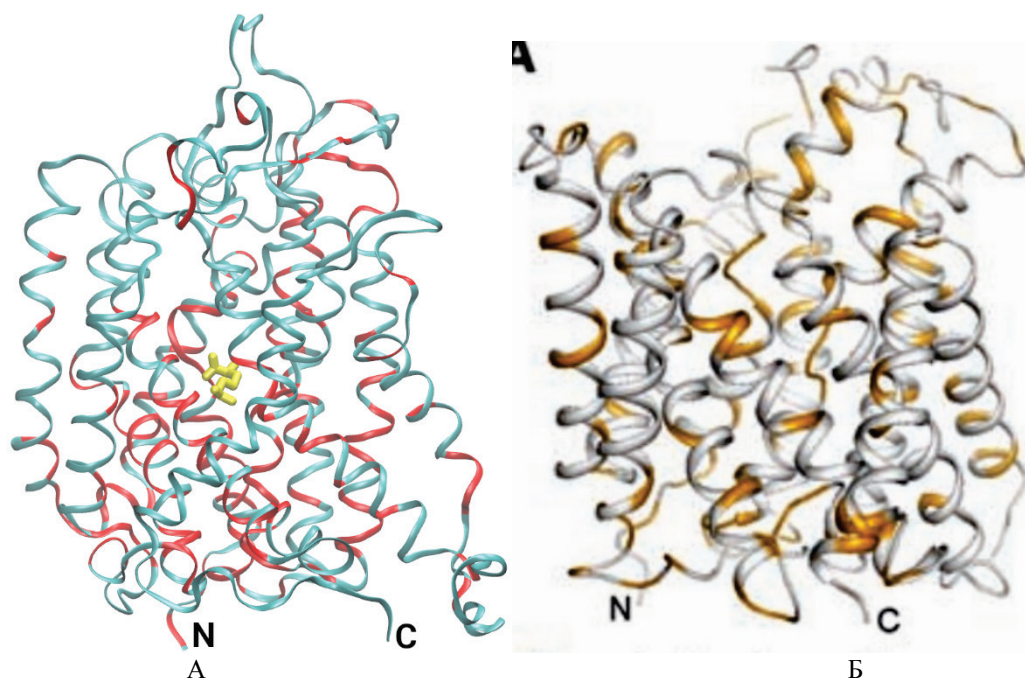


Рисунок 3. (А) Локализация аминокислот, обусловленных одиночными missense (красный цвет) мутациями и инактивирующих аргинин пермиазу Can1. (Б) Локализация консервативных а.о. на структуре AdiC. Аминокислоты, инвариантные для AdiC, CadB и PotE, окрашены в желтый цвет

AdiC	7	AHKVGLIPVTLMVSCNIMSCGVLLPANLASTGC	---	IAIYGMVVTIIGALGLSMVYAKMSFLD	SPGGSYAYARRCFCFFLYQ	88																						
Can1	85	KRELKQRHIGMIALCGTICTCLFGLSTPLTNAC	CPVGALISYLFMGSLAYSVTQSLGEMATFI	VTSSFTVFSQNFLEAFCAA	168																							
AdiC	89	TNVLVYLACNIGAIAMVVGYSYFFPILKDPWVLT	ITTCVVLWTFVLLNIVGPKMITRVQAVATV	LALIPVGI	172																							
Can1	169	NGMYWFSWATTFALFELS	VVGQVIQFW---	TYKVPAAWISIFWVITITIMNLF	PPVRYGFEFEFWVASIKVLAIGFLIYCFCM	248																						
AdiC	173	FR	ET	YMAAWNVS-----	GLGTFGAIQSTLNVTLWSFIVESASVAGV	KNKRNVP	239																					
Can1	249	VC	AGVTGPVGFRIWRNPGAWGPGIISKDKNE	---	FLGWSS	---	INAAFTFQSTELVGITAGEAANERKSVER	AIKKVFRILTFY	231																			
AdiC	240	VLS	TTA	MGMIPNAALR-----	VSASPEGDARMALGDTAGAT	VSFCAAGCLGSLGGWTL	LAGQTAKAAADDGL	PF	PIFAR	316																		
Can1	333	IG	SLLF	GLLV	PYNDPKLTQSTSY	VS	TS	PF	II	AI	ENSGTKVLP	HE	NAVILTTI	ISAANSNIYVGS	RILFGLSKNKL	AP	FLSR	416										
AdiC	317	VN	ACT	EVAGLI	IVGILMTIFQLSSI	SP	NAT	KE	FE	GLVSSVS	VIFTLPY	YT	CAALL	LL	LGHG-----	HF	GKAR	PAYLAVT	391									
Can1	417	TT	KGGV	YIAVFV	TAAFGALAYMET	---	ST	GGDKV	FE	EWLLNITGVAGFFAW	---	FI	S	SHIRFMQALKYRG	ISRDEL	PF	KA	KIMPGLA	499									
AdiC	392	TI	AFLY	CIWAVV	SG-----	AK	EV	MWSF	VTLMVIT	MYA	---	NY	NRLH	KNPY	PLD	AP	ISKD	---	445									
Can1	500	YY	AT	FMT	IIII	IQ	CF	TAF	AP	KFNGV	SFAA	YISIFL	FL	AV	WIL	---	FQ	CI	FR	CR	FI	WKIGD	V	D	I	D	S	563

Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков Can1 и AdiC. TM-спирали обозначены синими полосками выше для AdiC или ниже последовательности для Can1. Остатки, взаимодействующие с субстратом отмечены звездочкой. Консервативные остатки в AdiC и Can1 помещены в красные ящики

На рисунке 4 приведены выровненные последовательности белков Can1 и AdiC [2], а в таблице 1 – консервативные аминокислотные остатки. Из 63 консервативных остатков 26 остатков встречаются в списке выделенных нами мутаций, инактивирующих пермиазу (выделены жирным).

Место входа субстрата формируется четырьмя полярными или заряженными аминокислотами: Gly100 (С-конец TM1), Tyr172 (середина TM3), Glu301 (TM6), Trp464 (середина TM10). Две из них встречаются в нашей выборке – Glu100 и Trp464. Так, мутация Trp464Arg приводит к замене ароматического Trp на положительно заряженный Arg, что, по-видимому, снижает эффективность связывания с положительно заряженным субстратом.

В отдельную группу можно выделить мутации, локализованные во внутреннем кольце трансмембранных элементов (табл. 2), формирующие канал связывания и транспорта субстрата.

Среди аминокислотных остатков обращают на себя внимание Gly118, Trp177, Thr180, Glu184, Gly224, Glu227, Gly229, Arg327, Ala389, Arg399 и Gly460, любая замена которых инактивирует белок. По-видимому, они играют ключевую роль в функционировании пермиазы. Эти аминокислотные остатки не относятся к консервативным. По-видимому, это дополнительная возможность выявления важных (сrucial) сайтов. Локализация crucial аминокислот отмечена на рисунке 2, А, цветными кольцами. Видно, что часть из них (W177, T180, E184, A389,

G460) локализована во внутренних ТМ-элементах или предшествуют ТМ-элементу (Gly118, Arg327) и, таким образом, принимают участие в формировании центрального канала и связывания субстрата (табл. 2, выделены жирным). Полученные результаты показывают перспективность используемого подхода для изучения функционирования транспортеров.

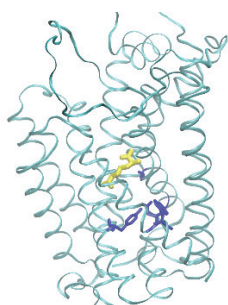
Пермиаза функционирует в виде гомодимера. В димеризации гомодимера принимают участие четыре ТМ-элемента по два от каждой молекулы [1]. Гидрофобные аминокислоты ТМ11 молекулы перемежаются неполярными остатками ТМ12 второй молекулы. В нашей коллекции мутаций к ним относятся, по-видимому, гидрофобные Р495 и Y501 (ТМ11). Дополнительные взаимодействия опосредуются N-терминальной частью ТМ3 и С-терминальной частью ТМ10. Димеризация может привести к изменению структуры и сдвигу некоторых ТМ. В дальнейшем планируется построить модель гомодимера. И провести анализ локализации мутантных аминокислот в канале транспорта субстрата.

Таблица 1. Консервативные аминокислотные остатки

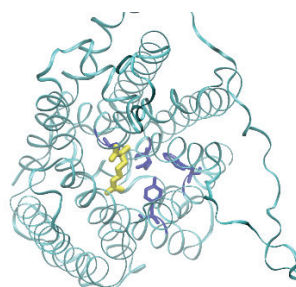
Элемент структуры	Аминокислотные остатки
ТМ1	G99, G103, G105 , F107
ТМ2	G118, A122 , L127, A133, M143
Петля 2-3	P148 , R159, P163, G166
ТМ3	Y173, W174, I179
ТМ4	L202 , I212, N217
Петля 4-5	K222
ТМ5	I237, G239, G251
ТМ6	G281, F283, S288, I290, F297, G299, E301, A307, G308
Петля 6-7	N312, P313 , V317, P318, A320, V325
ТМ7	Y332, S335 , I339, P344
Петля 7-8	V357, S358, S360, P361, F362, A365
ТМ8	I377
Петля 8-9	L409 , P411, R416, K419
ТМ9	G421, P423
Петля 9-10	S442, K447, F449
ТМ10	L465
ТМ11	A503, G515
ТМ12	A539, L543

Таблица 2. Аминокислотные остатки, локализованные во внутреннем кольце ТМ-элементов, мутантные замены в которых вызывают инактивацию пермиазы

ТМ-элемент	Аминокислотные остатки
ТМ1	G94, M95, A97, G99, G100, G103, G104, G105, L106
ТМ3	G170, W174, S176, W177, T180, E184 , L185
ТМ6	T296, Q298, G229, L302, G304, A307
ТМ8	S388, A389 , S392, N394, I394
ТМ10	V458, A459, G460 , W464



А



Б

Рисунок 5. Расположение Gly100, Tyr172, Glu301 и Trp464, локализованных около входа в транспортный канал: А) вид сбоку; Б) вид сверху. Молекула канаванина выделена желтым цветом

Список литературы /References:

1. Gao X., Lu F., Zhou L., Dang S., Sun L., Li X., Wang J., Shi Y. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science*, 2009, vol. 324, pp. 1565-1568.
2. Gao X., Zhou L., Jiao X., Lu F., Yan C., Zeng X., Wang J., Shi Y. Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature*, 2010, vol. 463, pp. 828-833.
3. Ressel S., Terwisscha van Scheltinga A.C., Vonnrhein C., Ott V., Ziegler C. Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP. *Nature*, 2009, vol. 458, pp. 47-53.
4. Hellsberg E., Ecker G.F., Stary-Weinzinger A., Forrest L.R. A structural model of the human serotonin transporter in an outward-occluded state. *PLOS ONE*, 2019, vol. 14, no. 6, e0217377, doi: 10.1371/journal.pone.0217377.
5. Колтовая Н.А., Душанов Э.Б. Распределение мутаций в молекуле белка дрожжевой аргинин пермиазы CAN1. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 4, с. 644-651. [Koltovaya N.A., Dushanov E.B. Landscape of mutation substitutions in yeast arginine CAN1 permiase. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 644-651. (In Russ.)]

MUTATIONAL ANALYSIS OF STRUCTURE OF YEAST ARGININE PERMIASE CAN1**Koltovaya N.A., Dushanov E.B.**

Joint Institute for Nuclear Research

6 Joliot-Curie St., Dubna, 141980, Russia; e-mail: koltovaya@jinr.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0561

Abstract. Currently, the structure and functioning of transmitters, which more than 250 members in different organisms, maintaining pH and osmosis, transport of amino acids and neurotransmitters, such as serotonin, are being intensively studied. This class of proteins is characterized by low nucleotide homology, but a similar structure. Enzymes have a cylindrical shape formed by transmembrane elements consisting of α -helices. Yeast arginine permiase Can1 can serve as a good model for studying the structure and mechanism of transport. The incorporation of arginine is proton pump dependent, thus Can1 catalyzes H⁺/arginine symport. Inactivation of Can1 leads to resistance to the arginine analogue canavanine. Widespread use of Can1^R-mutation detection system allows selecting among several thousand mutations single missense mutations that inactivate Can1 yeast arginine permiase. At the 3D level, the large mutants are ranked res. 184 out of res. 590 of the enzyme. A stable dynamic model of permiase and charge landscape have been constructed. We selected several crucial amino acid residues, any replacement of which lead to enzyme inactivation. They are increased the list of the most significant amino acid residues involved in the transport of arginine. In the future, it is planned to continue the analysis of selected amino acid residues for a more detailed understanding of the mechanism of substrate transport.

Key words: dynamic model, charge distributions, localization of crucial amino acids.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧИЙ В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА ПУТЕМ КЛАСТЕРИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛГОРИТМА kMEANS

Марнаутов Н.А., Елфимов А.Б., Комиссарова Л.Х.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: nmarnautov@gmail.com
Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0562

Аннотация. В работе исследована возможность кластеризации мышей на основе динамики развития опухолевого процесса. Исследование проводили на мышах линии C57Bl/6, с перевитой карциномой Льюис. Контрольной группе (группа №1) введение препаратов не осуществляли. Опытным группам проводили химиотерапию с использованием рубомицина (группа №2) / магнитолипосомального рубомицина (группы №3 - №4). Группу №4 дополнительно подвергали воздействию внешнего магнитного поля на область опухоли в течение 1 часа после введения препарата. Введение препаратов осуществляли на 10, 14, 18 сутки после перевивки опухоли. Достоверность различий между группами определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни. Кластеризацию полученных данных осуществляли с использованием алгоритма k-средних (kMeans). Было обнаружено, что при кластеризации уверенно выделяется кластер мышей, не получавших химиотерапию. Так же было обнаружено, что при кластеризации на три кластера, большая часть мышей из групп №3 и №4 были отнесены к одному кластеру, не смотря на то, что на 21 сутки после перевивки опухоли между данными группами наблюдаются статистически достоверные различия ($p < 0.05$).

Ключевые слова: кластеризация, k-means, метод k-средних, метод главных компонент, PCA, магнитные липосомы, наночастицы магнетита, магнитоуправляемые носители, направленная доставка, химиотерапия, рубомицин, карцинома Льюис.

Задача кластеризации – классическая задача обучения без учителя, позволяющая группировать объекты, на основе различных признаков, что часто является важнейшим шагом для дальнейшего анализа данных. Одним из наиболее распространенных алгоритмов кластеризации является алгоритм **k-средних (kMeans)**, который был предложен еще в 1957 году [1,2]. В данной статье мы исследуем возможность кластеризации с использованием алгоритма kMeans для выявления различий в динамике развития опухолевого процесса. Для эффективного лечения рака наблюдение за динамикой развития опухолевого процесса является одним из ключевых факторов, который часто является определяющим при выборе стратегии и методов лечения [3,4]. Потенциально, кластеризация пациентов на основе динамики опухолевого процесса, может позволить выявлять схожие по течению болезни случаи, что может обеспечить более эффективное принятие решений при лечении пациента.

В работе использовали мышей-опухоленосителей линии C57Bl/6 с перевитой карциномой Льюис. Подопытные животные были разделены на 4 группы, группа №1 – контрольная, группы №2-№4 получали противоопухолевую терапию. Каждая группа содержала 6 мышей. Введение противоопухолевых препаратов осуществлялось внутривенно. Мышам из **группы №1 (К-1)** введение препарата не осуществлялось, мышам из **группы №2 (Рбц)** осуществляли введение раствора рубомицина (3,75 мг/кг), мышам из **группы №3 (Млп-Рбц)** и **№4 (Млп-Рбц + Мп)** осуществляли введение гидрозоля магнитолипосомального рубомицина (3,75 мг/кг). Мышей из группы №4 дополнительно подвергали воздействию внешнего магнитного поля (600 мТл) на область опухоли в течение часа сразу после введения препарата [5]. Введение химиотерапевтических препаратов осуществляли на 10, 14 и 18 сутки после перевивки опухоли. На рисунке 1 представлена динамика роста карциномы Льюис в исследуемых группах животных.

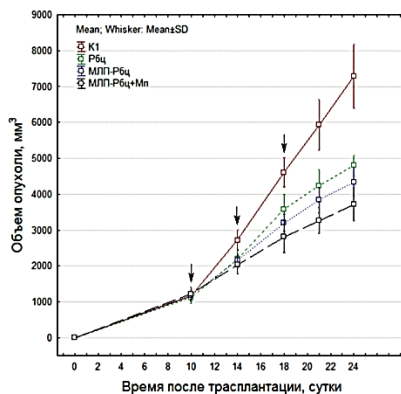


Рисунок 1. Динамика роста карциномы Льюис в исследуемых группах животных

Таблица 1. Результат кластеризации мышей на основе динамики развития опухолевого процесса с использованием алгоритма kMeans

	Группа №1, К1 (6 мышей)	Группа №2, Рбц (6 мышей)	Группа №3, МЛП-Рбц (6 мышей)	Группа №4, МЛП-Рбц+МП (6 мышей)	Всего
Кластеризация на 2 кластера					
Кластер №1	5	1	0	0	6
Кластер №2	1	5	6	6	18
Кластеризация на 3 кластера					
Кластер №1	5	0	0	0	5
Кластер №2	1	4	2	0	7
Кластер №3	0	2	4	6	12
Кластеризация на 4 кластера					
Кластер №1	5	0	0	0	5
Кластер №2	1	4	2	0	7
Кластер №3	0	2	4	4	10
Кластер №4	0	0	0	2	2

Достоверные различия (U-критерий Манна-Уитни; $p < 0,05$) наблюдаются между группами №2-4 и группой №1 начиная с 14 суток после трансплантации опухоли (4 сутки после первого введения химиопрепарата), между группой №2-3 и группой №4 начиная с 18 суток после трансплантации опухоли. Между группой №2 и группой №3 достоверных различий не наблюдалось. Более подробно о дизайне эксперимента написано в работе [5]. У мышей были индивидуальные пометки, что позволило наблюдать индивидуальную динамику опухоли. Данные по динамике опухоли для каждой мыши были представлены в виде вектора $V(v_1, v_2, v_3, v_4)$ размерности 4, где v_1, v_2, v_3, v_4 – средний размер опухоли данной мыши измеренный на 10, 14, 18 и 21 сутки, соответственно.

В первом эксперименте не использовали объем опухоли, измеренный на 24 сутки, т.к. на 24 сутки после перевивки опухоли уже наблюдалась гибель животных (группа №1 – 1 мышь, группа №2 – 2 мыши). Исследовали кластеризацию на 2, 3 и 4 кластера. Результаты представлены в таблице 1.

При кластеризации на 2 кластера в первый кластер вошло 5 мышей из группы №1 и одна мышь из группы №2, все остальные мыши были отнесены ко второму кластеру (табл. 1). Полученный результат указывает на то, что удалось достаточно уверенно выделить кластер мышей, получающих химиотерапию и кластер мышей, лечение которых не осуществлялось. При кластеризации на 3 кластера мыши, так же уверенно выделяется кластер мышей не получающих химиотерапию (кластер №1), интересно отметить, что почти все мыши из групп №3 и №4 (лечение которых осуществлялось магнитолипосомальным препаратом с/без воздействия магнитного поля) отнесены к одному кластеру (кластер №3), а большая часть мышей из группы №2 отнесены к другому кластеру (кластер №2), не смотря на то, что между группами №2 и №3 не наблюдалось статистически достоверной разницы на 21 сутки после перевивки опухоли, а между группами №3 и №4 наблюдалась (U-критерий Манна-Уитни; $p < 0,05$). Вероятно, это происходит вследствие того, что при оценке U-критерия Манна-Уитни мы учитываем данные лишь одного дня наблюдений, а при кластеризации учитываются данные 4 дней. Косвенно полученный результат указывает на то, что динамика опухолевого процесса для групп получающих магнитолипосомальный препарат является схожей. При кластеризации на 4 кластера результаты совпадают с результатами кластеризации на 3 кластера, за исключением того, что выделился дополнительный подкластер из 2х мышей группы №4.

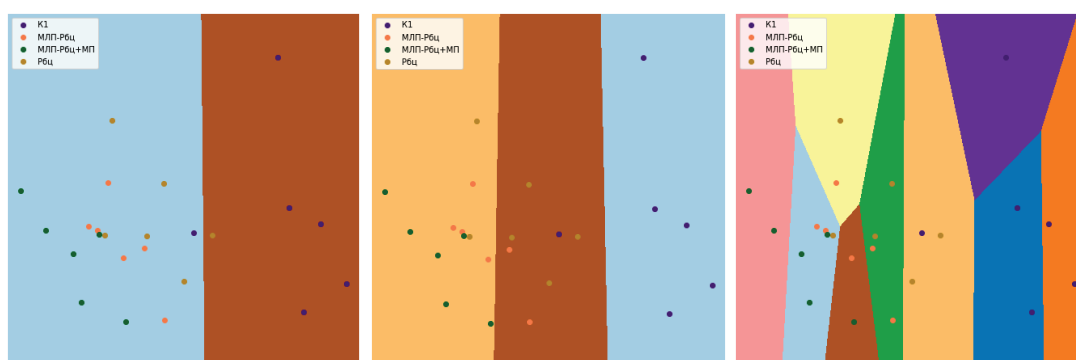


Рисунок 2. Визуализация результатов кластеризации с применением алгоритма kMeans. Эксперимент №1. (а) Кластеризация на 2 кластера. (б) Кластеризация на 3 кластера. (в) Пример кластеризации на большее число кластеров (9 кластеров)

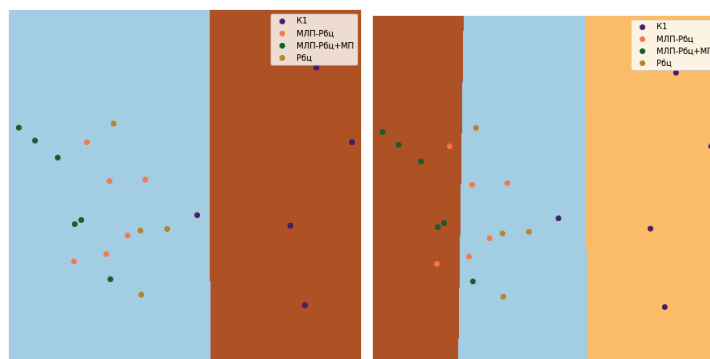


Рисунок 3. Визуализация результатов кластеризации с применением алгоритма kMeans. Эксперимент №2. (а) Кластеризация на 2 кластера. (б) Кластеризация на 3 кластера

Для визуализации результатов кластеризации размерность вектора V (v_1, v_2, v_3, v_4) уменьшали методом главных компонент (PCA) [6,7]. Полученные вектора с уменьшенной размерностью так же кластеризовали с использованием алгоритма kMeans. На рисунке 2 представлена визуализация результатов кластеризации.

Во втором эксперименте данные по динамике опухоли для каждой мыши были представлены в виде вектора $V(v_1, v_2, v_3)$ размерности 3, где v_1, v_2, v_3 – средний размер опухоли данной мыши измеренный на 18, 21 и 24 сутки, соответственно. Животные погибшие на 24 сутки были исключены. При кластеризации на 2 кластера так же, как и в первом эксперименте выделяется кластер мышей, получавший химиотерапию и кластер мышей, не получавший химиотерапию. При кластеризации на три кластера можно обнаружить, что образуются кластера, которые можно трактовать, как кластер мышей, не получавших химиотерапию, кластер мышей лечение, которых осуществлялось рубомицином и магнитолипосомальным рубомицином без воздействия внешнего магнитного поля, а также кластер мышей, лечение которых осуществлялось магнитолипосомальным рубомицином с последующим воздействием внешнего магнитного поля. Визуализацию данных осуществляли аналогично эксперименту №1

Полученные результаты показывают, что при кластеризации мышей линии C57Bl/6 с перевитой карциномой Льюис на основе динамики развития опухолевого процесса с использованием алгоритма kMeans можно выделять кластера отражающие различия в развитие опухолевого процесса.

Список литературы / References:

1. Ghosal A., Nandy A., Das A.K., Goswami S., Panday M. A short review on different clustering techniques and their applications. *Emerging technology in modelling and graphics*, 2020, pp. 69-83.
2. Omran M.G.H., Engelbrecht A.P., Salman A. An overview of clustering methods. *Intelligent Data Analysis*, 2007, vol. 11, no. 6, pp. 583-605.
3. Bruno R., Bottino D., De Alwis D.P., Fojo A.T., Guedj J., Liu C., Jin J.Y. Progress and Opportunities to Advance Clinical Cancer Therapeutics Using Tumor Dynamic Models Tumor Dynamics Modeling to Advance Clinical Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*, 2020, vol. 26, no. 8, pp. 1787-1795.
4. Cunningham J.J., Brown J.S., Gatenby R.A., Stankova K. Optimal control to develop therapeutic strategies for metastatic castrate resistant prostate cancer. *Journal of theoretical biology*, 2018, vol. 459, pp. 67-78.
5. Марнаутов Н.А., Комиссарова Л.Х., Ерохин В.Н., Семенов В.А., Елфимов А.Б., Голощапов А.Н. Исследование действия магнитных липосом, нагруженных рубомицином, на динамику роста карциномы льюис у мышей. *Вестник новых медицинских технологий*, 2020, т. 27, № 4, с. 60-64. [Marnautov N.A., Komissarova L.Kh., Erohin V.N., Semenov V.A., Elfimov A.B., Goloshchapov A.N. Investigating the action of magnetic liposomes loaded with rubomycin on the dynamics of Lewis carcinoma growth in mice. *Journal of new medical technologies*, 2020, vol. 27, no. 4, pp. 60-64. (In Russ.)]
6. Daffertshofer A., Lamoth C.J., Meijer O.G., Beek P.J. PCA in studying coordination and variability: a tutorial. *Clinical biomechanics*, 2004, vol. 19, no. 4, pp. 415-428.
7. Zhao Y., Luo F., Chen M., Wang Y., Xia J., Zhou F., Chen W. Evaluating multi-dimensional visualizations for understanding fuzzy clusters. *IEEE transactions on visualization and computer graphics*, 2018, vol. 25, no. 1, pp. 12-21.

A STUDY OF THE POSSIBILITY OF DETECTING DIFFERENCES IN DYNAMICS OF TUMOR GROWTH BY CLUSTERING USING k-MEANS ALGORITHM

Marnautov N.A., Elfimov A.B., Komissarova L.Kh.

Institute of Biochemical Physics. N.M. Emanuel RAS

Ulitsa Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: nmarnautov@gmail.com

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0562

Abstract. The paper investigates the possibility of clustering mice based on the dynamics of the development of the tumor process. The study was carried out on mice of the C57Bl/6 line, with an intertwined Lewis carcinoma. The control group (group No. 1) was not administered drugs. The experimental groups were treated with chemotherapy using rubomycin (group No. 2) / magnetoliposomal rubomycin (groups No. 3 - No. 4). Group No. 4 was additionally exposed to an external magnetic field on the tumor area for 1 hour after administration of the drug. The drugs were administered on the 10th, 14th, 18th day after the tumor was transplanted. The reliability of the differences between the groups was determined using the Mann-Whitney U-test. Clustering of the obtained data was carried out using the k-means algorithm (kMeans). It was found that clustering confidently distinguishes a cluster of mice that have not received chemotherapy. It was also found that when clustering into three clusters, most of the mice from groups No. 3 and No. 4 were assigned to the same cluster, despite the fact that statistically significant differences were observed between these groups on the 21st day after tumor transplantation ($p < 0.05$).

Key words: clustering, k-means, k-means method, principal component analysis, PCA, magnetic liposomes, magnetite nanoparticles, magnetically controlled carriers, targeted delivery, chemotherapy, rubomycin, Lewis carcinoma.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ НИША КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЯМА, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ СОБСТВЕННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ВОЛНОВОЙ ФУНКЦИИ ЖИВОГО

Стригин М.Б.

ООО Митриал

ул. Академика Королёва, 4, г. Челябинск, 454004, РФ; e-mail: strigin1969@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0563

Аннотация. В данной работе рассматривается возможность перехода между микромиром квантовой механики и макромиром биологии, где важнейшим процессом является взаимоотношение биологического вида (БВ) с его экологической нишей (ЭН). В первой части работы выдвигается гипотеза, что ЭН выступает аналогом потенциальной ямы (ПЯ) в квантовой механике, что позволяет применить инструментарий последней. Тогда устойчивому состоянию БВ, как системной структуры, соответствуют собственные значения некоторой волновой функции, которая осциллирует в ЭН (подобно электрону в атоме). При этом можно выделить линейные и нелинейные этапы этих осцилляций. Нелинейная часть эволюции, когда биологический вид входит в хаотический этап существования, может определяться как внешними изменениями в ЭН, так и внутренними причинами на уровне генома. Первые причины можно назвать дарвиновскими, вторые – ламарковскими. В общем виде собственные значения БВ определяются граничными условиями ниши (на базе куба Хатчинсона): обобщённой геометрией ЭН и другими параметрами экологических факторов. Показано, как базовые концепты квантовой механики проявляются в биологии: суперпозиция, туннелирование сквозь потенциальный барьер, принцип Паули. Последний соответствует закону Гаузе в биологии: внутри одной экологической ниши может проживать только один вид с определёнными экологическими потребностями. Во второй части работы обсуждаются возможные эффекты сопряжённости эволюции между ПЯ, определяемой соответствующей ЭН, и ПЯ, влияющей на конформационное (энергетическое) состояние генома БВ. Предполагается, что изменение ЭН преобразует информационный статус генома путём естественного отбора, но с другой стороны и наоборот, изменение топологии генома у отдельных особей, может в итоге повлиять на некоторые потребности всего вида и привести к преобразованию его ЭН.

Ключевые слова: экологическая ниша, биологический вид, закон Гаузе, квантовая механика, волновое уравнение, собственная функция, потенциальная яма, граничные условия, нелинейный осциллятор, туннелирование, эволюция, геном.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из центральных понятий квантовой механики является представление о собственных значениях некоторого осциллятора. Это может быть электрон в атоме, фонон в кристалле, магنون в металле или некоторое поле в резонаторе. И во всех случаях собственные значения перечисленных сущностей определяются граничными условиями, иначе говоря, некоторыми потенциальными ямами, имеющими определённые границы, внутри которых эти сущности осциллируют. Аналогично границы атома определяют собственные функции электронов в этом атоме, посредством внутреннего отражения и образования устойчивой интерференционной картины. Представления о границах со временем усложняются, происходит переход к представлению о фазовом пространстве, размерность в котором имеет уже не три координаты, а шесть, так как добавились координаты импульсов, появилась размерность спина как дополнительной пространственной характеристики.

Но подобная картина наблюдается и в макромире, за тем исключением, что размерность фазового пространства, в котором существуют объекты макромира, значительно выше. В принципе каждая из наук (биология, химия, социология, психология и т.д.) обнаруживает собственное фазовое пространство на базисе параметров специфического для неё процесса, в котором и выстраивает законы эволюции собственных сущностей и собственную таксономию. Как демонстрирует физика, очень важно обнаружить все размерности, необходимые для описания некоторого феномена, в противном случае возникают размерные складки, приводящие к парадоксам, которые Франкл назвал димензиальными [1].

Аналогично граничным условиям в квантовой механике, в биологии имеется представление об *экологической нише*. Важно отметить, что на масштабе экологической ниши сущностью становится не единица вида, а сам биологический вид [2]. Ранее Дж. Э. Хатчинсон предложил модель экологической ниши в виде гиперобъёма [2], где имеется собственное фазовое пространство, и вместе с координатами и скоростями (например, собственной скоростью представителя вида или скоростью миграции) фигурируют другие экологические факторы.

В математике имеется представление о базисе, когда внутри некоторого пространства обнаруживается бесконечно много различных сущностей, но только N из них линейно независимы. Понятие независимости очень важно, оно подразумевает равенство нулю производной одного фактора (y) по другому фактору (x). В общем виде такая производная имеет вид:

$$\frac{\partial y_i}{\partial x_j} = \delta_{ij}, \quad (1)$$

где δ_{ij} – символ Кронекера, который означает, что, если $i \neq j$, соответствующая производная равна нулю.

Аналогично этому в модели Хатчинсона принято, что реакция на один фактор не зависит от воздействия другого фактора и факторы независимы друг от друга (аналогично в квантовой механике принято, что импульсы и координаты независимы). В его модели представлен n -мерный куб, где на осях отложены отрезки, обозначающие экологические факторы, лежащие в некоторых диапазонах. Кроме того, экологические ниши разделены в ней на два класса: *фундаментальные* и *реализованные*, где первые определяются всеми факторами, которые задаёт география (или геометрия) ниши: пищевые ресурсы, климатические аспекты, отношения с паразитами и т. п., вторые определяются отношением с конкурирующими видами и с хищниками. Диапазоны экологических факторов, определяющие фундаментальные ниши, Шелфорд назвал диапазонами толерантности [2].

Мы выдвигаем гипотезу, что эта экологическая модель воспроизводит представление о волновом уравнении Шредингера [3]:

$$i\hbar \frac{d\varphi}{dt} = (H_0 + H_1 + H_2 + \dots)\varphi, \quad (2)$$

где H_0 — гамильтониан, определяемый ближайшей геометрией, например структурой атома, внутри которого находится электрон, а H_1 и H_2 — малые (на определённом этапе) поправки. H_0 — в терминах биологии та энергетическая часть экологической ниши, которая главным образом определяет поведение биологического вида: пищевые, климатические аспекты. Часть гамильтониана H_1 определяется, например, движением пролетающего мимо электрона (в терминах биологии — конкурента), или мимо пролетающего атома (в терминах биологии — хищника). Первый может выбить рассматриваемый электрон и занять его место, а второй может выхватить электрон из начального положения и присвоить его. Если часть гамильтониана H_1 определяется внешней средой, то H_2 мы определяем как часть, приводящую к зависимости эволюции волновой функции от внутреннего состояния, иными словами, воздействия электрона на собственный атом и модуляции гамильтониана H_0 или (в терминах биологии) воздействия вида на экологическую нишу, что в квантовой механике называется самовлиянием. Конкуренция членов H_1 и H_2 приводит к дискурсу относительно природы экологической ниши — принадлежит ли она биологическому виду или порождена окружающей средой. Ответ демонстрирует волновое уравнение Шредингера (2): экологическая ниша находится в суперпозиции окружающей среды и биологических видов. Согласно нашему представлению, экологическая ниша может выполнять роль специфического оператора, преобразующего волновую функцию биологического вида, и определяющего его эволюцию.

Целесообразно вспомнить здесь и про явление резонанса. В обычных условиях при воздействии внешнего поля на электрон некоторого атома оно пренебрежимо мало в сравнении с полем, производимым самим атомом, $H_0 \gg H_1$. При этом вероятность возбуждения электрона и преобразование его волновой функции также пренебрежимо малы. Но если частота внешнего поля совпадает с собственной частотой электрона, то вероятность возбуждения линейно возрастает со временем (золотое правило Ферми). Аналогично этому в биологии необходимо обнаруживать период, когда частота внешнего воздействия совпадает с частотой осцилляции биологического вида, и, соответственно, такое возбуждение выходит на первый план во влиянии на данный вид. Необходимо отметить, что многими учёными в ряде исследований биофизических процессов отмечается частотная преемственность — макро-частоты присутствуют в спектрах гистограмм микропроцессов, и наоборот [4]. Например, были обнаружены общие частоты при изучении хемилюминесценции планарий и флуктуаций температуры мелких млекопитающих и птиц [5]. Соответственно, виды, обладающие общими частотами, могут резонансно модулировать экологические ниши друг друга.

Таким образом, оба представления о квантовых и экологических нишах (потенциальных ямах) в рамках нашей гипотезы предлагается рассматривать с позиции концепта волнового уравнения Шредингера, где гамильтониан является оператором над полем комплексных чисел. Именно с подачи самого Э. Шредингера [6] начались поиски подходов к моделированию динамики существования живого (от молекул до популяций видов) во взаимодействии с окружающей средой. Он использовал принцип энергетического порога в квантовой механике для понимания стабильности генома. Для описания указанного порога он также использовал представление о потенциальной яме. Центральным положением его теории было представление о геноме как аperiодическом кристалле. Это представление имеет отношение и к нашей работе. Если обычный кристалл характеризуется решёткой Браве [7] и единственной частотой ω , то аperiодический кристалл можно представить в виде $\sum_i \omega_i$, где из-за большого количества собственных частот сложно обнаружить периодичность. Многомерность куба, сконструированного Хатчинсоном, позволяет предположить множество устойчивых колебаний (собственных частот), образованных в плоскостях, формируемых парой координат.

Математических моделей, начиная с модели Лотки-Вольтерра, было предложено достаточно много [8,9]. Большая часть из них решали конкретные кинетические и динамические задачи на уровне клеток и популяций. Обзорная работа была написана Иваницким [10], который после Шредингера пытался освежить тему «жизнь с точки зрения физики» и предложил определение жизни как свойства наличия памяти. Наверное, это важный аспект жизни, однако на наш взгляд, память возможно появляется вместе с нарушением симметрии, что уже

наблюдается и в так называемой неживой материи в момент синтеза. В своих моделях мы пытаемся идти от общего к частному, чтобы соединить миры биологии и квантовой механики в духе синергического подхода, введённого Хакеном.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы является моделирование существования биологического вида на основе гипотезы: вид живого по аналогии с квантовыми феноменами является сущностью, осциллирующей внутри определённой экологической ниши как потенциальной ямы. Геометрия и суперпозиция независимых параметров экологической ниши детерминируют собственные значения (устойчивые решения уравнения) волновой функции данного биологического вида и собственные частоты. Экологическая ниша выполняет роль биологического оператора, приводящего к эволюции волновой функции вида живого. Исходя из нашей модели, показано, что определённый вид живого, подобно квантовой частице, может совершать туннелирование сквозь потенциальный барьер экологической ниши и тем самым переходить в другую нишу, синтезируя новый биологический вид.

Модель вида живого в экологической нише как нелинейный осциллятор. Попробуем определить природу волновой функции в отношении биологического вида. Рассуждая по аналогии с квантовой механикой, где произведение $\rho = \varphi \times \varphi^*$ означает вероятность нахождения частицы или плотность материи, определим, что ρ есть не что иное, как плотность заселённости (численности) вида живого. Для лучшего понимания необходимо развеять пару мифов о мистике волновой функции и уравнении Шредингера. Как считается, Шредингер написал его эвристично, но в действительности это уравнение может считаться расширением уравнения диффузии (или теплопроводности) в комплексную область:

$$\frac{d\varphi}{dt} = \nabla(D\nabla\varphi), \quad (3)$$

где ∇ – градиент, D – коэффициент диффузии.

Это достаточно частый приём в математике и физике для увеличения полноты описания. Иными словами, «волновая функция» вида описывает расширенную диффузию (распространение) его в природе или (и) его эволюцию. При этом выход в комплексную область позволяет учитывать не только обмен энергией, но и фазой, поэтому по причине интерференции диффузия не происходит однородно.

Интерпретация волновой функции, данная Максом Борном, гласит, что сама волновая функция не имеет реального смысла, а является некоторой математической абстракцией, согласующейся с «копенгагенской» интерпретацией этой функции как волны вероятности [3]. С другой позиции физический смысл комплексного сопряжения может заключаться именно в отражении волновой функции от границы. Наблюдаемо только взаимодействие $\varphi \times \varphi^*$, но не сами волны. Такая интерференция актуализирует волну. Например, мы слышим звук интерференционного паттерна, образуемого прямой и обратной волной, бегущей по струне. Можно представить картину физической реальности как результат глобальной интерференции на разных уровнях, и благодаря этому процессу в динамике возникает внутренняя устойчивость разных сущностей в живой и неживой природе. В этом контексте уравнение Шредингера можно интерпретировать как эволюцию интерференции.

Далее интересно определить принцип неопределённости Гейзенберга в отношении биологического вида. В классической форме он записывается в виде:

$$\Delta x \times \Delta p = \frac{\hbar}{2}, \quad (4)$$

В рамках нашей гипотезы Δx можно определить как пространственную ячейку в кубе Хатчинсона, а оператор импульса (Δp) является своего рода аналогом когнитивности вида живого, иначе говоря, набором эффективных стратегий, которые он использует для выживания. С одной стороны, оператор импульса связан с градиентом $\frac{\partial}{\partial x_i}$, что определяет эволюцию вида, его когнитивную приспособляемость или приобретение новых стратегий, с другой стороны, он определяется массой (m) или инерцией биологического вида (стабильностью генома), который, в свою очередь, отражает как бы сумму врождённых стратегий биологического вида. Одновременно уровень когнитивности вида может при определённых условиях служить внутренним ресурсом биологического вида. Можно попробовать расширить понятие об экологической массе биологического вида, выйдя в область комплексной области и ввести понятие импеданса экологической ниши как характеристики её инерциальной устойчивости. Данное понятие, как показано в [11], является ключевым в процессах параметрического резонанса, когда незначительное периодическое воздействие на импеданс приводит к существенным изменениям. Параметрическое воздействие на некоторый фактор экологической ниши может быть вызвано как внешней силой, так и внутренней. Когерентное изменение инертности или когнитивности вида приводит к параметрическому резонансу внутри экологической ниши.

Таким образом, сам вид как бы моделирует экологическую нишу. Это следует и из модели Лотки-Вольтерра, описывающей классические уравнения хищник-жизнь — истребление хищниками рассматриваемого вида приводит к уменьшению пищевого ресурса хищника, и, соответственно, к его вымиранию (хотя саму стратегию борьбы с хищником ввести в уравнения весьма затруднительно). В данной модели принято, что хищники определяют главный член гамильтониана H_0 , но очевидно, что в природе имеется множество случаев, когда это не так. Например, ситуация с сумчатыми в Австралии, где их эволюция определяется иными экологическими

факторами. Кроме того, члены H_0, H_1, H_2 могут часто меняться местами. Например, известно, что, когда травоядные поедают траву больше определённой нормы, в ней начинают активно плодиться паразиты, которые уменьшают поголовье животных, защищая таким образом вид растений [12]. Следовательно, трава превращается из ресурса в хищника для этих особей, и увеличение их численности сменяется уменьшением.

Принцип суперпозиции, который используется в квантовой механике, основан на представлении о независимости показателей свойств частицы, например, электрона в атоме, что позволяет в первом приближении описывать его поведение линейной суперпозицией его собственных состояний. Суперпозиция – это линейная комбинация базисных, независимых векторов, или их линейная оболочка.

На одно из проявлений квантовой суперпозиции в биологии обратил внимание Э. Шредингер – в случае, когда оба аллеля, и рецессивный, и доминантный, определяют онтогенез организма [6]: при скрещивании гомозиготных белого львиного зева с малиновым получаются розовые потомки, т.е. с промежуточным окрасом. Таким образом, рецессивность и доминантность могут быть не абсолютны, а аллели отца и матери выполнять роль «независимых координат».

Представление о линейности и суперпозиции связано с представлением о закрытости системы, когда, например, атом существует бесконечно долго, и электрон может вечно в нём осциллировать, тогда уравнение Шредингера выглядит следующим образом:

$$i\hbar \frac{d\varphi}{dt} = H_0\varphi, \text{ где } H_0 = \text{const.} \quad (5)$$

В терминах экологической ниши это означает, что внутри неё поддерживается постоянный диапазон температур, имеются бесконечные пищевые ресурсы и т.д., иными словами, вид может вечно существовать, осциллируя вокруг некоторого значения его численности. Но в действительности закрытых систем не существует, и мы наблюдаем как энтропийные процессы, так и обратные, когда появляются когерентные состояния, уменьшающие энтропию. Имеются различные подходы к моделированию физических процессов в открытых системах (уравнение Линдблада, эффекты Белоусова-Жаботинского и т.д.) [8].

Исходя из нашего подхода к состоянию биологического вида в экологической нише, возвращаемся к уравнению (2), где H_2 может нелинейно зависеть от H_0 . В рамках нашей аналогии экологическая ниша выполняет роль биологического оператора H , приводящего к эволюции волновой функции вида живого. Причем, важно, что в нашей модели этот гамильтониан является оператором над полем комплексных чисел, т.е. работает в комплексной области.

В попытке осмысления такой эволюции нами ранее была предложена модель *нелинейного осциллятора* в качестве описания эволюции произвольной сущности, в том числе вида живого [13].

Произвольный биологический вид обладает определённой устойчивостью, характеризующийся некоторой временной длительностью его существования. Если рассмотреть длительности, превышающие наиболее характерные для него, то в итоге вид, как целое, теряет устойчивость и может либо совсем исчезнуть, либо распасться на производные от него биологические подвиды и на составляющие его особи, способные занять иные экологические ниши, например, путём миграции. Подобный процесс можно представить в виде диаграммы – модели, изображённой на рисунке 1.

Модель демонстрирует в общем виде эволюцию биологического вида, проявляющего системные (и волновые) качества, иначе говоря, сохраняющего определённую темпоральную инвариантность (по оси t), которая здесь соответствует этапу устойчивых осцилляций амплитуды A , например, численности вида, продолжающиеся некоторый период. Важно отметить, что в модели подразумевается образование (синтез) новых сущностей как живой, так и неживой материи, на базе определённой экологической ниши.

На рисунке 1 этапы 1-2-3 демонстрируют период, когда эволюцию вида определяет только оператор H_0 : этап 1 – рождение нового вида φ_0 в пределах новой ниши H_0 , этап 2 – адаптация вида (мелкий пунктир), этап 3 – устойчивые осцилляции численности, когда вид устойчиво существует (сплошная синусоидо-подобная кривая)

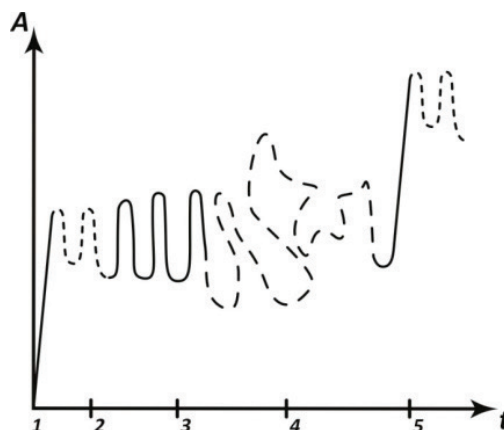


Рисунок 1. Модель-диаграмма нелинейного осциллятора, демонстрирующая эволюцию биологического вида.
A – численность вида. t – время эволюции вида

Этапы 4-5 демонстрируют период, когда становится существенной часть гамильтониана H_1, H_2 , либо внутренний ресурс вида меняет H_0 , преобразуя экологическую нишу, создавая новую $H_0 + H_2$, либо внешние условия преобразуют нишу $H_0 + H_1$, с последующим рождением нового вида $\phi 1$, и затем повторение всех этапов.

Как можно заметить, представленная модель содержит два особых аспекта (на этапах 1, 2 и 4), отсутствующие в традиционной диалектике эволюции, во-первых, этап синтеза в большинстве случаев предваряется этапом *хаоса*, что характеризуется неустойчивостью существования, во-вторых, в диаграмме акцентируется этап *адаптации*, который Хомский назвал этапом выхода из стохастического колодца [14]. Этап хаоса онтологически необходим, поскольку синтез, означающий кардинальную трансформацию вида, невозможен на гармоническом этапе (по причине высокой инертности биологического вида).

Такая обобщённая модель для трёх этапов эволюции вида названа *нелинейным осциллятором*, так как она демонстрирует линейность только на определённом этапе, заканчивающемся резко нелинейным этапом и последующим новым синтезом. Линейный этап характеризуется участием двух основных сил: жертва-хищник, вид-пищевой ресурс, вид-болезнь (смерть). Согласно теореме Пуанкаре [15], устойчивые осцилляции невозможны, если сил больше двух. Таким образом, если гамильтониан определяется тремя силами (связями), которые нельзя разбить попарно (т.е. появляются перекрёстные члены), например, жертва-хищник-болезнь, то такой биологический вид с большой вероятностью выйдет из устойчивого состояния.

Как уже отмечалось выше, если все координаты независимы, то гамильтониан представляет собой сумму частей, что соответствует устойчивым многомерным осцилляциям — $\sum_i w_i$.

Необходимо прояснить, что вид нелинейности — квадратичная, кубическая и т. д. в рамках нашей модели неважен. В общих чертах поведение осциллятора будет подобно изображённому на рисунке 1 [15]. Основным их отличием будет длительность каждого периода: адаптации, гармонической устойчивости, хаотического. В то же время эта диаграмма позволяет обобщить представление о собственных значениях волновой функции, которой оперирует квантовая механика, и таким образом соединить разные масштабы микромира и макромира. Если мы представим ничем не ограниченную произвольную микрочастицу, то такая частица, согласно квантовой механике, будет описываться бесконечной волной в пространстве-времени. В случае внешних ограничений волновая функция локализуется внутри них, и будет описываться рядом устойчивых собственных значений, которые определяются как границами (формой), так и внутренними параметрами (заряд, энергия), отвечающими за содержание сущности. В макромире произвольный биологический вид ограничен множеством условий и поэтому имеет как темпоральные, так и пространственные пределы.

С другой стороны, произвольный биологический вид — это, как правило, устойчивая система, состоящая из некоторого набора организмов, существующих каждый в своей нише. Заметим, что понятие устойчивости как обладания некоторым порядком во времени, также эволюционирует: до недавнего времени считалось, что кристаллы могут обладать только определёнными симметриями, которые исключали, например, симметрию пятого порядка, однако недавно были обнаружены структуры, названные квазикристаллами, обладающие такой симметрией.

В рамках нашей модели согласованное (когерентное) состояние особей, длящееся на протяжении гармонического этапа, можно назвать *собственным значением* экологической ниши, актуализированной в виде определённого биологического вида.

Модель экологической ниши как потенциальной ямы биологического вида, механизмы их сопряжённой эволюции. Продемонстрируем несколько квантово-механических эффектов на примере эволюции вида, чтобы показать соответствие нашей модели реальной экологической нише. В рамках открытий, сделанных Г.Ф. Гаузе, Д. Лэком, можно представить природу указанных выше обобщённых *собственных значений* биологического вида. Закон Гаузе, который гласит, что «два вида животных с одинаковыми экологическими потребностями не могут жить в одном ареале» [16], оказывается, как бы подобием принципа Паули (два и более фермиона, не могут одновременно находиться в одном и том же состоянии). Например, два вида белок могут обитать на одной территории, но располагаться на разных уровнях деревьев и почти не пересекаться друг с другом. Изменение экологической ниши сопряжено с изменением потенциальной ямы и соответственно с изменением её *собственного значения*, что отражается на трансформации вида. В итоге вид, поменяв экологическую нишу, меняет внешний облик, что сопряжено с определёнными изменениями на уровне генома. На рисунке 2 представлена диаграмма нелинейного осциллятора в терминах экологических ниш.

На рисунке 2 *экологическая ниша* изображена в виде потенциальной ямы, внутри которой вид осциллирует, подстраиваясь под её форму. Цифрой 1 обозначено незначительное изменение параметров экологической ниши (например, температуры, ресурсов, конкурентов, и др.), не приводящие к изменению вида, который продолжает осциллировать внутри ниши. Но если ниша трансформируется существенно, как показано далее на диаграмме слева рисунка 2, когда ограничение, сдерживающее вид внутри неё, существенно снижается, тогда происходит этап синтеза, и вид занимает принципиально новую нишу.

Исследователями [2] отмечается, что возможно «просачивание» вида за пределы экологической ниши. Тогда вторую часть рисунка 2 можно изобразить иначе (по аналогии с туннельным переходом в квантовой механике), как показано на рисунке 3.

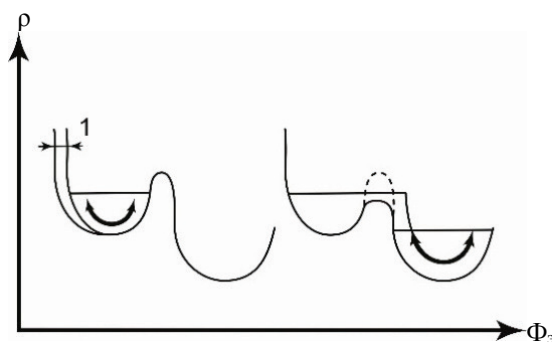


Рисунок 2. Эволюция экологических ниш. Дугообразной стрелкой показаны осцилляции вида внутри ниши. Горизонтальные прямые-максимальные амплитуды осцилляций плотности вида (ρ). Φ_3 – экологический фактор

Такое «туннелирование» (при ограничениях) через барьер и занятие новой экологической ниши возможно за счёт внутренних энергетических ресурсов, что подобно пути эволюции по теории Ламарка. Так, например, Дэвид Лэк [16] обнаружил, что увеличение размера клюва у галапагосских вьюрков имеет скорее социальную природу, а не является ответом на изменения пищевой цепочки. Особи одного подвида устанавливают родство только с особями, обладающими клювами соответствующего размера, что является внутренним ресурсом эволюции. Интересно, что некоторое время вид выступает суперпозицией двух подвидов, пока подвиды не разойдутся по различным экологическим нишам (аналогично в квантовой механике волновая функция также является суперпозицией собственных функций, которая «эволюционирует»).

Модель нелинейного осциллятора вида живого в экологической нише в общих чертах соотносится с синтетической теорией эволюции, обоснованной в двадцатом веке С.С. Четвериковым, Дж. Холдейном, Р. Фишером, Г.Ф. Гаузе, Д. Лэком. Синтетическая теория соединила в себе дарвиновскую теорию эволюции, представления Ламарка и достижения новейших исследований в области генетики.

Прежде всего, учёными было установлено, что пространство естественного отбора является сопряжённым с пространством генетических изменений и поэтому одно без другого рассматривать нельзя: изменения в одном тут же сказываются в другом (внешние и внутренние изменения модулируют геном, который посредством вида влияет на экологическую нишу). Кроме того, ряд учёных, таких, как Линн Маргулис, Ник Лейнид, Ноам Хомский [14], полагают, что имеются мутации двух различных типов: микромутации, описывающие дрейф генов, иными словами, мягкую подстройку организма под изменения внешних условий, и макромутации, в результате которых происходит зарождение новых видов (в том числе появление новых органов). Тогда, в согласии с моделью на рисунке 1, микромутации – это непрерывные устойчивые гармонические осцилляции, которые представляются ответом на изменение внешних условий, тогда как макромутации – взрывной сингулярный переход, который связан не только с внешним, дарвиновским давлением, но и с внутренней энергетикой, что можно в какой-то степени отнести к неоламаркизму.

Внешние причины можно связать с дарвиновским путём эволюции, тогда как внутренние с путём Ламарка. И те, и другие могут преобразовывать экологическую нишу, что меняет граничные условия, и, соответственно, собственные значения волновой функции вида, в итоге преобразовывая его. Внешние причины могут быть связаны, например, с похолоданием или потеплением. Внутренние – с влиянием вида на экологическую нишу, которое может быть различных типов. Например, биоотходы преобразуют химический фон экологической ниши. Или возможно самовлияние, например, посредством эпигенетической модуляции. Согласно Ламарку, виды эволюционируют в направлении желания индивида, которое формируется необходимостью. Например, если на некоторой территории на среднем уровне деревьев листьев стало недостаточно и остались листья только на верхнем уровне — это должно заставить удлиняться шею у животных, поскольку они потянутся к верхним, что в итоге приведёт к образованию нового вида животных, типа жирафа или слона с длинным хоботом. Различные прямые эксперименты показали, что в подобном варианте теория Ламарка неверна. Но искусственное стимулирование желания и жизненно необходимая потребность – это разные экспериментальные условия.

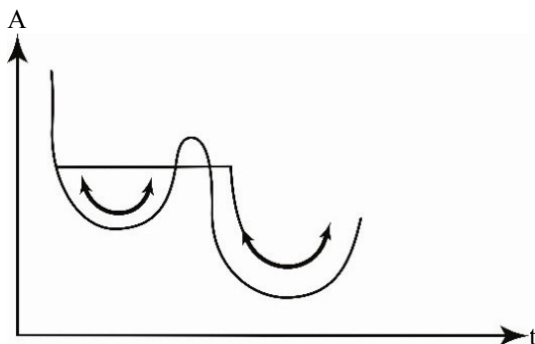


Рисунок 3. Диаграмма с демонстрацией «просачивания» вида из одной экологической ниши в другую, более выгодную для существования

Теория Дарвина подразумевает, что изменения вида происходят часто и их много, но актуализируются те, которые оказываются выгодны виду, и вид приобретает конкурентные преимущества, большую устойчивость. Таким образом, обобщая, можно полагать, что дарвиновская теория ближе к описанию гармонической части эволюционного пути видов осцилляциями внутри экологической ниши, в то время как для описания синтетического этапа более соответствует теория Ламарка. Это может объяснить парадокс появления на двух различных эволюционных ветках совершенно одинаково устроенных органов, например, глаза. Бергсон [17] описал сходство глаз, присущих морским гребешкам (вид моллюсков) и млекопитающим. Согласно дарвиновской эволюционной теории такое невозможно.

В пользу реализации эволюционного пути по Ламарку может свидетельствовать современное представление о геноме: это не просто длинная молекула из нуклеотидов, расположенных в определённом порядке, но и сложная топологическая надмолекулярная структура, то есть обладающая многоуровневой формой, которая сопряжена с её энергетическим статусом. Такая многоуровневая упаковка характерна и для других важных биополимеров в клетках, например гемоглобина в эритроцитах крови. В экспериментах с эритроцитами обнаружено, что незначительная модуляция конформации гемоглобина может приводить к существенному изменению динамики биологической структуры. Эритроцит обладает четырьмя центрами захвата кислорода в виде четырёх атомов железа, расположенных внутри гемоглобина, и эффективность захвата кислорода одним из центров определяется тем, был ли захвачен кислород остальными центрами. Далёкий для остальных трёх центров захват кислорода меняет всю топологию эритроцита, и таким образом реализуется дальняя связь.

В то же время имеются экспериментальные данные, указывающие на корреляции между степенью проявления разумности с особенностями пространственной упаковки генома [18]. В связи с этим необходимо учитывать особенности когнитивных связей внутри вида (по аналогии, например, с муравейником), что комплементарно его геному.

Мы предполагаем, что на уровне биологического вида проявляется отображение некоторых свойств экологической ниши в топологии генома, ведущее к изменению его конформационного (сопряжённого энергетическому) состояния. В этом смысле существенной становится сопряжённость потенциала внутри экологической ниши, реактивности топологической структуры генома и когнитивных способностей вида.

На рисунке 4 упрощённо демонстрируется динамическое соответствие генома и экологической ниши, где изменения вида внутри одной экологической ниши (или «дарвиновские осцилляции») соответствуют осцилляциям генома между формами 1 и 2, тогда как ламарковские преобразования приводят к изменениям форм от 1 к 3.

Таким образом, может возникать связь между топологией (энергетическим статусом) генома и структурным базисом (биологическим оператором) экологической ниши через онтогенез. Топологию генома определяет множество факторов, включая эпигенетические модификации. На наш взгляд, некоторые эпигенетические преобразования могут понижать порог энергетического барьера конформного преобразования генома. Такие модуляции генома могут формироваться не только внешней средой, но и волей (психической энергией) индивида. Например, диета – один из способов эпигенетической модуляции. Другой способ такой модуляции – груминг у обезьян. Эпигенетическая модуляция одновременно модулирует энергетическую яму, внутри которой осциллирует состояние генома.

Нужно заметить, что смена конформационных состояний генома – многоуровневый процесс, разворачивающийся длительно во времени. Например, если эволюционно глаз более выгоден энергетически, чем пигментное пятно, которое было ранее, энергетический барьер сохранится, пока не произойдёт весь комплекс изменений. Но когда появится новый видовой признак, запустится лавинообразный процесс, приводящий к процессу, названному стохастическим колодезцем. Таким образом, в отличие от статистических осцилляций Дарвина, где задействован весь вид, в понижении энергетического барьера главную роль играет отдельный индивид (например, изменение у него некоторых конформационных (энергетических) состояний генома усиливает сообразительность особей вида при адаптации).

Как указывает Романовский в [9], специальных участков в цепи ДНК, ответственных за временное и пространственное развитие организма, обнаружено не было. Можно предположить, что именно чувствительная топология генома к воздействиям, сопряжённая с факторами экологической ниши, потенциально обеспечивает временные ключевые моменты онтогенеза и эволюцию вида в целом.

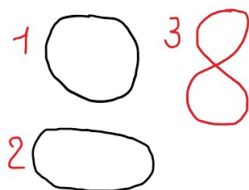


Рисунок 4. Диаграмма демонстрирует формы 1 и 2 генома, соответствующие осцилляциям вида внутри одной экологической ниши. Формы 1 и 3 демонстрируют смену энергетической формы генома при смене ниши

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая модели, рассмотренные в данной работе, можно заключить, что в рамках нашей гипотезы гармоническая фаза соответствует осцилляциям вида живого внутри экологической ниши. Период понижения барьера ниши и переход вида на новую потенциальную яму соответствует этапам хаоса и синтеза (нелинейная осцилляция). При дальнейшем снижении барьера система будет стремиться сменить экологическую нишу и синтезировать биологический вид с новыми потребностями. Исходя из представления об устойчивых состояниях биологического вида (гармонических осцилляциях) как собственных значениях экологической ниши, можно полагать, что и человеческое существование характеризуется преодолением границ среды обитания вида *Homo sapiens* [19] путём «туннелирования» (смены экологических ниш), восстановлением устойчивости вида через этап нового синтеза, чему способствует особая открытость человеческой системы миру.

Список литературы / Reference:

1. Франкл В. *Человек в поисках смысла*. М.: Прогресс, 1990, 368 с. [Frankl V. *Man in search of meaning*. Moscow: Progress, 1990, 368 p. (In Russ.)]
2. Озерский П.В. К формализации концепции экологической ниши Элтона-Одума. История вопроса. *Функциональная морфология, экология и жизненные циклы животных*. М.: Научные труды РГПУ им. Герцена, 2013, т. 13, № 1, с. 55-68. [Ozersky P.V. On the formalization of the concept of the ecological niche of Elton-Odum. The history of the issue. *Functional morphology, ecology and life cycles of animals*. Moscow: *Scientific Works of the Herzen State Pedagogical University*, 2013, vol. 13, no. 1, pp. 55-68. (In Russ.)]
3. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Квантовая механика (нерелятивистская теория)*. М.: Наука, 1989, 768 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Quantum mechanics (non-relativistic theory)*. Moscow: Nauka, 1989, 768 p. (In Russ.)]
4. Шноль С.Э. Космофизическая природа идеи формы гистограмм, построенных по результатам измерений процессов разной природы. *Метафизика. Век XXI. Альманах*. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007, вып. 2, с. 284-320. [Shnol S.E. The cosmophysical nature of the idea of the form of histograms constructed from the results of measurements of processes of different nature. *Metaphysics. Century XXI. Almanac*. M.: BINOM. Laboratory of Knowledge, 2007, iss. 2, pp. 284-320. (In Russ.)]
5. Панчелюга В.А., Панчелюга М.С. Принцип Маха и универсальный спектр периодов: комплементарные фрактальные распределения как следствие рациональных и иррациональных отношений между частями целостной системы. *Метафизика. Журнал*, 2021, № 2 (40), с. 39-56. [Panchelyuga V.A., Panchelyuga M.S. The Mach principle and the universal spectrum of periods: complementary fractal distributions as a consequence of rational and irrational relations between parts of an integral system. *Metaphysics. Journal*, 2021, no. 2 (40), pp. 39-56. (In Russ.)]
6. Шрёдингер Э. *Что такое жизнь с точки зрения физики?* М.: РИМИС, 2015, 176 с. [Schrodinger E. *What is life from the point of physics view?* M.: RIMIS, 2015, 176 p. (In Russ.)]
7. Ашкрофт Н., Мермин Н. *Физика твёрдого тела*. М.: 2013, 459 с. [Ashcroft N., Mermin N. *Solid State Physics*. Moscow: 2013, 459 p. (In Russ.)]
8. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. *Биофизическая динамика продукционных процессов*. Москва-Ижевск: 2004, 464 с. [Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. *Biophysical dynamics of production processes*. Moscow-Izhevsk: 2004, 464 p. (In Russ.)]
9. Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. *Математическое моделирование в биофизике*. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2003, 402 с. [Romanovsky Yu.M., Stepanova N.V., Chernavsky D.S. *Mathematical modeling in biophysics*. Moscow-Izhevsk: Institute of Computer Research, 2003, 402 p. (In Russ.)]
10. Иваницкий Г.Р. XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики. *Успехи физических наук*, 2010, т. 180, № 4, с. 339-369. [Ivanitsky G. R. XXI century: what is life from the point of physics view? *Successes of physical sciences*, 2010, vol. 180, no. 4, pp. 339-369. (In Russ.)]
11. Зельдович Б.Я. Импеданс и параметрическое возбуждение осцилляторов. *Успехи физических наук*, 2008, т. 178, № 5, с. 489-510. [Zeldovich B.Ya. Impedance and parametric excitation of oscillators. *Successes of physical sciences*, 2008, vol. 178, no. 5, pp. 489-510. (In Russ.)]
12. Циммер К. *Паразит — царь природы: Тайный мир самых опасных существ на Земле*. М.: Альпинанон-фикшн, 2017, 362 с. [Zimmer K. *Parasite — the king of nature: The secret world of the most dangerous creatures on Earth*. Moscow: Alpinanon-fiction, 2017, 362 p. (In Russ.)]
13. Стринг М.Б. Аналитический и синтетический этапы эволюции произвольных систем: онтологические особенности и характеристики. *Современный учёный*, 2018, № 8, с. 31-39. [Strigin M.B. Analytical and synthetic stages of the evolution of arbitrary systems: ontological features and characteristics. *A modern scientist*, 2018, no. 8, pp. 31-39. (In Russ.)]
14. Хомский Н. *Человек говорящий. Эволюция и язык*. СПб.: Питер, 2018, 304 с. [Chomsky N. *A talking man. Evolution and language*. St. Petersburg: Piter, 2018, 304 p. (In Russ.)]
15. Арнольд В. И. *Теория катастроф*. М.: ЛЕНАНД, 2016, 136 с. [Arnold V. I. *Theory of catastrophes*. M.: LENAND, 2016, 136 p. (In Russ.)]
16. Галл Я.М. Дэвид Лэк: две версии видообразования, либо от нейтрализма к адаптационизму. *Вавилонский журнал генетики и селекции*, 2014, т. 18, № 3, с. 585-598. [Gall Ya.M. David Lack: two versions of

speciation, either from neutralism to adaptationism. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2014, vol. 18, no. 3, pp. 585-598. (In Russ.)]

17. Бергсон А. *Творческая эволюция*. М.: Академический проект, 2015, 320 с. [Bergson A. *Creative evolution*. М.: Academic project, 2015, 320 p. (In Russ.)]

18. Марков А. *Эволюция человека. Нейроны и душа*. М.: Издательство АКТ: CORPUS, 2018, 512 с. [Markov A. *Humanevolution. Neurons and soul*. М.: Publishing house АКТ: CORPUS, 2018, 512 p. (In Russ.)]

19. Пригожин И. *Порядок из хаоса: новый диалог человека с природой*. М.: Едиториал УРСС, 2014, 304 с. [Prigozhin I. *Order from chaos: a new dialogue between man and nature*. Moscow: Editorial URSS, 2014, 304 p. (In Russ.)]

ECOLOGICAL NICHE AS A POTENTIAL PIT DETERMINING THE EIGENVALUES OF THE WAVE FUNCTION OF A LIVING

Strigin M.B.

Mitrial LLC

Akademika Korolova st., 4, Chelyabinsk, 454004, Russia; e-mail: strigin1969@gmail.com

Received 28.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0563

Abstract. This work considers the possibility of an analog transition between the microcosm of quantum mechanics and the macrocosm of biology, where the most important process is the relationship of a biological species (BS) with its ecological niche (EN). In the first workpart the hypothesis is put forward, that the EN acts as an analogue of a potential well in quantum mechanics, which makes it possible to apply the tools of the latter. Then the stable BS state, as a system structure, corresponds to the eigenvalues of some wave function that oscillates in the EN (like an electron in an atom). At the same time, it is possible to distinguish the linear and nonlinear stages of these oscillations. The evolution nonlinear part, when the BS enters a chaotic stage of existence, can be determined by both external changes in the EN and internal causes at the genome level. The first reasons can be called Darwinian, the second — Lamarckian. In general, the BS eigenvalues are determined by boundary conditions (based on the Hutchinson cube): generalized the EN geometry and other environmental factors. It is shown how the basic concepts of quantum mechanics such as superposition, tunneling through a potential barrier, the Pauli principle are manifest themselves in biology. The latter corresponds to Gause's law in biology: only one species with certain ecological needs can live inside one ecological niche. In the second work part possible evolutionary correlation effects are discussed between the potential well, determined by the corresponding EN, and the potential well, which affects the conformational (energy) genome state of the BS. It is assumed that a change in the EN transforms the informational genome status through natural selection. On the other hand, and a change in the genome topology of the individuals can eventually to change the species whole and lead to the transformation of its niche.

Key words: *ecological niche, biological species, Gause's law, quantum mechanics, wave equation, eigenfunction, potential well, boundary conditions, nonlinear oscillator, tunneling, evolution, genome.*

УСИЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, УРОВНЯ АПОПТОЗА И ИЗМЕНЕНИЕ В УРОВНЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *BCL* И *BAX* У ДЕТЕЙ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ РАС

Чудакова Ю.М.¹, Шмарина Г.В.¹, Ершова Е.С.¹, Мартынов А.В.¹, Никитина С.Г.², Костюк С.В.¹

¹ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова
Москворечье ул., 1, г. Москва, 115478, РФ; e-mail: julia.chudakova@yandex.ru

² Научный центр психического здоровья
ул. Каширское шоссе, 34, г. Москва, 115522, РФ

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0564

Аннотация. Расстройства аутистического спектра (РАС) – гетерогенная группа психиатрических заболеваний, часто встречающихся у детей. Пациенты с РАС характеризуются дефицитом когнитивных, поведенческих, коммуникативных сфер и навязчивым стереотипным поведением. На данный момент этиология и патогенез РАС одна из важнейших проблем детской психиатрии. Для пациентов с РАС характерно усиление окислительного стресса. Целью данного исследования было охарактеризовать роль окислительного стресса у пациентов с РАС в усиление уровня апоптоза. Клиническую группу составили 133 ребенка с РАС (DSM-5) 4-12 лет, наблюдавшиеся ФГБНУ НЦПЗ. Дети с РАС были разделены на две подгруппы по тяжести течения заболевания, согласно баллам CARS. В контрольную группу вошли 27 здоровых детей. Из цельной крови выделяли лимфоциты центрифугированием в градиенте фиколла-урографина. Уровень экспрессии генов в лимфоцитах периферической крови пациентов с РАС и здоровых контролей оценивали по количественному определению уровня мРНК методом ПЦР в реальном времени и по уровню содержания белка в клетках, проточной цитофлюориметрией. Уровень активных форм кислорода (АФК) внутри лимфоцитов оценивали по уровню окисленного до DCF реагента H₂DCFH с помощью проточной цитофлюориметрии. В лимфоцитах детей из подгруппы с легкой и средней формой РАС уровень АФК был повышен, но уровень значимости не был достигнут, при этом в лимфоцитах детей с тяжелым течением РАС уровень АФК был в 2,2-2,5 раз выше, чем у детей контрольной группы ($p < 0,01$). Уровень экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* в лимфоцитах детей с тяжелой формой РАС был понижен в 2-2,5 раза ($p < 0,01$), а уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* был в 1,8-2,3 ($p < 0,01$) раза выше по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать об усилении у пациентов с тяжелым течением РАС окислительного стресса и апоптоза.

Ключевые слова: РАС, аутизм, АФК, активные формы кислорода, окислительный стресс, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) – гетерогенная группа психиатрических заболеваний детей. Пациенты с РАС характеризуются дефицитом когнитивных, поведенческих, коммуникативных сфер и навязчивым стереотипным поведением. РАС один из самых распространенных психиатрических диагнозов среди детей. Этиология и патогенез аутизма является одной из главных задач современной детской психиатрии во всем мире. В США в 2016 году РАС был диагностирован у 1 ребенка из 68 детей [1]. В России в данный момент нет утвержденной методики учета случаев аутизма, поэтому официальной статистики распространенности заболевания в нашей стране нет. По данным Минздрава РФ, общая численность детей с расстройством аутистического спектра (РАС), согласно мониторингу 2020 года, превысила 32 тысячи человек. Проведенный мониторинг выявил выраженную динамику увеличения численности по сравнению с 2019 годом на 42%, и в 2,3 раза – по сравнению с 2014 годом. На данный момент этиология и патогенез РАС одна из важнейших проблем детской психиатрии. На развитие аутизма влияют генетические, эпигенетические и средовые факторы. Для пациентов с РАС характерно усиление окислительного стресса, аберантное воспаление, дисфункция митохондрий [2].

Целью данного исследования было охарактеризовать роль окислительного стресса у пациентов с РАС в усиление уровня апоптоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническую группу составили 133 ребенка с РАС (диагноз был поставлен согласно DSM-5) (102 мальчика и 31 девочка 4-12 лет [3]). Дети были обследованы в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр психического здоровья» в 2016-2018 гг.

Пациенты прошли оценку согласно AMSE (Autism Mental Status Examination, обследование психического статуса пациента с РАС), CARS (The Childhood Autism Rating Scale, оценка тяжести аутизма), SCQ

(Communication Questionnaire, опрос родителей) [4-6]. В исследовании не принимали участие пациенты с синдромальной формой аутизма. Критериями исключения служили расстройства известной этиологии, клинически значимые сенсорные или двигательные нарушения, серьезных медицинских состояний, влияющие на развитие мозга, тяжелые воспалительные расстройства или аллергические реакции. Как и в ранее проводимых исследованиях [7-11] Клиническая группа была поделена на две подгруппы в соответствии с баллам CARS, оценивающими тяжесть протекания аутизма [2]. Первую группу (n=62) составили дети со слабыми и средними проявлениями аутизма, набравшие по шкале CARS от 30 до 36 баллов. Вторую группу (n=71) составили дети с тяжелым проявлением аутизма, набравшие по шкале CARS от 30 до 36 баллов [2]. В контрольную группу вошли 27 здоровых детей мужского пола из того же возрастного диапазона, что и клиническая группа.

Биологическим материалом служили 8-9 мл венозной крови, взятые у детей, вошедших в исследуемую выборку.

Опекуны детей подписали информированное согласие о заборе 8 мл веной крови и участие в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова».

Из цельной крови выделяли лимфоциты центрифугированием в градиенте фиколла-урографина.

Выделяли тотальную РНК из лимфоцитов набором RNeasy Plus Mini Kit ("Qiagen" Германия). Обратную транскрипцию проводили обратной транскриптазой MuLV-RT ("Силекс" (Россия)). Оценивали концентрацию кДНК, окрашивая ее красителем *ricoGreen*, мерили флуорисценцию. Уровень экспрессии генов оценивали полимеразной цепной реакцией в реальном времени, используя интеркалирующий краситель SYBRGreen PCRMasterMix (Applied Biosystems), амплификатор StepOnePlus instrument (Applied Biosystems). В качестве референсного гена использовали TBP. Использовали праймеры TBP (F: GCCCGAAACGCCGAATAT, R: CCGTGGTTCGTGGCTCTCT), BAX (F: GGAGCTGCAGAGGATGATTG, R: AGTTGAAGTTGCCGTCAGAA), BCL2 (F: TTTGGAAATCCGACCACTAA, R: AAAGAAATGCAAGTGAATGA).

Уровень АФК внутри лимфоцитов оценивали по уровню окисленного до DCF реагента H2DCFH с помощью проточной цитофлуориметрии. Уровень апоптотических клеток в крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии, предварительно окрасив клетки йодидом пропидия и антителами к аннексину-V, меченные FITC. Статистический анализ результатов исследования проводили в пакете программ PAST версии 2.17.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках организма активные формы кислорода (АФК) участвуют в регуляции внутренних процессов. Повышение уровня АФК в клетках приводит к у усилению окислительного стресса и развитию патологий в организме. Уровень АФК в лимфоцитах периферической крови здоровых детей и детей с РАС оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии, предварительно окрасив клетки H2DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate или 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). Этот реагент в присутствии различных радикалов АФК окисляется до дихлорфлуоресцеина (DCF), что позволяет по его флуорисценции определить уровень окислительного стресса в клетках.

Уровень DCF в клетках детей РАС из обеих клинических групп был выше, чем у здоровых детей из контрольной группы. В клетках детей с легкой и средней формой РАС уровень АФК в мононуклеарах был выше на 30-40% выше, чем в лимфоцитах здоровых детей, но уровень значимости не был достигнут. Однако в группе с тяжелой формой РАС уровень АФК был значимо выше в 2,2-2,5 раз выше ($p < 0,01$). Эти данные свидетельствуют о повышении уровня окислительного стресса в клетках детей с РАС особенно при тяжелом течении заболевания.

Усиление окислительного стресса может приводить к апоптозу клеток. Уровень апоптотических клеток в крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии, предварительно окрасив клетки йодидом пропидия и антителами к аннексину-V, меченные FITC.

Уровень апоптоза был повышен и в группе со средней и легкой формой РАС (на 5-15%) и в группе с тяжелой формой РАС (35-45%), но уровень значимости был достигнут только в группе с тяжелым течением РАС (рис. 2).

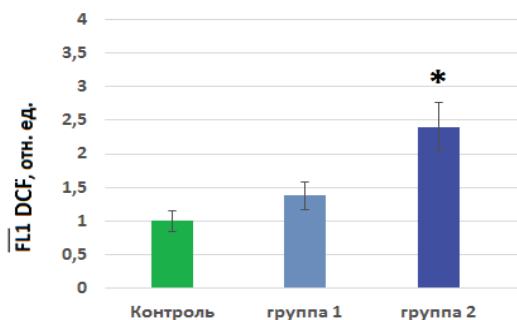


Рисунок 1. Уровень АФК в мононуклеарах периферической крови детей с тяжелой формой РАС (группа 2) и с легкой и средней тяжестью РАС (группа 1). * - $p < 0,01$, критерий U Манна — Уитни

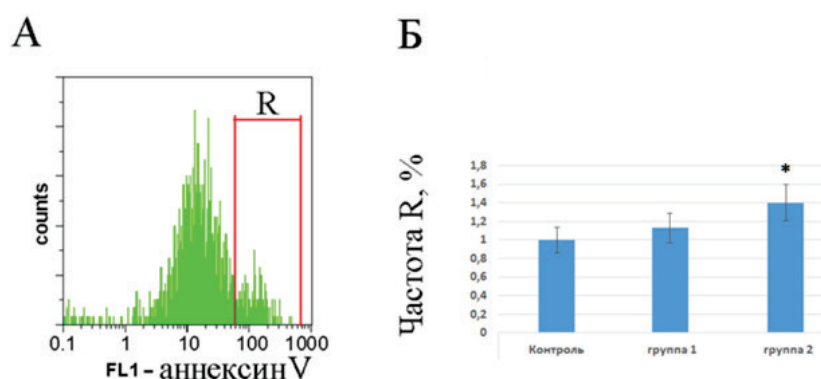


Рисунок 2. Уровень апоптотических клеток в мононуклеарах периферической крови детей с тяжелой формой РАС (группа 2) и с легкой и средней тяжестью РАС (группа 1). * - $p < 0,01$, критерий U Манна–Уитни. Окислительный стресс, приводя к усилению уровня апоптоза, так же влияет экспрессию генов в клетках. Мы оценивали уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* и антиапоптотического гена *BCL2* методом ПЦР в реальном времени (рис. 3)

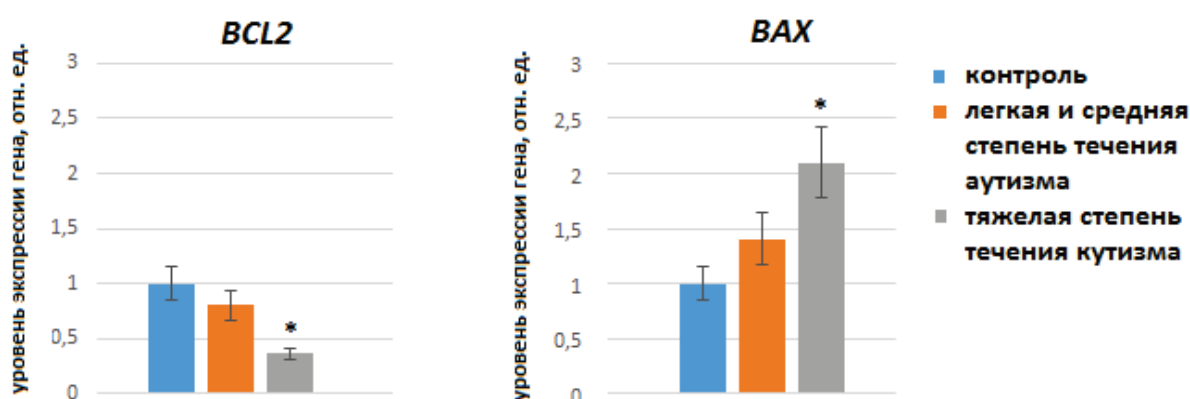


Рисунок 3. Уровни экспрессии генов *BCL2*, *BAX* в мононуклеарах периферической крови пациентов с РАС по сравнению с контролем. Группа 1 - дети с легкой и средней формой аутизма, группа 2 - дети с тяжелой формой аутизма. * p -value $< 0,01$ в сравнении с контрольной выборкой (критерий Манна-Уитни)

Уровень экспрессии проапоптотического гена *BAX* был повышен в группе детей с легким и средним течением РАС в 1,3 раза и в группе детей с тяжелой формой РАС в 1,8-2,3 ($p < 0,01$), но повышение было значимо только в группе с тяжелым течением РАС. Подобная картина наблюдалась при оценке уровня экспрессии антиапоптотического гена *BCL2*. Уровень его экспрессии был понижен в группе детей с легким и средним течением РАС на 30-40 % и в группе детей с тяжелой формой РАС в 2-2,5 ($p < 0,01$), но понижение было значимо только в группе с тяжелым течением РАС. При этом отношение уровней экспрессии гена *BAX* к уровню экспрессии *BCL2* у детей с тяжелой формой РАС было выше в 4-5 раз ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Данные были подтверждены и на уровне белков *BCL2* и *BAX*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У детей с тяжелой формой РАС в клетках периферической крови наблюдается увеличение количества апоптотических клеток, а также повышение уровня окислительного стресса по сравнению с группами сравнения (клетки условно-здоровых доноров и детей со средней и легкой формой РАС). Определение уровня апоптоза клеток и уровня АФК в клетках крови может способствовать дифференциальной диагностике тяжелой формы течения РАС и выбору подходящей конкретному пациенту схемы терапии.

Список литературы / References:

- Christensen D.L. et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. Morbidity and mortality weekly report. *Surveillance summaries*, 2016, vol. 65, no. 3, pp. 1-23.
- Симашкова Н., Ключник Т., Якупова Л. Клинико-биологические подходы к диагностике и обоснованию персонализированной терапии у пациентов с расстройствами аутистического спектра. *Психиатрия*, 2018, т. 2, с. 17-24. [Simashkova N., Klyushnik T., Yakupova L. Clinical-Biological Approaches to Diagnosis and Rationale for Personalized Therapy in Patients with Autism Spectrum Disorders. *Psychiatry*, 2018, 2, 17-24.

3. American Psychiatric Association. In Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), Fifth Edition, 2013, pp. 50-59.
4. Grodberg D. et al. Brief Report: The Autism Mental Status Examination: Development of a Brief Autism-Focused Exam. *Journal of autism and developmental disorders*, 2012, vol. 42, no. 3, pp. 455-59.
5. Rutter M., Bailey A. (SCQ) *Social Communication Questionnaire*. 2003.
6. Scholper E., Van Bourgondien M.E., Wellman G.J., Love S.R. (CARS-2) *Childhood Autism Rating Scale*. 2010.
7. Esnafoglu Erman, Sema Nur Ayyıldız. Decreased Levels of Serum Fibroblast Growth Factor-2 in Children with Autism Spectrum Disorder. *Psychiatry research*, 2017, vol. 257, pp. 79-83.
8. Kaku Sowmyashree Mayur et al. Early Childhood Network Alterations in Severe Autism. *Asian journal of psychiatry*, 2019, vol. 39, no. 114-119.
9. Ning J. et al. Increased Serum Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Autism Spectrum Disorders. *Neurotoxicology*, 2019, vol. 71, pp. 1-5.
10. Ocakoglu, Fevzi Tuna, Sezen Kose, Burcu Ozbaran, and Huseyin Onay. The Oxytocin Receptor Gene Polymorphism -Rs237902- Is Associated with the Severity of Autism Spectrum Disorder: A Pilot Study. *Asian journal of psychiatry*, 2018, vol. 31, pp. 142-149.
11. Qasem H. et al. Impaired Lipid Metabolism Markers to Assess the Risk of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Metabolic brain disease*, 2018, vol. 33, no. 4, pp. 1141-1153.

INCREASED OXIDATIVE STRESS AND CHANGES IN THE LEVEL OF EXPRESSION OF THE BCL AND BAX GENES IN CHILDREN WITH SEVERE ASD

Chudakova Y.M.¹, Shmarina G.V.¹, Ershova E.S.¹, Martynov A.V.¹, Nikitina S.G.², Kostyuk S.V.¹

¹ Research Centre For Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: julia.chudakova@yandex.ru

² Mental Health Research Center

Kashirskoe highway, 34, Moscow, 115522, Russia

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0564

Abstract. Autism Spectrum Disorders (ASDs) are a heterogeneous group of psychiatric disorders most commonly seen in children. Patients with ASD are characterized by cognitive, behavioral, communicative deficits and obsessive stereotypical behavior. At that moment, the etiology and pathogenesis of ASD is one of the most important problems in child psychiatry. Patients with ASD are characterized by increased oxidative stress. The aim of this study was to characterize the role of oxidative stress in patients with ASD in enhancing the level of apoptosis. The clinical group consisted of 133 children with ASD (DSM-5), 4-12 years old, who were followed up by the Federal State Budget Scientific Institution National Center for Health Care. Children with ASD were divided into two subgroups according to the severity of the course of the disease, according to CARS scores. The control group included 27 healthy children. Lymphocytes were isolated from whole blood by centrifugation in a ficoll-urographin gradient. The level of gene expression in peripheral blood lymphocytes of patients with ASD and healthy controls was assessed by quantitative determination of the mRNA level by real-time PCR and by the level of protein in cells, flow cytometry, cytofluorometry. In the lymphocytes of children from the subgroup with mild and moderate forms of ASD, the level of ROS was increased, but the level of significance was not reached, while in the lymphocytes of children with severe ASD, the level of ROS was 2.2-2.5 times higher than in children of the control group. groups ($p < 0.01$). The level of expression of the anti-apoptotic gene BCL2 in lymphocytes of children with severe ASD was reduced by 2-2.5 times ($p < 0.01$), and the level of expression of the pro-apoptotic BAX gene was increased by 1.8-2.3 ($p < 0.01$) times higher compared to the control. This may indicate an increase in oxidative stress and apoptosis in patients with severe ASD.

Key words: ASD, autism, ROS, reactive oxygen species, oxidative stress, apoptosis.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СИСТЕМ С БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТОЙ КАК “МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ” ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИКИ

Пастухов А.А.

Институт Органической Химии РАН

Ленинский просп., 47, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: pastukhov.2013@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0565

Аннотация. Проведено экспериментальное исследование и термодинамическое моделирование растворимости бензойной кислоты (БК) в органических растворителях. Методами термического анализа исследованы бинарные системы бензойная кислота – бензофенон и бензойная кислота – бензил. Построены фазовые диаграммы и определены координаты эвтектических точек в этих системах. В системе бензойная кислота – бензофенон температура эвтектической точки равна 310,3 К при 18 мол. %. БК, в системе с бензилом температура равна 348,5 К при 35 мол. % БК. Политермы растворимости бензойной кислоты представлены в виде линейной зависимости: $\ln X = a - b/T$, X – мол. доля БК, T – температура в К: в метилацетате ($a = 2,7748$, $b = 1389,7$), этилацетате ($a = 1,8099$, $b = 1102,6$), н-пропилацетате ($a = 0,9580$, $b = 854,2$), н-бутилацетате ($a = 1,2178$, $b = 902,0$), н-пентилацетате ($a = 1,0719$, $b = 836,0$), 1,4-диоксане ($a = 0,0164$, $b = 406,0$), хлорбензоле ($a = 8,2765$, $b = 3268,4$), н-декане ($a = 12,332$, $b = 4916,9$), н-додекане ($a = 14,623$, $b = 5808,1$). Рассчитаны значения растворимости бензойной кислоты в растворителях при 298 К с использованием параметров растворимости Гильдебранда и Хансена. Проведено сравнение экспериментальных и литературных данных. Установлена зависимость растворимости от разности параметров растворимости компонентов и приведенного радиуса. Рассмотрены модели для термодинамического описания растворимости веществ в органических растворителях на примере бензойной кислоты. Рекомендованы модели регулярных растворов с параметром растворимости Хансена для экспресс-метода расчета растворимости бензойной кислоты в органических растворителях.

Ключевые слова: бензойная кислота, фазовые диаграммы, политермы растворимости, параметры растворимости.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование политерм растворимости органических веществ позволяет выбрать растворитель для очистки соединений методом массовой кристаллизации, а также обнаружить твердофазный полиморфизм и определить условия для получения низкоплавкой полиморфной модификации, которая имеет, как правило, более высокую растворимость в данном растворителе. Для веществ, обладающих фармакологическими свойствами, это интересно, так же, как и подбор условий для получения со-кристаллов (см., например, [1-5]). Изучение фазовых диаграмм плавкости и политерм растворимости дает представление о характере межмолекулярных взаимодействий в системах [6-8]. В последние годы представляют интерес работы, позволяющие провести компьютерное моделирование подобных систем при минимуме исходных данных [6,9,10]. Для апробации расчетных методов используют «модельные системы»; в таком качестве широкое применение благодаря доступности, химической стабильности, возможности получения высоко чистых образцов нашла бензойная кислота [10-12].

Таким образом, целью работы является разработка методов термодинамического описания растворимости органических соединений на примере систем с бензойной кислотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве «модельного» объекта исследования использована бензойная кислота (БК, квалификации «хч», ГОСТ 10521-78). Были изучены фазовые диаграммы БК с бензофеноном (чда) и бензилом (чда). Для изучения политерм растворимости в качестве растворителей были выбраны н-декан, н-додекан, хлорбензол, 1,4-диоксан, метилацетат, этилацетат, н-пропилацетат, н-бутилацетат, н-пентилацетат. Физические свойства веществ, используемых для построения фазовых диаграмм, представлены в таблице 1, данные взяты из справочной литературы [13,14].

С целью получения Т-х-диаграмм бинарных систем и изучения политерм растворимости были применены термические методы анализа. Дифференциально-термический анализ (ДТА) был основным методом для определения фазовых переходов. Методика приведена в [15]. Масса образца – 0,5 г. Скорость нагрева – 1-2 К/мин. Визуально-политермический анализ (ВПА) использовался для подтверждения результатов ДТА. В эксперименте использовались выносной термостат TW-2.02 (Латвия) и термореактор ТР-150. Политермы растворимости были получены при выдерживании насыщенных растворов в термостате в течение не менее 3-4 часов.

Таблица 1. Вещества и их физические свойства

Вещество	М, г/моль	Номер CAS	Квалификация	$\Delta_{пл}H$, кДж/моль	$T_{пл}$, К	$T_{кип}$, К
Бензойная кислота	122,12	65-85-0	хч	17,91	395,4	522,4
Бензофенон	184,22	119-61-9	чда	18,81	321,3	578,6
Бензил	198,23	134-81-6	чда	22,76	369,6	619,2

Чтобы определить отклонение раствора от идеальности и выбрать модель для описания растворов, в точке эвтектики (температура T_m) рассчитана избыточная парциальная энергия Гиббса для БК по формуле:

$$G_1^E = RT_m \ln(\gamma_1), \quad (1)$$

где $R = 8,314$ Дж/(моль·К) – газовая постоянная; γ_1 – коэффициент активности БК. Значение этой величины соответствовало 0,58 кДж/моль – для системы с бензофеноном и 0,71 кДж/моль – для системы с бензилом. Таким образом, поскольку в системах с бензойной кислотой наблюдаются положительные отклонения от идеальности, такие системы могут быть описаны с использованием модели регулярных растворов [10,12,16].

Растворимость бензойной кислоты. С точки зрения термодинамики, большой интерес представляет определение растворимости и коэффициентов активности в растворах. Для этого были изучены политермы растворимости бензойной кислоты в органических растворителях различных классов – хлорбензол, н-декан, н-додекан (рис. 3) и в сложных эфирах – метилацетат, этилацетат, пропилацетат, бутилацетат, пентилацетат (рис. 4). На рис. 3 для сравнения также приведены данные по линиям ликвидуса систем с бензофеноном и бензилом. Из рисунков 3 и 4 видно, что бензойная кислота хорошо растворяется в хлорбензоле и сложных эфирах, причем, чем длиннее алкильная цепь алкилацетата, тем выше растворимость бензойной кислоты. Однако, полярность растворителя в ряду алкилацетатов с ростом цепи падает, что говорит о дополнительных возможных взаимодействиях между бензойной кислотой и углеводородной цепью сложного эфира. Данные по растворимости могут быть описаны в линейных координатах от обратной температуры:

$$\ln X_1 = \alpha - \frac{b}{T}, \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Апробация методов термодинамического описания систем проводилась на «модельном» веществе – бензойной кислоте.

Фазовые диаграммы систем с бензойной кислотой. На рисунках 1 и 2 приведены Т-х-диаграммы бинарных систем бензойная кислота – бензофенон (рис. 1) и бензойная кислота – бензил (рис. 2). Диаграммы – эвтектического типа. Координаты точки эвтектики: в системе бензойной кислоты с бензофеноном: $T_e = 310,3$ К, $x_e = 18$ мол. %, в системе бензойной кислоты с бензилом: $T_e = 348,5$ К, $x_e = 35$ мол. %.

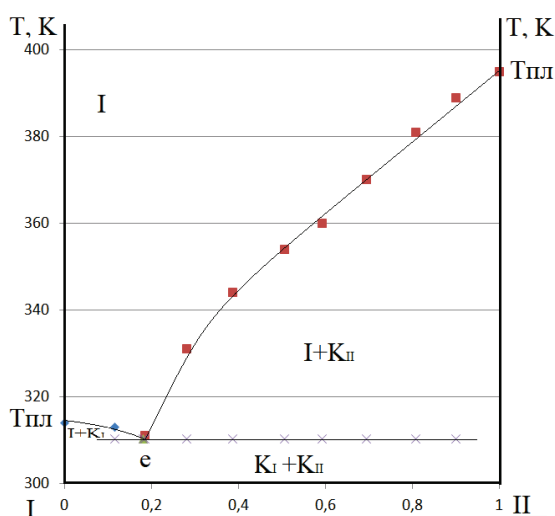


Рисунок 1. Фазовая диаграмма системы бензофенон (I) – бензойная кислота (II)

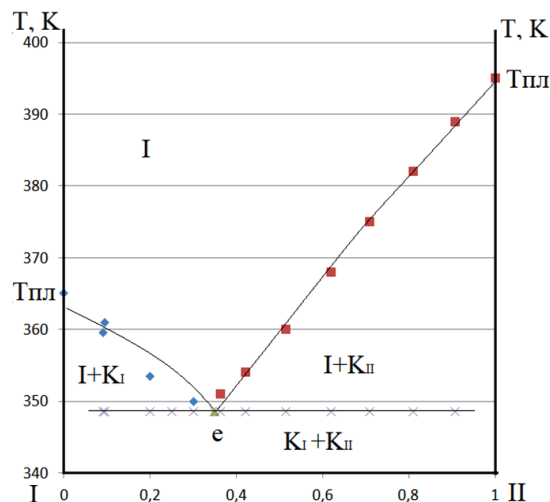


Рисунок 2. Фазовая диаграмма бензил (I) – бензойная кислота (II)

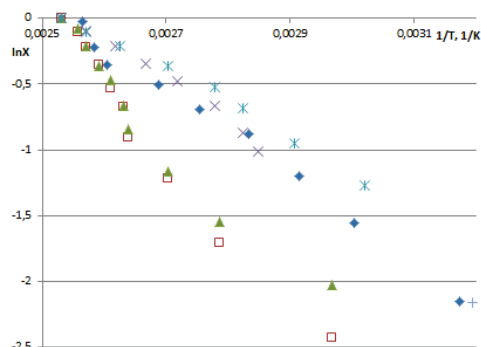


Рисунок 3. Политермы растворимости бензойной кислоты: хлорбензол – $\blacklozenge$, декан – $\blacktriangle$, додекан – $\blacksquare$, бензил – $\times$, бензофенон – $\ast$

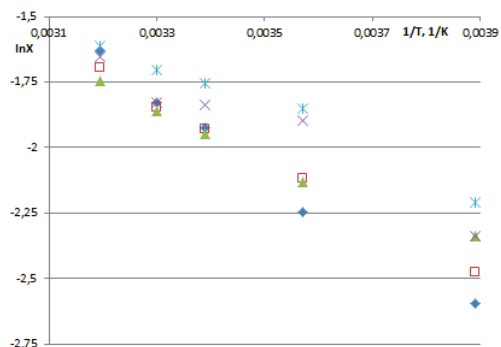


Рисунок 4. Политермы растворимости бензойной кислоты в сложных эфирах: метилацетат – $\blacklozenge$, этилацетат – $\blacksquare$, пропилацетат – $\blacktriangle$, бутилацетат – $\times$, пентилацетат – $\ast$

X_1 – мольная доля БК в насыщенном растворе, коэффициенты линейной зависимости a и b , полученные из политерм растворимости (рис. 3, 4), приведены в таблице 2. Из параметра a , согласно модели регулярных растворов, можно получить величину $\Delta_{пл}H$ по уравнению:

$$\Delta_{пл}H = bR. \quad (3)$$

Для оценки растворимости веществ в растворителе удобно использовать параметры растворимости, которые позволяют количественно оценить сродство жидкостей. Для корреляции растворимости бензойной кислоты в растворителях при 298 К были использованы параметры растворимости Гильдебранда и Хансена.

Параметр растворимости Гильдебранда можно рассчитать по уравнению:

$$\delta = \sqrt{\frac{\Delta H_{v,298} - RT}{V}}$$

где $\Delta_{v}H_{298}$ – энтальпия испарения; V – мольный объем компонента.

Параметр растворимости Хансена [12,16] состоит из 3 составляющих:

$$\delta_{tot} = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2}$$

где δ_d – дисперсионный вклад; δ_p – поляризационный вклад; δ_h – вклад водородных связей.

Значения этих вкладов, а также энтальпии испарения и мольный объем для бензойной кислоты ($\delta_{tot} = 21,9 \text{ МПа}^{1/2}$, $\delta_p = 18,2 \text{ МПа}^{1/2}$, $\delta_d = 6,9 \text{ МПа}^{1/2}$, $\delta_h = 9,8 \text{ МПа}^{1/2}$, $V = 113,1 \text{ см}^3/\text{моль}$) и органических растворителей были взяты из [12].

В таблице 3 приведены литературные и экспериментальные данные по растворимости бензойной кислоты при 298 К и параметры растворимости Хансена для каждого растворителя (см. литературные данные из [10-12,16,17]). Подход с использованием параметра растворимости Хансена был также использован при подборе растворителей для получения со-кристаллов [18-20].

Рассмотрим применимость подхода с использованием параметров растворимости Гильдебранда.

Применение параметра Гильдебранда дает хорошие результаты для систем без сильных межмолекулярных взаимодействий (например, таких, как водородные связи). Для систем с сильными межмолекулярными взаимодействиями лучше использовать параметры растворимости Хансена. На рисунке 5 показана зависимость растворимости бензойной кислоты (табл. 3) при 298 К ($\ln X_1$) от параметра растворимости (δ_2 , $\text{МПа}^{1/2}$). Приведены

Таблица 2. Параметры политерм бензойной кислоты

№	Растворитель	a	b	R ²	$\Delta_{пл}H$, кДж/моль	$\ln X_{298}$
1	Метилацетат	2,7748	1389,7	0,989	11,55	-1,88
2	Этилацетат	1,8099	1102,6	0,997	9,17	-1,88
3	Пропилацетат	0,958	854,22	0,987	7,10	-1,91
4	Бутилацетат	1,2178	902,02	0,930	7,49	-1,81
5	Пентилацетат	1,0719	835,96	0,975	6,95	-1,73
6	Декан	12,332	4916,9	0,942	40,88	-4,16
7	Додекан	14,623	5808,1	0,971	48,29	-4,86
8	Хлорбензол	8,2765	3268,4	0,990	27,17	-2,69
9	1,4-диоксан	0,0164	406,0	0,772	3,38	-1,34
10	Бензофенон	6,428	2529,2	0,994	21,03	-2,05
11	Бензил	7,8443	3082,9	0,984	25,63	-2,46

$\ln X_1$ – мольная доля БК в растворе при 298 К

Таблица 3. Значения параметров растворимости растворителя δ_{tot} , МПа^{1/2} и растворимости бензойной кислоты в растворителе $\ln X$

Растворитель	δ_{tot}	$\ln X$	Растворитель	δ_{tot}	$\ln X$
гексан	14,90	-4,66	2-пропанол	23,58	-1,64
гептан	15,30	-4,45	глицерин	36,16	-4,11
октан	15,50	-4,35	1-бутанол	17,90	-1,60
декан	15,70	-4,16	2-метил-1-пропанол	22,66	-1,88
додекан	16,00	-4,86	1-пентанол	21,59	-1,69
циклогексан	16,80	-4,59	1,4-диоксан	20,50	-1,34
бензол	18,51	-2,68	диэтиловый эфир	15,60	-1,69
толуол	18,20	-2,61	ацетон	19,90	-1,68
метанол	29,61	-1,81	этилацетат	18,20	-1,88
этанол	26,50	-1,72	пропилацетат	17,60	-1,91
этиленгликоль	32,95	-2,43	бутилацетат	17,40	-1,81
глицерин	36,16	-4,11	пентилацетат	17,30	-1,73
2-пропанол	23,58	-1,64	ацетон	19,90	-1,68
1-бутанол	17,90	-1,60	ацетофенон	21,72	-1,67
2-метил-1-пропанол	22,66	-1,88	формамид	36,65	-1,88
1-пентанол	21,59	-1,69	ДМФА	24,90	-0,71
1-октанол	21,01	-1,62	ацетонитрил	24,40	-2,92
бензиловый спирт	23,79	-1,94	ДМСО	26,70	-0,67
уксусная кислота	21,40	-1,79	хлороформ	18,90	-2,05
пропионовая кислота	19,95	-1,67	этилендихлорид	20,80	-2,67
этиленгликоль	32,95	-2,43	хлорбензол	19,60	-2,69

полученные в данной работе экспериментальные (красные точки) и литературные (синие точки) данные. Такой подход дает наглядную оценку растворимости бензойной кислоты в условиях недостатка данных.

В модели с использованием параметра растворимости Хансена используется приведенный радиус (рис. 6), который рассчитывается по уравнению:

$$R_a^2 = 4 \cdot (\delta_{d(1)} - \delta_{d(2)})^2 + (\delta_{p(1)} - \delta_{p(2)})^2 + (\delta_{h(1)} - \delta_{h(2)})^2$$

На графике зависимости молярной доли бензойной кислоты от приведенного радиуса (рис. 6) видно, что с увеличением R_a уменьшается растворимость и с уменьшением R_a увеличивается растворимость БК, как и должно быть для большинства веществ [16].

На графиках зависимости растворимости от параметра растворимости Гильдебранда растворителей (рис. 5) видно, что, чем разница между параметрами Гильдебранда бензойной кислоты и растворителей меньше, тем больше молярная доля бензойной кислоты в насыщенном растворе. Так же видно, что бензойная кислота лучше всего растворяется в ДМФА, ДМСО, диоксане и диэтиловом эфире. Так как параметры растворимости позволяют разделить вещества с высокой и низкой растворимостью, то появляется удобный метод для быстрого определения растворимости веществ друг в друге. Таким образом, для бензойной кислоты, наилучшими растворителями будут являться растворители с параметрами растворимости, приближающиеся к параметру растворимости бензойной кислоты (22 МПа^{1/2}).

Также, для оценки растворимости веществ, используется модель регулярных растворов в системах с положительным отклонением от идеальности [12,16,17]. В работе была рассчитана растворимость бензойной

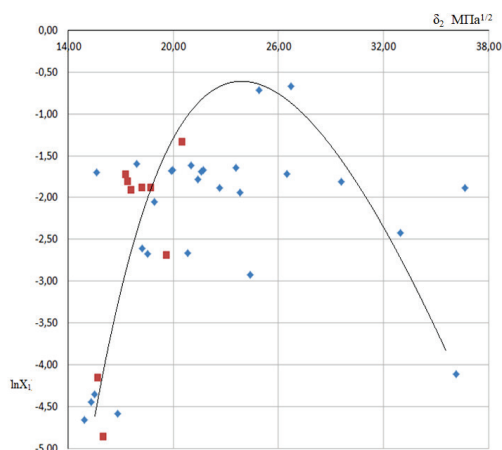


Рисунок 5. Растворимость бензойной кислоты в зависимости от параметра растворимости

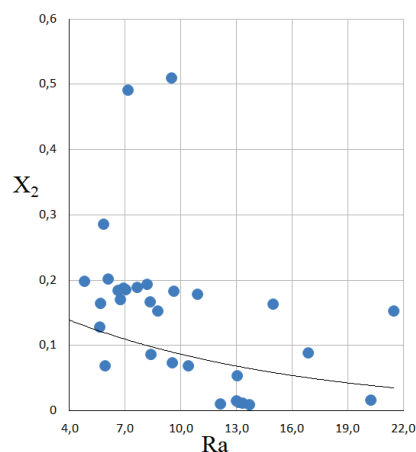


Рисунок 6. Зависимость молярной доли бензойной кислоты от приведенного радиуса R_a

Таблица 4. Растворимость бензойной кислоты в органических растворителях, полученная по расчетным методам при температуре 298 К

Растворитель	$\ln X_2$ экспериментальная	$\ln X_2$ метод Скотчарда- Гильдебранда	$\ln X_2$ по схеме Смола	$\ln X_2$ по схеме Аскадского
Метилацетат	-1,88	-2,03	-2,81	-2,43
Этилацетат	-1,88	-2,01	-2,80	-2,44
Пропилацетат	-1,91	-1,96	-2,89	-2,40
Бутилацетат	-1,81	-2,04	-2,89	-2,43
Пентилацетат	-1,73	-2,50	-2,88	-2,46
Декан	-4,16	-2,03	-2,8	-2,48
Додекан	-4,86	-2,01	-2,8	-2,51
Хлорбензол	-2,69	-1,96	-2,74	-2,68
1,4-диоксан	-1,34		-2,93	-2,75
Бензофенон	-2,05	-2,10	-2,72	-3,12
Бензил	-2,46	-2,50	-2,63	-2,53

кислоты (табл. 4) по следующему уравнению:

$$\ln X_{calc} = \ln X_{id} + \ln Y$$

где $\ln X_{id} = -1,45$ – идеальная растворимость, полученная из уравнения Шредера; $\ln Y$ – расчетные коэффициенты активности, полученные по уравнению Скотчарда-Гильдебранда [16]:

$$\ln Y = \frac{(\delta_1 - \delta_2)^2}{RT \left(\frac{1}{V_1 x_1} + \frac{1}{V_2 x_2} \right)},$$

где V – мольный объем; x – мольная доля. Это уравнение включает в себя параметр растворимости, который может быть рассчитан не только по методу Гильдебранда и Хансена. Существуют и другие методы расчета параметра растворимости, в том числе схемы Смолла [21] и Аскадского [22].

Экспериментальная растворимость бензойной кислоты в органических растворителях достаточно хорошо описывается расчетными методами на основе модели регулярных растворов. В основном, наиболее близкими к экспериментальным были значения растворимости бензойной кислоты, полученные по методу Скотчарда-Гильдебранда (табл. 4). Однако растворимость бензойной кислоты в хлорбензоле лучше описывалась при расчете по схеме Аскадского. В случае растворов бензойной кислоты в алканах растворимость, полученная в эксперименте, значительно отличалась от расчетной растворимости для всех способов расчета. Из таблицы видно, что метод Скотчарда-Гильдебранда, с использованием схем расчета Смолла и Аскадского подходит для систем с хорошей растворимостью, значения которой не сильно отклоняются от идеальной растворимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследована растворимость бензойной кислоты. Построены фазовые диаграммы систем бензойная кислота – бензофенон и бензойная кислота – бензил. Определены координаты точек эвтектики в бинарных системах бензойная кислота – бензофенон и бензойная кислота – бензил. Получены полимеры растворимости бензойной кислоты в н-декане, н-додекане, хлорбензоле, 1,4-диоксане, метилацетате, этилацетате, н-пропилацетате, н-бутилацетате и н-пентилацетате.

Рекомендованы модели регулярных растворов с параметром растворимости Хансена для экспресс-метода расчета растворимости бензойной кислоты в органических растворителях.

Список литературы / References:

1. Craig D.Q.M., Reading M. Thermal analysis of pharmaceuticals. Boca Raton: CRC Press, 2007, 400 p.
2. Bernstein J. *Polymorphism of molecular crystals*. M.: Nauka, 2007, 500 p. (In Russ.)
3. Brittain H.G. Polymorphism in pharmaceutical solids. New York: Informa Healthcare, 2009, 640 p.
4. Hilfiker R., von Raumer M. *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2019, 496 p.
5. Byrn S.R., Zografi G., Chen X. Solid-state properties of pharmaceutical materials. Hoboken: Wiley, 2017, 406 p.
6. Augustijns P. Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceuticals. New York: Springer, 2007.
7. Balakrishnan I., Venkatachalam S., Datta D., Jawahar N. A brief review on eutectic mixture and its role in pharmaceutical field. *Int. J. of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2020, vol. 11, no. 3, pp. 3017-3023, doi: 10.26452/ijrps.v11i3.2398.
8. Sunita Budhwar V., Choudhary M. Pharmaceutical eutectics: A promising drug delivery system. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2020, vol. 13, no.11, pp. 5515-5523, doi: 10.5958/0974-360X.2020.00963.4.
9. Lei Z., Chen B., Li C., Liu H. Predictive Molecular Thermodynamic Models for Liquid Solvents, Solid Salts, Polymers, and Ionic Liquids. *Chemical Reviews*, 2008, vol. 108, no. 4, pp. 1419-1455, doi: 10.1021/cr068441+.

10. Jouyban A. *Handbook of solubility data for pharmaceuticals*. Boca Raton: CRC Press, 2010, 306 p.
11. Acree W.E. Solubility of Benzoic Acid and Substituted Benzoic Acids in Both Neat Organic Solvents and Organic Solvent Mixtures. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2013, vol. 42, no. 3, 526 p., doi: 10.1063/1.4816161.
12. Hansen C.M. *Hansen solubility parameters: a user's handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2007., 519 p.
13. Acree J.W., Chickos J.S. Phase Transition Enthalpy Measurements of Organic and Organometallic Compounds. Sublimation, Vaporization and Fusion Enthalpies From 1880 to 2015. Part 1. C1-C10. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2016, vol. 45, p. 033101-1-565, doi: 10.1063/1.4948363.
14. Acree J.W., Chickos J.S. Phase Transition Enthalpy Measurements of Organic and Organometallic Compounds and Ionic Liquids. Sublimation, Vaporization, and Fusion Enthalpies from 1880 to 2015. Part 2. C11-C192. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 2017, vol. 46, p. 013104-1-532, doi: 10.1063/1.4970519.
15. Molochko V.A., Pestov S.M. *Phase equilibria and thermodynamics of systems with liquid crystals*. M.: IPC MIFCT, 2003, 242 p. (In Russ.)
16. Walas S.M. *Phase equilibria in chemical engineering: in two chapters*. M.: MIR, 1989, 304 p. (In Russ.)
17. Stefanis E., Panayiotou C. Prediction of Hansen solubility parameters with a new group-contribution method. *Int. J. Thermophys.*, 2008, vol. 29, pp. 568-585, doi: 10.1007/S10765-008-0415-Z.
18. Mohammad M.A., Alhalaweh A., Velaga S.P. Hansen solubility parameter as a tool to predict cocrystal formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, vol. 407, pp. 63-71, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.01.030.
19. Salem A., Nagy S., Pal S., Szechenyi A. Reliability of the Hansen solubility parameters as co-crystal formation prediction tool. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, vol. 558, pp. 319-327, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.007.
20. Gaikwad E.R., Khabade S.S., Sutar T.B., Bhat M.R., Payghan S.A. Three-dimensional Hansen solubility parameters as predictors of miscibility in cocrystal formation. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2017, vol. 11, no. 4, pp. 302-318, doi: 10.22377/AJP.V11I04.1627.
21. Van Krevelen D.W. *Properties of polymers correlation with chemical structures*. M.: Chemistry, 1976, 414 p. (In Russ.)
22. Askadsky A.A., Matveev J.I. *Chemical structures and physical properties of polymers*. M.: Chemistry, 1983, 248 p. (In Russ.)

THERMODYNAMIC MODELING OF SYSTEMS WITH BENZOIC ACID AS MODEL SYSTEMS FOR PHARMACEUTICALS

Pastukhov A.A.

Institute of Organic Chemistry RAS

Leninsky prospect, 47, Moscow, 119334, Russia; e-mail: pastukhov.2013@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0565

Abstract. In this article, experimental investigation and thermodynamic modelling of benzoic acid (BA) solubility in organic solvents was made. Phase diagrams of binary systems of benzoic acid – benzophenone and benzoic acid – benzil were investigated by the thermal analysis methods. Phase diagrams are studied and eutectic coordinates in these systems were determined. Eutectic point temperature (310.3 K) and composition of benzoic acid (18 mol. %) for benzoic acid – benzophenone system and eutectic point temperature (348.5 K) and mole fraction of benzoic acid (35 mol. %) for benzoic acid – benzil system were found. In the form of a linear relationship solubility curves of benzoic acid $\ln X = a - b/T$, X – mole fraction BA, T – temperature in K in methyl acetate ($a = 2.7748$, $b = 1389.7$), ethyl acetate ($a = 1.8099$, $b = 1102.6$), n-propyl acetate ($a = 0.9580$, $b = 854.2$), n-butyl acetate ($a = 1.2178$, $b = 902.0$), n-pentyl acetate ($a = 1.0719$, $b = 836.0$), 1,4-dioxane ($a = 0.0164$, $b = 406.0$), chlorobenzene ($a = 8.2765$, $b = 3268.4$), n-decane ($a = 12.332$, $b = 4916.9$), n-dodecane ($a = 14.623$, $b = 5808.1$) were introduced. The solubility of benzoic acid in solvents at 298 K were calculated using the Hildebrand and Hansen solubility parameters. Comparison of the experimental and literature data was held. Dependence of benzoic acid solubility on difference of the solubility parameters and the reduced radius was established. Models for the thermodynamic description of the solubility of substances in organic solvents are considered using benzoic acid as an example. Regular solution models with Hansen solubility parameters for express calculate solubility method of benzoic acid in organic solvents were recommended.

Key words: *benzoic acid, phase diagrams, solubility, solubility parameters.*

СПЕКТРОМЕТРИЯ РАСТВОРА АЛЬБУМИНА В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННОЙ ВОДЕ

Погорелов А.Г.¹, Ипатова Л.Г.¹, Гулин А.А.², Кузнецов А.Л.¹, Станкевич А.А.¹,
Погорелова В.Н.¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ

² ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0566

Аннотация. Электрохимическая активация воды (ЭХАВ) – актуальный метод безреагентного регулирования физико-химических параметров водных пищевых сред. Свойства растворов макронутриентов на основе ЭХА воды могут отличаться от аналогичных растворов на необработанной воде. В работе исследованы закономерности взаимодействия анодной и катодной фракций ЭХАВ с молекулами белка. Состояние ЭХА воды и растворов характеризуется аномальными физико-химическими параметрами (рН, окислительно-восстановительным потенциалом ОВП), что обуславливает их биологическую активность. Растворы как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений на основе ЭХА воды могут отличаться по некоторым характеристикам от аналогичных растворов, приготовленных на воде, не подвергнутой электрохимической активации. Используя спектральные подходы (UV спектрометрию, ToF – SIMS), показано, что исследуемый образец монопродукта белковой природы (бычий сывороточный альбумин) и композиция пищевых протеинов (желатин, казеин) подвержены модификации в растворе фракций ЭХАВ. Совокупность полученных данных позволяет предположить то, что наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены изменением структуры белка и/или его фрагментацией. Выявленные эффекты влияния анодной и катодной фракций ЭХАВ на свойства сывороточного альбумина подтверждают перспективность направленного использования технологии ЭХА в пищевых производствах с целью смягчения условий технологических процессов. Другими словами, электрохимическая активация является эффективной технологией получения кислотных и щелочных (анолит и католит) экстрагирующих растворов, заменяющих соляную кислоту и гидроксид натрия в производстве пищевых продуктов.

Ключевые слова: Электрохимически активированная вода, бычий сывороточный альбумин, вязкость, молекулярная масс-спектрометрия (TOF-SIMS).

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение более экономичных и экологически безопасных приемов обработки пищевого сырья требует разработки новых технологических решений, что не отменяет необходимости поддержания высокого качества производимой продукции [1-3]. Научное сопровождение призвано обеспечить понимание взаимосвязи инновационного подхода и свойств веществ в цепочке производственного процесса, включая подготовку исходного сырья и промежуточных полуфабрикатов, а также получение конечного пищевого продукта и утилизацию отходов производства [4-6]. На изменение структуры и свойств пищевых ингредиентов влияют как физические условия (температура, давление, скорость перемешивания и др.), так и химические взаимодействия с другими нутриентами, в том числе с водой [7-9]. Направленное воздействие на водную основу может играть важную роль в формировании характеристик полуфабриката и готового продукта [10,11]. В связи с этим в настоящей работе рассматривали технологию электрохимической активации (ЭХА) как актуальный метод безреагентного регулирования физико-химических и реологических свойств пищевой системы.

Принцип технологии ЭХА заключается в униполярном (в зоне одного из электродов) электрохимическом воздействии на воду или водные растворы электролитов (электролизе) в анодной или катодной камере диафрагменного или мембранного электрохимического реактора [12,13]. Феномен ЭХА представляет собой совокупность электрохимических и электрических процессов, протекающих в воде в двойном электрическом слое (ДЭС) электродов с неравновесным переносом электрического заряда через ДЭС электронами при интенсивном диспергировании в воде газообразных продуктов электрохимических реакций. В результате обработки воды постоянным электрическим током при электрических потенциалах, превышающих потенциал разложения воды (+1,25 В), вода переходит в метастабильное состояние, которое характеризуется аномальными уровнями активности электронов, окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП) и другими физико-химическими параметрами. По завершении воздействия вода сохраняет достигнутое метастабильное состояние длительное время, противодействуя переходу в состояние термодинамического равновесия с окружающей средой [12].

Метастабильные соединения с высокой окислительной (в анолите) или восстановительной (в католите) способностью при хранении растворов постепенно переходят в стабильные в результате серии самопроизвольных структурно-энергетических и химических превращений. В этот период повышается их

реакционная способность по отношению к химическим веществам и биологическим объектам. Метастабильные соединения значительно усиливают проявление кислотных и окислительных свойств анолита [14,15], щелочных и восстановительных свойств католита [16,17]. Электрохимическое неравновесное воздействие приводит к многократному изменению реакционной способности ионов в растворах без изменения их концентрации. Например, в процессе электрохимического воздействия на воду в модульных элементах значения pH полученных католита и анолита соответствуют равновесным концентрациям щелочи и кислоты, многократно превышающим содержание в воде солей, из которых данные щелочи и кислоты теоретически могли быть получены. Значения же ОВП выходят за рамки химических возможностей регулирования при данной электропроводимости [12].

Во многом химическая активность ЭХА воды и растворов обусловлена присутствием электрически активных микропузырьков электролизных газов (размером 0,2 до 5 мкм, концентрация может достигать $10^6 - 10^7$ мл⁻¹), стабилизированных нескомпенсированными электрическими зарядами, сосредоточенными на границе раздела фаз “газ-жидкость” [12,14,18].

Состояние ЭХА воды и растворов характеризуется аномальными физико-химическими параметрами (pH, окислительно-восстановительным потенциалом ОВП), что обуславливает их биологическую активность [13,18,19]. Растворы как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений на основе ЭХА воды могут отличаться по некоторым характеристикам от аналогичных растворов, приготовленных на воде, не подвергнутой электрохимической активации [12,16].

ЭХА вода и растворы по-разному функционируют в технологических процессах. Так, в исследовании [20] показано влияние электролизованной воды и сверхчистой воды на экстракцию абрикосового белка. При том же pH = 9,5, эффективность экстракции белка абрикоса электролизованной водой (ЕАР) превосходила эффективность экстракции белка сверхчистой водой (UAP). Пенообразующая способность и стабильность эмульсии ЕАР составляли 11,17% и 36,33 мин, для UAP только 4,75% и 23,88 мин соответственно. По сравнению с UAP, вторичная структура ЕАР была более упорядоченной. Упорядоченные структуры α -спирали и β -листа составляли 7,5 и 60,2%, в то время как неупорядоченные структуры поворотов и случайных витков составляли 8,4 и 23,8% соответственно. Описанный способ экстракции позволяет повысить выход продукта, оценить и минимизировать структурную деградацию и функциональные свойства абрикосового белка [20].

Технология электроактивации (ЕА) была использована для извлечения белка из жмыха канолы [21]. В катодной камере электролизера под воздействием электрического поля из раствора хлорида натрия NaCl генерировался щелочной раствор с улучшенными экстрактивными свойствами по сравнению с растворами, подвергнутыми химической алкализации. Анализ экстрактивности, состава и вторичной структуры экстрагированных белков подтвердил эффективность данного способа. ЕА проводили при концентрации NaCl 0,01-1 М, продолжительности 10-60 мин, и силе тока 0,2А, 0,3А в трехкамерной ячейке, разделенной ионообменными мембранами.

Полученные растворы использовали для экстракции. Максимальная экстрактивность белка, равная $34,32 \pm 1,21\%$, наблюдалась при использовании ЕА раствора, сгенерированного при 0,3А независимо от времени активации. Обычная экстракция в тех же условиях (pH 7-10) дала $31,18 \pm 1,89\%$ белков. Электрофоретические профили электроактивированных белковых концентратов и изолятов, проанализированных на SDS-PAGE, были четко различимы по сравнению с теми, которые были получены традиционным методом. FTIR-исследование показало значительные различия во вторичных структурах белков в зависимости от pH раствора и концентрации соли. Различие между обычными и ЕА образцами свидетельствует о более низком уровне спектра денатурации для последних [21].

Влияние электрического поля на свойства водных растворов белков объясняется их электропроводностью, обусловленной химической структурой полиэлектролитов со свойствами полиамфолитов. Наличие ионогенных боковых групп в аминокислотных звеньях, чередование кислотных и основных групп обеспечивает макромолекулам характерные электрические, конфигурационные и гидродинамические свойства [22]. В зависимости от концентрации полиэлектролита в растворе, температуры, давления, присутствия низкомолекулярных веществ или величины pH меняется конформация молекул, объем молекулы в растворе, и как следствие, реологические свойства [23-27].

Примером реализации такой взаимосвязи могут служить белки сыворотки крови животных. Сывороточные белки широко используются во многих продуктах благодаря своим полезным питательным свойствам. Апробированным объектом белковой природы считается глобулярная молекула бычьего сывороточного альбумина (BSA), состоящая из нескольких сотен аминокислотных остатков. Трехмерная структура альбумина лабильна, обладает подвижностью и подвержена конформационным изменениям под действием экзогенных факторов [23,26,28]. Для раствора BSA характерно присутствие фрагментов белка разной размерности, где мономеры и агрегаты находятся в состоянии динамического равновесия, а вес полипептидов увеличивается с ростом концентрации альбумина в растворе [26].

На процесс растворения кристаллического альбумина оказывает влияние продолжительность контакта фаз, приводящая к изменению его конформации, образованию или разрушению межмолекулярных связей. Интенсивность постепенного структурирования растворов альбуминов и усиления его поверхностных свойств зависит от pH раствора и значения pH изoeлектрической точки (ИЭТ). Значительное увеличение мутности растворов и уменьшение их вязкости вблизи ИЭТ обусловлено минимальной энергией электростатического отталкивания между боковыми цепями молекул альбумина и самими молекулами. Образующиеся при этом более плотные и компактные агрегаты большего размера меньше влияют на течение жидкости и значительно

увеличивают светорассеяние. Вследствие процессов структурирования растворов в зависимости от концентрации белка нелинейно изменяются их мутность и вязкость [24,27].

Поверхностная активность альбумина существенно повышается с увеличением концентрации протонов. Предположительно, в кислой среде больше неполярных группировок выходит на поверхность молекулы, чем в нейтральной или слабощелочной среде. Очевидно, при физиологических значениях pH поверхностная активность молекул альбумина минимальна [27].

Процесс денатурации и агрегации изолятов сывороточного белка зависит от pH среды - эффект, который получил широкое применение в пищевых технологиях. Показано, что с уменьшением кислотности до pH=1 происходит денатурация BSA, сопровождающаяся конформационным переходом, во время которого происходит потеря третичной структуры и разворачивание полипептидной цепи молекул BSA, приводящие к увеличению размеров агрегатов [26]. В сильнощелочной среде (2N раствор NaOH с pH 12,4 $\pm$ 0,4 или щелочная электролизованная вода с pH 11,5 $\pm$ 0,4) наблюдается более выраженный текстурный эффект, чем в условиях кислой среды (2N HCl с pH 2,0 $\pm$ 0,2 или кислая электролизная вода с pH 2,5 $\pm$ 0,2) [29].

В растворе альбумин, как полиэлектролит с высокой конформационной подвижностью, должен реагировать не только на изменение кислотности раствора, но и его окислительно-восстановительного потенциал, что характерно для описанной выше технологии электрохимической активации. Протеиновая составляющая биологической матрицы (в том числе пищевого сырья или продукции) наряду с жирами и углеводами относится к макронутриентам и подвергается разнообразным изменениям и превращениям в технологических процессах. Поэтому выявление закономерностей взаимодействия ЭХАВ с молекулами пищевых веществ, в частности белков, является актуальным и интересным с точки зрения перспектив безреагентного управления свойствами и поведением биологического сырья в технологической цепочке производства пищевых продуктов. Ряд проблем, связанных с потерями пищевых веществ в результате переработки пищевого сырья, может быть решен при использовании электрохимической активации. Ресурсосбережение и щадящие условия технологических процессов могут стать положительным итогом применения указанной технологии в пищевом производстве. Цель данной работы состояла в изучении методами вискозиметрии, UV-спектрометрии и времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) свойств сывороточного альбумина в образцах воды, подвергнутой электрохимической активации в анодной или катодной камере электрохимического реактора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образца. Объектом исследования служил бычий сывороточный альбумин BSA100 (Merck, Sigma-Aldrich). В качестве дополнительных объектов исследований применяли препараты, содержащие белки казеин и желатин пищевой быстрорастворимый (Dr. Oetker, ООО Оеткер, Россия, ТУ 20.59.60-011-42450906-2018). Для UV спектрометрии, времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) и электрофореза готовили маточный водный 1% раствор белка, который затем разводили в соотношении 1:4 водой или ЭХАВ. Фракции ЭХАВ, католит (pH 8,2, ОБП -800 мВ) и анолит (pH 2,2, ОБП +800 мВ) получали на установке для очистки пресной питьевой воды, посредством прямого электрохимического воздействия на очищаемую воду в диафрагменных модульных электрохимических элементах (ООО «Делфин Аква», Россия). В качестве контроля применяли артезианскую воду (pH 7,2, ОБП +360 мВ) из городского водопровода. В эксперименте по исследованию вязкости раствора, ЭХАВ с отрицательным значением ОБП получали на установке «Изумруд-К1» (ОАО НПО «Экран»), последовательно пропуская водопроводную воду через ряд стадий:

- анодную камеру проточного электрохимического модуля ПЭМ-3, где происходит обеззараживание воды за счет образования пероксидных и хлоркислородных соединений, насыщение воды кислородом, озоном, что обеспечивает уничтожение микроорганизмов, окисление органических примесей;
- реакционно-флотационный реактор с целью удаления скоагулировавших продуктов анодной обработки на полученных электролитически микропузырьках кислорода и озона;
- гетерофазный каталитический реактор, где происходит удаление соединений активного хлора с одновременным образованием соединений активного кислорода;
- катодную камеру модуля, где остаточные количества ионов железа, меди, магния и др. переводятся в нерастворимые гидроксиды, которые затем удаляются во флотационном и электрокинетическом реакторах. В процессе катодной обработки в воду поступает молекулярный водород и свободные гидроксильные группы, придавая воде отрицательный ОБП и антиоксидантные свойства.

Показатели ЭХАВ соответствовали значениям pH 7,3 и ОБП -223 мВ, а для исходной воды эти значения были 7,3 и +190 мВ, соответственно. Величину кислотности (pH) и окислительно-восстановительный потенциал раствора измеряли с помощью многопараметрического прибора SevenExcellence S470 (METTLER TOLEDO, Швейцария), оснащенного pH-электродом (Inlav Routine Pro, Mettler Toledo, Швейцария), электродом ОБП (Inlav Redox Pro, Mettler Toledo, Швейцария). В зависимости от концентрации BSA кислотность раствора принимала значение pH в диапазоне 7,2÷7,6 для ЭХАВ и 7,9÷8,6 для водопроводной воды.

UV-vis спектрометрия. Наличие эффекта действия ЭХАВ оценивали посредством спектрометрии водных растворов белка. Для этого регистрировали оптическую плотность в спектре поглощения образца в области ультрафиолета на длине волны 235 и 280 нм с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2401PC (Япония).

Времяпролетная масс-спектрометрия вторичных ионов (TOF-SIMS). Образцы для масс-спектрометрии получали следующим образом. Капли раствора BSA в воде или фракциях ЭХАВ, объемом 2 мкл каждая, наносили на чистую стеклянную подложку, поверхность которой покрыта токопроводящей пленкой ИТО- indium tin oxide (Sigma-Aldrich). После высушивания в струе инертного газа, например, азота, образец переносили в камеру масс-спектрометра вторичных ионов TOF-SIMS 5 (ION-TOF GmbH, Германия). Препарат ионизировали пучком первичных ионов Bi_3^+ с энергией 30 кэВ, диаметром 200 нм. После воздействия длительностью 70 нс и последующей регистрации вторичных ионов (~80 мкс) пучок перемещался в следующую точку поверхности. Плотность дозы облучения первичными ионами не превышала $\approx 5 \times 10^{12}$ ионов/см². Для оценки различий между полученными масс-спектрами применили метод PCA (principal component analysis) [30,31].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

UV спектрометрия. Эффект действия ЭХАВ на белок оценивали посредством спектрометрии водных растворов в области ультрафиолета. Такой спектр поглощения раствора, содержащего различные виды биомолекул, не является специфичным, но позволяет проводить сравнительный анализ интегральных изменений в образце. Для сравнения в эксперименте изучали препараты BSA, пищевого желатина и казеина (рис. 1).

Видно (рис. 1), что комплекты полученных спектров поглощения по виду идентичны для всех исследуемых белков. Для растворов фракций ЭХАВ, по сравнению с раствором в воде, характерно уменьшение оптической плотности и появление пика поглощения в области 235 нм и 280 нм. Если сравнивать между собой эффект фракций ЭХАВ, то для всех исследуемых образцов следует отметить незначительное превышение уровня поглощения раствора белка в католите. Описанные изменения наиболее выражено наблюдаются в растворе биохимически чистого альбумина (рис. 1а), по сравнению с образцами пищевого желатина и казеина (рис. 1б, рис. 1в). Таким образом, результаты UV спектрометрии демонстрируют модификацию белка в растворе фракций ЭХАВ. Дополнительные данные о состоянии альбумина в растворе дает молекулярная масс-спектрометрия (ToF-SIMS).

Времяпролетная масс-спектрометрия вторичных ионов (TOF-SIMS). Молекулярный анализ белка проводили с применением времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) на препарате, который получали после высыхания в струе чистого воздуха капли раствора, нанесенной на покровное стекло. Данные TOF-SIMS содержат информацию о составе образца, молекулярной ориентации, порядке поверхности, химическом связывании, чистоте образца. При помощи TOF-SIMS был получен масс-спектр каждого препарата. Для оценки различий между спектрами применяют ряд методов классификации данных. Один из наиболее популярных приемов, используемых в масс-спектрометрии, – метод главных компонент (principal component analysis, PCA), который позволяет очертить 95% доверительный интервал на основе анализа наиболее интенсивных пиков масс-спектров [30,31].

Кратко, программа получает 20 главных компонент, чем выше номер компоненты, тем большую вариацию данных она отражает. На практике не требуется такое число координат поэтому, обычно для анализа схожести образцов использовали пространство первых двух компонент. Описанная выше методика подготовки препаратов белковых растворов для ToF-SIMS и их сравнительный анализ (PCA) были применены ко всем образцам биологических макромолекул, исследуемых в данной работе. Результаты молекулярной масс-спектрометрии представлены на рисунке 2.

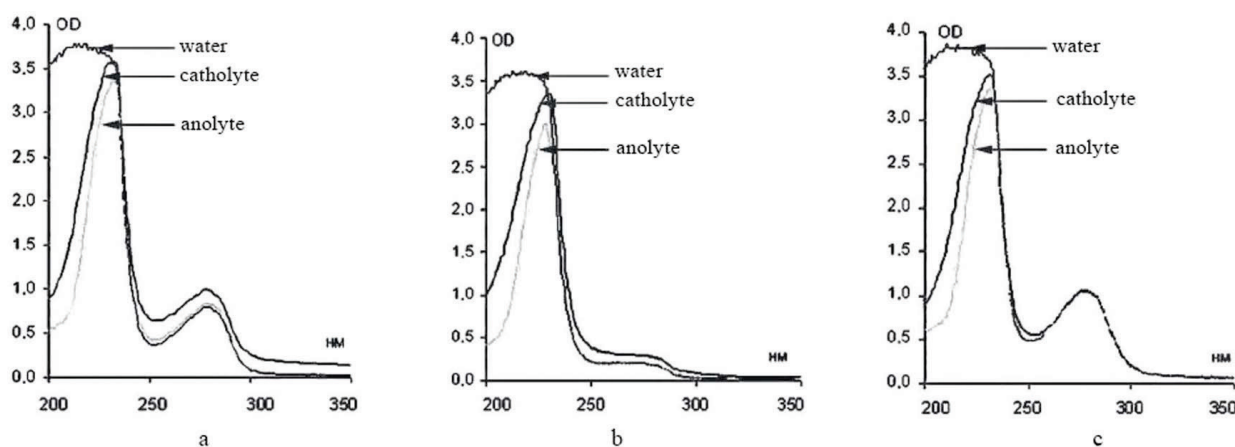


Рисунок 1. Неспецифические UV спектры поглощения 0,20% растворов белка в воде или водных фракциях ЭХАВ (католит, анолит): (а) растворы альбумина, (б) растворы желатина, (с) растворы казеина

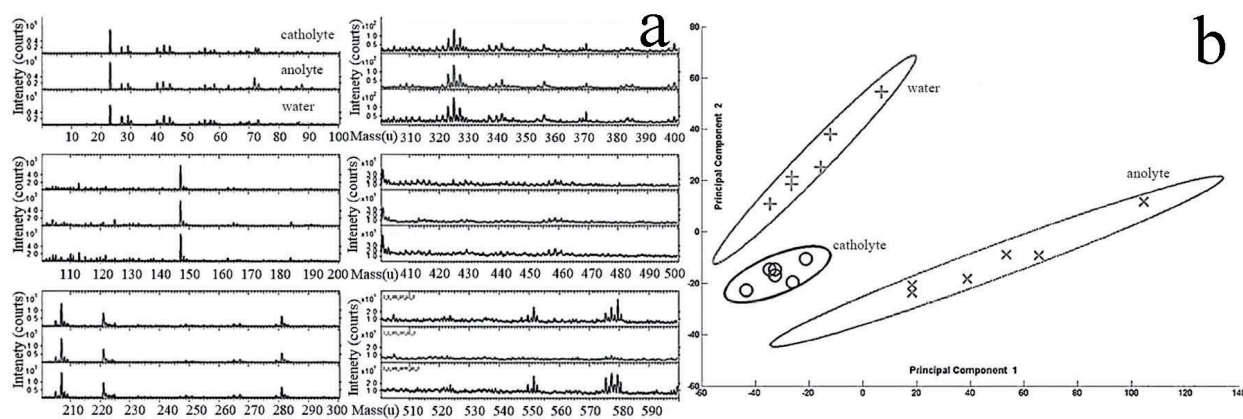


Рисунок 2. Результаты ToF-SIMS анализа образцов BSA, приготовленных из раствора белка в воде (контроль) или фракциях ЭХАВ (анолит, католит): (а) интервалы молекулярных масс, где везде нижний масс-спектр соответствует контролю (water), средний - после обработки анолитом (anolyte), верхний - после обработки католитом (catholyte); (б) эллипсами обозначены 95% доверительные интервалы для групп из 6 измерений в каждой. Сравнение различий между масс-спектрами образцов проведено методом PCA

Характерный масс-спектр BSA, растворенного в воде или фракциях ЭХАВ, приведен на рисунке 2а. Сравнение данных ToF-SIMS анализа (рис. 2b) свидетельствуют о значимом различии между собой всех трех препаратов. Белок, обработанный католитом, показывает значительную гетерогенность, по сравнению с контролем и особенно относительно обработки анолитом. Обработка анолитом оказывает фокусирующее действие на пробы белка, если сравнивать с гетерогенной группой образцов, полученных из раствора альбумина в католите или воде. Отметим, что изменение масс-спектра может быть обусловлено образованием новых пиков и/или изменением интенсивности схожих пиков. Результаты молекулярного анализа BSA статистически достоверно подтвердили данные UV спектрометрии (рис. 1а) о наличии модификации альбумина под действием фракций ЭХАВ. В совокупности, изменение физико-химических свойств белка позволяет прогнозировать изменение реологических свойств (вязкости) раствора.

Завершая обсуждение результатов, следует отметить следующее. Используя спектральные подходы, показано, что исследуемый образец монопродукта белковой природы (альбумин) и композиция пищевых протеинов (желатин, казеин) подвержены модификации в растворе фракций ЭХАВ. Совокупность полученных данных позволяет предположить то, что наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены изменением структуры белка и/или его фрагментацией. Выявленные эффекты влияния анодной и катодной фракций ЭХАВ на свойства сывороточного альбумина подтверждают перспективность направленного использования технологии ЭХА в пищевых производствах с целью смягчения условий технологических процессов. Другими словами, электрохимическая активация является эффективной технологией получения кислотных и щелочных (анолит и католит) экстрагирующих растворов, заменяющих соляную кислоту и гидроксид натрия в производстве пищевых продуктов.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-16-00019).

Список литературы / References:

1. Davis K.F., Downs S., Gephart J.A. Towards Food Supply Chain Resilience to Environmental Shocks. *Nature Food*. Springer Science and Business Media, 2020, vol. 2, pp. 54-65.
2. Li X., Liao Y., Zhu G., Yu G. Analysis of Residents' Food Safety Satisfaction from the Perspective of Income Heterogeneity. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, pp. 85-91.
3. Fung F., Wang H-S., Menon S. Food Safety in the 21st Century. *Biomedical J.*, 2018, vol. 41, pp. 88-95.
4. Prosekov A.Y., Ivanova S.A. Providing Food Security in the Existing Tendencies of Population Growth and Political and Economic Instability in the World. *Food and Raw Materials*, 2016, vol. 4, pp. 201-211.
5. Socas-Rodriguez B., Alvarez-Rivera G., Valdes A., Ibanez E., Cifuentes A. Food By-Products and Food Wastes: are they Safe Enough for Their Valorization? *Trends in Food Science & Technology*, 2021, vol. 114, pp. 133-147.
6. Kasza G., Szabo-Bodi B., Lakner Z., Izso T. Balancing the Desire to Decrease Food Waste with Requirements of Food Safety. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, vol. 84, pp. 74-76.
7. Athayde D.R., Flores D.R.M., da Silva J.S., Genro A.L.G., Silva M.S., Klein, B. Application of Electrolyzed Water for Improving Pork Meat Quality. *Food Research International*, 2017, vol. 100, pp. 757-763.
8. Qian J., Wang C., Zhuang H., Zhang J., Yan W. Oxidative Stress Responses of Pathogen Bacteria in Poultry to Plasma-Activated Lactic Acid Solutions. *Food Control*, 2020, vol. 118, p. 1073555.
9. Timakova R.T., Tikhonov S.L., Tikhonova N.V., Gorlov I.F., Effect of Various Doses of Ionizing Radiation on the Safety of Meat Semi-Finished Products. *Foods and Raw Materials*, 2018, vol. 6, pp. 120-127.
10. Cayemite P.E., Gerliani N., Raymond P., Aider M. Study of the Impacts of Electro-activated Solutions of Calcium Lactate, Calcium Ascorbate and Their Equimolar Mixture Combined with Moderate Heat Treatments on the

- Spores of *Bacillus Cereus* ATCC 14579 under Model Conditions and in Fresh Salmon. *Int. J. Food Microbiology*, 2021, p. 109285.
11. Zwietering M.H., Jacxsens L., Membre J-M., Nauta M., Peterz M. Relevance of Microbial Finished Product Testing in Food Safety Management. *Food Control*, 2016, vol. 60, pp. 31-43.
 12. Bakhir V.M., Pogorelov A.G., Universal electrochemical technology for environmental protection. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, 2018, vol. 7, pp. 41-57.
 13. Shirahata S., Hamasaki T., Teruya K., Advanced Research on the Health Benefit of Reduced Water. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, vol. 23, pp. 124-131.
 14. Suvorov O.A., Kuznetsov A.L., Shank M.A., Volozhaninova S.Yu., Pugachev I.O., Pasko O.V. Electrochemical and Electrostatic Decomposition Technologies as a Means of Improving the Efficiency and Safety of Agricultural and Water Technologies. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, 2018, vol. 7, pp. 43-52.
 15. Yan P., Daliri EB-M., Oh D-H. New Clinical Applications of Electrolyzed Water: A Review. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, p. 9010136.
 16. Ignatov I., Mosin O., Gluhchev G., Karadzhov S., Miloshev G. The Evaluation of the Mathematical Model of Interaction of Electrochemically Activated Water Solutions (Anolyte and Catholyte) with Water. *European Reviews of Chemical Research*, 2015, vol. 4, pp. 72-86.
 17. Gorbacheva M., Tarasov V., Kalmanovich S., Sapozhnikova A. Electrochemical Activation as a Fat Rendering Technology. *Foods and Raw Materials*, 2021, vol. 9, pp. 32-42.
 18. Ito H., Kabayma S., Goto K. Effects of Electrolyzed Hydrogen Water Ingestion During Endurance Exercise in a Heated Environment on Body Fluid Balance and Exercise Performance. *Temperature*, 2020, vol. 7, pp. 290-299.
 19. Henry M., Chambron J. Physico-Chemical, Biological and Therapeutic Characteristics of Electrolyzed Reduced Alkaline Water (ERAW). *Water*, 2013, vol. 5, pp. 2094-2115.
 20. Li Z-H., Zhou B., Li X-T., Li S-G. Effect of Alkaline Electrolyzed Water on Physicochemical and Structural Properties of Apricot Protein Isolate. *Food Sci Biotechnol*, 2019, vol. 28, pp. 15-23.
 21. Gerzhova A., Mondor M., Benali M., Aider M. A Comparative Study Between the Electro-activation Technique and Conventional Extraction Method on the Extractability, Composition and Physicochemical Properties of Canola Protein Concentrates and Isolates. *Food Bioscience*, 2015, vol. 11, pp. 56-71.
 22. Krol Z., Malik M., Marycz K., Jarmoluk A. Characteristic of Gelatine, Carrageenan and Sodium Alginate Hydrosols Treated by Direct Electric Current. *Polymers*, 2016, vol. 8, pp. 275-281.
 23. Safonov V.I., Miniaeva O.A. *Mathematical analysis of functional dependences of the viscosity of biological systems*. In: 67th scientific conference of the Natural Sciences Section, 2015, pp. 455-460.
 24. Zhang Z., Arrighi V., Campbell L., Lonchamp J., Euston S.R. Properties of Partially Denatured Whey Protein Products 2: Solution Flow Properties. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 56, pp. 218-226.
 25. Dharmaraj V.L., Godfrin P.D., Liu Y., Hudson S.D. Rheology of Clustering Protein Solutions. *Biomicrofluidics*, 2016, vol. 10, p. 4955162.
 26. Polianichko A.M., Mikhailov N.V., Romanov N.M., Baranova I.U.G., Chikhirzhina E.V. Intermolecular Interactions of Serum Albumin in Solution. *Cytology*, 2016, vol. 58, pp. 707-713.
 27. Pavlova E.Yu., Dmitrieva I.B., Kergentsev A.A., Drozdov M.A., Egorova A.R., Rudenko A.E. Influence of the concentration of the dispersed phase and the acidity of the medium on the colloidal properties of aqueous solutions of egg albumin and human serum albumin. *Butlerov Readings*, 2018, vol. 53, pp. 43-48.
 28. Bujacz A. Structures of Bovine, Equine and Leporine Serum Albumin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2012, vol. 68, pp. 1278-1289.
 29. Onwulata C.I., Isobe S., Tomasula P.M., Cooke P.H. Properties of Whey Protein Isolates Extruded under Acidic and Alkaline Conditions. *Journal of Dairy Science*, 2006, vol. 89, pp. 71-81.
 30. Graham D.J., Wagner M.S., Castner D.G. Information from complexity: Challenges of TOF-SIMS data interpretation. *Applied Surface Science*, 2006, vol. 252, pp. 6860-6868.
 31. Graham D.J., Castner D.G. Multivariate Analysis of ToF-SIMS Data from Multicomponent Systems: The Why, When, and How. *Biointerphases*, 2012, vol. 7, pp. 49-61.

SPECTROMETRY OF SERUM ALBUMIN SOLUTION IN ELECTROCHEMICALLY ACTIVATED WATER

Pogorelov A.G.¹, Ipatova L.G.¹, Gulin A.A.², Kuznetsov A.L.¹, Stankevich A.A.², Pogorelova V.N.¹¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS
Institutskaya st., 3, Pushchino, Moscow Oblast, 142290, Russia² N.N. Semenov` Institute of Chemical Physics RAS
Kosygina st. 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: agpogorelov@rambler.ru
Received 27.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0566

Abstract. Electrochemical activation of water (ECAW) is a topical method of reagent-free regulation of physicochemical parameters of aquatic food environments. The properties of solutions of macronutrients based in ECAW may differ from similar solutions on untreated water. In this work, the regularities of the interaction of the anodic and cathodic fractions of ECAW with protein molecules have been investigated. ECAW state and solutions are defined by anomalous physical chemical features (pH, redox potential) that provide their biological activity. Solutions both low molecular and high molecular compounds prepared on the basis of ECAW can be distinguished from solutions prepared with non activated water. Applying spectral approaches (UV spectrometry, ToF – SIMS), it was shown that the analyzed mono product of protein nature (bovine serum albumin) and the complex food proteins (gelatin, casein) were modified in ECAW fractions. A number of data obtained allows us to suggest that funded effects may be provided with changes of structure in the protein and/ or its fragmentation. The shown results of the anolyte and catholyte impact on properties of bovine serum albumin confirm the perspective of the direct use of ECAW approach in the food industry for aim to improve the parameters of technological process. In the other words, electrochemical activation is the efficacious way to get acidic and alkalic solutions for replacing NaCl acid and sodium hydroxide in the industry of foodstuffs.

Key words: *electrochemically activated water, bovine serum albumin, viscosity, molecular mass spectrometry (TOF-SIMS).*

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА КАК ИНГИБИТОРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Грачев Д.И.^{1,2}, Медведева В.А.^{1,2}, Шумаев К.Б.^{2,3}, Ланкин В.З.², Рууге Э.К.^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова

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

³ Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН

Ленинский просп., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: di.grachev@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0567

Аннотация. В работе рассматривается влияние динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) на процессы свободнорадикального перекисного окисления липидов, вносящие существенный вклад в развитие многих патологических состояний. В этих процессах происходит повреждение липидов и других макромолекул, и, кроме того, конечные продукты перекисного окисления липидов являются мутагенами и канцерогенами. Поиск новых антиоксидантных соединений, способных подавлять перекисное окисление липидов, имеет достаточно продолжительную историю, однако по-прежнему остается немало вопросов, в том числе касающихся потенциального клинического применения. В рамках данной работы получены данные, которые позволяют расширить и дополнить представление о ДНКЖ как о значимых антиоксидантных агентах. С помощью методов спектроскопии ЭПР и спектрофотометрии показано, что динитрозильные комплексы железа способны ингибировать перекисное окисление липидов в модельных системах с гидропероксидом трет-бутила и цитохромом *c*, а также в экспериментах с липопротеинами низкой плотности при их окислении ионами меди. Предположительно, ДНКЖ могут быть использованы как терапевтическое средство, предотвращающее или снижающее повреждения липидов и накопление токсичных конечных продуктов их перекисного окисления.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, динитрозильные комплексы железа, антиоксиданты, спектроскопия ЭПР.

К настоящему времени известны антиоксидантные свойства различных соединений, однако существует немало неразрешенных вопросов, связанных с механизмами их действия, а также возможным терапевтическим применением. Среди различных мишеней антиоксидантов следует особенно отметить те, которые так или иначе участвуют в перекисном окислении липидов.

С перекисным окислением липидов (ПОЛ) связаны многие физиологические и патологические процессы, среди которых особенно выделяются различные пути клеточной гибели [1]. Также стоит отметить, что токсичность продуктов ПОЛ была показана во многих исследованиях [1,2]. К конечным продуктам ПОЛ следует отнести активные карбонильные соединения, например, такой дикарбонил, как малоновый диальдегид. По этим причинам, поиск соединений, предотвращающих или регулирующих окислительную модификацию липидов, представляется весьма перспективным направлением исследований. Одним из таких соединений могут являться динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). Антиоксидантный эффект ДНКЖ, в том числе с лигандом глутатионом (GS-ДНКЖ), был показан ранее в различных работах [3,4].

В нашей работе с помощью методов спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновой ловушки DEPMPO (5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин-N-оксид) оценивался уровень продукции свободных радикалов. Накопление диеновых конъюгатов (липогидропероксидов – первичных продуктов ПОЛ) оценивали спектрофотометрически по поглощению при $\lambda = 233$ нм. С помощью этого метода было изучено влияние ДНКЖ на перекисное окисление липидов в липопротеинах низкой плотности (ЛНП), которое запускалось добавлением в среду с ЛНП сульфата меди (CuSO_4). Среда инкубации ЛНП: концентрация ЛНП в растворе – 50 мкг/мл, концентрация CuSO_4 – 30 мкМ, буферный раствор – PBS.

Предполагаемые нами антиоксидантные свойства GS-ДНКЖ нашли подтверждение в экспериментах с гемопротеинами (гемоглобином и цитохромом *c*) и гидропероксидом трет-бутила (t-BOOH). В этих экспериментах моделировалось образование органических свободнорадикальных интермедиатов, аналогичное тому, что происходит в ходе перекисного окисления липидов и других биомолекул. На рисунке 1 приведены спектры ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO с этими свободными радикалами. Показано снижение сигналов аддуктов спиновой ловушки DEPMPO со свободнорадикальными интермедиатами (рис. 2).

Антиоксидантное действие ДНКЖ исследовали при окислении ЛНП ионами меди и в присутствии метилглиоксала (MGO), дикарбонильного соединения, существенно стимулирующего перекисное окисление в ЛНП (рис. 3). Ранее такой эффект был показан в статье В.З. Ланкина с соавторами [5]. В этой работе также установлено, что MGO усиливает свободнорадикальное окисление липосом из лецитина. Кроме того, известно, что при взаимодействии MGO с аминокислотами образуется супероксидный радикал [6]. Следует отметить, что MGO является одним из ключевых активных карбонильных соединений, определяющих развитие патологических процессов при диабете.

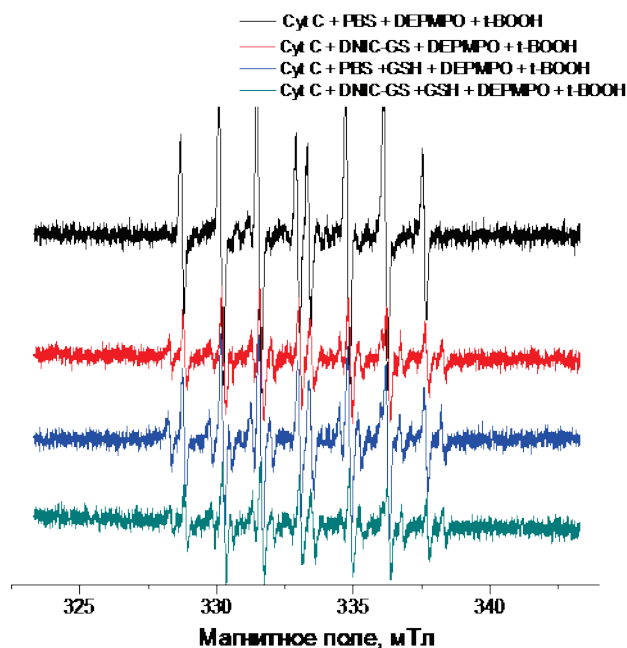


Рисунок 1. Спектры ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO в различных реакционных системах

Антиоксидантное действие GS-ДНКЖ в ходе перекисного окисления липидов ЛНП сравнивалось с действием тиольного соединения – глутатиона, который является лигандом ДНКЖ (рис. 3). Было установлено, что в этой системе GS-ДНКЖ существенно подавляют накопление липогидропероксидов, причём эти комплексы были намного более эффективны, чем свободный глутатион (GSH). Как видно из рисунка 3, глутатион не показал существенного защитного действия в экспериментах с окислением ЛНП. В условиях наших экспериментов этот эффект GSH может быть связан с его участием в редокс-цикле меди, т.е. восстановлением Cu^{2+} до Cu^{+} , что стимулирует цепные реакции перекисного окисления липидов (реакция разветвления цепи ПОЛ).

Эти данные вполне согласуются с тем, что в сравнении с свободным GSH глутатион-содержащие ДНКЖ более эффективно ингибируют индуцированный хлорноватистой кислотой гемолиз эритроцитов [7]. Как было показано нами ранее [8], ДНКЖ с фосфатными лигандами сначала ингибировали окисление ЛНП, но позже их антиоксидантное действие снижалось. Более того, через 70 мин инкубации ЛНП с этим вариантом ДНКЖ наблюдалась инверсия антиоксидантного действия в прооксидантное. Данный эффект может быть обусловлен низкой стабильностью содержащих фосфат динитрозильных комплексов железа. Можно предположить, что ионы железа, высвобождающиеся при распаде ДНКЖ, так же, как и ионы меди могут катализировать процессы ПОЛ. Вероятно, аналогичный эффект может объяснить меньшее антиоксидантное действие 100 мкМ ДНКЖ в присутствии MGO (рис. 3), причём в этом случае именно дикарбонил разрушает комплексы, взаимодействуя с

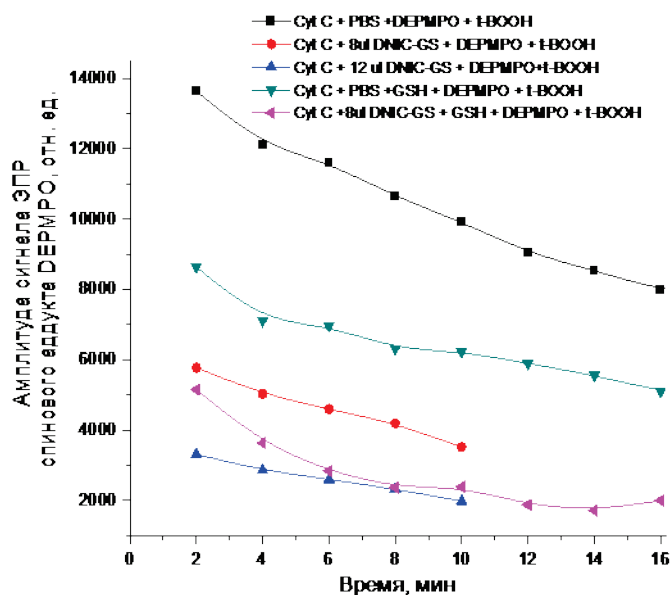


Рисунок 2. Кинетика снижения сигнала спинового аддукта DEPMPO в реакционных системах, содержащих Cyt C и t-BOOH в присутствии GS-ДНКЖ и/или глутатиона

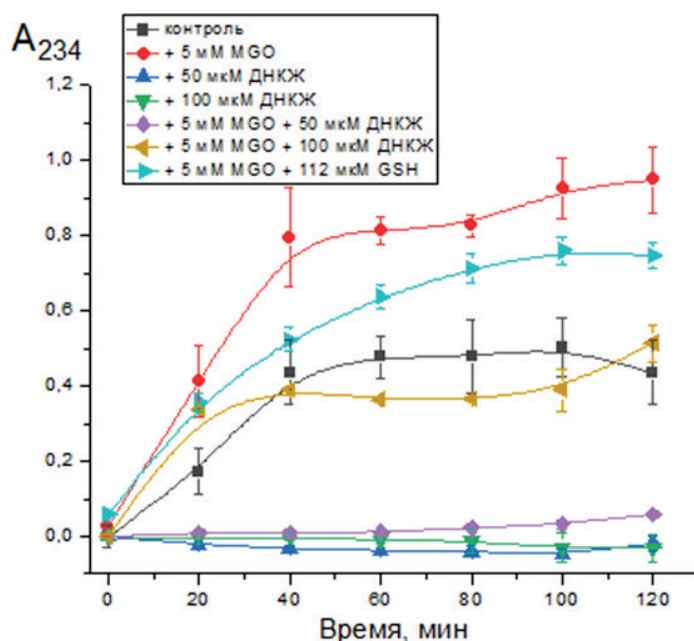


Рисунок 3. Окисление липопротеинов низкой плотности в присутствии метилглиоксала (MGO) и GS-ДНКЖ, а также глутатиона (GSH) – концентрации указаны на рисунке

тиольными лигандами. С другой стороны, ингибирование катализируемых ионами железа реакций свободнорадикального окисления может происходить благодаря связыванию этих ионов в составе ДНКЖ [9]. Следует отметить, что в ходе разрушения ДНКЖ должен также выделяться свободный NO. Считается, что оксид азота благодаря взаимодействию с алкильными ($L\cdot$), алкилперекисными ($LOO\cdot$) и алкоксильными радикалами ($LO\cdot$) липидов способен обрывать цепные реакции ПОЛ [10]. Вместе с тем, при взаимодействии NO с супероксидом образуется такой сильный окислитель, как пероксинитрит [8].

ДНКЖ с глутатионовыми лигандами ингибируют свободнорадикальное перекисное окисление липидов, а также перехватывают супероксидный радикал. Антиоксидантные свойства этих ДНКЖ, по всей видимости, определяются “кооперативным” действием входящих в них тиольных и NO-лигандов. Общим механизмом при взаимодействии ДНКЖ с супероксидом и алкилперекисными радикалами липидов может быть формирование нестабильных интермедиатов, при разрушении которых не образуются сильные окислители, продолжающие цепные реакции ПОЛ. Напротив, в аналогичных реакциях свободного NO продуцируется пероксинитрит и его органический аналог, при гомолизе которых вновь образуются свободные радикалы.

Таким образом, нами было установлено, что динитрозильные комплексы железа эффективно снижают уровень липогидропероксидов, а также свободнорадикальных интермедиатов ПОЛ. Вместе с тем, глутатион-содержащие ДНКЖ могут оказывать существенное антиоксидантное действие не только при окислительном, но и при карбонильном стрессе, который развивается в результате накопления активных дикарбонильных соединений в условиях диабетической гипергликемии.

Мы предполагаем, что исследование антиоксидантного действия ДНКЖ и препаратов на их основе (Оксаком и др.) является достаточно перспективным и позволит разработать новый класс протекторных соединений, ингибирующих ПОЛ и сопряженные с ним патологические процессы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Список литературы / References:

1. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, vol. 482, no. 3, pp. 419-425.
2. Radi R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, vol. 288, no. 2, pp. 481-487.
3. Pisarenko O. et al. Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 2019, vol. 471, no. 4, pp. 583-593.
4. Shumaev K.B. et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 37-46.
5. Lankin V. et al. The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 2014, vol. 395, no. 1, pp. 241-252.

6. Шумаев К.Б. и др. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями. Биохимия, 2009, vol. 74, № 4, pp. 568-574. [Shumaev K.B. et al. Superoxide formation as a result of interaction of L-lysine with dicarbonyl compounds and its possible mechanism. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, vol. 74, no. 4, pp. 461-466. (In Russ.)]
7. Shumaev K.B. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, vol. 2019, p. 2798154.
8. Шумаев К.Б. и др. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа. Биомедицинская химия, 2021, т. 67, № 2, с. 162-168. [Shumaev K.B. et al. A possible mechanism of the antioxidant action of dinitrosyl iron complexes. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2021, vol. 15, no. 4, pp. 313-319. (In Russ.)]
9. Li Q. et al. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase*. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 29, pp. 19917-19927.
10. Pryor W.A. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. American Physiological Society*, 2006, vol. 291, no. 3, pp. R491-R511.

DINITROSYL IRON COMPLEXES AS LIPID PEROXIDATION INHIBITORS

Grachev D.I.^{1,2}, Medvedeva V.A.^{1,2}, Shumaev K.B.^{2,3}, Lankin V.Z.², Ruuge E.K.^{1,2}

¹ Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 1/2, Moscow 119991, Russia

² E.I. Chazov National Medical Research Centre of Cardiology

st. 3rd Cherepkovskaya, 15a, Moscow, 121552, Russia

³ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre of Biotechnology RAS

Leninsky pr-t, 33/2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: di.grachev@physics.msu.ru

Received 27.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0567

Abstract. The paper considers the effect of dinitrosyl iron complexes (DNIC) on the processes of free radical lipid peroxidation, which make a significant contribution to the development of many pathological conditions. These processes damage lipids and other macromolecules, and, in addition, the end products of lipid peroxidation are mutagens and carcinogens. The search for new antioxidant compounds capable of inhibiting lipid peroxidation has a fairly long history, but there are still many questions, including those related to potential clinical applications. In the framework of this work, data were obtained that allow expanding and supplementing the idea of DNIC as significant antioxidant agents. With the use of EPR spectroscopy and spectrophotometry, it was shown that dinitrosyl iron complexes are able to inhibit lipid peroxidation in model systems with tert-butyl hydroperoxide and cytochrome C, as well as in experiments with low-density lipoproteins during their oxidation with copper ions. Presumably, DNIC can be used as a therapeutic agent that prevents or reduces lipid damage and the accumulation of toxic end products of lipid peroxidation.

Key words: lipid peroxidation, dinitrosyl iron complexes, antioxidants, EPR spectroscopy.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ ПРИ ЕЁ МЕЗЕНХИМАЛЬНОМ ПЕРЕХОДЕ

Бакурова Е.М.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького
пр. Ильича, 16, г. Донецк, 283003, ДНР; e-mail: 32023@mail.ru,

Поступила в редакцию 30.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0568

Аннотация. Эпителиальные опухоли различных локализаций способны продуцировать активные формы кислорода, стимулирующие их эпителиально-мезенхимальную трансформацию. Для опухолей немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), аденокарцином желудка и кишечника (АКЖК) установлена их метаболическая неоднородность. По результатам анализа в морфологически однородных опухолях одной локализации выделены кластеры, характеризовавшиеся повышением активности ксантиноксидазы, супероксиддисмутазы, снижением активности глутатионпероксидазы (для неё установлена отрицательная связь с патологией ($\rho = -0,465$, $p < 0,05$)). Так, во втором кластере АКЖК активность глутатионпероксидазы была минимальной, ниже в 1,4 раза, а в их первом кластере ниже в 1,8 раза, чем в опухолях НМКРЛ соответствующих кластеров. Во втором кластере НМКРЛ она была в 1,5 раза ниже, чем в их первом. На этом фоне активность супероксиддисмутазы в опухолях различных локализаций, вошедших во вторые кластеры, наоборот, нарастала, соответственно в 2 раза при НМКРЛ, в 1,7 раза при АКЖК. Это ведет повышению продукции пероксида водорода в опухоли. Выявленное при этом повышение активности аденозиндезаминазы (установлена положительная сильная связь (ранговый коэффициент корреляции Спирмена $\rho = 0,805$, $p < 0,01$) может сопровождаться снижением уровней аденозина и его регуляторных эффектов, препятствующих развитию агрессивных свойств опухоли. Следовательно, в аденокарциномах желудка и кишечника, опухолях немелкоклеточного рака легких выявлена возможность метаболического стимулирования эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли.

Ключевые слова: ферменты, активные формы кислорода, эпителиальные опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

К перспективным современным направлениям в лечении рака относят индивидуальную таргетную терапию сигнальных путей, реализующих опухолевую прогрессию [1]. Рост эпителиальной опухоли активирует ряд онкогенов, контролирующих ангиогенез, резистентность к апоптозу, формирование цитоскелета и межклеточных контактов; продукцию мезенхимальных белков, обеспечивающих подвижность и инвазию. Вместе с тем, эти агрессивные свойства ведут к так называемому эпителиально-мезенхимальному переходу или трансформации опухоли (ЭМТ) [2]. Состоявшийся мезенхимальный переход сопровождается развитием химио- и радиорезистентности, инвазией и метастазированием. В реализацию ЭМТ вовлечены сигнальные пути, стимулируемые активными формами кислорода (АФК), в частности, супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot-}$) и пероксидом водорода (H_2O_2). Например, это JAK2-STAT1 путь, отвечающий за развитие подвижности опухолевых клеток [1]. Согласно Kumari S. и соавт., подавление продукции АФК может способствовать гибели трансформированных клеток или стволовых опухолевых клеток, опосредующих агрессивные свойства [3].

Учитывая вовлеченность АФК в канцерогенез, т.ч. развитие ЭМТ, актуально исследование особенностей их продукции в опухолях эпителиального генеза. Известно, что клеточные уровни $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 во многом зависят от активности ксантиноксидазы, завершающей клеточный катаболизм пуринов. Эта флавиносодержащая оксидоредуктаза может реализовывать окисление гипоксантина и ксантина до мочевой кислоты, что сопровождается образованием $O_2^{\cdot-}$, а затем пероксида водорода H_2O_2 . Уровни этих АФК также зависят от активности ферментов антиоксидантов. Среди последних важную роль играют супероксиддисмутаза (СОД), продуцирующая H_2O_2 при обезвреживании $O_2^{\cdot-}$, а также обезвреживающая H_2O_2 глутатионпероксидаза (ГПО). Так, связь СОД с продукцией пероксида водорода позволила W. Li и соавт. считать, что фермент непосредственно участвует в развитии ЭМТ [4].

Цель исследования: определить особенности тканевой активности ферментов катаболизма пуринов и антиоксидантной системы в эпителиальных опухолях различной локализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено сравнительное изучение особенностей активности ферментов в гомогенатах эпителиальных опухолей различной локализации. Среди них 25 образцов немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ) и 22 случая аденокарцином желудка и кишечника (АКЖК). По уровню инвазии опухоли соответствовали $T_2N_{0-x}M_0$ и $T_3N_{0-x}M_0$ стадиям. Особенности метаболизма опухоли в каждом случае исследовали в сопоставлении с индивидуальным контролем - визуально нетрансформированными тканями края резекции, удаленными от неё не менее, чем на 1 см.

Активность аденозиндезаминазы исследовали спектрофотометрически по снижению оптической плотности аденозина при 265 нм, активность ксантиноксидазы - по повышению продукции мочевой кислоты, регистрировавшейся при 283 нм на фиолетовом светофильтре [5,6]. Активность СОД определяли по торможению самопроизвольного окисления адреналина в щелочной среде [5]. За 1 условную единицу активности СОД принимали активность, замедлявшую его самоокисление в 2 раза. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом [5].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием специализированной для биологических исследований программы «MedStat» (Альфа) и программы «Statistica 5.5» (StatSoft). Данные, не подчинявшиеся закону нормального распределения, представлены в виде медианного значения данных (Me) и интервала между 25-м и 75-м процентилями (первый и третий квартили (Q_1 ; Q_3)). Различия между тремя и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Краскела-Уоллиса. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Корреляционную взаимосвязь между признаками анализировали, рассчитывая ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что помимо $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 , аденозин также является сигнальной молекулой. В частности, он влияет на активность «запасных путей» синтеза нуклеотидов, активация которых сопряжена с интенсивностью клеточной пролиферации. Также описаны его антиапоптозные эффекты, он стимулирует синтез белков антиоксидантной системы, препятствует опухолевой прогрессии, метастазированию [6]. Аденозиндезаминаза (АДА) контролирует клеточные уровни аденозина, запуская его деградацию до мочевой кислоты. При исследовании выявлено повышение опухолевой активности АДА. В образцах НМКРЛ её медианные значения 202,30 (первый и третий квартили (Q_1 ; Q_3): 181,14; 231,12 нмоль/мин·мг). В контрольных нетрансформированных тканях краев резекции, соответственно, 122,30 (103,22; 149,11) нмоль/мин·мг. В образцах АКЖК 234,40 (164,63; 276,22); в контрольных образцах: 125,60 (107,44; 139,52) нмоль/мин·мг. В гомогенатах НМКРЛ она превышала активность в контроле в 1,7 раза ($p = 0,001$), а в опухолях желудка и кишечника еще значительнее – в 1,9 раза ($p = 0,001$). Повышение опухолевой активности АДА может быть универсальным свойством карцином исследуемых локализаций, согласно рисунку 1.

В отличие от активности АДА изменения активности ксантиноксидазы в гомогенатах опухолей менялись не однонаправленно. Действительно, в большинстве случаев НМКРЛ (18 из 25, 72%), и в АКЖК (17 из 22, 77%) установлено повышение активности КСО по сравнению с нетрансформированными тканями, соответственно в 2,2 раза ($p = 0,01$) и в 1,9 раза ($p = 0,001$). Поскольку $O_2^{\cdot -}$, трансформирующийся затем в H_2O_2 – продукты её реакции, можем предположить эквивалентное нарастание их уровней на фоне повышения активности КСО. В тоже время, в ряде случаев, в образцах опухолей изучаемых локализаций достоверных различий между активностью КСО в опухоли по сравнению с индивидуальным контролем не выявлено. На первый взгляд, это противоречит установленному повышению активности АДА. В тоже время, известно об активации «запасных путей синтеза» нуклеотидов и пролиферации при опухолевом росте. Следовательно, можем предположить активное потребление продукта реакции, катализируемой АДА, в «запасных путях» ресинтеза нуклеотидов.

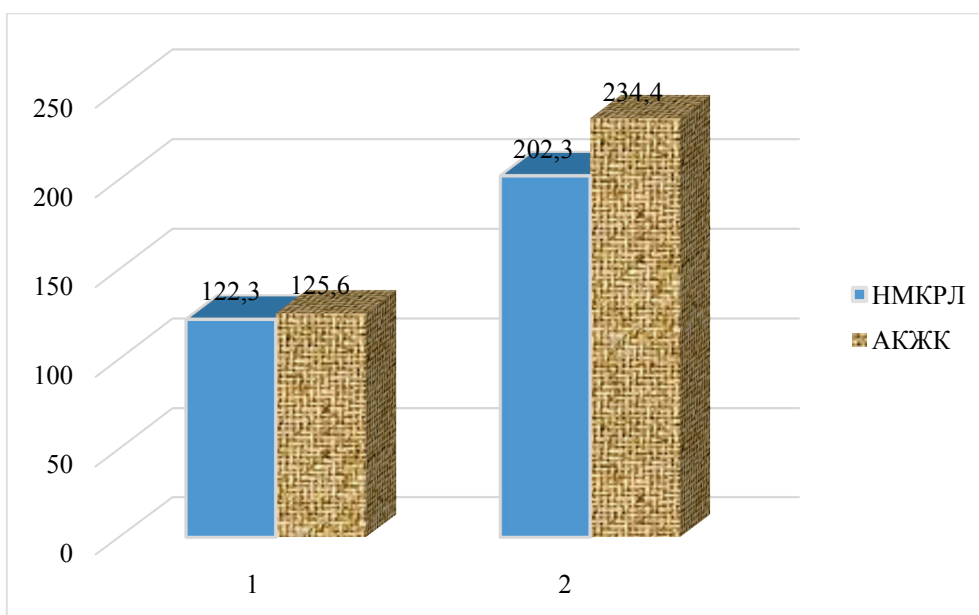


Рисунок 1. Медианные значения активности аденозиндезаминазы в нетрансформированных тканях (1) и в опухолях (2); нмоль/мин·мг

В исследуемых образцах НМКРЛ и АКЖК опухолевая активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) или не отличалась достоверно от контроля (СОД), или снижалась (ГПО). При статистической обработке результатов выявлена корреляция ферментативной активности с патологией. Для АДА установлена положительная сильная связь (ранговый коэффициент корреляции Спирмена $\rho = 0,805$, $p < 0,01$) для активности ГПО связь с патологией отрицательная ($\rho = -0,465$, $p < 0,05$). В опухолях НМКРЛ медианные значения ГПО составляли 2,92 (Q_1 ; Q_3), соответственно: 1,91; 4,20 нмоль/мин·мг). Это было достоверно ниже, чем в нетрансформированной контрольной ткани (3,40 (2,30; 5,10) нмоль/мин·мг; $p < 0,05$). В АКЖК опухолевая активность фермента составила: 1,61 (1,10; 2,11) нмоль/мин·мг; в контроле: 2,19 (1,63; 3,15) нмоль/мин·мг. Причем опухолевая активность ГПО в АКЖК была ниже, чем в образцах НМКРЛ ($p = 0,002$). Согласно критериям множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H) и медианного теста (χ^2) выявили, что активность ГПО органоспецифична и связана с локализацией опухоли: $H = 9,31$ ($p = 0,003$), $\chi^2 = 9,09$ ($p = 0,002$). Для других ферментов связь особенности активности с локализацией опухоли не выявлена.

Кластерный анализ абсолютных значений активности ферментов АОС выявил их неоднородность. Опухоли одной локализации статистически распределялись в 2 кластера как при НМКРЛ, так и при АКЖК; данные приведены в таблице 1.

Для дальнейшей обработки данных были выбраны кластеры активности СОД, данные по другим ферментам соответствовали каждому индивидуальному образцу, отнесенному в определенный кластер по активности СОД. Так, из 25 опухолей НМКРЛ 11 статистически были отнесены во второй кластер, из 22 образцов АКЖК во второй кластер вошли 10 аденокарцином.

Установили, что во 2-х кластерах как при НМКРЛ, так и в АКЖК на фоне повышения активности СОД, активность ГПО, наоборот, была низкой и не только в опухоли, но и в нетрансформированных тканях края резекции. Так, во 2-м кластере АКЖК на фоне максимальной активности СОД ($p = 0,009$), активность ГПО была минимальной ($U = 14,00$, $Z = -3,05$, $p = 0,002$ по сравнению с 1-м кластером и кластерами НМКРЛ). Установленные разнонаправленные изменения активности СОД и ГПО ведут к повышению уровня H_2O_2 . Эти ферментативные особенности были более выражены во 2-х кластерах НМКРЛ и АКЖК.

Активность АДА, согласно кластерам, в опухолях НМКРЛ: 1-й кластер 192,48 (153,45; 207,69), 2-й кластер 223,19 (199,11; 287,39) нмоль/мин·мг. Соответственно, для АКЖК: 1-й кластер 203,68 (133,88; 267,91), 2-й кластер 237,17 (167,36; 335,33) нмоль/мин·мг. Опухолевая активность фермента, оставаясь выше контрольных значений в каждом кластере, имела тенденцию к повышению во вторых кластерах для каждой локализации. Эта тенденция выявлена и для КСО.

Таким образом, в образцах эпителиального рака различных локализаций выявлена метаболическая неоднородность по активности ферментов катаболизма пуринов и АОС среди опухолей одного морфологического типа. В частности, для кластеров с повышенной активностью СОД было характерно снижение активности ГПО и повышение опухолевой активности АДА и КСО. Выявленные особенности ферментативной активности способствуют продукции таких АФК, как O_2^- и H_2O_2 . Это создает условия для стимулирования данными АФК их сигнальных путей. Как уже отмечалось, H_2O_2 активирует ряд чувствительных онкогенов, способствующих опухолевой прогрессии, реализации ЭМТ, метастазированию [4,7]. Так, пероксид водорода, угнетая экспрессию Е-кадгерина, отвечающего за межклеточные контакты, стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров – виментина, α -актина гладких мышц. Клетки опухоли приобретают подвижность. Стимулирующие эффекты H_2O_2 на экспрессию матриксных металлопротеиназ также способствуют инвазии и метастазированию. Экспрессируя мезенхимальные маркеры, и снижая, или даже теряя способность экспрессировать эпителиальные маркеры, опухоли реализуют ЭМТ. Возможно, формированию агрессивных свойств опухоли также способствует снижение уровней аденозина на фоне повышения активности АДА.

Действительно, при проводившемся параллельно морфологическом исследовании именно в образцах опухолей, вошедших во вторые кластеры, регистрировали развитие ЭМТ [8]. Согласно данным, опубликованным ранее, её регистрировали в 100 % опухолей НМКРЛ и 80 % АКЖК, составлявших вторые кластеры. В этих образцах наблюдалось снижение пролиферативной активности, усиление ангиогенеза, признаки инвазии.

Таблица 1. Активность ферментов АОС в опухолях различной локализации, нмоль/мин·мг; (Me; (Q_1 ; Q_3))

Фермент кластер	СОД		ГПО	
	1-й кластер	2-й кластер	1-й кластер	2-й кластер
НМКРЛ (n = 25)	0,69 (0,55; 0,75) */ 0,80 (0,74; 0,98)	1,38 (1,20; 1,46)/ 1,14 (1,01; 1,38)	3,30 (2,11; 4,00) */ 5,12 (2,61; 5,91)	2,16 (1,45; 4,22)/ 3,03 (1,80; 4,00)
АКЖК (n = 22)	1,00 (0,63; 1,13) */ 1,08 (0,75; 1,33)	1,72 (1,33; 2,26) */ 1,41 (0,96; 1,57)	1,88 (1,03; 2,23)/ 2,22 (1,40; 3,04)	1,52 (1,11; 2,00)/ 2,23 (1,96; 2,99)

Примечание: /курсив - данные по контролю; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Последние были обусловлены появлением двигательной активности трансформировавшихся опухолевых клеток, что подтверждалось экспрессией в них α -актина гладких мышц. Эти клетки экспрессировали и другие мезенхимальные маркеры. В сосудах наблюдались эмболы опухолевых клеток, что указывало на возможность метастазирования.

Следовательно, среди опухолей одной локализации и морфологии была выявлена их метаболическая неоднородность, характеризующаяся повышением продукции H_2O_2 , а также снижением уровней аденозина. Предполагаем, это может способствовать активации сигнальных путей, реализующих программы ЭМТ.

Список литературы / References:

1. Liu J., Qu L., Meng L., Shou C. Topoisomerase Inhibitors Promote Cancer Cell Motility via ROS-Mediated Activation of JAK2-STAT1-CXCL1 Pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res*, 2019, vol. 38, no. 1, pp. 370-375, doi: 10.1186/s13046-019-1353-2.
2. Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. *Clin. Exp. Morphol*, 2021, vol. 10, no. 2, pp. 13-20, doi: 10.31088/CEM2021.10.2.13-20.
3. Kumari S., Badana A.K., G M.M., Shailender G., Malla R.R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark Insights*, 2018, vol. 13, pp. 1-9, doi: 10.1177/1177271918755391.
4. Li W., Cao L., Han L., Xu Q., Ma Q. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H_2O_2 /ERK/NF- κ B axis. *Int J Oncol*, 2015, vol. 46, no. 6, pp. 2613-2620, doi: 10.3892/ijo.2015.2938.
5. Бакурова Е.М. Особенности энергетического метаболома эритроцитов у больных раком распространенных стадий. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научн-технич. конференции*, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т. 2, Севастополь: Севастопольский государственный университет, 2016, 226 с. [Bakurova E.M. The Energy Metabolism of Red Blood Cells Features in Patients with Advanced Tumors. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry. BPPC-2016: Proceedings of XI International Science-Technical Conference*, Sevastopol, 25-29 of April, 2016, vol. 2, Sevastopol: Sevastopol State University, 2016, 226 p. (In Russ.)]
6. Зуйков С.А., Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д., Хомутов Е.В. Повышение активности ферментов катаболизма пуринов как один из факторов патогенеза злокачественных новообразований. *«Новообразование» (Neoplasm)*, 2021, т. 13, № 2 (33), с. 86-90. [Zuikov S.A., Bakurova E.M., Tursunova Y.D., Khomutov E.V. Increasing the activity of purine catabolism enzymes as one of the pathogenesis factors of malignant neoplasms. *Neoplasm*, 2021, vol. 13, no. 2 (33), pp. 86-90. (In Russ.)]
7. Zeng J., Li M., Xu J.-Y., Xiao H., Yang X., Fan J.-X., Wu K., Chen Sh. Aberrant ROS mediate cell cycle and motility in colorectal cancer cells through an oncogenic CXCL14 signaling pathway. *Front Pharmacol*, 2021, no. 12, doi: 10.3389/fphar.2021.764015.
8. Бакурова Е.М., Василенко И.В., Турсунова Ю.Д., Добаева Н.М., Борзенко Б.Г., Ельский В.Н. Особенности активности ферментов обмена нуклеозидов и антиоксидантной системы в солидных опухолях. *Российский биотерапевтический журнал*, 2022, т. 21, № 2, с. 73-81. [Bakurova E.M., Vasilenko I.V., Tursunova Yu.D., Dobaeva N.M., Borzenko B.G., Yelsky V.N. The features of enzymes activity to nucleoside and antioxidant systems in solid tumors. *Russian Journal of Biotherapy*, 2022, vol. 21, no. 2, pp. 73-81, doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-73-81. (In Russ.)]

THE EPITHELIAL TUMOR METABOLISM FEATURES DURING ITS MESENCHYMAL TRANSITION

Bakurova E.M.

Maksim Gorky National Medical University,
pr. Il'icha, 16, Donetsk, 283003, DPR; e-mail: 32023@mail.ru
Received 30.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0568

Abstract. The epithelial tumors of various localizations are capable of producing reactive oxygen species that stimulate their epithelial-mesenchymal transformation. For tumors of non-small cell lung cancer (NSCLC), gastric and intestinal adenocarcinomas (GIAC) their metabolic heterogeneity was established. By the results of analysis in morphologically homogeneous tumors of the same localization we detected clusters of tumors characterized by increased activity of xanthine oxidase, superoxide dismutase, decreased activity of glutathione peroxidase (negative relation with pathology ($p = -0.465$, $p < 0.05$)). Thus, glutathione peroxidase activity was minimal in the second GIAC cluster, 1.4-fold lower, and 1.8-fold lower in their first cluster than in NSCLC tumors of the corresponding clusters. In the second NSCLC cluster, it was 1.5-fold lower than in their first cluster. Against this background, superoxide dismutase activity in tumors of different localizations included in the second clusters, on the contrary, increased 2-fold in NSCLC and 1.7-fold in GIAC, respectively. It leads to increased production of hydrogen peroxide in the tumor. Increase of adenosine deaminase activity detected (positive strong correlation (Spearman rank correlation coefficient $p = 0.805$, $p < 0.01$)) may be accompanied by a decrease of adenosine levels and its regulatory effects preventing tumor aggressive properties. Correlation of enzymatic activity with pathology was established. In different localization tumors the possibility of metabolic stimulation of tumor epithelial-mesenchymal transformation was revealed.

Key words: enzymes, reactive oxygen species, epithelial tumors.

МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 РЕГУЛИРУЕТ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ KEAP1/NRF2/ARE И АПОПТОЗ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Гуценко О.И., Корниенко И.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Внуков В.В.

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

ул. Стачки 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: natmilut@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0569

Аннотация. Установлено, что при окислительном стрессе, вызванном гипероксией (0,5 МПа, 90 мин), наблюдается снижение уровня мРНК фактора транскрипции Nrf2 и Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов (SOD1, CAT, GPx4) в лейкоцитах периферической крови крыс. Изменение профиля экспрессии исследованных генов при гипероксии сопровождается дисбалансом активности антиоксидантных ферментов в лейкоцитах – активацией супероксиддисмутазы, ингибированием каталазы, глутатионпероксидазы. Введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к повышению уровня мРНК фактора транскрипции Nrf2 и Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов SOD2 и GPx4, нормализации транскрипционной активности генов SOD1 и CAT в лейкоцитах при окислительном стрессе, вызванном гипероксией. Одновременно в лейкоцитах наблюдалось увеличение активности каталазы и глутатионпероксидазы на фоне возвращения к контрольному уровню активности супероксиддисмутазы. Предполагается, что протекторный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия и путем стимуляции защитной системы Keap1/Nrf2/ARE. Исследование уровня апоптоза лимфоцитов методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидиум йодида показало более чем двукратное усиление экспрессии фосфатидилсерина на поверхности лимфоцитарных мембран. Применение SkQ1 в крайне малых количествах (50 нмоль/кг в течение 5 дней) эффективно ингибирует накопление молекулярных продуктов ПОЛ, нормализует структурное состояние мембран лимфоцитов и уровень их апоптоза в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе.

Ключевые слова: митохондриально-адресованный антиоксидант, лейкоциты, экспрессия генов, антиоксидантные ферменты, гипероксия, апоптоз.

Окислительный стресс способствует нарушению редокс-гомеостаза и приводит к свободно-радикальному повреждению разнообразных клеточных компонентов, что сопровождается развитием многих заболеваний и старения, а также участвует в развитии программируемой клеточной гибели [1]. Чувствительным сенсором и регулятором окислительного стресса является сигнальный путь Keap1/Nrf2/ARE, который вовлечен в молекулярные механизмы многих патологических процессов [2].

Цитопротекторные свойства и механизмы нового класса веществ – митохондриально-направленных антиоксидантов также являются объектами интенсивного изучения. Среди подобных веществ высокой эффективностью отличаются соединения семейства SkQ и его представитель SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний, представляющий собой конъюгат проникающего катиона децилтрифенилфосфония и пластохинона (компонента электротранспортной цепи хлоропластов с мощными антиоксидантными свойствами) [3].

В настоящее время установлено, что реализация защитных механизмов клетки при окислительном/электрофильном стрессе в большой степени связана с активацией редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2, индуцирующей активацию более 200 генов, среди которых гены антиоксидантных белков, ферментов детоксикации и др. [4-6] Кроме того, показано влияние фактора транскрипции Nrf2 на промежуточный метаболизм и митохондриальные функции [6]. Найдены соединения-индукторы данной системы, в частности ее ключевого звена – фактора транскрипции Nrf2, среди которых важное место отводится пара- и орто-гидрохинонам. В связи с этим, целью работы стало исследование влияния SkQ1, содержащего в своей конструкции пластохинон, на уровень экспрессии гена фактора транскрипции Nrf2 и Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов, их активность в лейкоцитах крови крыс в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО), а также интенсивность апоптоза в лейкоцитах периферической крови крыс при окислительном стрессе, индуцированном ГБО.

Проведенное исследование показало, что введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение пяти дней приводит к повышению на 318% уровня экспрессии гена фактора транскрипции Nrf2 в лейкоцитах крови крыс относительно контроля (рис. 1). Это подтверждается соответствующим повышением относительного уровня мРНК фактора транскрипции Nrf2 по сравнению с нормой. Параллельно было исследовано влияние введения SkQ1 на экспрессию Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов – изоферментов супероксиддисмутазы (SOD₁ и SOD₂), каталазы (CAT), глутатионпероксидазы 4 (GPx4) – в лейкоцитах крыс. Было показано, что в лейкоцитах крови крыс на фоне введения SkQ1 наблюдается повышение количества мРНК SOD₁ на 70% и мРНК

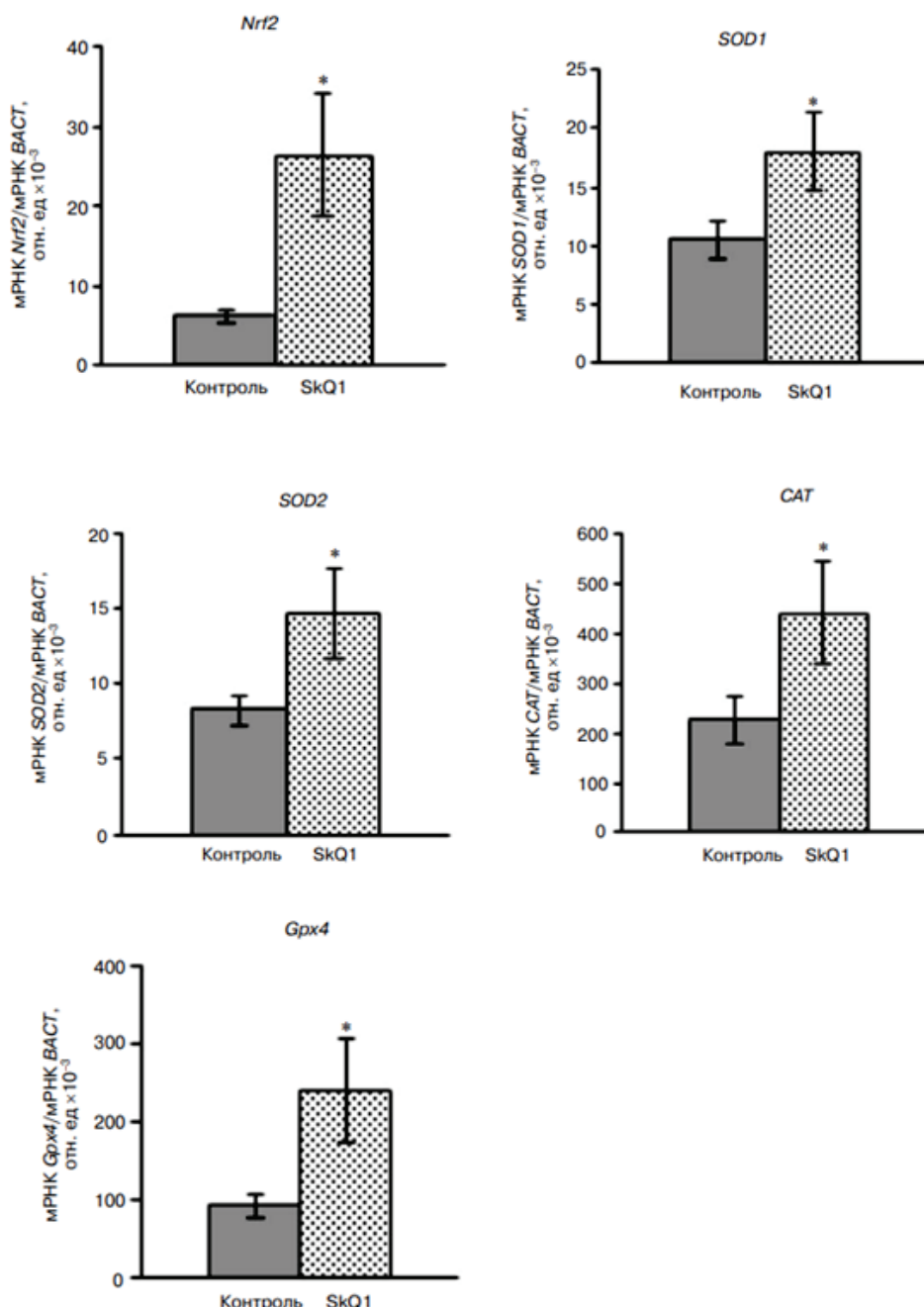


Рисунок 1. Влияние SkQ1 на уровень мРНК гена Nrf2 и генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс. $M \pm m$. Количество животных в группах – 13–26.

* – Статистически значимые различия между контрольной и опытной группами ($p < 0,05$)

SOD₂ – на 77%, что указывает на увеличение транскрипционной активности соответствующих генов (рис. 1). Кроме того, показано, что применение SkQ1 в течение пяти дней приводит к повышению содержания мРНК CAT на 95%, а количество мРНК Gpx4 увеличивается на 156% в лейкоцитах крови крыс, что свидетельствует о повышении уровня экспрессии данных генов под влиянием катионного производного пластохинона. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что SkQ1 является позитивным регулятором транскрипционной активности гена Nrf2 и генов антиоксидантных ферментов, что может способствовать повышению антиоксидантного потенциала лейкоцитов в физиологических условиях.

Повышение уровня экспрессии исследованных генов антиоксидантных ферментов в условиях физиологической нормы при введении SkQ1 сопровождается возрастанием в лейкоцитах активности каталазы и глутатионпероксидазы, что способствует повышению антиоксидантного потенциала лейкоцитов крови. При этом общая активность SOD в лейкоцитах на фоне введения SkQ1 оставалась на уровне контроля.

В условиях окислительного стресса, вызванного ГБО (0,5 МПа, 90 мин), в лейкоцитах крови крыс наблюдается снижение на 33% уровня экспрессии гена ядерного фактора транскрипции Nrf2, который, как известно, играет критическую роль в защите от окислительного стресса при гипероксии. Это подтверждается соответствующим снижением относительного уровня мРНК фактора транскрипции Nrf2 относительно контроля.

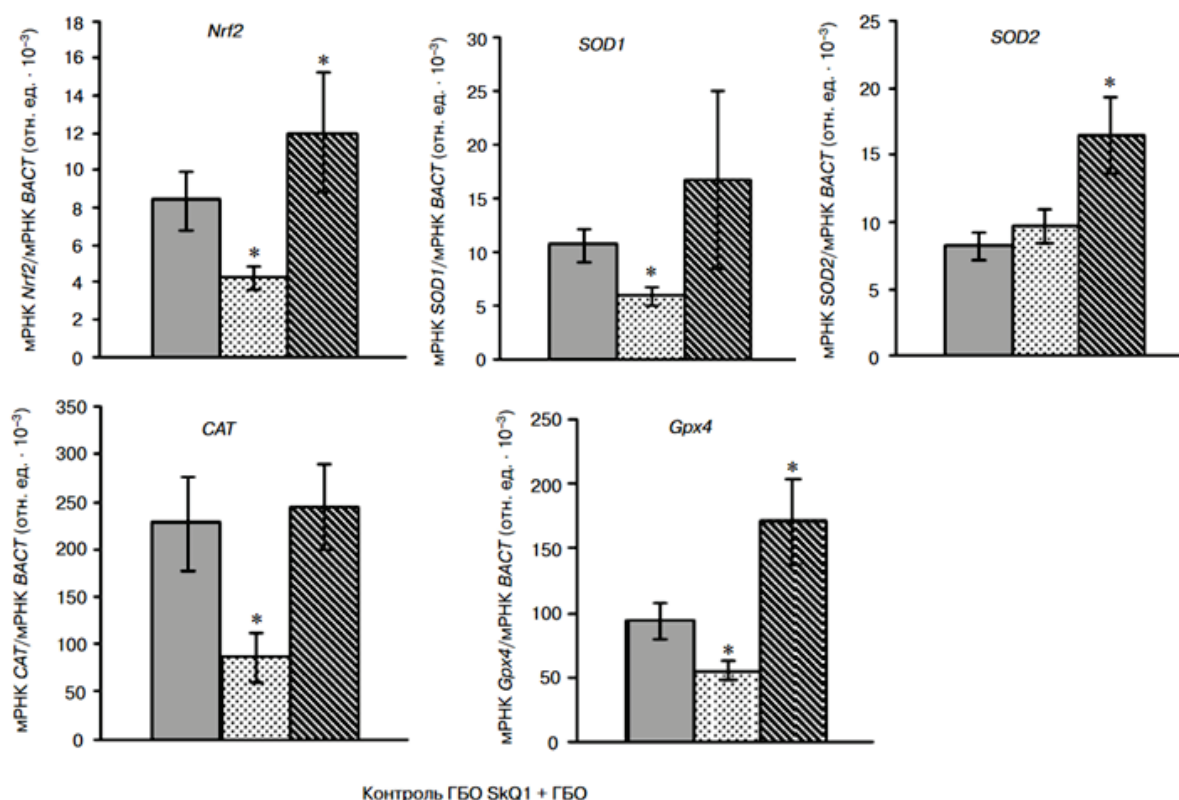


Рисунок 2. Влияние SkQ1 на уровень мРНК гена Nrf2 и генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс после ГБО-индуцированного окислительного стресса. М ± m.

Число животных в группах 13–26. Статистически значимые различия между контрольной и опытной группой отмечены символом * ($p < 0,05$)

На фоне подавления транскрипционной активности гена Nrf2 в лейкоцитах крови крыс при гипероксии наблюдается снижение уровня экспрессии ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы 1 (SOD1), каталазы (CAT), митохондриальной изоформы глутатионпероксидазы 4 (GPx4). Так, содержание мРНК SOD1 снижается на 44%, мРНК CAT – на 62%, мРНК GPx4 – на 40% в лейкоцитах по сравнению с нормой (рис. 2). Изменение профиля экспрессии исследованных генов при гипероксии сопровождается дисбалансом активности антиоксидантных ферментов в лейкоцитах – активацией супероксиддисмутазы, ингибированием каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к повышению уровня мРНК фактора транскрипции Nrf2 и Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов SOD2 и GPx4, нормализации транскрипционной активности генов SOD1 и CAT в лейкоцитах при ГБО-индуцированном окислительном стрессе (рис. 2).

Одновременно в лейкоцитах наблюдалось увеличение активности каталазы и глутатионпероксидазы на фоне возвращения к контрольному уровню активности супероксиддисмутазы. Предполагается, что протекторный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия и путем стимуляции защитной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE.

Проведенное исследование показывает, что в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса резко возрастает интенсивность апоптоза лимфоцитов периферической крови крыс, что продемонстрировано с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Данный метод позволяет идентифицировать клетки, находящиеся на различных стадиях программируемой клеточной гибели. Внесение в клеточную суспензию двух меток – аннексина V-FITC и пропидиума иодида (PI) – позволяет одновременно оценивать количество интактных (аннексин V-негативных/PI-негативных), ранних апоптотических (аннексин V-позитивных/PI-негативных) и поздних апоптотических/некротических (аннексин V-позитивных/PI-позитивных) клеток. Дискриминационный анализ типа клеточной гибели позволил установить, что при окислительном стрессе, индуцированном ГБО, количество аннексин V-позитивных лимфоцитов, находящихся на ранней стадии апоптоза (квадрант Q4), возрастает на 110% относительно контроля (рис. 3). Известно, что апоптоз является редокс-зависимым процессом, тесным образом связанным с интенсивностью свободнорадикальных процессов, уровень которых при ГБО существенно возрастает [7].

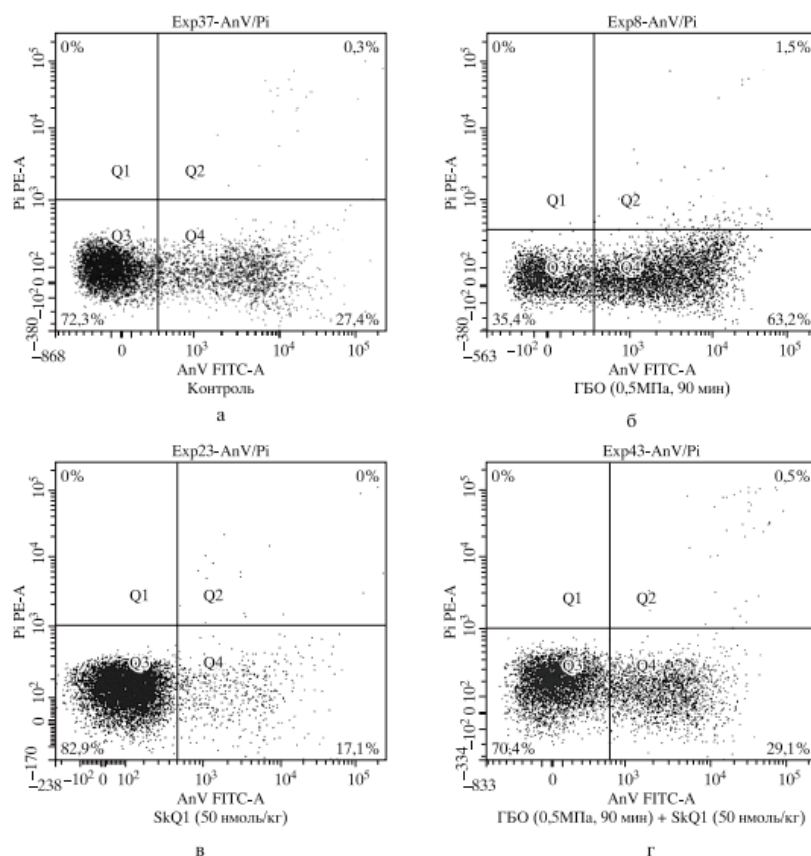


Рисунок 3. Влияние SkQ1 на распределение апоптотических и жизнеспособных лимфоцитов периферической крови крыс в условиях физиологической нормы и при ГБО-индуцированном стрессе (двумерная гистограмма). Q1 – аннексин V-негативные/PI-позитивные клетки – некроз; Q2 – аннексин V-позитивные/PI-позитивные клетки – поздний апоптоз/некроз; Q3 – аннексин V-негативные/PI-негативные клетки – жизнеспособные клетки; Q4 – аннексин V-позитивные/PI-негативные клетки – ранний апоптоз. Интенсивность апоптоза: а – 27,4%, б – 63,2%, в – 17,1%, г – 29,1%

Исследование уровня апоптоза лимфоцитов методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидиум йодида показало, что применение SkQ1 в крайне малых концентрациях (50 нмоль/кг в течение 5 дней) эффективно ингибирует накопление молекулярных продуктов ПОЛ, нормализует структурное состояние мембран лимфоцитов и уровень их апоптоза в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе (рис. 3). Предварительное применение катионного производного пластохинона SkQ1 в течение 5 дней перед действием ГБО способствует нормализации количества апоптотических лимфоцитов в крови при окислительном стрессе. Можно полагать, что важнейшей причиной нормализующего влияния SkQ1 на интенсивность апоптоза лимфоцитов крови при ГБО-индуцирующем окислительном стрессе является активация транскрипционной активности гена *Nrf2* и *Nrf2*-контролируемых генов антиоксидантных ферментов.

Как следует из полученных результатов, предварительное введение митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 intactным крысам приводит к снижению уровня раннего апоптоза в условиях физиологической нормы и поддержанию программируемой клеточной гибели лимфоцитов периферической крови на уровне контроля в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса. Антиапоптотический эффект SkQ1 при ГБО-индуцированном окислительном стрессе, показанный на популяции циркулирующих лимфоцитов, по-видимому, является прямым следствием антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия препарата, предварительное введение которого способствует сохранению стационарного уровня ПОЛ и структурного гомеостаза мембран лимфоцитов. Очевидно, что значение митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 как регулятора программируемой клеточной гибели может играть важнейшую роль при различных патологических состояниях, связанных с митохондриальной дисфункцией.

Таким образом, защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

Список литературы / References:

1. Redza-Dutodoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. et Biophys. Acta*, 2016, vol. 1863, no. 9, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.

2. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, no. 6, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
3. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro*. *Биохимия*, 2008, т. 73, с. 1589-1606. [Antonenko Yu.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E. et al. A plastoquinone derivative targeted to mitochondria as a drug that interrupts the aging program. 1. Cationic derivatives of plastoquinone: synthesis and in vitro study. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, pp. 1589-1606. (In Russ.)]
4. Турпаев К.Т. Сигнальная система Keap1/Nrf2. Механизмы регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений. *Биохимия*, 2013, т. 78, с. 1240-1250. [Turpaev K.T. Keap1/Nrf2 signaling system. Regulatory mechanisms and importance for cell protection from the toxic effects of xenobiotics and electrophilic compounds. *Biochemistry*, 2013, vol. 78, pp. 1240-1250. (In Russ.)]
5. Jaiswal A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, vol. 36, pp. 1199-1207.
6. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 2014, vol. 39, pp. 199-216.
7. Ahmad S., Ahmad A., Ghosh M., Leslie C.C., White C.W. Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, pp. 16317-16325.

MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SKQ1 REGULATES OF SIGNAL SYSTEM KEAP1/NRF2/ARE AND APOPTOSIS IN THE LEUKOCYTES OF BLOOD UNDER OXIDATIVE STRESS

Gutsenko O.I., Kornienko I.V., Ananyan A.A., Milutina N.P., Vnukov V.V.

Southern Federal University, the Academy of Biology and Biotechnology, the Department of Biochemistry and Microbiology

prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don 344090, Russia; e-mail: natmilut@rambler.ru

Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0569

Abstract. This study demonstrated that hyperoxia-induced (0.5 MPa, 90 min) oxidative stress decreased mRNA level of Nrf2 transcription factor and Nrf2-induced genes encoding antioxidant enzymes (SOD1, CAT, GPx4) in leukocytes of rat blood. The change in gene expression profiles in hyperoxia was accompanied by disbalance of antioxidant enzyme activities in the leukocytes – activation of superoxide dismutase, and inhibition of catalase, glutathione peroxidase. The administration of SkQ1 (50 nmol/kg during 5 days) significantly increased mRNA level of Nrf2 transcription factor and Nrf2-induced genes encoding antioxidant enzymes SOD2 and GPx4 and normalized the transcriptional activity of the SOD1 and CAT genes in the leukocytes under the hyperoxia-induced oxidative stress. Catalase and glutathione peroxidase activity in the leukocytes increased concurrently with reversion of superoxide dismutase activity to the control level. The protective effect of SkQ1 in hyperoxia-induced oxidative stress may be realized via direct antioxidant activity and the stimulation of the Keap1/Nrf2/ARE defense system. Administration of SkQ1 in extremely low amounts (50 nmol/kg for 5 days) effectively inhibits the accumulation of lipid peroxidation molecular products, normalizes the structural state of lymphocyte membranes and the level of their apoptosis under the condition of physiological standard and oxidative stress.

Key words: mitochondria-targeted antioxidant, leukocytes, gene expression, antioxidant enzymes, hyperoxia, apoptosis.

ВОЗМОЖНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Генералов Е.А., Симоненко Е.Ю., Яковенко Л.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, 119991, ГСП-1, г. Москва, РФ; e-mail: generals1179@gmail.com

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0570

Аннотация. За последние десятилетия многочисленными исследованиями установлено, что полисахариды, полученные из различных источников, обладают широким спектром биологических активностей, включая противовирусное действие. В настоящей работе приведены данные, в основном, по противовирусной активности полисахаридов и внутриклеточным сигнальным путям, которые могут участвовать в ее проявлении, указаны некоторые источники и типы полисахаридов, особенности их состава и структуры, основные виды их биологических активностей. В связи с пандемией COVID-19 более подробно рассмотрены особенности возбудителя этого заболевания – вируса SARS-CoV-2, его взаимодействий с клеточными рецепторами, молекулярные механизмы последствий заболевания и возможного лекарственного действия полисахаридов при этом заболевании. Природные полисахариды в перспективе могут оказаться эффективными средствами терапии при различных вирусных заболеваниях, возможно, более эффективными и не имеющими побочных эффектов по сравнению с традиционными противовирусными препаратами.

Ключевые слова: полисахариды, биологическая активность, противовирусное действие, вирусные заболевания, SARS-CoV-2.

Природные полисахариды (ПС) обладают широким спектром биологических активностей и уже давно используются в медицинских целях, в основном, в странах Азии. ПС имеют, как правило, растительное или бактериальное происхождение, хотя известны и ПС, получаемые из животных и грибов, обладающие высокой биологической активностью в различных ситуациях [1]. Множество разных ПС получают из цианобактерий, одноклеточных и многоклеточных водорослей, как пресноводных, так и морских, а также из наземных растений [1-4]. Для них характерно чрезвычайно разнообразие состава и свойств, что определяется не только видом продуцента, но и такими факторами, как среда обитания (температура, состав, освещенность и т.п.) и фаза жизненного цикла. По роли в жизни организма-продуцента ПС можно разделить на две группы: запасные и структурные, при этом запасные ПС являются основным источником энергии, а структурные, как следует из названия, обеспечивают прочность структур клеток и тканей и защищают от вредных воздействий окружающей среды. К основным запасным ПС относятся крахмал (амилопектин и амилоза), флоридский крахмал (полу-амилопектин без амилозы) и гликоген. Крахмал накапливается в пластидах зеленых растений, включая водоросли, флоридский крахмал – в цитозоле красных водорослей и глаукофитов, гликоген – в цитозоле клеток животных, грибов, а также некоторых цианобактерий и архей. У бурых водорослей основным запасным ПС является ламинаран (ламинарин), который представляет собой (1,3)- β -D-глюкан с ветвлениями (1,6)- β [2]. Ламинаран с высокой степенью ветвления хорошо растворим в холодной воде, а с низкой – только в горячей.

Основным структурным ПС у наземных растений и некоторых водорослей является целлюлоза, которая образуется путем конденсации D-глюкозы с образованием β -(1,4)-гликозидных связей [5]. У бурых водорослей в клеточной стенке и матриксе содержатся альгинаты, которые состоят из гомополимерных и гетерополимерных блоков β -(1,4)-D-маннуриновой кислоты и α -(1,4)-L-гулуриновой кислоты. С точки зрения биологической активности важный класс ПС составляют сульфатированные ПС, обнаруженные у всех групп водорослей, но не у наземных растений [2]. Красные водоросли продуцируют сульфатированные галактаны, причем в каррагинанах (различные галактопиранозы) использованы D-энантиомеры, а в агаре (агароза и агаропектин) – L-энантиомеры галактозы. Зеленые водоросли продуцируют сульфатированные глюканы, галактаны и арабиногалактаны, а цианобактерии – спироураны. Множество других ПС, экстрагированных из водорослей, получили названия в соответствии с названием продуцента: фуцелларан, порфиран, ульван, спироуран, фукан, фукоидан и т.д. Клеточные стенки некоторых бурых водорослей состоят, в основном, из фукоиданов.

Исследования показали, что среди огромного разнообразия ПС есть такие, которые при соответствующей очистке обладают выраженными биологическими активностями при введении в организмы здоровых и больных животных: ускорение регенерации, стимуляция процессов кроветворения, а также противовоспалительное, противовирусное, антиоксидантное, гепатопротекторное действие и активация иммунной системы, причем эффекты зависят от дозы [1]. Обычно ПС оказывают не прямое действие, а опосредованное, за счет модуляции состояний клеток и систем организма [6]. Основные сложности при исследованиях биологической активности ПС связаны с очисткой и накоплением достаточных количеств этих соединений, поскольку в продуцентах они часто содержатся в низких концентрациях. Большинство ПС с высокой биологической активностью имеют большие молекулярные массы – сотни и тысячи килодальтон, но известны и низкомолекулярные ПС, обладающие заметной биологической активностью.

Из всех гликанов к ПС с наибольшей биологической активностью следует, видимо, отнести β -глюканы, которые, взаимодействуя с различными клеточными рецепторами (Dectin-1, CR3, CD-209, TLR-2, TLR-4,

TLR-6), приводят к запуску каскадов иммунологических реакций и изменений в соответствующих клетках [7]. При действии на плюрипотентные клетки ПС они активируют миграцию клеток к месту повреждения ткани и гемопоэз, стимулируя миелоидный, эритроидный и лимфоидный ростки кроветворения в костном мозге и в селезенке [8].

Многие ПС, полученные из водорослей, способны препятствовать прикреплению вирусов к мембранам клеток хозяина и, тем самым, облегчать течение заболевания. Среди ПС, полученных из бурой водоросли *Sargassum trichophyllum*, были ламинаран, альгинат и фукоидан, но только фукоидан обладал активностью против вирусов простого герпеса ВПГ-1 и ВПГ-2 [9]. Низкомолекулярные фракции фукоидана из другой бурой водоросли *Laminaria japonica* обладали противовирусной активностью *in vitro* в отношении вируса гриппа типа А, парагриппа типа 1 и аденовируса [10]. Из бурой водоросли *Cladisiphon okamuranus* (модзуку, популярная в Японии съедобная водоросль) с высокой активностью против вируса азиатской чумы птиц и меньшей цитотоксичностью, чем у противовирусного препарата рибовирин [11]. Противовирусную активность в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2, вирусов свиной чумы и коровьей оспы, гепатита А, энцефаломиокардита проявляют некоторые каррагинаны [12].

Некоторые ПС бактериального происхождения также обладают противовирусной активностью, при этом их действие обычно связано с нарушениями фаз адсорбции вирусов на мембранах клеток хозяина и репликации в клетках. Из цианобактерии спироулы (*Arthrospira platensis*) выделяют сульфатированный ПС Са-спироулан, который проявляет антиоксидантную, иммуномодулирующую, противовоспалительную активность, и, кроме того, противовирусную активность в отношении вирусов ВПГ-1, кори, эпидемического паротита, гриппа А, ВИЧ-1, цитомегаловируса человека на стадии адсорбции и проникновения вирусов в клетки [13]. Противовирусная активность многих ПС связана с их способностью индуцировать выработку интерферона I типа и оказывать противовоспалительное действие за счет ингибирования выработки провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-8 [14].

Несмотря на то, что исследование биологических активностей, включая противовирусную активность, ПС из различных источников проводятся много десятилетий, их молекулярные механизмы остаются не выясненными. По-видимому, прямое воздействие ПС с вирионами следует исключить. Можно предположить, что молекулярные механизмы противовирусного действия ПС связаны с изменениями в экспрессии генов в различных типах клеток, приводящих к изменениям функционального состояния клеток. Можно предположить, что защитное действие ПС обусловлено тем, что при изменении состояния клетки происходят и изменения ее взаимодействий с вирионом: уменьшается адсорбционная способность по отношению к вириону (по разным причинам), ингибируются пути репликации вируса внутри клетки и, возможно, клетка переключается на апоптоз до того, как погибает. С другой стороны, вирионы и отдельные вирусные белки также могут запускать внутриклеточные сигнальные каскады в клетках и приводить к изменениям их состояния. Очевидно, что степень поражения вирусом тканей и возникновение различных патологических системных процессов связаны с долей соответствующих клеток, в которых происходит репликация вируса или с которыми связаны вирионы или вирусные белки, и эта доля определяется количеством доступных путей проникновения вируса в эти клетки («мощностью» потока вируса в клетки), то есть наличием на клеточных мембранах рецепторов вирионов и вирусных белков. Кроме того, вирусные белки могут непосредственно взаимодействовать с белками человека и приводить к различным патологическим процессам и состояниям. Скорее всего, во всех случаях существует пороговый эффект: при превышении порога воздействия происходит бифуркация и клетка (или система) переключается с одного пути поведения (эволюции) на другой. Для выявления молекулярных механизмов действия ПС сначала надо установить, с какими рецепторами взаимодействуют как ПС, так и вирионы и вирусные белки. Рассмотрим этот вопрос на примере вируса SARS-CoV-2.

Вирус SARS-CoV-2 относится к бетакоронавирусам семейства Coronaviridae. По классификации Балтимора [15, 16] вирус относится к классу IV – вирусам, содержащим одноцепочечную (+) РНК. Протеом вируса состоит из 29 белков. В зависимости от наличия клеточных протеаз вирус проникает в клетку либо за счет эндоцитоза, либо при прямом слиянии с клеточной мембраной. Основным путем считается связывание с рецептором ангиотензин-превращающего фермента второго типа (ACE2). Существуют данные о том, что для проникновения вируса в клетку необходим клеточный гепарансульфат, который является ко-рецептором ACE2 и в отсутствие которого способность вируса инфицировать клетку снижается на 80–90% [17]. Проникновение вируса в клетку могут обеспечить и другие рецепторы, среди которых следует отметить нейропилин-1 (NRP1), трансмембранный гликопротеин CD-147, рецепторную тирозинкиназу AXL, KREMEN1 и ASGR1.

NRP1 – гликопротеин с одной трансмембранной цепью, широко представленный в разных тканях. Он не проявляет тирозинкиназной активности, но является многофункциональным корецептором, связывающимся с различными белками и играющим разнообразные физиологические роли в организме. Вирус SARS-CoV-2 связывается с доменом b1 NRP1 за счет комплементарной части шиповидного белка коронавируса (S-белка), при этом проникновение его в клетку существенно ускоряется. NRP1 в больших количествах экспрессируется в обонятельном эпителии, в клетках центральной нервной системы, связанных с обонятельным эпителием, и в клетках легких. Во всех этих клетках уровень экспрессии ACE2 очень низок. Считается, что NRP1 участвует в проникновении SARS-CoV-2 в нервные клетки, и с этим могут быть связаны неврологические последствия заболевания COVID-19 даже в легких случаях [18–20].

CD-147 – трансмембранный гликопротеин из семейства иммуноглобулинов. Обнаружено прямое взаимодействие S-белка с CD-147 [21]. Проникновение вириона в клетку происходит за счет эндоцитоза с

участием caveолина, липидных рафтов и цитоскелета, при этом клатрин и макропиноцитоз в этом не участвуют [22]. CD-147 присутствует на поверхностях различных клеток, в том числе, Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, и его взаимодействие с вирионом может приводить к образованию петли положительной обратной связи: при инфицировании лимфоцитов их количество в кровотоке снижается, что при COVID-19 является прогностическим фактором тяжести заболевания.

AXL – рецепторная тирозинкиназа, участвующая в регуляции многочисленных физиологических процессов, таких как выживание, дифференцировка, пролиферация и, кроме того, в ингибировании врожденного иммунного ответа. Рецептор имеет высокое сродство к N-концевому домену S-белка (882 нМ) [23]. В трахее, бронхах и легких клеток, экспрессирующих AXL, больше, чем экспрессирующих ACE2, причем совместно эти рецепторы не экспрессируются.

Кроме упомянутых выше рецепторов, в проникновении SARS-CoV-2 в клетки могут участвовать также рецепторы KREMEN1 и ASGR1 [24,25]. Они обладают высоким сродством к некоторым доменам белка S-1. Эти рецепторы участвуют в регуляции множества разных сигнальных путей, как внутриклеточных, так и системных. Проникновение вируса в клетки с участием этих рецепторов может быть связано с устойчивостью к нейтрализации его антителами.

Патологические состояния и процессы в инфицированном организме могут быть связаны не только с проникновением вирусов в клетки, но и с непосредственными взаимодействиями вирусных белков с белками и ДНК. Продукты репликации вирусов в клетках могут приводить как к повреждениям ДНК, так и к нарушениям процессов репарации ДНК, в результате чего возникает нестабильность генома, нарушается клеточный цикл, изменяются уровни экспрессии белков, в частности, в некоторых случаях наблюдается повышенная экспрессия ACE2 [26,27]. Известно более 300 типов взаимодействий вирусных белков с белками человека, которые связаны с большим числом разнообразных жизненно важных для клеток процессов, таких как транскрипция, трансляция, транспорт везикул и белков, убиквитинирование белков, функционирование цитоскелета и митохондрий [28]. Некоторые вирусные белки непосредственно влияют на сигнальные каскады врожденного иммунитета. Так, белки NSP13, NSP15 и ORF9b влияют на интерфероновый каскад, а белки NSP13 и ORF9c – на сигнальный путь через NF- κ B [29]. Белок ORF6 взаимодействует с интерферон-индуцируемым ядерным экспортным комплексом мРНК NUP98-RAE1 [30]. Появились данные о том, что в тяжелых случаях COVID-19 происходит индуцированный вирусом апоптоз Т-клеток, который, возможно, является одной из причин Т-лимфопении и цитокинового шторма [31].

Очевидно, что при таком разнообразии взаимодействий вируса и его компонентов с инфицированным организмом единственным универсальным подходом к лечению является формирование сбалансированного иммунного ответа. Видимо, это и лежит в основе противовирусного действия некоторых ПС. Так, например, ПС HTLP с молекулярной массой около 2 МДа, недавно выделенный из топинамбура (*Helianthus tuberosus L.*), способен индуцировать или ингибировать продукцию и высвобождение цитокинов макрофагами [32].

Добавление HTLP к мононуклеарам периферической крови доноров при высокой спонтанной продукции интерлейкина IL-1 приводило к снижению количества высвобождаемого IL-1, тогда как при низкой продукции цитокина наблюдалась стимуляция высвобождения IL-1. Поскольку IL-1 является медиатором острого и хронического воспаления, влияние HTLP на уровень его выработки можно рассматривать как иммуномодулирующую активность ПС. HTLP влияет также на продукцию интерлейкина IL-6, причем увеличение продукции в клеточных культурах мононуклеаров периферической крови зависит от дозы, что дает возможность регуляции уровня его выработки, и, следовательно, провоспалительного или противовоспалительного действия. Выработка IL-6 стимулируется TNF и IL-1. Будучи фактором дифференцировки для В-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, IL-6 играет незаменимую роль в противоинфекционном иммунном ответе, формируя клоны специфических цитотоксических Т-лимфоцитов и продуцентов антител – В-лимфоцитов. Усиление выработки цитокина IL-6 активированными макрофагами вносит существенный вклад в механизм противовирусного эффекта HTLP, что и было показано в модели герпетического менингоэнцефалита у мышей [33].

Как уже было упомянуто ранее, β -глюканы являются лигандами для множества рецепторов различных клеток. Предположительно, важнейшие сигнальные каскады реализуются при этом с участием рецепторов Dectin-1, TLR-2, TLR-6 и TNFR. Связывание HTLP с Dectin-1 и TLR-6 приводит не только к увеличению выработки цитокинов, но и активация макрофагов, нейтрофилов, моноцитов, Т-клеток и дендритных клеток и, в конечном итоге, к повышенной противомикробной и противовирусной активности этих клеток [33,34]. Индукция выработки интерферона IFN- γ под действием HTLP, по-видимому, также связана с активацией Dectin-1 и TLR-2 и TLR-6 рецепторов, что в клетках разных типов может приводить к разным ответам. В частности, миелоидные и плазматическоидные дендритные клетки трансформируются в Т-рег с повышенной продукцией IL-17 [35], в Т-клетках CD4 происходит запуск выживаемости и активации противогрибкового иммунитета [36], в плазматических клетках происходит переход к созреванию до В-клеток, которые, в свою очередь, созревают до плазмобластов, с повышенной выработкой антител [37], NK-клетки активируют противоопухолевое действие иммунной системы [38].

Детали молекулярных механизмов противовирусного действия ПС остаются в большой степени не известными, поэтому разработка научно обоснованных подходов к комплексной терапии с использованием ПС при вирусных заболеваниях затруднена. Одним из перспективных направлений в решении этой проблемы является анализ состояния и поведения клетки с помощью математического моделирования. Построение

многомерных моделей, учитывающих множество сигнальных каскадов, запускаемых вирусами и ПС, конечно, пока невозможно, однако и модели малой размерности, оперирующие с обобщенными переменными и являющиеся по сути качественными, могут быть в некоторой степени полезными. Клетку можно рассматривать как активную среду, поскольку в ней имеются распределенные источники энергии, и все реакции идут самопроизвольно. Это позволяет адаптировать существующие модели активных сред к некоей общей ситуации взаимодействия ПС с клеткой. Такой подход был реализован в [39] на основе системы уравнений Фитц-Хью–Нагумо в модификации Алиева–Панфилова. В этом модели рассмотрена клетка, у которой на мембране имеются рецепторы Dectin-1, димер TLR-2–TLR-6 и TNFR. При связывании ПС с Dectin-1 происходит димеризация рецептора (или связывание происходит сразу с димером). Взаимодействие ПС димерами рецепторов приводит к индукции синтеза цитокина TNF, который связывается с TNFR. Это приводит к запуску основных из известных сигнальных каскадов, связанных с этими рецепторами, в результате чего формируется проапоптотический сигнал. В здоровых клетках его уровень низок, и вероятность перехода клетки в предапоптотическое состояние и к апоптозу мала. В трансформированных клетках проапоптотический сигнал может превысить пороговое значение, и клетка перейдет к апоптозу. Эти результаты качественно согласуются с наблюдаемыми в экспериментах.

Приведенные в настоящей работе данные позволяют сделать вывод, что природные ПС в перспективе могут оказаться эффективными средствами терапии при различных вирусных заболеваниях, возможно, более эффективными и не имеющими побочных эффектов по сравнению с традиционными противовирусными препаратами. При COVID-19, в частности, ПС могут потенциально быть полезными на острой стадии заболевания, при пост-ковидном синдроме, а также при легком течении болезни.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

Список литературы / References:

1. Ramawat K.G., Merillon J.-M. (Eds.) *Polysaccharides. Bioactivity and Biotechnology*. Cham: Springer, 2015, 2241 p., doi: 10.1007/978-3-319-16298-0.
2. Misurcova L., Orsavova J., Ambrozova J.V. Algal polysaccharides and health. vol. 1, pp. 109-144.
3. Liu J., Willfor S., Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015, vol. 5, iss. 1, pp. 31-61, doi: 10.1016/j.bcdf.2014.12.001.
4. Sun Y. Structure and biological activities of the polysaccharides from the leaves, roots and fruits of *Panax ginseng* C.A. Meyer: An overview. *Carbohydrate Polymers*, 2011, vol. 85, pp. 490-499, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.03.033.
5. Held M.A., Jiang N., Basu D., Showalter A.M., Faik A. Plant cell wall polysaccharides: structure and biosynthesis. vol. 1, pp. 3-54.
6. Li Y., Wang X., Ma X., Liu C., Wu J., Sun C. Natural polysaccharides and their derivatives: a promising natural adjuvant for tumor immunotherapy. *Front. Pharmacol.*, 2021, vol. 12, p. 621813, doi: 10.3389/fphar.2021.621813.
7. Herre J., Gordon S., Brown G. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular immunology*, 2004, vol. 40, pp. 869-876, doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.007.
8. Yi-Ming Zhang, Li-Ying Zhang, Heng Zhou, Yang-Yang Li, Kong-Xi Wei, Cheng-Hao Li, Ting Zhou, Ju-Fang Wang, Wen-Jun Wei, Jun-Rui Hua, Yun He, Tao Hong, Yong-Qi Liu. Astragalus polysaccharide inhibits radiation-induced bystander effects by regulating apoptosis in Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs). *Cell Cycle*, 2020, vol. 19, no. 22, pp. 3195-3207, doi: 10.1080/15384101.2020.1838793.
9. Lee J.-B., Takeshita A., Hayashi K., Hayashi T. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*. *Carbohydrate Polymers*, 2011, vol. 86, no. 2, pp. 995-999, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.05.059.
10. Chaisuwan W., Phimolsiripol Y., Chaiyasit T., Techapun C., Leksawasdi N., Jantanasakulwong K., Rachtanapun P., Wangtueai S., Sommano S.R., You S., Regenstein J.M., Barba F.J., Seesuriyachan P. The Antiviral Activity of Bacterial, Fungal, and Algal Polysaccharides as Bioactive Ingredients: Potential Uses for Enhancing Immune Systems and Preventing Viruses. *Frontiers in nutrition*, 2021, vol. 8, p. 772033, doi: 10.3389/fnut.2021.772033.
11. Trejo-Avila L.M., Morales-Martinez M.E., Ricque-Marie D., Cruz-Suarez L.E., Zapata-Benavides P., Morán-Santibáñez K., Rodríguez-Padilla C.I. In vitro anti-canine distemper virus activity of fucoidan extracted from the brown alga *Cladophora okamurae*. *Virusdisease*, 2014, vol. 25, no. 4, pp. 474-480, doi: 10.1007/s13337-014-0228-6.
12. Pereira L. *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2018, 560 p., doi: 10.1201/9781315152844.
13. Claus-Desbonnet H., Nikly E., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S., Pierre G., Benbassat N., Katsarov P., Michaud P., Lukova P., Delattre C. Polysaccharides and Their Derivatives as Potential Antiviral Molecules. *Viruses*, 2022, vol. 14, 426, doi: 10.3390/v14020426.
14. Wu G.-J., Shiu S.-M., Hsieh M.-C., Tsai G.-J. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. *Food Hydrocoll.*, 2016, vol. 53, pp. 16-23, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.019.
15. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.*, 1971, vol. 35, no. 3, pp. 235-241, doi: 10.1128/MMBR.35.3.235-241.1971.
16. Condit R.C. Principles of Virology. Lippincott, Williams & Wilkins. *Fields Virology*, 2013, vol. 1, pp. 21-51.

17. Clausen T.M., Sandoval D.R., Spliid C.B., Pihl J., Perrett H.R., Painter C.D., Narayanan A., Majowicz S.A., Kwong E.M., McVicar R.N. et al. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 1043-1057.e15, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.033.
18. Cantuti-Castelvetri L., Ojha R., Pedro L.D., Djannatian M., Franz J., Kuivanen S., Kallio K., Kaya T., Anastasina M., Smura T. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 2020, vol. 370, pp. 856-860, doi: 10.1125/science.abd2985.
19. Gudowska-Sawczuk M., Mroczko B. The Role of Neuropilin-1 (NRP-1) in SARS-CoV-2 Infection: Review. *J. Clin. Med.*, 2021, vol. 10, p. 2772, doi: 10.3390/jcm10132772.
20. Endeshaw Chekol Abebe, Teklie Mengie Ayele, Zelalem Tilahun Muche, Tadesse Asmamaw Dejen. Neuropilin 1: A Novel Entry Factor for SARS-CoV-2 Infection and a Potential Therapeutic Target. *Biologics: Targets and Therapy*, 2021, vol. 15, pp. 143-152, doi: 10.2147/BTT.S307352.
21. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J.-Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X.-X., Gong L. et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2020, vol. 5, p. 283, doi: 10.1038/s41392-020-00426-x.
22. Zhou Y.Q., Wang K., Wang X.Y., Cui H.Y., Zhao Y., Zhu P., Chen Z.N. SARS-CoV-2 pseudovirus enters the host cells through spike protein-CD147 in an Arf6-dependent manner. *Emerg. Microbes Infect.*, 2022, vol. 11, no. 1, pp. 1135-1144, doi: 10.1080/22221751.2022.2059403.
23. Zhang Q., Xiang R., Huo S., Zhou Y., Jiang S., Wang Q., Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2021, vol. 6, p. 233, doi: 10.1038/s41392-021-00653-w.
24. Gu Y., Cao J., Zhang X., Gao H., Wang Y., Wang J., He J., Jiang X., Zhang J., Shen G. et al. Receptome profiling identifies KREMEN1 and ASGR1 as alternative functional receptors of SARS-CoV-2. *Cell Res.*, 2022, vol. 32, pp. 24-37, doi: 10.1038/s41422-021-00595-6.
25. Hoffmann M., Pohlmann S. Novel SARS-CoV-2 receptors: ASGR1 and KREMEN1. *Cell Res.*, 2022, vol. 32, pp. 1-2, doi: 10.1038/s41422-021-00603-9.
26. Mekawy A.S., Alaswad Z., Ibrahim A.A., Mohamed A.A., AlOkda A., Elserafy M. The consequences of viral infection on host DNA damage response: a focus on SARS-CoVs. *J. Gen. Eng. Biotech.*, 2022, vol. 20, p. 104, doi: 10.1186/s43141-022-00388-3.
27. Panico P., Ostrosky-Wegman P., Salazar A.M. The potential role of COVID-19 in the induction of DNA damage. *Mut. Res.-Rev. Mut. Res.*, 2022, vol. 789, p. 108411, doi: 10.1016/j.mrrev.2022.108411.
28. Sokullu E., Pinard M., Gauthier M.S., Coulombe B. Analysis of the SARS-CoV-2-host protein interaction network reveals new biology and drug candidates: focus on the spike surface glycoprotein and RNA polymerase. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2021, vol. 16, no. 8, pp. 881-895, doi: 10.1080/17460441.2021.1909566.
29. Eskandarzade N., Ghorbani A., Samarfard S., et al. Network for network concept offers new insights into host-SARS-CoV-2 protein interactions and potential novel targets for developing antiviral drugs. *Comput. Biol. Med.*, 2022, vol. 146, p. 105575, doi: 10.1016/j.compbimed.2022.105575.
30. Li T., Wen Y., Guo H., Yang T., Yang H., Ji X. Molecular Mechanism of SARS-CoVs Orf6 Targeting the Rae1-Nup98 Complex to Compete With mRNA Nuclear Export. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, vol. 8, doi: 10.3389/fmolb.2021.813248.
31. Andre S., Picard M., Cezar R., Roux-Dalvai F., Alleaume-Butaux A., Soundaramourty C., Santa Cruz A., Mendes-Frias A., Gotti C., Leclercq M. T cell apoptosis characterizes severe Covid-19 disease. *Cell Death & Differentiation*, 2022, doi: 10.1038/s41418-022-00936-x.
32. Generalov E.A. A water-soluble polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L.: Radioprotective, colony-stimulating, and immunomodulating effects. *Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 60-65, doi: 10.1134/S0006350915010121.
33. Generalov E.A. Spectral characteristics and monosaccharide composition of an interferon-inducing antiviral polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. *Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 53-59, doi: 10.1134/S000635091501011X.
34. Chiba S., Ikushima H., Ueki H., Yanai H., Kimura Y., Hangai S., Nishio J., Negeshi H., Tamura T., Saijo S. et al. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife*, 2014, vol. 3, e04177, doi: 10.7554/eLife.04177.
35. Moss W.C., Irvine D.J., Davis M.M., Krummel M.F. Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 23, pp. 15024-15029, doi: 10.1073/pnas.192573999.
36. Drummond R., Dambuza I., Vautier S., Taylor J.A., Reid D.M., Bain C.C., Underhill D.M., Masopust D., Kaplan D.H., Brown G.D. CD4+ T-cell survival in the GI tract requires dectin-1 during fungal infection. *Mucosal Immunol.*, 2016, vol. 9, pp. 492-502, doi: 10.1038/mi.2015.79.
37. Ferreira-Gomes M., Wich M., Bode S., Hube B., Jacobsen I., Jungnickel B. B Cell Recognition of *Candida albicans* Hyphae via TLR 2 Promotes IgG1 and IL-6 Secretion for TH17 Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 2021, vol. 12, p. 698849, doi: 10.3389/fimmu.2021.698849.
38. Osorio F., LeibundGut-Landmann S., Lochner M., Lahl K., Sparwasser T., Eberl G., Reis e Sousa C. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur. J. Immunol.*, 2008, vol. 38, no. 12, pp. 3274-3281, doi: 10.1002/eji.200838950.

39. Generalov E.A., Levashova N.T., Sidorova A.E., Chumakov P.M., Yakovenko L.V. An autowave model of the bifurcation behavior of transformed cells in response to polysaccharide. *Biophysics*, 2017, vol. 62, pp. 717-721, doi: 10.1134/S0006350917050086.

POSSIBLE MOLECULAR MECHANISMS OF POLYSACCHARIDES ACTION IN VIRAL DISEASES

Generalov E.A., Simonenko E.Yu., Yakovenko L.V.

M.V. Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: generals1179@gmail.com

Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0570

Abstract. Over the past decades, numerous studies have established that polysaccharides obtained from various sources have a wide range of biological activities, including antiviral action. This paper presents data mainly on the antiviral activity of polysaccharides and intracellular signaling pathways that may be involved in its manifestation, some sources and types of polysaccharides, features of their composition and structure, and the main types of their biological activities are mentioned. In connection with the COVID-19 pandemic, the features of the causative agent of this disease, the SARS-CoV-2 virus, its interactions with cell receptors, the molecular mechanisms of the consequences of the disease and the possible medicinal effect of polysaccharides in this disease are considered in more detail. In prospect, natural polysaccharides may prove to be effective therapeutic agents for various viral diseases, perhaps more effective and without side effects in comparison with traditional antiviral drugs.

Key words: polysaccharides, biological activity, antiviral effect, viral diseases, SARS-CoV-2.

КОНТРАСТНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И МИКРОДВИЖЕНИЯ ГЛАЗ КАК МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ И РЕАДАПТАЦИИ В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ГРАВИТАЦИИ

Шошина И.И.¹, Зеленская И.С.², Бекренева М.П.², Ляпунов С.И.³, Ляпунов И.С.³, Котова Д.А.¹, Томиловская Е.С.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7-9, г. Санкт-Петербург, 196034, РФ; e-mail: i.shoshina@spbu.ru

² Институт медико-биологических проблем РАН
Хорошевское ш., 76А, г. Москва, 123007, РФ

³ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН
ул. Вавилова 38, г. Москва, 119991 ГСП-1, РФ

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0571

Аннотация. Визуальное восприятие играет решающую роль в обеспечении мозга информацией, необходимой для принятия решений, построения картины мира и адаптации к изменяющимся условиям среды. В условиях «сухой» иммерсии, моделирующей эффекты невесомости на организм человека, исследовали контрастную чувствительность и треморные движения глаз при изменении условий среды. В исследовании приняли участие 10 добровольцев-испытателей (средний возраст $30,8 \pm 4,6$ лет). Контрастную чувствительность зрительной системы регистрировали с помощью метода визоконтрастометрии. Предъявляли элементы Габора с пространственной частотой: 0,4; 0,8; 1,0; 3,0; 6,0 и 10,0 цикл/град. Параметры микродвижений глаз – амплитуду и частоту треморных колебаний глаз регистрировали с помощью оптической системы, обеспечивающей высокочастотную видеосъемку. Измерения проводили за день до погружения в иммерсионную ванну (фон), на 1, 3, 5 и 7 дни «сухой» иммерсии (СИ), а также на следующий день после ее окончания. Установлено изменение контрастной чувствительности в диапазоне низких и высоких пространственных частот, а также амплитуды микродвижений глаз. Полученные данные на сегодняшний день являются новым шагом в поиске методов объективной оценки функционального состояния при изменении условий среды.

Ключевые слова: контрастная чувствительность, микротремор глаз, иммерсия, гравитация, адаптация.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий довольно глубоко исследованы физиологические последствия влияния на организм человека условий космического полета, в частности невесомости, однако предстоит еще большая работа по изучению адаптации мозга к условиям микрогравитации [1-3]. Неоднократно показано, что оперативная деятельность членов экипажа может быть нарушена из-за пространственной дезориентации, иллюзий восприятия, укачивания, нарушений равновесия и сенсомоторного контроля, возникающих при смене условий гравитации [1-8].

Визуальное восприятие играет решающую роль в обеспечении мозга информацией, необходимой для принятия решений, построения картины мира и адаптации к изменяющимся условиям среды. Контрастная чувствительность – фундаментальная характеристика зрительного восприятия, отражающая процессы обработки информации на уровне сенсорного входа. Контрастная чувствительность преимущественно регистрируется в ответ на паттерны из чередующихся светлых и темных полос с размытыми краями (синусоидальные решетки), с распределением света, интенсивность которого изменяется в соответствии с синусоидальной функцией. Контрастная чувствительность – величина обратная пороговому контрасту, отличающаяся для разных пространственных частот. Пространственная частота – величина, обратная количеству светлых и темных полос на единицу длины. Синусоидальные решетки, по поверхности которых интенсивность света меняется медленно (черные и белые полосы широкие), содержат низкие пространственные частоты. В случае, когда интенсивность света меняется быстро, решетка состоит из большого количества узких черных и белых полос, говорят, о решетке с высокими пространственными частотами.

Согласно теории пространственно-частотной фильтрации информации, зрительная система представлена совокупностью каналов, специфичных к восприятию определенного спектра пространственных частот [9]. Основные из них – крупноклеточные магноцеллюлярные и мелкоклеточные парвоцеллюлярные каналы или системы [10]. На корковом уровне магно- и парвоцеллюлярные каналы дают начало, соответственно, дорзальному и вентральному потокам передачи информации из каудальных во фронтальные отделы коры, взаимодействие которых обеспечивает целостность зрительного восприятия [11,12]. Характеристики нейронов магно- и парвоцеллюлярной систем определяют особенности восприятия информации (пространственно-частотной фильтрации) на входе и высокоуровневых когнитивных процессов [11,13,14].

Тремор глазных движений наряду с дрейфом характеризует межсаккадические периоды фиксации, когда поступает большая часть информации и происходит детальный анализ изображения. В результате тремора ось глаза описывает эллипсоподобные фигуры. Средняя амплитуда треморных колебаний глаз составляет 20"–40", частота 87 Гц. Теория треморно-модуляционного сигнала (ТМС) описывает взаимосвязь между показателями контрастной чувствительности и микродвижений глаз [15–18].

В наземных условиях для моделирования физиологических эффектов невесомости успешно используется метод «сухой» иммерсии (СИ) [19]. Физиологические эффекты невесомости в этом случае моделируются созданием условий безопорности и гиподинамии.

Гипотеза исследования – параметры зрительного восприятия являются объективными показателями функционального состояния при изменении условий гравитации (гравитация-микрогравитация-гравитация).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

К участию в исследовании врачебно-экспертной комиссией были допущены десять добровольцев-испытателей (средний возраст $30,8 \pm 4,6$ года).

Контрастную чувствительность зрительной системы регистрировали с помощью метода визоконтрастометрии в диапазоне низких, средних и высоких пространственных частот [7,8], к восприятию которых в разной степени специфичны нейроны магно- и парвоцеллюлярной систем, формирующих дорзальный и вентральный потоки [12]. Исходили из того, что нейроны магноцеллюлярной системы более специфичны к восприятию низких пространственных частот, парвоцеллюлярной системы – высоких пространственных частот [11]. Так как средние пространственные частоты обрабатываются нейронами обеих систем, контрастную чувствительность в этих пространственных частотах рассматривали, как меру рассогласования их взаимодействия.

В качестве стимулов использовали элементы Габора, которые представляют собой синусоиду, умноженную на функцию Гаусса. Элемент Габора описывается выражением (для вертикальной ориентации элемента):

$$f(x, y, \sigma, v, \varphi) = \sin(2\pi vx + \varphi) \times e^{\frac{-(x_2 + y_2)}{2 \times \sigma_2}} \quad (1)$$

где x, y – координаты на изображении, σ – стандартное отклонение, v – пространственная частота, φ – фаза (в изображениях, синтезируемых программой, $\varphi = -\pi/2$).

Предъявляли элементы Габора с пространственной частотой: 0,4; 0,8; 1,0; 3,0; 6,0 и 10,0 цикл/град на экране монитора Toshiba Satellite A200-1M8, Intel® Core™2 Duo - T7100 1800 МГц/1024 Мб, дисплей 15,4" TFT WXGA активная матрица повышенной яркости (Toshiba TruBrite), разрешение 1024*600 пикселей, частота обновления 60 Гц. Стимулы выводили в случайном порядке слева или справа от центра экрана (рис. 1). Для предъявления стимулов и регистрации контрастной чувствительности использовали компьютерную программу, позволяющую формировать тестовые изображения на мониторе любого типа без предварительной его калибровки. Для передачи яркостного профиля тестовых изображений в программе использованы вариации плотности случайно расположенных на черном фоне белых точек. Измерение порогового контраста реализовано с помощью адаптивной "лестничной" процедуры [7,8,13]. При анализе данных к диапазону низких пространственных частот относили частоты 0,4 и 0,8 цикл/град, средних – 1,0, и 3,0 цикл/град, высоких частот – 6,0 и 10,0 цикл/град.

Задача испытуемого состояла в том, чтобы нажать на правую кнопку мыши, если он видит изображение справа, левую кнопку, – если слева. Выбор просили делать и тогда, когда испытуемый не был уверен, что видит тестовое изображение.

Измерения контрастной чувствительности и показателей микротремора глаз проводили за день до погружения в иммерсионную ванну (фон), на 1, 3, 5 и 7 дни «сухой» иммерсии (СИ), а также на следующий день после ее окончания (R1). Параметры микродвижений глаз – амплитуду (A_t) и частоту (f_t) треморных колебаний глаз регистрировали с помощью оптической системы, позволяющей осуществлять высокочастотную видеосъемку [19]. Разрешающая способность видеосъемки 960 fps. Анализ показателей микротремора глаз

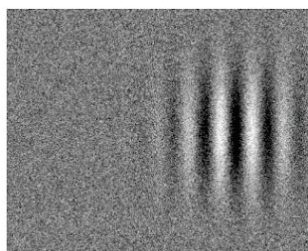


Рисунок 1. Пример изображений элементов Габора, предъявляемых в исследовании по оценке контрастной чувствительности зрительной системы

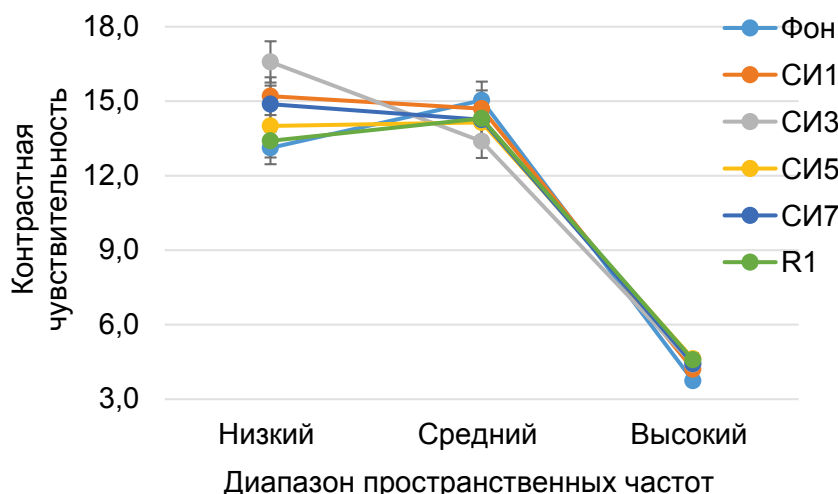


Рисунок 2. Контрастная чувствительность зрительной системы в различных диапазонах пространственных частот в модельном эксперименте с «сухим» погружением

осуществляли по частотности попадания колебаний микродвижений глаз в условно выделенные диапазоны частоты тремора, что позволяло получить более детальное представление о спектральных характеристиках микротремора. За 1 принимали общее количество видеок кадров. Для измерения контрастной чувствительности иммерсионную ванну с установленным на ней на расстоянии 1,5 метров от испытателя монитором, накрывали плотной черной тканью, не пропускающей солнечный свет. Монитор был установлен так, чтобы уровень расположения глаз испытателя примерно соответствовал середине экрана. Наблюдение осуществляли бинокулярно. Острота зрения всех испытуемых соответствовала норме.

Статистический анализ достоверности различий выполняли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в программе STATISTICA 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено значимое изменение контрастной чувствительности в диапазоне низких ($p=0,02$) и высоких ($p=0,01$) пространственных частот на третий день «сухого» погружения по сравнению с фоновыми показателями в условиях гравитации (рис. 2).

На следующие сутки после окончания иммерсии контрастная чувствительность в диапазоне низких пространственных частот соответствовала исходным фоновым значениям ($p=0,9$). Полученные данные рассматриваются как свидетельства рассогласования во взаимодействии между магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной системами, что, вероятно, является одним из факторов повышения уровня внутреннего шума зрительной системы.

Для показателей микротремора глаз установлено следующее. На третьи сутки погружения происходило значимое изменение амплитуды тремора в широком диапазоне частот, также как и при переходе из условий микрогравитации к гравитации после окончания погружения (рис. 3). Значимость различий амплитуды для разных диапазонов частот варьировала от $p=0,001$ до $p=0,03$. По показателю частоты микротремора различия наблюдались только для диапазона с частотой тремора до 40 Гц и только между фоновыми значениями и на третий день «сухого» погружения.

Таким образом, наиболее информативными с точки зрения оценки процессов смены функционального состояния при изменении условий гравитации являются параметры амплитуды тремора, по сравнению с частотой тремора.

Функциональная специфика глазодвигательных реакций позволяет использовать их в качестве интегративного показателя состояния ЦНС [21,22]. Полученные данные рассматриваются нами, как свидетельства повышения уровня внутреннего шума зрительной системы при переходе к условиям моделируемой микрогравитации и обратно в результате, в том числе, рассогласования во взаимодействии магно- и парвоцеллюлярной систем, берущих начало от разного типа ганглиозных клеток сетчатки и через соответствующие слои латерального коллатерального тела, передающих информацию к коре головного мозга, где формируют два корковых потока информации из каудальных во фронтальные зоны коры [12]. Нейроны магноцеллюлярной системы формируют дорзальный поток, пролегающий через заднетеменную кору, дополнительное зрительное поле, прилегающее к моторным зонам, и отвечают за восприятие движения, оценку местоположения в пространстве. Нейроны парвоцеллюлярной системы формируют вентральный поток информации из каудальных во фронтальные зоны коры через нижневисочную кору, обеспечивая объектное зрение. Согласованная работа этих систем обеспечивает целостность восприятия и ее нарушение при

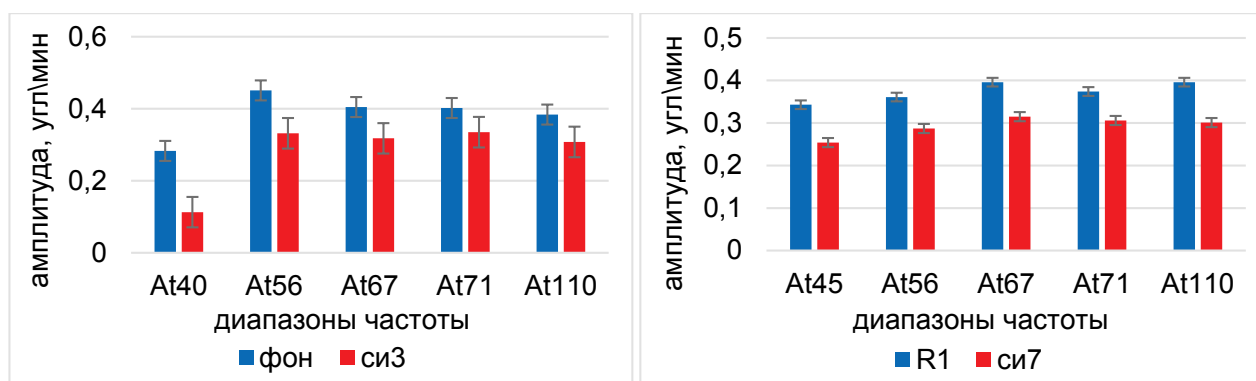


Рисунок 3. Особенности амплитуды треморных движений глаз (At) в модельном эксперименте с «сухим» погружением

рассогласовании взаимодействия. Результаты недавних послеполетных исследований [2] свидетельствуют о реорганизации при длительном отсутствии опоры взаимосвязей между сенсомоторной, зрительной, проприоцептивной и вестибулярной системами. Наиболее заметные изменения включают увеличение связи правой задней супрамаргинальной извилины (области заднетеменной коры) с остальной частью мозга; усиление связей между левой и правой островковыми зонами; снижение сцепления мозжечка со зрительной корой и с правой нижней теменной корой; изменение связей островковых долей обоих полушарий, вестибулярных ядер, правой нижней теменной коры и мозжечка с другими областями, вовлеченными в обеспечение моторных, зрительных, вестибулярных и проприоцептивных функций. Вероятно, что условия безопорности и гиподинамии приводят к редукции обратной афферентации и возникновению конфликта на входе от разных сенсорных модальностей [23], что также является фактором повышения уровня внутреннего шума зрительной системы.

Снижение амплитуды микротремора как в низко- так и высокочастотной составляющей спектра микродвижений глаз при изменении интенсивности опорной афферентации в иммерсии свидетельствует о снижении чувствительности зрительной системы. Изменения глазодвигательной активности при моделировании эффектов микрогравитации в «сухой» иммерсии могут быть результатом недостатка входной афферентации и снижения возбуждающих воздействий со стороны управляющих корковых зон на подкорковые ядра, регулирующие глазные движения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Контрастная чувствительность, в первую очередь, в диапазоне низких пространственных частот и амплитуда треморных микродвижений глаз могут служить в качестве объективных показателей функционального состояния центральной нервной системы при изменении условий среды.

Выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-18-00074).

Список литературы / References:

1. White O., Clement G., Fortrat J.O. et al. Towards human exploration of space: the THESEUS review series on neurophysiology research priorities. *NPJ Microgravity*, 2016, vol. 2, p. 16023, doi: 10.1038/npjmgrav.2016.23.
2. Pechenkova E., Nosikova I., Rumshiskaya A. et al. Alterations of Functional Brain Connectivity After Long-Duration Spaceflight as Revealed by fMRI. *Front. Physiol.*, 2019, vol. 10, p. 761, doi: 10.3389/fphys.2019.00761.
3. Marshall-Goebel K., Damani R., Bershad E.M. Brain physiological response and adaptation during spaceflight. *Neurosurgery*, 2019, vol. 85, pp. E815-E821.
4. Stahn A.C., Riemeier M., Wolbers T. et al. Spatial Updating Depends on Gravity. *Front. Neural Circuits*, 2020, vol. 14, p. 20.
5. Roberts D.R., Stahn A.C., Seidler R.D., Wuyts F.L. Towards understanding the effects of spaceflight on the brain. *Lancet Neurol*, 2020, vol. 19, p. 808.
6. Sosnina I.S., Lyakhovetskii V.A., Zelenskiy K.A. et al. Effects of Five-Day “Dry” Immersion on the Strength of the Ponzo and the Müller-Lyer Illusions. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2019, vol. 49, no. 7, p. 847.
7. Shoshina I., Sosnina I., Zelenskii K., et al. The Contrast Sensitivity of the Visual System in “Dry” Immersion Conditions. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 681-685.
8. Shoshina I., Zelenskaya I., Karpinskaia V., et al. Sensitivity of Visual System in 5-Day “Dry” Immersion With High-Frequency Electromyostimulation. *Frontiers in Neural Circuits*, 2021, p. 702792.
9. Campbell F.W., Robson J.G. Application of Fourier Analyses to the Visibility of Gratings. *J. Physiol*, 1968, vol. 197, p. 551.
10. Nassi J.J., Callaway E.M. Parallel Processing Strategies of the Primate Visual System. *Nat. Rev. Neurosci*, 2009, vol. 10, no 5, p. 360.

11. Шошина И.И., Шелепин Ю.Е. *Механизмы глобального и локального анализа зрительной информации при шизофрении*. СПб.: Изд-во ВВМ, 2016, 300 с. [Shoshina I.I., Shelepin Yu.E. *Mechanisms of global and local analysis of visual information in schizophrenia*. St. Petersburg: Publishing House of VVM, 2016, 300 p. (In Russ.)]
12. Milner A.D. How do the two visual streams interact with each other? *Exp. Brain Res*, 2017, vol. 235, p. 1297.
13. Shoshina I.I., Mukhitova Yu.V., Tregubenko I.A., et al. Contrast Sensitivity of the Visual System and Cognitive Functions in Schizophrenia and Depression. *Human Physiology*, 2021, vol. 47, no. 5, pp. 527-538, doi: 10.1134/S0362119721050121.
14. Isaeva E.R., Tregubenko I.A., Mukhitova Yu.V., Shoshina I.I. Functional States of the Magnocellular and Parvocellular Neural Systems and Cognitive Impairments in Schizophrenia at Different Stages of the Disease. *Russian Psychological Journal*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 74-90, doi: 10.21702/rpj.2021.1.6.
15. Lyapunov S.I. Threshold contrast of the visual system as a function of the external conditions for various test stimuli. *J. Opt. Technol.*, 2014, vol. 81, no. 6, p. 349.
16. Lyapunov S.I. Visual acuity and contrast sensitivity of the human visual system. *J. Opt. Technol.*, 2017a, vol. 84, no. 9, p. 613.
17. Lyapunov S.I. Visual-perception depth of field as a function of external conditions. *J. Opt. Technol.*, 2017, vol. 84, no. 1, p. 16.
18. Lyapunov S.I. Response of the visual system to sine waves under external conditions. *J. Opt. Technol.*, 2018, vol. 85, no. 2, p. 100.
19. Tomilovskaya E., Shigueva T., Sayenko D. et al. Dry Immersion as a Ground-Based Model of Microgravity Physiological Effects. *Front. Physiol.*, 2019, vol. 10, p. 284.
20. Lyapunov S.I., Shoshina I.I., Lyapunov I.S. Tremor Eye Movements as an Objective Marker of Driver's Fatigue. *Human Physiology*, 2022, vol. 48, no. 1, pp. 71-77, doi: 10.1134/S0362119722010091.
21. Кубарко А.И., Лихачев С.А., Кубарко Н.П. *Зрение*. Минск: БГМУ, 2009, т. 2, 352 с. [Kubarko A.I., Likhachev S.A., Kubarko N.P. *Zrenie*. Minsk: BSMU, 2009, vol. 2, 352 p. (In Russ.)]
22. Schwartz S.H. *Visual Perception a clinical orientation*. NY: McGrawHill. 2010, 488 p.
23. Kornilova L.N., Kozlovskaya I.B. Neurosensory mechanisms of space adaptation syndrome. *Hum. Physiol.*, 2003, vol. 29, pp. 527-538, doi: 10.1023/A:1025899413655.

CONTRAST SENSITIVITY AND EYE MICROTREMOR AS MARKERS OF ADAPTATION AND READAPTATION IN A MODEL EXPERIMENT TO STUDY THE INFLUENCE OF GRAVITY CHANGES

Shoshina I.I.¹, Zelenskaya I.S.², Bekreneva M.P.², Lyapunov S.I.³, Lyapunov I.S.³, Kotova D.A.¹, Tomilovskaya E.S.²

¹ Saint Petersburg State University
Universitetskaya 7-9, St. Petersburg, 196034, Russia; e-mail: i.shoshina@spbu.ru

² Institute for Biomedical Problems, RAS
Khoroshevskoe 76A, Moscow, 123007, Russia

³ A.M. Prokhorov Institute of General Physics, RAS
Vavilova 38, Moscow, 119991 GSP-1, Russia

Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0571

Abstract. Visual perception plays a crucial role in providing the brain with the information it needs to make decisions, build a picture of the world, and adapt to changing environmental conditions. Under conditions of "dry" immersion, which simulates the effects of weightlessness on the human body, contrast sensitivity and tremor eye movements were studied under changing environmental conditions. The study involved 10 volunteers (mean age 30.8±4.6 years). The contrast sensitivity of the visual system was recorded using the method of visiocontrastometry. We presented the Gabor elements with a spatial frequency: 0.4; 0.8; 1.0; 3.0; 6.0 and 10.0 cycle/deg. The parameters of eye micromovements, i.e., the amplitude and frequency of eye tremor oscillations, were recorded using an optical system providing high-frequency video recording. The measurements were carried out the day before immersion in the immersion bath, on days 1, 3, 5, and 7 of "dry" immersion, as well as the next day after its completion. A change in contrast sensitivity in the range of low and high spatial frequencies, as well as in the amplitude of eye micromovements, was established. The data obtained today are a new step in the search for methods for an objective assessment of the functional state under changing environmental conditions.

Key words: contrast sensitivity, eye microtremor, immersion, gravity, adaptation.

**НОВЫЕ ВАРИАНТЫ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА.
АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ**
**Шумаев К.Б.^{1,2}, Космачевская О.В.¹, Топунов А.Ф.¹, Грачев Д.И.^{2,3}, Насыбуллина Э.И.¹,
Пугаченко И.С.¹, Рууге Э.К.^{2,3}**

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Ленинский просп., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова Минздрава России
ул. 3-я Черепковская, 15а, г. Москва, 121552, РФ

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: tomorov@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0572

Аннотация. Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются важными метаболитами оксида азота (NO), обладающими широким спектром биологической активности. Свойства этих комплексов определяют не только NO-лиганды, но и другие компоненты, входящие в их состав. С помощью спектроскопии ЭПР было показано, что железо в ДНКЖ может быть связано с карнозином, L-эрготионеином и аденозиндифосфатом (АДФ). Установлено, что наиболее эффективно новые варианты динитрозильных комплексов железа образуются с участием нитроксильного аниона, который является продуктом одноэлектронного восстановления NO. В модельных системах показано, что ДНКЖ связанные с карнозином и эрготионеином снижают уровень различных свободных радикалов. В частности, эти варианты ДНКЖ перехватывают супероксидный анион-радикал, который является предшественником других активных форм кислорода и азота. Вместе с тем, ДНКЖ связанные с карнозином уменьшают концентрацию органических свободных радикалов в системе содержащей нитроксильный анион, ионы железа и гидропероксид трет-бутила. С другой стороны, ДНКЖ связанные с эрготионеином и АДФ могут играть важную роль в защите митохондрий. Можно предположить, что новые варианты ДНКЖ являются компонентами антиоксидантных систем, локализованных в различных тканях организма. Также, они могут функционировать в качестве редокс-зависимых переключателей, регулирующих ответ клетки на окислительный стресс.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, свободные радикалы, спектроскопия ЭПР.

Считается, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются важными физиологическими производными оксида (NO) [1,2]. В настоящее время наиболее хорошо изучены ДНКЖ лигандами которых наряду с NO являются низкомолекулярные или связанные с белками тиолы. Известно, что эти ДНКЖ обладают широким спектром биологической активности, в том числе они способны функционировать в качестве переносчиков и доноров NO, а также эффективных антиоксидантов [3-6]. Вместе с тем, железо в динитрозильных комплексах может быть координировано с фосфатными анионами, азотом имидазольного кольца гистидина и другими молекулами [1-3,5].

В нашей работе с использованием спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было показано, что лигандами ДНКЖ может быть карнозин (бета-аланил-L-гистидин), L-эрготионеин и АДФ. Нужно отметить, что в отличие от известных тиол-содержащих динитрозильных комплексов железа в формировании новых вариантов парамагнитных ДНКЖ может участвовать нитроксильный анион (NO⁻), который является продуктом одноэлектронного восстановления NO [7]. Роль карнозина и L-эрготионенина в биологических системах до конца не ясна. Тем не менее, эти соединения накапливаются в некоторых тканях в миллимолярных концентрациях и перехватывают активные формы кислорода (АФК). Предполагают, что они защищают клетки от окислительного стресса, развивающегося в ходе многих патофизиологических процессов [8,9]. Известно, что ДНКЖ с тиольными лигандами перехватывают супероксидный анион-радикал и другие свободные радикалы с чем связывают их антиоксидантные свойства.

На рисунке 1 представлена кинетика образования связанных с карнозином ДНКЖ в реакционной среде, содержащей этот дипептид, ионы железа и донор NO⁻ - соль Анджели. Видно, что после добавления в среду ферментативной системы генерации супероксидного анион-радикала (ксантин+ксантиноксидаза) происходит падение уровня карнозиновых ДНКЖ, но достаточно быстро уровень этого парамагнитного комплекса снова начинает увеличиваться. Следует отметить, что в реакциях NO⁻ с молекулярным кислородом или NO с супероксидом (O₂^{•-}) образуется такой сильный окислитель как пероксинитрит (ONOO⁻):



Действительно, ранее нами было показано, что ДНКЖ связанные с гемоглобином эффективно утилизируют ONOO⁻ [6]. По всей видимости, карнозиновые ДНКЖ также способны нейтрализовать этот окислитель.

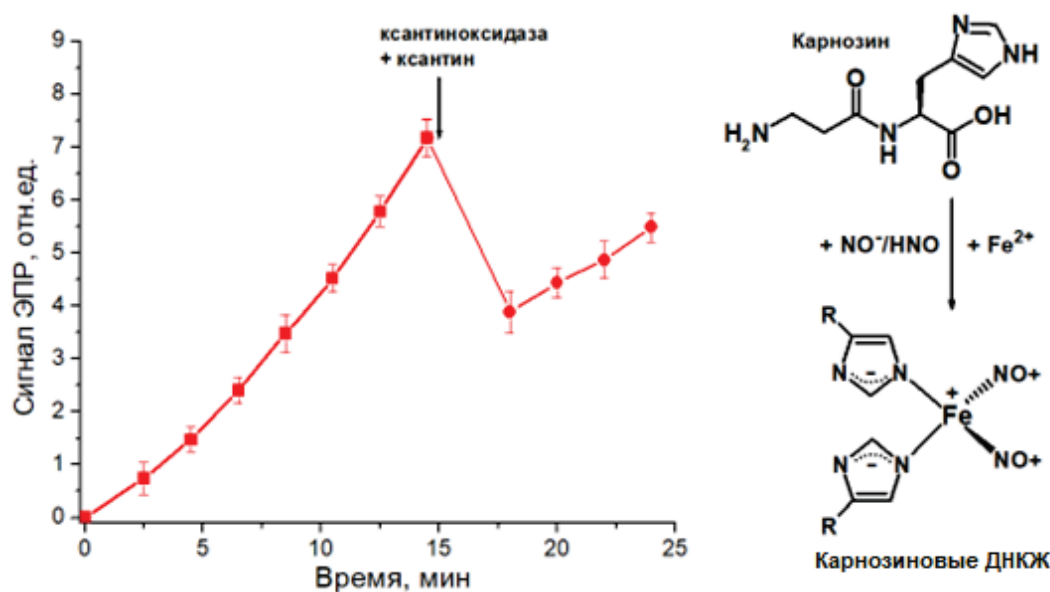


Рисунок 1. Кинетика образования ДНКЖ с карнозиновыми лигандами. Реакционная среда содержала 75 мМ карнозина, 1 мМ FeSO_4 , 5 мМ соли Анджели и 120 мМ Нерес буфер (pH 7,6). На рисунке также приведена схема формирования карнозиновых ДНКЖ. Спектры ЭПР снимались при комнатной температуре и аэрации образцов (образцы помещались в газопроницаемые капилляры и далее кварцевую трубку в резонаторе ЭПР-спектрометра через которую продували воздух)

Предполагают, что механизм утилизации супероксида и пероксинитрита при взаимодействии с ДНКЖ заключается в формировании интермедиатов содержащих связанный ONOO, распадающихся далее без образования свободных радикалов [5,6].

В модельной системе, содержащей Нерес буфер, соль Анджели, гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH) и ионы двухвалентного железа образуются органические свободные радикалы (рис. 2). Скорее всего в этих условиях при распаде органического гидропероксида образуются алкоксильные радикалы (*t*-BO $\cdot$), которые далее окисляют Нерес до свободных радикалов. Вместе с тем, при добавлении в эту систему карнозина приводит к формированию ДНКЖ и ингибированию продукции свободных радикалов.

В наших экспериментах антиоксидантный эффект карнозиновых ДНКЖ может быть обусловлен как перехватыванием алкоксильных радикалов, так и включением в состав комплексов ионов железа. Известно, что

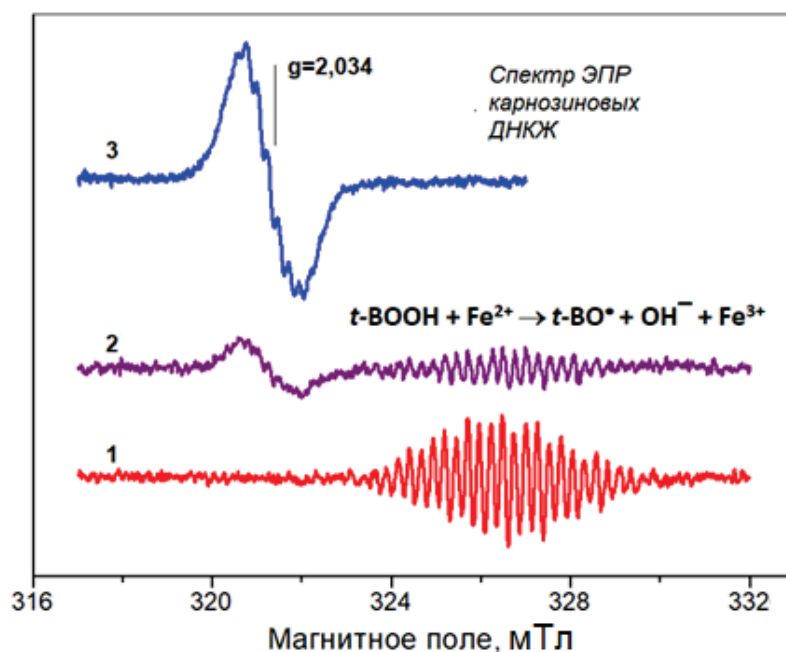


Рисунок 2. Спектры ЭПР зарегистрированные в реакционной среде содержащей 1 мМ FeSO_4 , 5 мМ соли Анджели и 120 мМ Нерес буфер и 4 мМ *t*-BOOH (1); то же что (1) + 75 мМ L-карнозина (2); то же что (1) но без *t*-BOOH (3)

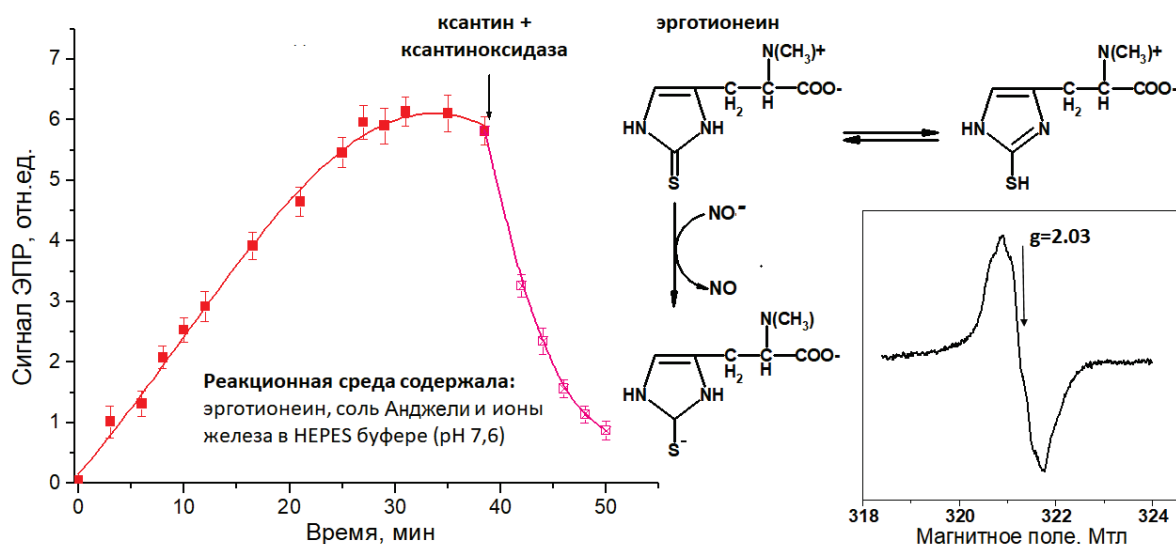


Рисунок 3. Кинетика образования и деструкции ДНКЖ связанных с L-эрготионеином. На врезке представлен спектр ЭПР этих ДНКЖ. Реакционная смесь содержала: 1 mM FeSO₄, 5 mM соли Анджели и 120 mM HEPES буфер и 10 mM L-эрготионеина. Приведена схема возможного восстановления L-эрготионенина NO⁻, в результате чего образуется тиолят-анион, который является эффективным лигандом ДНКЖ

связывание этих редокс-активных ионов в ДНКЖ предотвращает их участие в реакциях Фентоновского типа, в которых переходные металлы катализируют образование свободных радикалов [10].

Из рисунка 3 видно, что ДНКЖ связанные с L-эрготионеином, также разрушаются в условиях ферментативной генерации супероксидного радикала.

Известно, что L-эрготионеин концентрируется в митохондриях [8], которые являются одним из основных источников активных форм кислорода в клетке. На рисунке 3 представлены спектры ЭПР динитрозильных комплексов железа, связанных с АДФ. Можно предположить, что метаболизм этих комплексов также связан с митохондриями, а железо них координировано с пирофосфатной группой.

Нельзя исключить, что ДНКЖ, связанные с L-эрготионеином и АДФ, могут участвовать в защите митохондрий от супероксидного анион-радикала, который генерируется дыхательной цепью этих органелл. Следует отметить, что ранее нами было обнаружено формирование ДНКЖ в изолированных митохондриях из сердца крыс [7].

Таким образом, обнаруженные нами новые варианты ДНКЖ, как и тиолсодержащие комплексы, могут быть компонентами антиоксидантных систем, локализованных в различных тканях организма. Мы также полагаем, что ДНКЖ играют роль низкомолекулярных редокс-триггеров, регулирующих ответ клетки на окислительный

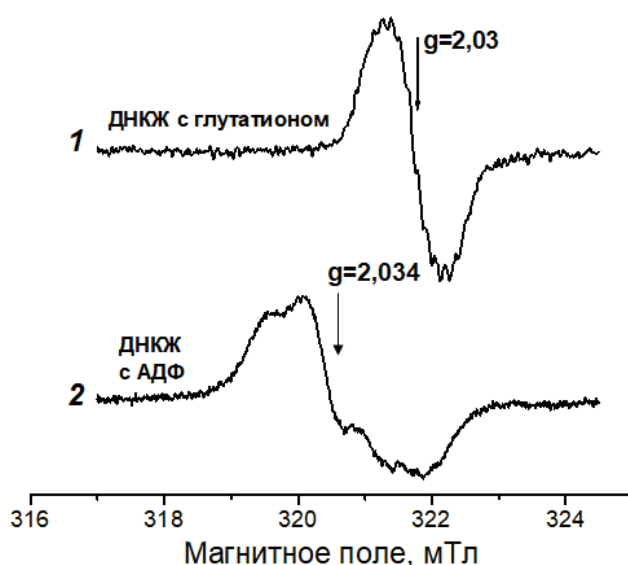


Рисунок 4. Типичный спектр ЭПР глутатионовых ДНКЖ (1), а также спектр ДНКЖ связанных с АДФ (2). Последний спектр был зарегистрирован в реакционной среде содержавшей: 40 mM HEPES буфер (pH 7,6), 0,5 mM FeSO₄, 10 mM соли Анджели и 10 mM АДФ

стресс, причём различные лиганды комплексов позволяют осуществлять тонкую настройку этой регуляции. Кроме того, на основе новых вариантов ДНКЖ могут быть разработаны перспективные фармакологические средства, обладающие комплексным действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Список литературы / References:

1. Lehnert N. et al. The Biologically Relevant Coordination Chemistry of Iron and Nitric Oxide: Electronic Structure and Reactivity. *Chem. Rev.*, 2021, vol. 121, no. 24, pp. 14682-14905.
2. Vanin A.F. Physico-Chemistry of Dinitrosyl Iron Complexes as a Determinant of Their Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 10356.
3. Shumaev K.B. et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 37-46.
4. Shumaev K.B. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, vol. 2019, art. id 2798154, 12 p.
5. Шумаев К.Б. и др. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа. *Биомедицинская химия*, 2021, т. 67, № 2, с. 162-168. [Shumaev K.B. et al. Probable mechanism of antioxidant action of iron dinitrosyl complexes. *Biomedical Chemistry*, 2021, vol. 67, no. 2, pp. 162-168. (In Russ.)]
6. Kosmachevskaya O.V. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes Bound with Hemoglobin on Oxidative Modification by Peroxynitrite. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 13649.
7. Shumaev K.B. et al. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria. *Biofactors*, 2018, vol. 44, no. 3, pp. 237-244.
8. Paul B.D., Snyder S.H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death Differ.*, 2010, vol. 17, no. 7, pp. 1134-1140.
9. Prokopenko et al. Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, vol. 2016, art. id 2939087, 8 p.
10. Li Q. et al. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 29, pp. 19917-19927.

NEW VARIANTS OF DINITROSYL IRON COMPLEXES. ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL EFFECT

Shumaev K.B.^{1,2}, Kosmachevskaya O.V.¹, Topunov A.F.¹, Grachev D.I.^{2,3}, Nasybullina E.I.¹, Pugachenko I.S.¹, Ruuge E.K.^{2,3}

¹ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre of Biotechnology RAS
Leninsky pr-t, 33/2, Moscow, 119071, Russia

² E.I. Chazov National Medical Research Centre of Cardiology
st. 3rd Cherepkovskaya, 15a, Moscow, 121552, Russia

³ Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 1/2, Moscow 119991, Russia; e-mail: tomorov@mail.ru
Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0572

Abstract. Dinitrosyl iron complexes (DNICs) are important metabolites of nitric oxide (NO) with a wide range of biological activity. The properties of these complexes are determined not only by NO-ligands, but also by other components included in their composition. Using EPR spectroscopy, it was shown that iron in the DNICs can be bound to carnosine, L-ergothioneine and ADP. New variants of DNICs are formed with the participation of a nitroxyl anion, which is a product of one-electron reduction of NO. In model systems, DNICs associated with carnosine and ergothioneine reduce the level of various free radicals. These DNICs intercept the superoxide anion radical, which is a precursor to other reactive oxygen and nitrogen species. At the same time, carnosine-bound DNICs reduce the concentration of organic free radicals in a system containing a nitroxyl anion, iron ions and tert-butyl hydroperoxide. On the other hand, DNICs associated with ergothioneine and ADP may play an important role in the protection of mitochondria. It has been suggested that the new DNICs may be components of antioxidant systems localized in various tissues of the body, as well as redox triggers regulating the cellular response to oxidative stress.

Key words: dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, free radical, EPR spectroscopy.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ НАНОКОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ И РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Баушева Д.К.¹, Шилягина Н.Ю.¹, Воденеев В.А.¹, Деев С.М.^{2,3}, Звягин А.В.^{1,3,4}
Гурьев Е.Л.¹

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: bausheva16@mail.ru

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

³ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, г. Москва, 119435, РФ

⁴ Университет Маккуори
Балаклава-Роуд, Маккуори-Парк, Новый Южный Уэльс, Сидней, Австралия

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0573

Аннотация. Тераностика – стремительно развивающаяся область биомедицины, направленная на разработку мультифункциональных агентов, обладающих диагностическими и терапевтическими свойствами одновременно. В данной работе описано получение HER2-специфичных тераностических наноконплексов на основе антистоксовых нанопосфоров и бифункциональных белков. В качестве платформы для сборки мультифункционального комплекса использовали неорганические нанокристаллы структуры ядро/оболочка $\text{NaY}_{0.794}\text{Yb}_{0.2}\text{Tm}_{0.006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$. Показано, что наноразмерные антистоксовые фосфоры (НАФ) обладают выраженными максимумами эмиссии фотолюминесценции в видимой и инфракрасной области спектра, что обеспечивает эффективную прижизненную визуализацию клеток и тканей методами оптического имиджинга. Покрытие НАФ дополнительными оболочками позволяет добиться их коллоидной устойчивости и присоединять к ним дополнительные внешние модули. В качестве терапевтического модуля наноконплексов был использован рекомбинантный адресный токсин DARPIn-LoPE, обладающий специфичной токсичностью в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор HER2. Показано, что тераностический комплекс НАФ-DARPIn-LoPE благодаря направляющему модулю DARPIn, входящему в состав, способен избирательно связываться с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими рецептор HER2.

Ключевые слова: наноразмерные антистоксовые фосфоры, НАФ, DARPIn-LoPE, тераностика, онкология.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день разработка новых методов и подходов для диагностики и терапии рака – одна из наиболее актуальных и активно развивающихся областей медицины. Одним из таких направлений является тераностика — концепция, включающая создание мультифункциональных агентов, обладающих одновременно диагностическими и терапевтическими свойствами [1]. Перспективной платформой для создания тераностических агентов представляются люминесцентные наночастицы (НЧ), обладающие уникальными свойствами, такими как: программируемость физических и химических характеристик в зависимости от размеров, состава и способов получения; наличие химически активных функциональных групп на поверхности, позволяющих модифицировать частицы; большая площадь поверхности, позволяющая присоединять значительное количество функциональных направляющих модулей; оптимальный размер, способствующий, в частности, преимущественному накоплению наночастиц в опухолевой ткани за счет ее морфологических особенностей [2,3].

НЧ активно используются для создания мультифункциональных агентов, снабженных набором компонентов (модулей), способных реализовывать направляющую, диагностическую (визуализирующую) и терапевтическую функции. Для этих целей наиболее перспективными представляются люминесцентные наночастицы, такие как антистоксовые нанопосфоры (наноразмерные антистоксовые фосфоры, НАФ). НАФ – неорганические фотолюминесцентные наночастицы, способные к ап-конверсии света, то есть к преобразованию нескольких фотонов с более низкой энергией в один фотон с более высокой энергией [4]. Люминесцентные наночастицы не только играют роль платформы для сборки комплекса, но и одновременно являются диагностическим модулем. Благодаря различным направляющим модулям, входящим в состав тераностических комплексов, возможно добиться их специфичного взаимодействия с опухолевыми клетками, несущими определённые антигены.

В качестве адресных модулей могут быть присоединены: антитела, укороченные фрагменты антител, альтернативные каркасные белки. В роли терапевтических агентов могут играть радиофармацевтические препараты, фотосенсибилизаторы, агенты для фототермической терапии, агенты для генотерапии [5-7]. Но

особый интерес представляют иммунотоксины, объединяющие в себе характеристики адресных и терапевтических агентов. Примером HER2 иммунотоксинов является DARPIn-LoPE.

Целью данной работы является создание терностических наноконструкций НАФ-DARPIn-LoPE и исследование эффективности адресной доставки HER2-специфичных наноконструкций к целевым опухолевым клеткам SKOVip-kat.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и исследование фотофизических свойств НАФ. В работе использовали НАФ структуры ядро/оболочка $\text{NaY}_{0,794}\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$, синтезированные методом сольватотермического разложения в ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Спектр эмиссии фотолуминесценции (ФЛ) НАФ получали с помощью спектрофлуориметра CM2203 (СОЛАР, Беларусь). ФЛ НАФ возбуждали с помощью внешнего полупроводникового лазера с длиной волны 980 нм (Полупроводниковые приборы, Россия).

Покрывание НАФ оболочкой из СМАОД. Для достижения коллоидной стабильности частиц НАФ покрывали полимером. Для этого к суспензии НАФ в хлороформе добавляли раствор сополимера малеинового ангидрида с 1-октадеценом (СМАОД) в хлороформе, перемешивали и обрабатывали ультразвуком (УЗ). Раствор инкубировали при перемешивании с открытой крышкой до испарения 4/5 объема. В пробирку с фосфатно-солевым буфером (PBS), в объеме 1 мл, добавляли смесь НАФ-СМАОД по 10 мкл, перемешивали, обрабатывали УЗ до полного испарения хлороформа. Суспензию центрифугировали 10 мин при 15000 g, после чего удаляли супернатант. Промывку повторяли дважды.

Присоединение к НАФ-СМАОД молекул ПЭГ и рекомбинантного белка DARPIn-LoPE. Для последовательного присоединения молекул ПЭГ суспензии НАФ-СМАОД центрифугировали в течение 10 мин при 15000g, удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок в буфере MES (100 mM MES pH 4,7), обрабатывали УЗ. Для превращения карбоксильных групп НАФ-СМАОД в аминокислоты, готовили 1M р-р этилендиамина в буфере MES (100 mM MES pH 4,7), добавляли 0,5 мл этого раствора к 0,5 мл суспензии НАФ-СМАОД. Добавляли 1-этил-3-карбодиимид гидрохлорида (EDC), инкубировали 2 ч при комнатной температуре (RT) при перемешивании. Суспензию НАФ-СМАОД трижды отмывали PBS.

Для дальнейших действий НАФ-СМАОД ресуспендировали в PBS. Готовили 10 mM раствор сшивающего реагента сукцинимидил 4-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) в диметилсульфоксиде (ДМСО) (3,34 мг в 0,5 мл), добавляли 50 мкл этого раствора к суспензии НАФ-СМАОД, инкубировали 30 мин при RT при перемешивании. Отмывали в PBS. Готовили раствор ПЭГ в PBS (5 мг в 0,5 мл), добавляли к 0,5 мл суспензии НАФ-СМАОД, инкубировали 30 мин при RT при перемешивании. Суспензию НАФ-СМАОД-ПЭГ трижды отмывали PBS.

Далее НАФ-СМАОД-ПЭГ ресуспендировали в 0,95 мл PBS. Добавляли 50 мкл 10 mM раствора SMCC в ДМСО к суспензии НАФ-СМАОД-ПЭГ. Инкубировали 30 мин при RT при перемешивании. Отмывали в PBS, ресуспендировали в 0,5 мл PBS. Добавили 0,5 мл раствора белка DARPIn-LoPE в PBS (3 мг/мл) к 0,5 мл суспензии НАФ-СМАОД-ПЭГ, инкубировали 30 мин при RT. Комплексы НАФ-СМАОД-ПЭГ-DARPIn-LoPE (НАФ-DARPIn-LoPE) трижды отмывали PBS.

Рекомбинантный белок DARPIn-LoPE, использованный для сборки терностических комплексов, был получен в лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Измерение гидродинамического диаметра и дзета-потенциала НАФ и комплексов. Гидродинамический диаметр НАФ измеряли методом динамического светорассеяния, дзета-потенциал – методом электрофоретического рассеяния света. Для измерения суспензию НАФ перемешивали на вортексе, обрабатывали УЗ, центрифугировали в течение 5 мин при 500g. Супернатант переносили в измерительную кювету, помещали в ячейку прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) и проводили измерение гидродинамического диаметра и дзета-потенциала согласно рекомендациям производителя.

Исследование взаимодействия комплексов с опухолевыми клетками. В качестве целевых клеток использовали клетки аденокарциномы яичника человека линии SKOVip-kat. Данная линия клеток характеризуется стабильной экспрессией дальнекрасного флуоресцентного белка TurboFP635 (Katushka) в цитоплазме ($\lambda_{\text{ex}}=588$ нм, $\lambda_{\text{em}}=635$ нм) и гиперэкспрессией мембраноассоциированного HER2 рецептора. В качестве контроля были использованы клетки аденокарциномы протоков молочной железы человека линии MCF-7 с отсутствием экспрессии рецептора HER2.

Клетки выращивали в культуральных флаконах (Corning, США) объемом 50 мл. Клетки линии SKOVip-kat культивировали в среде McCoy's, клетки MCF-7 в ростовой среде DMEM (HyClone, США), содержащей 10 мкг/мл бычьего инсулина. Росточные среды содержали 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для предотвращения ферментативного удаления поверхностных рецепторов при пассировании снятие клеток с подложки проводили раствором Версена (ПанЭко, Россия), без использования трипсина.

Для исследования эффективности адресной доставки терностических наноконструкций, суспензии клеток высевали на покровные стекла, помещенные в лунки шестилуночного планшета (Corning, США), и культивировали на протяжении 24 ч. Через сутки в инкубационную среду вносили суспензию НАФ-СМАОД-ПЭГ или комплексов НАФ-DARPIn-LoPE до конечной концентрации в среде 0,5 мкг/мл. Затем клетки трижды отмывали в PBS и фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 30 мин при 24°C в темноте.

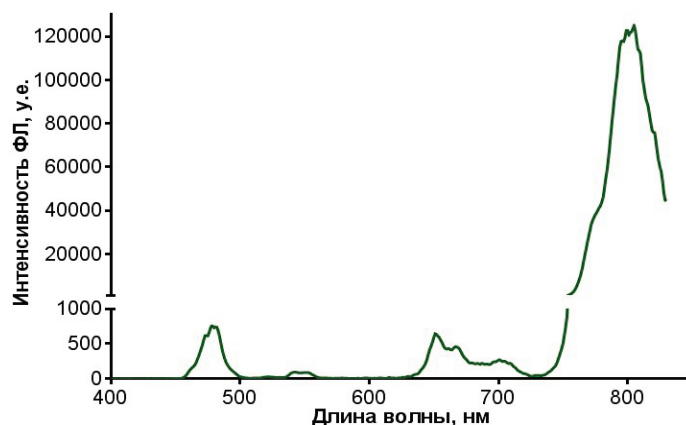


Рисунок 1. Спектр эмиссии ФЛ НАФ состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb:Tm}/\text{NaYF}_4$ при возбуждении светом с длиной волны 980 нм

Формальдегид удаляли, клетки трижды отмывали PBS и один раз деионизованной водой. Покровные стекла вынимали из лунок планшета, подсушивали, помещали в каплю глицерина и запаивали.

Оценку связывания комплексов с поверхностью целевых клеток проводили методом конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии с помощью системы Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO (Carl Zeiss, Германия). Импульсное возбуждение образцов осуществляли титан-сапфировым лазером Chameleon Vision II (Coherent, США) на длине волны 980 нм с частотой повторения 80 МГц и длительностью импульсов ~140 фс. ФЛ сигнал НАФ регистрировали с помощью 32-канального фотодетектора в спектральных диапазонах 446–486 нм и 768–850 нм. ФЛ сигнал НАФ на изображениях клеток количественно оценивали с помощью программы ImageJ (Version 1.47v, National Institutes of Health, США).

Статистика. Выполнение однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) для количественной зависимой переменной по единственной факторной переменной. Использование анализа One-Way ANOVA для исследования разницы значений ФЛ сигнала на изображениях клеток SKOVip-kat после инкубации с комплексами НАФ-DARPin-LoPE от остальных трёх групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами было показано, что НАФ, легированные ионами лантаноидов иттербия и тулия, обладают выраженными максимумами эмиссии ФЛ в видимой (в районе 474 нм) и ближней инфракрасной (ИК) области спектра (в районе 801 нм) при возбуждении светом с длиной волны 980 нм (рис. 1). Что позволяет рассчитывать на чувствительную регистрацию ФЛ сигнала в слое биоткани глубиной до 10 мм [8].

Синтезированные НАФ гидрофобны, так как на их поверхности находятся остатки олеиновой кислоты (ОК). Один из путей получения стабильных водных коллоидов состоит в покрытии НАФ амфифильными полимерами. Гидрофобные части их молекул соединяются с остатками олеиновой кислоты, а гидрофильные части оказываются обращенными к внешней среде, преобразуя частицу в гидрофильную. Покрытие НАФ СМАОД позволяет добиться их коллоидной устойчивости и присоединять к ним дополнительные внешние модули [9].

В результате покрытия СМАОД была получена суспензия гидрофильных НАФ в фосфатно-солевом буфере. Частицы имели на поверхности карбоксильные группы – продукт гидролиза ангидридных групп СМАОД. В качестве второго слоя оболочки было выбрано покрытие ПЭГ, что помогает увеличить время циркуляции частиц в кровеносном русле [10].

Гидродинамический диаметр образца НАФ-СМАОД-ПЭГ, составил 181 ± 11 нм при индексе полидисперсности (PDI) 0,1 (рис. 2).

Для получения комплексов к частицам НАФ-СМАОД-ПЭГ присоединяли адресный токсин DARPin-LoPE, обладающий специфичностью к рецептору эпидермального фактора роста человека HER2 и специфичной токсичностью в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор HER2 [11]. В роли цитотоксичного модуля в составе адресного токсина используется токсин бактериального происхождения LoPE, в молекуле которого инактивировано большинство иммунодоминантных эпитопов В-клеток человека, вследствие чего он обладает сниженной иммуногенностью [12].

Белок DARPin-LoPE содержал единичный остаток цистеина на С-конце полипептидной цепи. Конъюгация сульфгидрильной группы белка DARPin с аминогруппами НАФ-СМАОД-ПЭГ позволяет получать комплексы со строго определённой ориентацией белковых модулей на поверхности частиц. Это в свою очередь помогает сохранить функциональную активность белков и комплексов в целом.

В результате были получены комплексы НАФ-СМАОД-ПЭГ-DARPin-LoPE (далее по тексту НАФ-DARPin-LoPE) со средним гидродинамическим диаметром $234,1 \pm 28,8$ нм (рис. 2). Дзета-потенциал полученного образца комплексов составил -54 ± 9 мВ, что говорит об их коллоидной устойчивости.

Исследование взаимодействия комплексов НАФ-DARPin-LoPE с опухолевыми клетками. Комплексы

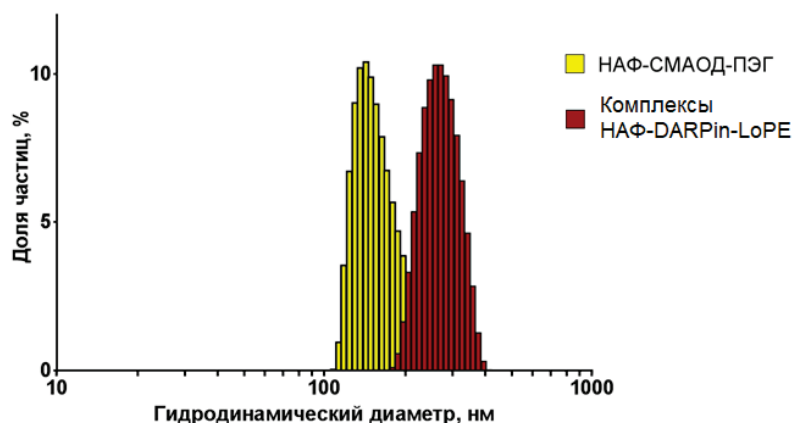


Рисунок 2. Распределение по размерам частиц HAФ-СМАОД-ПЭГ и комплексов HAФ-DARPin-LoPE

HAФ-DARPin-LoPE предназначены для таргетного воздействия на опухолевые клетки благодаря специфическому взаимодействию с молекулами-мишенями на их поверхности. В роли данных молекул выступает рецептор-онкомаркер HER2. Многие типы опухолей эпителиального происхождения имеют на своей поверхности гиперэкспрессированный рецептор HER2. Направляющий белок DARPin, входящий в состав комплекса и обладающий высокой аффинностью к рецептору эпидермального фактора роста, даёт возможность нацеливания комплекса на молекулу-мишень HER2 [12,13].

Для исследования специфичности связывания направленных комплексов HAФ-DARPin-LoPE с рецептором HER2 на поверхности клеток, в роли целевых клеток (HER2+) были использованы клетки аденокарциномы яичника человека SKOVip-kat, а в качестве контрольных (HER2-) использовали клетки аденокарциномы протоков молочной железы человека линии MCF-7.

На полученных микрофотографиях клеток SKOVip-kat (HER2+) после инкубации с комплексами хорошо видно накопление частиц на клетках (рис. 3). На микрофотографиях клеток MCF-7 (HER2-) после инкубации с комплексами накопление частиц в клетках не выражено, частицы располагаются хаотично (рис. 3). После инкубации клеток SKOVip-kat (HER2+) и MCF-7 (HER2-) с ненаправленными частицами HAФ-СМАОД-ПЭГ на поверхности клеток также не наблюдалось специфичного связывания частиц.

Для количественной оценки специфичности связывания комплексов HAФ-DARPin-LoPE с целевыми клетками был выполнен анализ интенсивности ФЛ сигнала HAФ в области расположения клеток на полученных микроскопических изображениях (рис. 4). На графике показано, что разница значений ФЛ сигнала на изображениях клеток SKOVip-kat после инкубации с комплексами HAФ-DARPin-LoPE отличается от остальных трёх групп ($p=0,0033<0,05$), что подтверждает достоверность проведенного исследования.

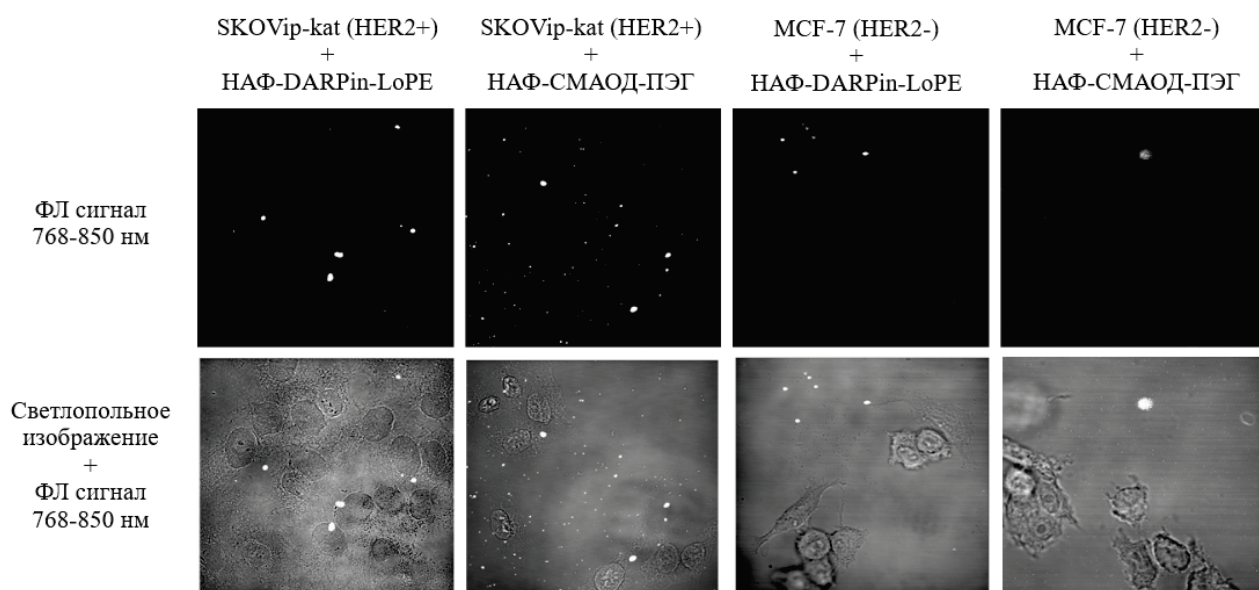


Рисунок 3. Микрофотографии, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии: клетки SKOVip-kat (HER2+) и MCF-7 (HER2-), инкубированные на протяжении 1 ч с комплексами HAФ-DARPin-LoPE и ненаправленными частицами HAФ-СМАОД-ПЭГ

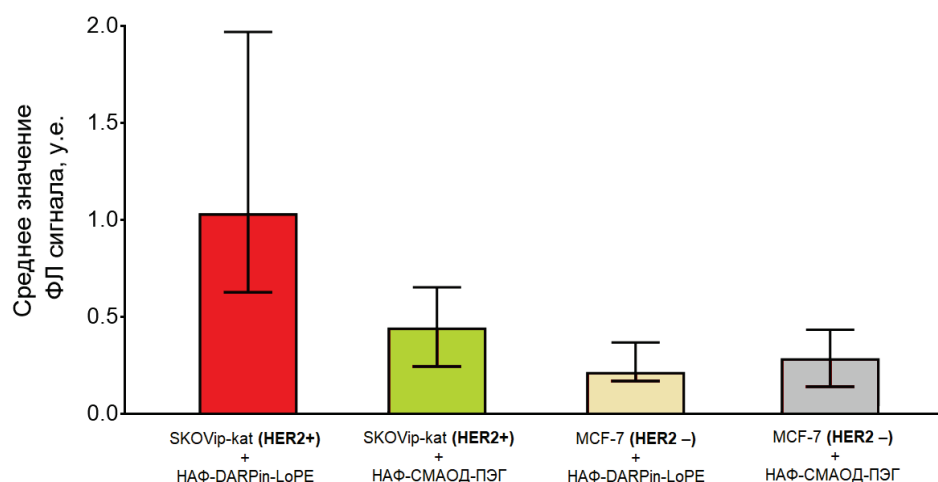


Рисунок 4. Медианы значений интенсивности ФЛ сигнала НАФ в группах изображений клеток SKOVip и MCF-7 после инкубации с комплексами НАФ-DARPin-LoPE и ненаправленными частицами НАФ-СМАОД-ПЭГ. Планки погрешностей представлены интерквартильным размахом

Проведенное исследование показало специфичность накопления комплексов НАФ-DARPin-LoPE на клетках, характеризующихся гиперэкспрессией рецептора-онкомаркера HER2. Это достигается благодаря направляющему модулю DARPin, входящему в состав комплекса. Токсический модуль LoPE в свою очередь, позволит осуществлять направленное токсическое воздействие на целевые опухолевые клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Путём последовательного ковалентного присоединения модулей были получены коллоидно стабильные тераностические наноконструкции НАФ-DARPin-LoPE, обладающие антистоксовой ФЛ и адресной направленностью в отношении HER2-гиперэкспрессирующих опухолевых клеток. Последующее исследование специфичности присоединения полученных комплексов к поверхности опухолевых клеток линии аденокарцинома яичника человека SKOVip-kat, гиперэкспрессирующих рецептор HER2, показали специфичное связывание НАФ-DARPin-LoPE с поверхностью HER2+ клеток SKOVip-kat. Связывание наноконструкций с HER2- клетками MCF-7 было выражено в значительно меньшей степени. Что позволяет заключить, что тераностические комплексы благодаря направляющему модулю DARPin способны избирательно связываться с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими рецептор HER2. Полученные результаты позволяют рассчитывать на применение наноконструкций на основе НАФ и бифункциональных белков для задач тераностики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» ННГУ (Проект № Н-418-99_2022-2023).

Список литературы / References:

1. Jeelani S., Jagat Reddy R.C., Maheswaran T., Asokan G.S., Dany A., Anand B. Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2014, vol. 6, no. suppl. 1, pp. S6-8.
2. Aires A., Ocampo S.M., Cabrera D., Cueva L., Salas G., Teran F.J., Cortajarena A.L. BSA-Coated Magnetic 650 Nanoparticles for Improved Therapeutic Properties. *Journal of Materials Chemistry*, 2015, vol. 3, pp. 6239-6247.
3. Farokhzad O.C., Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 1, pp. 16-20.
4. Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry, and applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 2014, vol. 114, no. 10, pp. 5161-5214.
5. Binz H.K., Amstutz P., Pluckthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotechnology*, 2005, vol. 23, pp. 1257-1268.
6. Dickerson E.B., Dreaden E.C., Huang X.H., El-Sayed I.H., Chu H.H., Pushpanketh S., McDonald J.F., El-Sayed M.A. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Letters*, 2008, vol. 269, pp.57-66.
7. Huh M.S., Lee S.Y., Park S., Lee S., Chung H., Lee S., Choi Y., Oh Y.K., Park J.H., Jeong S.Y., Choi K., Kim K., Kwon I.C. Tumor-homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, 2010, vol. 144, pp. 134-143.
8. Chen G.Y., Shen J., Ohulchanskyy T.Y., Patel N.J., Kutikov A., Li Z.P., Song J., Pandey R.K., Agren H., Prasad P.N., Han G. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, pp. 8280-8287.
9. Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., Zubov V.P., Klinov D.V., Panchenko V.Y., Deyev S.M., Zvyagin A.V.

Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, vol. 18, iss. 7, p. 76004.

10. Andreani T., Souza A.L., Kiill C.P., Lorenzon E.N., Fanqueiro J.F., Calpena A.C., Chaud M.V., Garcia M.L., Gremiao M.P., Silva A.M., Souto E.B. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, vol. 473, no. 1-2, pp. 627-635.

11. Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Лебеденко Г.М., Деев С.М. Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. *Молекулярная биология*, 2015, т. 7, № 3, с. 126-132. [Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko G.M., Deev S.M. Internalization and recirculation of HER2 receptor during interaction of targeted phototoxic protein DARPIn-miniSOG with human breast adenocarcinoma cells. *Russ. Molecular Biology*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 126-132. (In Russ.)]

12. Proshkina G.M., Kiseleva D.V., Shilova, O.N., Ryabova, A.V., Shramova, E.I., Stremovskiy, O.A., Deyev S.M. Bifunctional Toxin DARP-LoPE Based on the Her2-Specific Innovative Module of a Non-Immunoglobulin Scaffold as a Promising Agent for Theranostics. *Journal of Molecular Biology*, 2017, vol. 51, pp. 997-1007.

13. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. HER2-Specific Targeted Toxin DARPIn-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, p. 2399.

SYNTHESIS OF LUMINESCENT THERANOSTIC NANOCOMPLEXES BASED ON UPCONVERSION NANOPARTICLES AND RECOMBINANT PROTEINS

Bausheva D.K.¹, Shilyagina N.Yu.¹, Vodenev V.A.¹, Deev S.M.^{2,3}, Zvyagin A.V.^{1,3,4}, Guryev E.L.¹

¹Lobachevsky University

Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: bausheva16@mail.ru

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Bol'shaya Pirogovskaya st., 2/4, Moscow, Russia, 119435

⁴Macquarie University, Sydney, Australia

Balaclava Rd, Macquarie Park NSW 2109, Sydney, Australia

Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0573

Abstract. Theranostics is a rapidly developing field of biomedicine, aimed at the development of multifunctional agents with diagnostic and therapeutic properties simultaneously. This work describes the production of HER2-specific theranostic nanocomplexes based on upconversion nanoparticles and bifunctional proteins. Inorganic nanocrystals of the $\text{NaY}_{0.794}\text{Yb}_{0.2}\text{Tm}_{0.006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$ core/shell structure were used as a platform for the assembly of the multifunctional complex. Upconversion nanoparticles (UCNP) were shown to have pronounced maxima of photoluminescence emission in the visible and infrared regions of the spectrum, which provides effective in vivo imaging of cells and tissues by optical imaging methods. Covering UCNPs with additional shells allows achieving their colloidal stability and attaching additional external modules to them. The recombinant targeting toxin DARPIn-LoPE, which has specific toxicity against tumor cells expressing the HER2 receptor, was used as a therapeutic module of the nanocomplexes. The theranostic complex NAF-DARPIn-LoPE was shown to be able to selectively bind to tumor cells hyperexpressing the HER2 receptor due to the DARPIn guide module included in its composition.

Key words: upconversion nanoparticles, DARPIn-LoPE, theranostic, oncology.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕВОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Черетаев И.В.

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского
просп. Вернадского, 4, г. Симферополь, 295007, РФ; e-mail: ravaevam@yandex.ru
Поступила в редакцию 12.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0574

Аннотация. В работе рассматриваются показатели тканевого окислительного метаболизма у крыс после 10-тикратного воздействия низкоинтенсивным электромагнитным излучением крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) или миллиметрового (мм) диапазона. Эксперимент проводили на 40 половозрелых крысах-самцах линии *Wistar* массой 200-220 г, которые содержались в условиях вивария с естественным световым режимом. Животных разделили на 2 группы по 20 крыс в каждой. Животные, находящиеся в первой группе, являлись биологическим контролем и подвергались ложному воздействию ЭМИ КВЧ (плацебо), животные второй группы подвергались мм-воздействию в течение 10 сеансов ежедневно, в утреннее время. На 10-е сутки мм-воздействия проводилась регистрация показателей тканевой флуоресценции кожи основания хвоста диагностическим комплексом “ЛАЗМА МЦ” (Модификация ЛАЗМА-МЦ-III, пр-во ООО НПП “ЛАЗМА”, Москва, Россия). Результаты исследования показали, что у крыс, подвергшихся 10-тикратному мм-воздействию наблюдалось повышение значений нормированных амплитуд флуоресценции NADH и увеличение амплитуд FAD на 82,5% ($p \leq 0,05$) и 42,6% ($p \leq 0,05$), а также редокс-потенциала – на 36,9% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем. Эти изменения свидетельствуют, что 10-тикратное воздействие низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ вызывает увеличение вклада аэробного метаболизма у крыс в основном за счёт окислительного фосфорилирования, приводит к активации дыхательной цепи. Можно предположить, что данные перестройки в окислительном метаболизме определяются в первую очередь процессом адаптации микроциркуляторного кровотока к потребностям тканей в питательных веществах и удалению метаболитов.

Ключевые слова: тканевой окислительный метаболизм, низкоинтенсивное миллиметровое излучение, никотинамидадениндинуклеотид, флавинадениндинуклеотид, редокс-потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

Активация процессов перекисного окисления липидов является одним из главных повреждающих факторов при различных стрессорных воздействиях, в том числе и всех патологических процессах в организме [1]. При этом в тканях организма меняется относительная концентрация флуорофоров, к которым относятся вещества, способные к испусканию видимого излучения на разных длинах волн. Наиболее значимыми объектами исследования становятся соединения, являющиеся частью механизма энергетического обмена – восстановленные пиридиннуклеотиды (НАДН, НАДФН) и окисленные флавопротеиды (флавинадениндинуклеотид, ФАД). Каждое из данных соединений характеризуется специфичными конкретно для него спектрами поглощения и эмиссии. В процессе адаптации организма к воздействию повреждающих факторов изменяется морфология тканей, в результате чего изменяются ее спектральные и оптические характеристики, что является точной характеристикой клеточного и тканевого метаболизма [2,3].

Учитывая вышеизложенное, существует необходимость поиска факторов, способных снижать негативное действие повреждающих факторов и нормализовать метаболизм в тканях. Одним из таких физических методов может служить низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ), или миллиметрового (мм) диапазона. Действительно, многочисленные исследования, в том числе и наши [4-7], убедительно свидетельствуют, что низкоинтенсивное мм воздействие обладает выраженной биологической эффективностью. Среди наиболее изученных эффектов ЭМИ КВЧ известны антистрессорный, иммуномодулирующий, антиоксидантный, синхронизирующий, противовоспалительный, антиноцицептивный и некоторые другие. Результаты клинических исследований свидетельствуют и об эффективном использовании ЭМИ КВЧ для лечения заболеваний, в патогенезе которых отмечаются выраженные нарушения процессов окислительного метаболизма, однако они носят в основном описательный характер, в то время как экспериментальный материал практически отсутствует. Поэтому необходимы дополнительные исследования влияния данного физического фактора на процессы тканевого метаболизма, что позволит значительно расширить представления о механизмах его биологического действия и более эффективно использовать ЭМИ КВЧ как с профилактической, так и с терапевтической целью.

Цель работы – установить изменения показателей тканевого окислительного метаболизма у крыс после 10-тикратного воздействия низкоинтенсивным электромагнитным излучением миллиметрового диапазона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена на кафедре физиологии человека и животных и биофизики факультета биологии и химии в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика».

Эксперимент проводили на 40 половозрелых крысах-самцах линии *Wistar* массой 200-220 г, («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»), прошедших карантин не менее 14 дней. Животные содержались в условиях вивария с естественным световым режимом при температуре 18–22°C на подстилке «Рехофикс МК 2000» (на основе початков кукурузы), свободным доступом к воде и полноценному гранулированному корму. Эксперимент был выполнен в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009, правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований.

Для эксперимента были отобраны животные одинакового возраста, характеризующиеся средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью в тесте «открытое поле», которые составляют большинство в популяции. Такой отбор позволил сформировать однородные группы животных с близкими конституционными особенностями, одинаково реагирующих на действие того или иного фактора.

После предварительного отбора животных разделили на 2 группы по 20 крыс в каждой. Животные первой группы являлись биологическим контролем и подвергались ложному воздействию ЭМИ КВЧ (плацебо). При этом соблюдались все условия для облучения животных, но прибор не включался в сеть.

Животные второй группы подвергались действию ЭМИ КВЧ. КВЧ-воздействие на крыс проводилось 10-тикратно, в течение 30 минут ежедневно в утреннее время путем наложения на шейно-воротниковую область волновода аппарата КВЧ-терапии «КВЧ-НД» (рабочая длина волны 7,1 мм, плотность потока мощности облучения – 4-12 мВт/см² (Производство: ООО «Научно-коммерческая фирма РЭСЛА», Россия; Декларация соответствия № РОСС Ru. ME67.Д00227; Рег. удостов. № ФСР 2007/00763 от 18.09.2007).

На 10-е сутки у крыс обеих групп проводилась регистрация показателей тканевой флуоресценции диагностическим комплексом «ЛАЗМА МЦ» (Модификация ЛАЗМА-МЦ-III, пр-во ООО НПП «ЛАЗМА», Москва, Россия). Поскольку данный метод является высокочувствительным, то для сведения к минимуму внешних помех крысу на время записи помещали в прозрачный пенал из оргстекла, ограничивающий подвижность животного. Размер пенала подбирали так, чтобы животное могло свободно дышать, и ни одна часть тела не была плотно зажата. Хвост крысы фиксировали на ровной поверхности на одной линии с телом в горизонтальном положении тканевым пластырем. Оптоволоконный зонд прибора «Лазма-МЦ» также фиксировали тканевым пластырем перпендикулярно у основания хвоста. Сигнал записывали в тот момент, когда животное находилось в спокойном состоянии.

В доплеровском канале ЛАЗМА-МЦ-III использовали лазерный модуль с длиной волны излучения 1064 нм, для инициации флуоресценции применялись источники излучения с длинами волн 365 и 450 нм. Подвод зондирующего излучения и прием обратно отраженного от ткани вторичного излучения осуществляли одним оптическим волоконным зондом с диаметром 3 мм. В канале флуоресцентной спектроскопии диаметры каждого зондирующего и принимающего волокон составляли 400 мкм. Расстояние между источником и приемником устанавливали в пределах 1 мм. Числовая апертура волокон – 0,22. Общий принцип работы зондов диагностического комплекса «ЛАЗМА-МЦ» показан на рисунке 1.

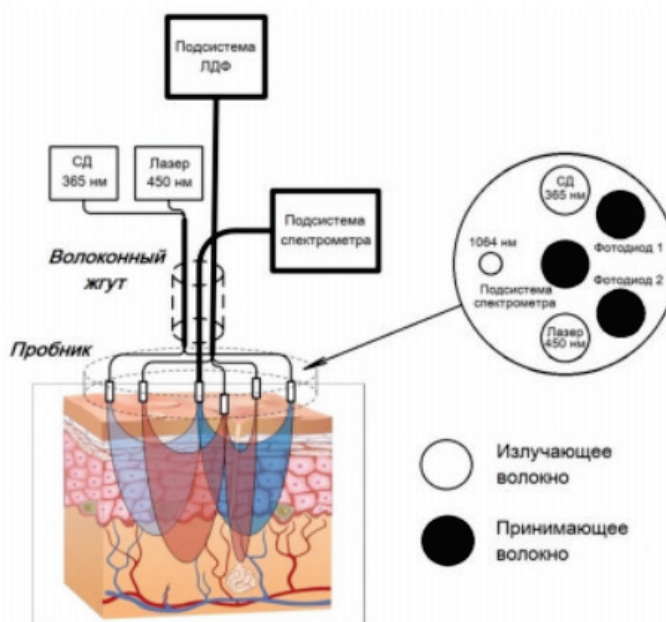


Рисунок 1. Общий принцип работы зондов диагностического комплекса «ЛАЗМА-МЦ»

Метод флуоресцентной спектроскопии позволяет оценить интенсивность окислительного метаболизма *in vivo* за счет прижизненной регистрации содержания в тканях эндогенных флуорофоров, определяющих метаболизм и энергообеспечение клеток путем регистрации переизлучения поглощенной ими энергии.

Для оценки внутриклеточных энергетических обменных процессов методом флуоресцентной спектроскопии оценивали следующие показатели:

- индекс тканевого содержания для восстановленного *NADH*;
- индекс тканевого содержания для окисленной формы *FAD*.
- редокс-соотношение амплитуды флуоресценции *NADH* и амплитуды флуоресценции *FAD*.

Установлено, что восстановленная форма кофермента *NADH* и окисленная форма *FAD*, определенные методом флуоресцентной спектроскопии, пропорциональны локальной клеточной концентрации этих коферментов и являются индикатором состояния метаболического процесса в биоткани [8,9].

При анализе полученных данных мы опирались на следующие сокращения и их значения: *UV* – нормированная амплитуда флуоресценции кофермента НАДН; *B* – нормированная амплитуда флуоресценции ФАД; *PO* – отношение нормированной амплитуды флуоресценции НАДН к нормированной амплитуде флуоресценции ФАД; *Mpm* – среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции; Δ – разница между результатами на разных этапах исследований; % – отношение в процентах между результатами исследований.

Индексы тканевого метаболизма вычисляли по следующей формуле:

$$I^{\lambda_1/\lambda_2} = \frac{\beta I_f^{\lambda_1}}{I \lambda_1^1} + \beta I_f^{\lambda_2}, \quad (1)$$

где I^{λ_1/λ_2} – определяемый индекс тканевого содержания вещества, λ_1 и λ_2 – используемые длины волн (нм) для возбуждения и регистрации флуоресценции соответственно, β – коэффициент ослабления порогового фильтра в приборе [8].

- редокс-отношение или индекс флуоресценции, определяемого по формуле:

$$PO = \frac{I_f NADH}{I_f FAD} \times \frac{I FAD}{I NADH}. \quad (2)$$

Из вышесказанного следует вывод, что редокс-потенциал прямо пропорционально связан с интенсивностью окислительного метаболизма. Клеточный метаболизм, как одна из составных частей микроциркуляторной системы, неинвазивно диагностируется с использованием метода лазерной флуоресцентной спектроскопии. В качестве индикаторов окислительного метаболизма используют данные о флуоресценции следующих коферментов: восстановленный *NADH* (никотинамидадениндинуклеотид) и окисленный *FAD* (флавинадениндинуклеотид), содержащихся в тканях микрососудистого русла. *NADH* транспортирует электроны к молекулярному кислороду, таким образом являясь донором, в то время как *FAD* их присоединяет [9].

Существуют особенности локализации этих веществ в клетке – *FAD* содержится строго в митохондриях, а *NADH* – как в митохондриях, так и в цитоплазме, что обеспечивает выполнение данными коферментами своих функций в дыхательной цепи. Считается, что интенсивность флуоресценции *NADH* в цитоплазме наименее значимо в оптической диагностике. Для стимуляции флуоресценции *NADH* применяют излучение при длине волны 365 нм, спектр флуоресценции *NADH* – около 460-470 нм. Для возбуждения *FAD* применяют излучение при длине волны 450 нм, а спектр флуоресценции *FAD* – около 510-520 нм.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета «STATISTICA – 8.0». Поскольку распределение экспериментальных значений в группах отличалось от нормального, то оценку достоверности межгрупповых различий проводили с помощью U-теста Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, как видно в таблице 1 и на рисунке 2, что у крыс, подвергшихся 10-тикратному КВЧ-воздействию отмечено повышение значений нормированных амплитуд флуоресценции *NADH* и увеличение амплитуд *FAD* на 82,5% ($p \leq 0,05$) и 42,6% ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с таковыми в контрольной группе крыс, показатели которых находились в пределах физиологической нормы.

Известно, что в качестве доноров восстановленной формы *NADH* в клетке рассматривают цикл Кребса, гликолиз и бета-окисление жирных кислот. При этом в коже преобладают первые два, но лишь цикл Кребса отвечает за выработку митохондриального *NADH*, который регистрируется при флуоресцентной микроскопии. *NADH*, выработанный в результате гликолиза в цитоплазме, практически не флуоресцирует [8]. В дальнейшем восстановленная форма этого кофермента попадает в первый белковый комплекс окислительного фосфорилирования, где и подвергается дальнейшему окислению. Стоит отметить, что *NADH*-дегидрогеназный комплекс играет одну из ключевых ролей в клеточном дыхании, обеспечивая 40% протонного градиента для синтеза АТФ.

Окисленная форма *FAD* участвует в реакциях 2-го комплекса окислительного фосфорилирования, а также в глицерол-3-фосфатном комплексе гликолиза. Однако ввиду того, что последний протекает в цитоплазме, существенного отклика от этой формы *FAD* при регистрации методом флуоресцентной спектроскопии не наблюдается, соответственно этим метаболическим путем в настоящем исследовании можно пренебречь.

Таблица 1. Показатели спектроскопической флуоресценции тканей у крыс, подвергшихся 10-тикратному KBЧ-воздействию

Показатели	Группы животных	
	Контрольная	KBЧ-воздействие
<i>NADH</i>	2,47±0,23	3,21±0,13 $p \leq 0,05$
<i>FAD</i>	3,06±0,28	4,54±0,14 $p \leq 0,05$
PO	0,81±0,08	1,08±0,06 $p \leq 0,05$

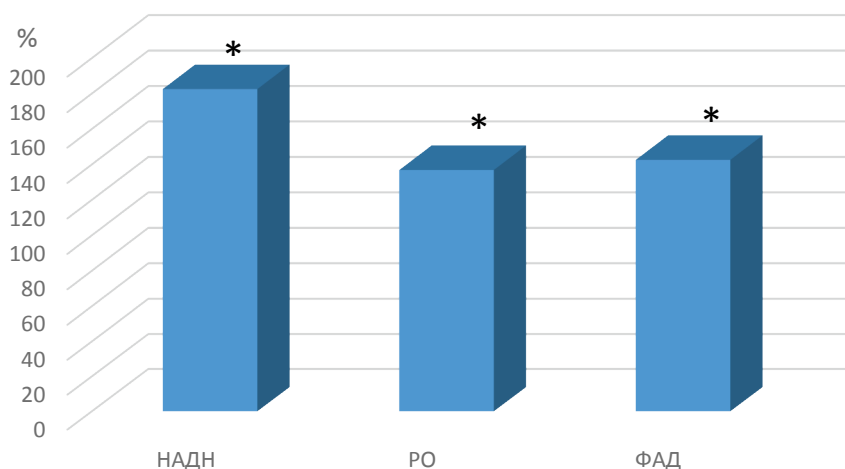
Примечание: достоверность межгрупповых различий – $p \leq 0,05$ по критерию Манна-Уитни; PO – редокс отношение (редокс-потенциал), FAD – флавинадениндуклеотид фосфат, NADH – никотинамидадениндуклеотид фосфат

Следовательно, ведущий механизм, в котором фигурирует окисленная форма *FAD* – 2-й комплекс электрон-транспортной цепи.

Таким образом, увеличение нормированных величин флуоресценции *NADH* и *FAD* под влиянием мм излучения свидетельствует об увеличении вклада аэробного метаболизма у крыс в основном за счёт окислительного фосфорилирования. Регистрируемые колебания концентраций восстановленной формы *NADH* и окисленной формы *FAD* могут быть сложными, а динамика этих колебаний может быть нелинейной в течение всего жизненного цикла клеток.

При проведении оценки функционального состояния митохондрий и активности окислительно-восстановительных процессов в клетке важным индикатором кислородного метаболизма является не только концентрация коферментов – восстановленной формы *NADH* и окисленной – *FAD*, но и их соотношение – редокс-отношение (редокс-потенциал). Именно по величине данного показателя можно говорить о способности веществ отдавать и присоединять электроны, а также о скорости протекания окислительно-восстановительных реакций. Как продемонстрировано в таблице 1 и на рисунке 2, после 10-тикратного KBЧ-воздействия редокс-потенциал увеличился на 36,9% ($p \leq 0,05$) относительно контрольной группы. Повышение редокс-потенциала у крыс так же является свидетельством увеличения окислительного фосфорилирования в тканях.

Увеличение концентрации и интенсивности флуоресценции *NADH* и повышение *FAD* свидетельствует о росте потребности клеток в АТФ и преобладании окислительного фосфорилирования над другими процессами [1]. Для стандартной клетки в нормальных условиях с оптимальным количеством питательных веществ и кислорода повышение потребности в АТФ влечет за собой рост редокс-отношения. Это связано с потерей NADH иона водорода и окисление его до *NAD+* в процессе окислительного фосфорилирования. При гипоксии в условиях недостатка кислорода, который является главным конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий, протекание реакций окислительного фосфорилирования становится практически не осуществимым и наблюдается увеличение концентрации *NADH*. Чтобы обеспечить энергетическую потребность

**Рисунок 2.** Показатели спектроскопической флуоресценции тканей у крыс, подвергшихся 10-тикратному KBЧ-воздействию (в % относительно значений в контрольной группе животных, принятых за 100%). Об* – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни; PO – редокс отношение (редокс-потенциал), FAD – флавинадениндуклеотид фосфат, NADH – никотинамидадениндуклеотид фосфат

в АТФ, клетка меняет тип обмена веществ на анаэробный гликолиз, в результате которого НАД⁺ присоединяет ион водорода и восстанавливается до НАДН с конечным образованием пирувата и АТФ. Отсутствие окисления НАДН через электронно-транспортную цепь и повышение концентрации восстановленной формы НАДН в процессе гликолиза приводит к повышению интенсивности флюоресценции НАДН в клетке. Повышение редокс-потенциала в данном случае может свидетельствовать об активации дыхательной цепи [3] при 10-тикратном КВЧ-воздействии.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что при 10-тикратном воздействии низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ происходит увеличение концентрации и интенсивности флюоресценции НАДН и повышение FAD и редокс-соотношения, что свидетельствует о росте потребности клеток в АТФ и преобладании окислительного фосфорилирования над другими процессами, что в целом свидетельствует об активации дыхательной цепи. Можно предположить, что данные перестройки в окислительном метаболизме определяются в первую очередь процессом адаптации микроциркуляторного кровотока к потребностям тканей в питательных веществах и удалению метаболитов.

Список литературы / References:

1. Курганова Л.Н. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс. *Вестник Нижегородского Университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология*, 2001, № 2, с. 74-76. [Kurganova L.N. Lipid peroxidation is one of the possible components of a rapid reaction to stress. *Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. Biology*, 2001, no. 2, pp. 74-76. (In Russ.)]
2. Москвин С.В., Антипов Е.В., Зарубина Е.Г., Рязанова Е.А. Эффективность кислородного обмена после применения лазерофореза различных гелей на основе гиалуроновой кислоты. *Вестник Эстетической Медицины*, 2011, т. 10, № 3, с. 48-55. [Moskvin S.V., Antipov E.V., Zarubina E.G., Ryazanova E.A. Oxygen exchange effectiveness after application of different gels based on hyaluronic acid laser-phoresis. *Bulletin of Aesthetic Medicine*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 48-55. (In Russ.)]
3. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2014, т. 12, № 4, с. 13-21. [Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova Ye.V. Role of reactive oxygen species in cell physiology and pathology and their pharmacological regulation. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2014, vol. 12, no. 4, pp. 13-21. (In Russ.)]
4. Чуян Е.Н., Бирюкова Е.А., Раваева М.Ю. Изменение показателей функционального состояния человека под воздействием низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ. *Физика живого*, 2008, т. 16, № 1, с. 91-98. [Chuyan E.N., Birukova E.A., Ravaeva M.Y. Modification of indices of human functional state under low-intensity electromagnetic radiation of very high frequency. *Physics of the living*, 2008, vol. 16, no. 1, pp. 91-98. (In Russ.)]
5. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. Механизмы действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на тканевую микрогемодинамику. В сб.: «Космос и биосфера. Тезисы докладов XII Международной крымской конференции, посвященной 100-летию Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского, 120-летию А.Л. Чижевского, 100-летию В.А. Троицкой и 130-летию П.М. Нагорского», Алушта, 2017, с. 158-162. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu. Mechanisms of action of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency on tissue microhemodynamics. In: *Space and the biosphere. Abstracts of the XII International Crimean Conference dedicated to the 100th anniversary of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University, the 120th anniversary of A.L. Chizhevsky, the 100th anniversary of V.A. Troitskaya and the 130th anniversary of P.M. Nagorsky*», Alusta, 2017, pp. 158-162. (In Russ.)]
6. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. Механизмы вазопротекторного действия электромагнитного излучения крайне высокой частоты в условиях хронического гипокинетического стресса. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2017, № 3, с. 55-65. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Y. Vasoprotective mechanisms of action of electromagnetic radiation of extremely high frequency in chronic hypokinetic stress. *Journal Biomedical Radioelectronics*, 2017, no. 3, pp. 55-65. (In Russ.)]
7. Чуян Е.Н., Раваева М.Ю. Роль катехоламинов в регуляции тканевого кровотока при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты. *Проблемы современной науки и образования*, 2014, т. 4, № 22, с. 13-18. [Chuyan E.N., Ravaeva M.Y. The role of catecholamines in the regulation of tissue blood flow under the action of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency. *Problems of Modern Science and Education*, 2014, vol. 4, no. 22, pp. 13-18. (In Russ.)]
8. Крупаткин А.И. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: рук-во для врачей. М.: Librocom, 2014, 498 с. [Krupatkin A.I. *Functional diagnostics of the state of microcirculatory and tissue systems: fluctuations, information, nonlinearity: guide for doctors*. M.: Librocom, 2014, 498 p. (In Russ.)]
9. Серёгина Е.С., Стельмашук О.А., Пьявченко Г.А., Воробьев Е.В., Кузнецова Е.А., Алексеев А.Г., Жеребцов Е.А., Подмастерьев К.В., Дунаев А.В. Оценка влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы клеток головного мозга методом флуоресцентной спектроскопии. *Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии*, 2018, № 1, с. 62-66. [Seregina E.S., Stelmaschuk O.A., Piyachenko G.A., Vorobyev E.V., Kuznetsova E.A., Alekseev A.G., Zherebtsov E.A., Journeymen K.V., Dunaev A.V. Evaluation of the effect of antioxidant substances on the metabolic processes of brain cells by fluorescence spectroscopy. *Physics and Radio Electronics in Medicine and Ecology*, 2018, no. 1, pp. 62-66. (In Russ.)]

THE EFFECT OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION OF EXTREMELY HIGH FREQUENCY ON THE INDICATORS OF TISSUE OXIDATIVE METABOLISM**Ravaeva M.Yu., Chuyan E.N., Cheretaev I.V.**

V.I. Vernadsky Crimean Federal University

Vernadsky Ave., 4, Simferopol, 295007, Russia; e-mail: ravaevam@yandex.ru

Received 12.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0574

Abstract. The paper considers the indicators of tissue oxidative in rats after 10-fold exposure to low-intensity electromagnetic radiation of the millimeter range. The experiment was carried out on 40 mature male rats of the Wistar line weighing 200-220 g, which were kept in a vivarium with a natural light regime. The animals were divided into 2 groups of 20 rats each. The animals in the first group were biological controls and were in normal vivarium conditions, the animals of the second group were exposed to EHF EMR for 10 sessions daily, in the morning. On the 10th day of EHF exposure, tissue fluorescence indicators were recorded by the diagnostic complex "LAZMA MC" (Modification of LAZMA-MC-III, LAZMA, Moscow, Russia). The results of the study showed that rats exposed to 10-fold EHF exposure had an increase in the values of normalized NADH fluorescence amplitudes and an increase in FAD amplitudes by 82.5% ($p < 0.05$) and 42.6% ($p < 0.05$), as well as redox potential - by 36.9% ($p < 0.05$), respectively, compared to with control. These changes indicate that 10-fold exposure to low-intensity EHF EMR causes an increase in the contribution of aerobic metabolism in rats mainly due to oxidative phosphorylation, leads to activation of the respiratory chain. It can be assumed that these changes in oxidative metabolism are determined primarily by the process of adaptation of microcirculatory blood flow to the needs of tissues for nutrients and the removal of metabolites.

Key words: *tissue oxidative metabolism, low-intensity millimeter radiation, nicotinamide adenine dinucleotide, flavinadenine dinucleotide, redox potential.*

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА РАЗМЕРНЫХ ФРАКЦИЙ ПЛАНКТОНА В АКВАТОРИИ Г. СЕВАСТОПОЛЬ ЗИМОЙ 2021-2022 ГГ: МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уфимцева М.А.¹, Кузнецов А.В.^{1,2}

¹ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

² Севастопольский государственный университет,

ул. Университетская 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: ritica011@bk.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0575

Аннотация. С целью мониторинга акватории г. Севастополя разработана линейка устройств последовательной макрофильтрации планктона в размерном диапазоне от 2 мм до 2 мкм. Выбраны 12 станций от Инкермана до Фиолента общей протяжённостью 30 км. С пирсов, далеко выступающих в море, отобраны с поверхности воды по 50-500 л морской воды и профильтрованы через систему последовательных сит 2 мм, 300, 150, 84 мкм и волоконный фильтр 2 мкм. Зимой 2021-2022 гг., когда температура морской воды составляла 8 °С, разнообразие планктонных морфотипов было незначительным. Для всех станций число морфотипов увеличивалось с уменьшением размерной фракции в виде экологических пирамид. Установлено, что богатство морфотипов в Инкермане значительно ниже, чем на других станциях. Пробы с соседних станций могут отличаться по составу морфотипов до 50% (пространственный срез). Также на 50% отличались по составу морфотипов пробы морской воды, взятые на одной станции с интервалом 1,5 месяца (временной срез). Полученные результаты свидетельствуют, что разработанная методика последовательной фильтрации даёт наглядное представление о состоянии мезо-, микро- и нано-планктона в пробах морской воды.

Ключевые слова: мониторинг, последовательная фильтрация, планктон.

ВВЕДЕНИЕ

Мониторинг экологической ДНК (eDNA - environmental DNA) является перспективным инструментом контроля окружающей среды [1,2]. Однако недавние исследования [3] показали, что явное представительство определённых видов не обязательно коррелирует с наличием их ДНК в пробах из природной среды, как и наоборот, ДНК вида может обнаруживаться, а сами представители отсутствовать в пробах. Это неожиданное обстоятельство подняло вопрос о взаимодополняющем генетическом и морфологическом анализе образцов. К сожалению, существующие методы отбора и оценки планктонных проб [4,5] достаточно трудоёмки, поэтому ощущается потребность в эффективных методах выявления отдельных представителей биоты пелагиали в природных популяциях.

Традиционно, отбор проб планктона ведётся с помощью сетей Апштейна или Джеди. Эффективным методом сбора микроорганизмов может быть забор воды с помощью насоса с последующей фильтрацией. Такое оборудование было установлено на яхте *Sorcerer II*, принадлежащей институту *Крейга Вентера*, для выполнения метагеномных проектов [6]. Учёными из Института Океанографии Национального Тайваньского Университета была разработана установка для высокопроизводительной многослойной фильтрации, сочетающая в себе достоинства конической сети Апштейна и системы последовательных фильтров [7].

Использование каскада последовательных фильтров для сепарации размерных фракций планктона имеет как явные преимущества, так и скрытые недостатки. К преимуществам метода относятся компактность установки фильтрации, её производительность, возможность отбирать образцы с помощью насоса и фракционирование образцов по размерам. Недостатком является хрупкость биологических объектов, возможность их разрушения и проникновение фрагментов в нижележащие фракции, что может приводить к контаминации.

Целью работы была разработка устройства для макрофильтрации планктонных организмов, представляющего набор последовательных сит с уменьшающимися размерами отверстий, а также исследование пространственно-временных характеристик планктонного сообщества с размером гидробионтов от 2 мм до 2 мкм в акватории г. Севастополя в зимний период для демонстрации работоспособности устройства.

МЕТОДИКА

Устройство последовательной фильтрации является набором пластиковых труб, которые можно вставлять друг в друга. В местах состыковки трубок прокладывается газ с ячейками уменьшающегося размера. На входе трубы расположена воронка и предварительное сито с размером ячеек 2 мм. Применяли установку, состоящую из 4-5 секций. На концах фильтрующей сборки расположены муфты с карабинами, через которые продевается репшнур, скрепляющий всю модульную конструкцию, которая устанавливается на сошки. Применяли сита с ячейками 300, 150 и 84 мкм, а также волоконный фильтр EN14683 с размером пор 1-5 мкм.

Конструкторские разработки и научные исследования проводились с ноября 2021 года по март 2022 года. Основные полевые испытания осуществлены в январе-феврале 2022 года.

Список экспериментальных станций. Пробы воды отбирали с помощью ведра с верхнего горизонта 0-0,5 м с пирсов и волноломов, далеко выступающих в море. Выбрано 12 станций от Инкермана до м. Фиолент общей протяжённостью 30 км: 0) Инкерман, причал №49, 1) Учкеевка-Любимовка, пляж Альбатрос, левый пирс, 2) Северная, паромный причал, 3) Водная станция, причал №148, 4) Артиллерийская бухта, паромный причал, 5) пляж Хрустальный (Якорь), 6) Гавань, РБК ИнБИОМ, 7) Песочная бухта, Солнечный пирс, 8) парк Победы, правый мол, 9) пляж Омега, первый пирс, 10) Казачья (Солёная) бухта, правый пирс, 11) мыс Фиолент, пляж Каравелла, причал.

Обработка проб. Биологический материал смывали с фильтров 5 мл физиологического раствора или искусственной морской воды, фиксировали глутаровым альдегидом до конечной концентрации 2,5% и хранили в холодильнике при 4 °С. Аликвоту 200 мкл анализировали на часовом стекле под бинокулярной лупой ZEISS Stemi 305 при увеличении от 8 до 40 крат, а затем исследовали на предметном стекле под микроскопом Nikon Eclipse Ts2R при увеличении 200 раз. Идентификацию видов осуществляли, пользуясь определителями [8-12].

Морфотип. В силу того, что у криптических видов диагностические признаки малозаметны, проводили идентификацию представителей планктона с точностью до рода и использовали понятие «морфотип», т.е. сводили в одну категорию все объекты, обладающие заранее обусловленными одинаковыми морфологическими признаками, что значительно ускорило работу.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уникальность зимнего сезона 2021-2022 гг. заключается в том, что температура морской воды в акватории г. Севастополя составляла 8°C, не было сильных штормов и ветров, заметных сгонов и нагонов воды. Тем не менее, локальное волнение моря при отборе проб на станциях №0-11 значительно отличалось, что отразилось на содержании взвешенных частиц в пробах.

Итог изучения размерных фракций планктона на разных станциях. Экологическую обстановку в пространственных координатах изучали на примере 12 станций, расположенных вдоль берега от Инкермана до мыса Фиолент. Строили диаграммы распределения числа морфотипов по размерным фракциям для разных станций. Для всех станций, кроме точки №0 (Инкерман, причал №49), отмечено возрастание количества морфотипов гидробионтов с уменьшением их геометрического размера (рис. 1). Станция №0 отличается от остальных тем, что находится глубоко во внутренней акватории Северной бухты недалеко от устья Чёрной речки и характеризуется самым низким разнообразием морфотипов в зимний период.

Изменение состава планктонного сообщества размерной фракции плюс 84 мкм – минус 1-5 мкм в пространстве и во времени. Для того чтобы оценить размах вариаций в пробах с исследуемых станций №0-11 и отличить флуктуации от трендов, были проведены сравнения представительства отдельных морфотипов в пробах, разнесённых в пространстве или во времени. Изучали планктон размером от 84 до 1-5 мкм. Оказалось, что пробы с соседних станций №3 (Водная станция) и №4 (Артиллерийская бухта) могут отличаться по составу

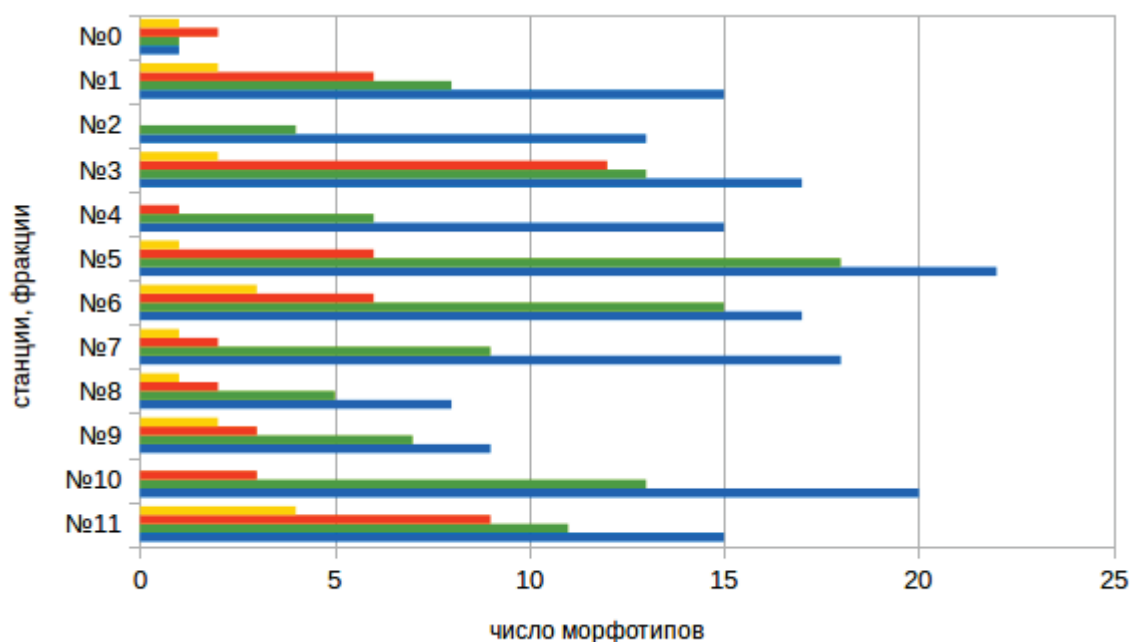


Рисунок. 1. Распределение планктонных организмов по размерам на экспериментальных станциях от Инкермана до мыса Фиолент, г. Севастополь, жёлтый цвет – сито с размером ячеек 300 мкм, красный – 150 мкм, зелёный – 84 мкм, голубой цвет – фильтр с размером пор 1-5 мкм

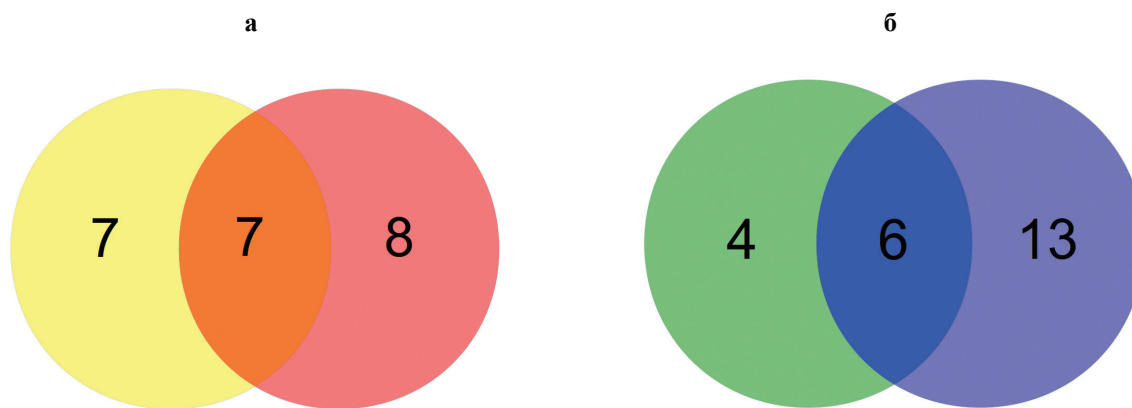


Рисунок 2. Круги Эйлера, построенные при анализе морфотипов биообъектов, которые были смыты с фильтра 1-5 мкм, для станций №3 от 11.02.22 и №4 от 13.02.22 (а), а также для станции №3 от 29.01.22 и 18.03.22 (б), соответственно, пересечение обозначает число общих морфотипов

морфотипов на 50% (рис. 2а). Также на 50% отличались по составу морфотипов пробы морской воды, взятые на станции №3 с интервалом 1,5 месяца (рис. 2б). Разительные отличия как по разнообразию морфотипов, так и по численности отдельных представителей выявлены для удалённых станций №0 (Инкерман) и №11 (Фиолент).

ОБСУЖДЕНИЕ

Критический анализ фильтрации планктона был дан в работе Микаэляна А.С. и Ведерникова В.И. «Фракционирование фитопланктона: проблемы и возможности» (1989 г.), где авторы отмечают, что работы по фракционированию планктона, проводились ещё в середине XX века и были посвящены разделению на сетной планктон и нанопланктон. В последующих исследованиях планктон разделяли по фракциям на нейлоновых ситах с размерами ячеек от 200 до 10 мкм. В современных исследованиях, благодаря применению ядерных фильтров, все большее внимание уделяется размерным фракциям менее 1-5 мкм. Несмотря на ряд недостатков разделение на фракции через различные фильтрующие материалы остаётся единственным подходом к исследованию структурно-функциональных характеристик разных размерных категорий планктона. В пределах метода фракционирования имеются методические различия. Например, при определении продукционных возможностей разных фракций микроводорослей, существенное значение имеют пре- или постфильтрация проб. При параллельном способе подпробы фильтруют через фильтры с разным диаметром пор и по разнице между контролем и опытом оценивают структурно-функциональные характеристики каждой фракции. При этом возникают неточности из-за различия исходного материала в подпробах. При последовательной фильтрации пробу пропускают через каскад фильтров. Планктонные организмы могут повреждаться, проходя через серию фильтров. На результат фракционирования влияет скорость прохождения воды через фильтры, количество взвеси, объем профильтрованной воды и т.д. [13].

Исследования по экологической ДНК, в отличие от фильтрации планктона, имеют короткую историю [14,15]. Тем не менее, становится понятно, что организмы по-разному «выплёскивают» свою ДНК в окружающую среду, что необходимо учитывать при мониторинге окружающей среды и интерпретации результатов исследований [3]. Необходимо совмещать методы молекулярной биологии и микроскопии для воссоздания целостной картины.

В настоящей работе обнаружено необычайно низкое разнообразие планктонных организмов на станции Инкерман в зимний период, которая находится во внутренней акватории Северной бухты недалеко от места впадения Чёрной речки (рис. 1). Таким образом, фракционирование планктонных организмов по размерам может быть использовано для анализа функционального состояния планктонных сообществ [16,17].

При тщательном отборе проб сохраняется «экологическая пирамида» [18] для размерных фракций планктона внутри отдельных проб, однако число морфотипов и их состав может варьировать, что указывает на неоднородность распределения планктонного сообщества во времени и пространстве. Оказалось, что пробы с соседних станций могут отличаться по составу морфотипов на 50%. Также на 50% отличались пробы морской воды, взятые на станции №3 с интервалом 1,5 месяца, как следствие увеличения продолжительности светового дня.

В дополнение ко всему, мы оценивали биопродуктивность размерных фракций по отношению хлорофилл А/общий белок, где, как и другие авторы, обнаружили, падение биопродуктивности с увеличением размера планктонной фракции; кроме того, метод хорошо себя зарекомендовал при оценке микропластикового загрязнения и в тесте по скорости оседания взвешенных неорганических частиц (данные не приводятся).

Выводы и перспективы. Полученные результаты показывают, что разработанная методика последовательной фильтрации даёт наглядное представление о состоянии мезо-, микро- и нано-планктона в

пробах морской воды. Предполагается использовать созданное устройство для экспресс-мониторинга окружающей среды, при сборе материала для биохимических и генетических анализов, а также для предварительной очистки проб в вирусологических исследованиях. Имеется возможность сократить число секций до 2-3, тем самым удешевив устройство и создав предпосылки для его массового изготовления, что позволит осуществлять единовременный сбор материала на нескольких станциях. Предложенный путь параллелизации находится внутри основной «lab-on-chip» [19] концепции миниатюризации, автоматизации и интеграции в сеть автономных устройств мониторинга окружающей среды.

Авторы глубоко признательны за поддержку Пирковой А.В., Челядиной Н.С., Попову М.А., Поспеловой Н.В. и Железновой С.Н., а также участникам проекта «Трихоплак для бионики».

Список литературы / References:

1. Stoeckle B.C., Kuehn R., Geist J. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 1120-1129.
2. Zhang Y., Pavlovska M., Stoica E., Prekrasna I., Yang J., Slobodnik J., Zhang X., Dykyi E. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environ Int.*, 2020, vol. 135, p. 105307.
3. Kawashima T., Yoshida M.A., Miyazawa H., Nakano H., Nakano N., Sakamoto T., Hamada M. Observing Phylum-Level Metazoan Diversity by Environmental DNA Analysis at the Ushimado Area in the Seto Inland Sea. *Zoolog Sci.*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 157-165, doi: 10.2108/zs210073.
4. Беклемишев К.В. *Экология и биогеография пелагиали*. М.: Наука, 1969, 291 с. [Beklemishev K.V. *Ekologiya i biogeografiya pelagiali*. M.: Nauka, 1969, 291 p. (In Russ.)]
5. Киселёв И.А. *Планктон морей и континентальных водоёмов*. Л.: Наука, 1969, т. 1, 658 с. [Kiselyov I.A. *Plankton morej i kontinental'nyh vodojotov*. L.: Nauka, 1969, vol. 1, 658 p. (In Russ.)]
6. Williamson S.J., Rusch D.B., Yooseph S., Halpern A.L., Heidelberg K.B., Glass J.I., Andrews-Pfannkoch C., Fadrosch D., Miller C.S., Sutton G., Frazier M., Venter J.C. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 1, p. e1456.
7. Wen L.S., Lee C.P., Lee W.H., Chuang A. An Ultra-clean Multilayer Apparatus for Collecting Size Fractionated Marine Plankton and Suspended Particles. *J Vis Exp.*, 2018, vol. 134, p. 56811.
8. Киселев И.А. *Панцирные жгутиконосцы (Dinoflagellata) морей и пресных вод СССР*. Определ. по фауне СССР. Л.: Изд-во Зоол. ин-та АН СССР, 1950, № 33, 280 с. [Kiselev I.A. *Pancirnye zhgutikonoscy (Dinoflagellata) morej i presnyh vod SSSR*. Opredel. po faune SSSR. L.: Izd-vo Zool. in-ta AN SSSR, 1950, № 33, 280 p. (In Russ.)]
9. Прошкина-Лавренко А.И. *Диатомовые водоросли планктона Чёрного моря*. М.-Л.: АН СССР, 1955, 222 с. [Proshkina-Lavrenko A.I. *Diatomovye vodorosli planktona Chyornogo morya*. M.-L.: AN SSSR, 1955, 222 p. (In Russ.)]
10. Мордохай-Болтовской Ф.Д. *Определитель беспозвоночных животных фауны Чёрного и Азовского морей*, 3 тома. Киев: "Киевская книжная фабрика", 1969. [Morduhaj-Boltovskoj F.D. *Opredelitel' bespozvonochnyh zhivotnyh fauny Chyornogo i Azovskogo morej*, 3 тома. Kiev: "Kievskaya knizhnaya fabrika", 1969. (In Russ.)]
11. Молло П., Нури А. *Планктон*. Учебное пособие. пер. с фр. В. И. Холодова. Севастополь, 2019, 195 с. [Mollo P., Nuri A. *Plankton*. Uchebnoe posobie. per. s fr. V. I. Holodova. Sevastopol', 2019, 195 p. (In Russ.)]
12. Рябушко Л.И. *Потенциально опасные микроводоросли Чёрного и Азовского морей*. НАНУ, Институт биологии южных морей НАН Украины, Океанологический центр НАНУ, Операционный Центр Международного Института в Украине, Севастополь: ЭКОСИ - Гидрофизика, 2003, 288 с. [Ryabushko L.I. *Potencial'no opasnye mikrovodorosli Chyornogo i Azovskogo morej*. NANU, Institut biologii yuzhnyh morej NAN Ukrainy, Okeanologicheskij centr NANU, Operacionnyj Centr Mezhdunarodnogo Instituta v Ukraine, Sevastopol': EKOSI - Gidrofizika, 2003, 288 p. (In Russ.)]
13. Микаэлян А.С., Ведерников В.И. Фракционирование фитопланктона: проблемы и возможности. Структурные и продукционные характеристики планктонных сообществ Чёрного моря. Сб. Ред. М.Е. Виноградов, М.В. Флинт. М.: Наука, 1989, с. 53-64. [Mikaelyan A.S., Vedernikov V.I. Frakcionirovanie fitoplanktona: problemy i vozmozhnosti. Strukturnye i produkcionnye harakteristiki planktonnyh soobshchestv Chyornogo morya. Sb. Red. M.E. Vinogradov, M.V. Flint. M.: Nauka, 1989, pp. 53-64. (In Russ.)]
14. Ruppert K.M., Kline R.J., Rahman M.S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 2019, vol. 17, p. e00547.
15. Cowart D.A., Murphy K.R., Cheng C.C. Environmental DNA from Marine Waters and Substrates: Protocols for Sampling and eDNA Extraction. *Methods Mol Biol.*, 2022, vol. 2498, pp. 225-251.
16. Виноградов М.Е., Флинт М.В. Структура и продукционные характеристики планктонных сообществ Чёрного моря. *Сборник научных трудов*. М.: Наука, 1989, 226 с. [Vinogradov M.E., Flint M.V. Struktura i produkcionnye harakteristiki planktonnyh soobshchestv Chyornogo morya. *Sbornik nauchnyh trudov*. M.: Nauka, 1989, 226 p. (In Russ.)]
17. Минеева Н.М. *Эколого-физиологические аспекты формирования первичной продукции планктона водохранилищ Волги*. Дис. на соискание д.б.н. по ВАК РФ 03.00.16, Борок, 2003. [Mineeva N.M. *Ekologo-*

fiziologicheskie aspekty formirovaniya pervichnoj produkcii planktona vodohranilishch Volgi. Dis. na soiskanie d.b.n. po VAK RF 03.00.16, Borok, 2003. (In Russ.)]

18. Colombet J., Fuster M., Billard H., Sime-Ngando T. Femtoplankton: What's New? *Viruses*, 2020, vol. 12, no. 8, p. 881.

19. Dutse S.W., Yusof N.A. Microfluidics-based lab-on-chip systems in DNA-based biosensing: an overview. *Sensors (Basel)*, 2011, vol. 11, no. 6, pp. 5754-5768.

EXPRESS ESTIMATION OF PLANKTON SIZE FRACTIONS IN THE WATER AREA OF SEVASTOPOL IN WINTER 2021-2022: MODEL STUDIES

Ufimtseva M.A.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2}

¹ Institute of Biology of the South Seas named after A.O. Kovalevsky RAS

Nakhimov ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia

² Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: ritica011@bk.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0575

Abstract. For the purpose of monitoring the water area of Sevastopol a line of devices for plankton macrofiltration in the size range from 2 mm to 2 microns has been developed. Twelve stations have been chosen from Inkerman to Fiolent with total length of 30 km. From piers far out at sea, 50-500 liters of seawater were sampled from the surface and filtered through a system of successive sieves 2 mm, 300, 150, 84 microns and a 2 µm fiber filter. In the winter of 2021-2022, when the seawater temperature was 8 °C, the diversity of plankton morphotypes was low. For all stations, the number of morphotypes increased as the size fraction decreased in the form of ecological pyramids. It was found that the richness of morphotypes in Inkerman is significantly lower than at other stations. Samples from neighboring stations may differ in the composition of morphotypes up to 50% (spatial section). Also, sea water samples taken at the same station with an interval of 1.5 months differed by 50% in the composition of morphotypes (time slice). The obtained results indicate that the developed technique of sequential filtration gives a visual representation of the state of meso-, micro- and nano-plankton in seawater samples.

Key words: *monitoring, sequential filtration, plankton.*

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОТЕХНИЧЕСКИХ СООРУЖЕНИЙ НЕКОТОРЫХ БУХТ Г. СЕВАСТОПОЛЯ

Дорошенко Ю.В.

Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: julia_doroshenko@mail.ru
Поступила в редакцию 29.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0576

Аннотация. Гидротехнические сооружения, которые постоянно присутствуют в бухтах, являются одним из факторов, влияющих на состояние прибрежных акваторий. Наибольшее показательное значение имеет микроперифитон, формирующийся на гидротехнических сооружениях в прибрежных зонах с различной степенью антропогенной и рекреационной нагрузки. Микробиологические исследования перифитона существенно дополняют характеристику экологического состояния побережья. В работе приведены данные о количественном распределении гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий в микроперифитоне илистых отложений южного мола Севастопольской бухты и восточного мола Камышовой бухты. Численность общего количества гетеротрофов в илистых отложениях южного мола, в целом, колебалась в пределах $10^3 - 10^4$ кл./мл, а восточного мола преимущественно варьировала в пределах $10^3 - 10^5$ кл./мл. Результаты исследований свидетельствуют о том, что илистые отложения молов в рассматриваемых акваториях, способствуют развитию анализируемых групп бактерий, участвующих в процессах самоочищения акваторий, а их численность не зависит от глубины. Анализ данных показал, что количество гетеротрофных бактерий на восточном моле была выше, чем на южном. Сезонные отличия количественного содержания исследуемых групп бактерий не выявлены. Установлено, что процессы самоочищения морской среды от нефти и нефтепродуктов активной происходят на внешней стороне молов, причём на южном молу эти процессы выражены сильнее.

Ключевые слова: гетеротрофные и углеводородокисляющие бактерии, гидротехнические сооружения, мол, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Гидротехнические сооружения, которые постоянно присутствуют в бухтах, являются одним из факторов, влияющих на состояние прибрежных акваторий. Вследствие ограждённости и пониженной общей гидродинамики, в акваториях морских портов происходит накопление разного рода взвесей, органических веществ, биогенных элементов. Причалные линии в портах, достигающие десятков километров, значительно увеличивают поверхность твёрдых субстратов для развития сообществ обрастаний. Боковые поверхности гидротехнических сооружений выполняют функции искусственных рифов и во многом напоминают поставленное вертикально дно. Биота искусственных гидротехнических сооружений, которые можно рассматривать как один из примеров гидробиологических систем, существенно влияет на общую продуктивность водоёма и формирование качества воды в конкретном регионе [1,2].

Перифитон, формирующийся на гидротехнических сооружениях, значительно увеличивает потенциал самоочищения морской воды [3]. В свою очередь мощным комплексом по трансформации органических веществ и биогенных элементов является бактериальный перифитон [4]. Наибольшее показательное значение имеет микроперифитон, формирующийся на гидротехнических сооружениях в прибрежных зонах с различной степенью антропогенной и рекреационной нагрузки [5]. Микробиологические исследования перифитона существенно дополняют характеристику экологического состояния побережья.

Объектом для проведения санитарно-биологических исследований были выбраны южный мол, расположенный у входа в Севастопольскую бухту с её южной стороны, а также восточный мол, ограничивающий Камышовую бухту со стороны мыса Восточного. Бухты Севастопольская и Камышовая различны по происхождению, уровню загрязнения донных осадков, антропогенной нагрузке [1].

Подводное основание гидротехнических сооружений обеспечивает дополнительную зону оседания многочисленных обрастающих организмов, которые увеличивают способность морской акватории к самоочищению и тем самым изменяют местный гидрологический режим. Биоостатки эпибиоты могут увеличивать седиментацию. Заиливание препятствует росту бентосных организмов, например, мидий в естественной среде и может аналогичным образом препятствовать развитию эпибиоты на гидротехнических сооружениях. Наряду с механическим воздействием, химический состав ила, в частности, органическая фракция, также является важным фактором, так как при разложении органические вещества потребляют кислород и могут вызвать кислородную недостаточность [6].

Целью работы является определение общей численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов в осевшей взвеси на подводной части мола, как показателей самоочищения морской среды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Характеристика районов исследований. Севастопольская бухта представляет собой вытянутую с востока на запад полузамкнутую акваторию эстуарного типа. На входе в бухту в 1976-1980 гг. были построены защищающие акваторию от западных ветров северный и, выдвигающийся ему навстречу с противоположного берега, южный молы. В результате проход в бухту сузился с около 1200 м до 415 м и водообмен существенно ухудшился. Суммарная протяжённость причалов в Севастопольской бухте достигает 11 км, а всех основных гидротехнических сооружений – 16 км, средняя глубина в бухте 12 м, у входа 19-20 м. Конструкция южного мола проста: бетонные кубы поверх подушки из камней и окружение из беспорядочно разбросанных тяжёлых (весом от полутонны) бетонных четырёхконечных волнорезов – тетраподов [1,2].

Акватория Камышовой бухты, в которой во второй половине XX в. был построен Рыбный порт, на входе защищена от штормового воздействия западным и восточным молами. Бухта протянулась на 2,5 км, ширина её около километра. Берега невысоки – до 25 м, в меру пологи. Кроме причалов Рыбного порта в бухте имеются причалы ещё целого ряда предприятий, оборудованы плавучие пирсы. Порт доступен для судов с осадкой до 8 м. Восточный мол Камышовой бухты представлен хаотически установленными бетонными блоками [1,2].

Микробиологический анализ. Пробы отбирались с помощью водолазов на 6 станциях с площади 2×2 см² стерильными шприцами объёмом 20 мл. Схема отбора проб приведена на рисунке 1. Станции располагались на внешней и внутренней сторонах молов с глубинами 1 м (горизонты Ia и Ib соответственно у основания молов), 7 м (горизонты IIa и IIb соответственно в центральной части) и 15 м (горизонты IIIa и IIIb соответственно у оконечности) молов. Отбор проб проводился ежеквартально. На Южном молу отобрано 23 пробы (1 шприц был утерян). На Восточном молу отобрано 24 пробы.

После доставки в лабораторию вся последующая обработка проб проводилась в стерильных условиях. Количество микроорганизмов в пробе определяли методом предельных разведений с последующим посевом 1 мл из каждого разведения в элективные среды. Для исследования общего количества гетеротрофов (ГТ) использовали пептонную воду, для определения численности углеводородокисляющих бактерий (УОБ) – среду Диановой-Ворошиловой с добавлением дизельного топлива. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объёма рассчитывали по таблице Мак-Креди, основанной на методе вариационной статистики [7,8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При обследовании водолазами было обнаружено заиливание молов в бухтах, как с внешней, так и с внутренней сторон, которое неблагоприятно влияет на развитие сообщества макрообрастателей, но позволяет активно развиваться микроорганизмам [2], поскольку большинство природных популяций бактерий существует в прикреплённом состоянии [9]. Заселению гидротехнических сооружений из бетонов микроорганизмами способствуют такие его свойства, как пористость, капиллярность, неоднородность состава [10]. В составе биоплёнки обрастания гидротехнических сооружений были выявлены диатомовые, сине-зелёные, зелёные и жёлто-зелёные водоросли. Видовое разнообразие поверхностных альгоценозов изменялось и зависело, прежде всего, от уровня антропогенной нагрузки [11,12]. Кроме того, на объектах гидротехнических сооружений нередко обнаруживаются аммонифицирующие, сульфатредуцирующие, железоокисляющие, силикатные и тионовые группы бактерии [10,13]. Гетеротрофные микроорганизмы являются биоиндикаторами наличия различных видов загрязняющих веществ в морской воде. Обилие гетеротрофных бактерий является одним из показателей степени эвтрофикации водоёма. Подобной чувствительностью обладают и микроорганизмы, растущие на нефти, которые высевались из морской воды, где концентрация нефти не определялась химическими методами. Это обстоятельство представляет практический интерес, поскольку по наличию в море таких бактерий можно судить о присутствии в воде низких концентраций нефтепродуктов порядка 10^{-4} – 10^{-5} мл/л, которые оказывают в ряде случаев токсический эффект на морские организмы [1].

Южный мол (б. Севастопольская). Исследуемые группы бактерий определены повсеместно. Численность общего количества гетеротрофов в илистых отложениях колебалась в пределах 10^3 – 10^4 кл./мл на всех горизонтах (рис. 2). Максимальное значение $2,5 \times 10^5$ кл./мл отмечено в осенний период в верхнем горизонте (Ib).

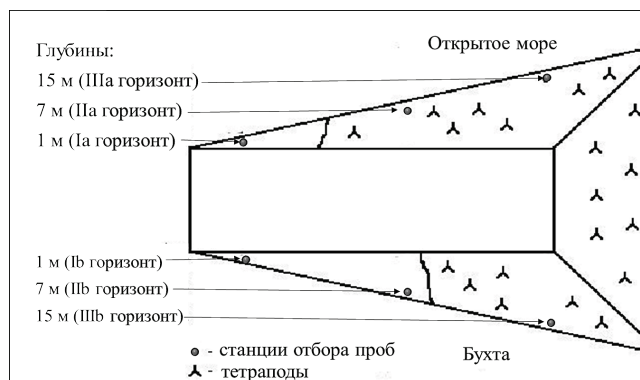


Рисунок 1. Схема отбора проб на южном молу Севастопольской бухты и восточном молу Камышовой бухты

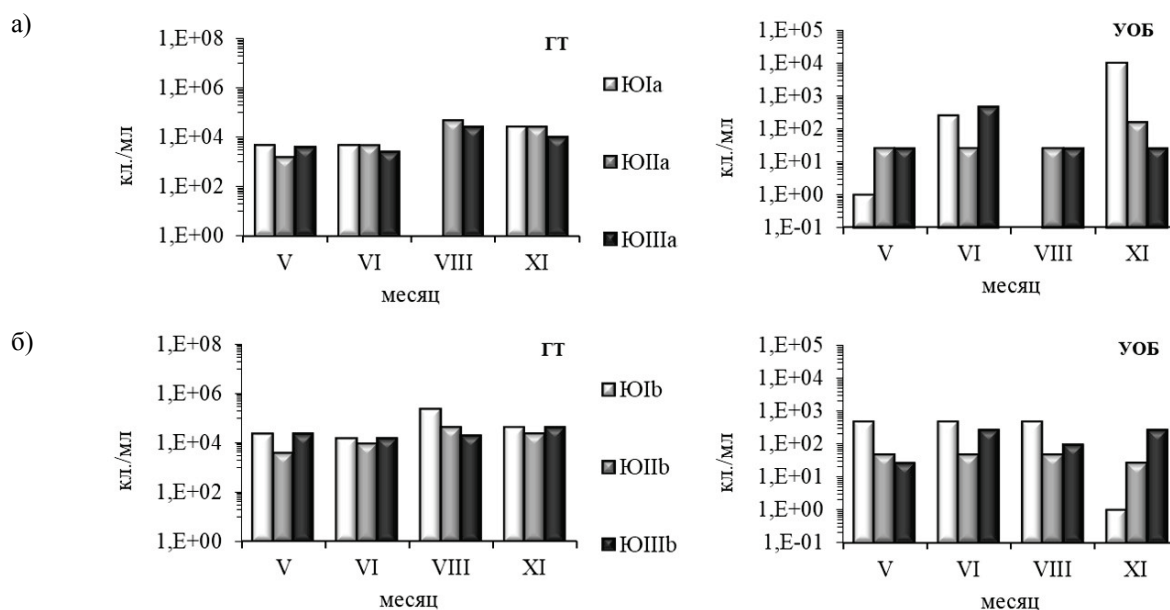


Рисунок 2. Численность общего количества гетеротрофов (ГТ) и углеводородоокисляющих бактерий (УОБ) в илистых отложениях южного мола Севастопольской бухты: а - внешняя (мористая) сторона мола, б - внутренняя сторона мола

Минимальное значение 4×10^3 кл./мл соответствует среднему горизонту. Подобная тенденция отмечена при исследовании вертикального распределения суммарного органического вещества (СОВ) на внутренней стороне мола [6]. Так, в верхнем горизонте (Ib) СОВ составляло 40,1 мг/100 г сухого веса, на среднем горизонте (IIb) это значение уменьшалось в 2 раза, а на нижнем (IIIb) опять увеличивалось до 25 мг/100 г сухого веса.

На внешней стороне мола значения численности ГТ были несколько ниже. Однако в [6] отмечено более высокое содержание органического вещества (56 мг/100 г сухого веса) на внешней стороне мола, что авторы связывают с выходом у основания канализационного коллектора, через который периодически сбрасываются сточные воды. Кроме того, внешняя сторона мола характеризуется наибольшим разнообразием растительных сообществ [12].

Численность УОБ, в целом, незначительно колебалась в пределах одного порядка величин (25-450 кл./мл). Максимальное значение (9500 кл./мл) соответствует станции, расположенной на глубине 1 м с внешней стороны мола (Ia), что свидетельствует о наличии нефтяного загрязнения. Этой станции соответствует так называемая «кутовая» часть, где при определённых метеорологических условиях может происходить скопление загрязняющих веществ. Количество нефтеокисляющих бактерий на этой станции в ноябре достигало 38 % от общего количества гетеротрофных бактерий. Кроме того, если на внутренней стороне мола численность УОБ от ГТ не превышала 3 %, на внешней стороне мола в июне это соотношение составляло 6 % и 18 % соответственно в верхнем (Ia) и нижнем (IIIa) горизонтах. Минимальные значения нефтеокисляющих микроорганизмов наблюдали на станциях, расположенных на глубине 1 м с внешней и внутренней сторон мола – 0,7 и 0,9 кл./мл соответственно.

Таким образом, в районе южного мола Севастопольской бухты постоянно присутствуют легкодоступные органические вещества. Анализ численности УОБ убедительно показывает, что процессы самоочищения морской среды от нефти и нефтепродуктов активной происходят на внешней стороне мола.

Восточный мол (б. Камышовая). Численность общего количества гетеротрофов преимущественно варьировала в пределах $10^3 - 10^5$ кл./мл во всех пробах (см. рис. 3). Однако в октябре это значение резко возросло и составляло на всех станциях внешней и внутренней сторон 10^7 кл./мл. В то же время численность УОБ была необыкновенно низкой и не превышала 10 кл./мл. К тому же, на среднем горизонте (IIb) внутренней стороны мола определить эту группу бактерий не удалось. Это свидетельствует о значительном поступлении органических веществ в портовую акваторию в данный период времени. Анализ данных показал, что количество ГТ на восточном моле была выше, чем на южном. Это согласуется с результатами [6] по содержанию СОВ на восточном молу Камышовой бухты. Закономерности изменения численности ГТ от глубины не обнаружены, что может быть связано со слабо выраженной вертикальной стратификацией полей содержания общего взвешенного вещества и растворённого органического вещества в мористой части Камышовой бухты [14].

В целом, наблюдали колебания численности нефтеокисляющих бактерий от 25 до 950 кл./мл, т.е. в пределах одного порядка величин. Максимальное значение УОБ 4500 кл./мл определено в нижнем горизонте (IIIa). Анализ данных указывает на то, что в летний период на внешней стороне мола процессы самоочищения протекали наиболее активно. Здесь соотношения УОБ от ГТ составляли 3-5 % на различных горизонтах.

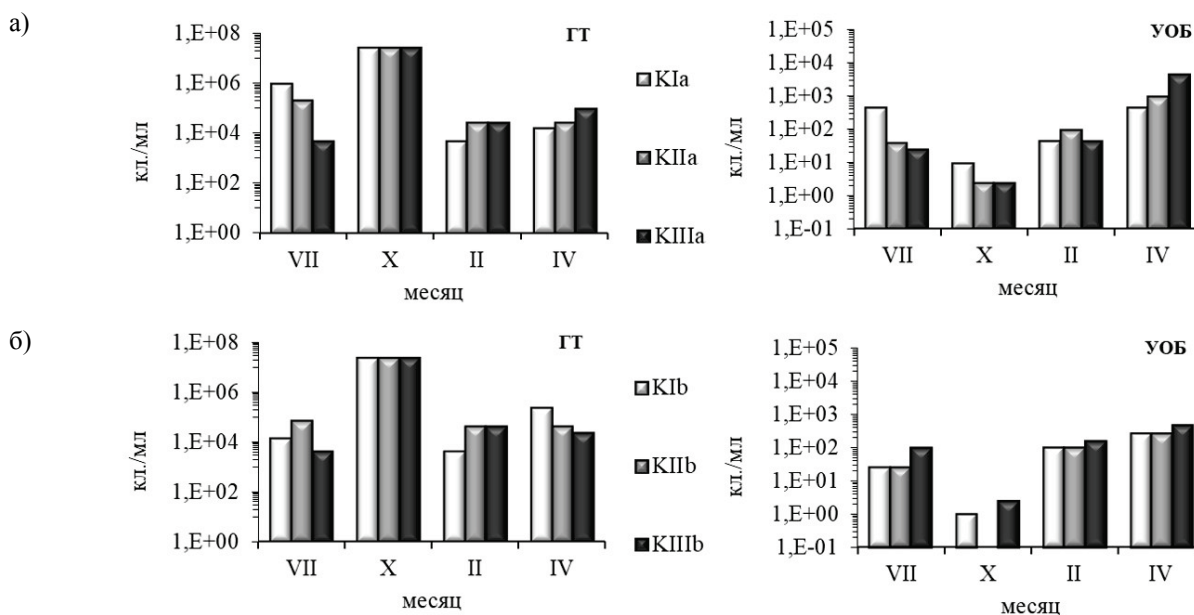


Рисунок 3. Численность общего количества гетеротрофов (ГТ) и углеводородокисляющих бактерий (УОБ) в илистых отложениях восточного мола Камышовой бухты: а – внешняя (мористая) сторона мола, б – внутренняя сторона мола

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены данные о количественном распределении гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий в микроперифитоне илистых отложений южного мола Севастопольской бухты и восточного мола Камышовой бухты. Результаты исследований свидетельствуют о том, что илистые отложения мол в рассматриваемых акваториях, способствуют развитию анализируемых групп бактерий, участвующих в процессах самоочищения акваторий, а их численность не зависит от глубины. Сезонные отличия количественного содержания исследуемых групп бактерий не выявлены. Установлено, что процессы самоочищения морской среды от нефти и нефтепродуктов активнее происходят на внешней стороне мол.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ: №121031500515-8 «Молисмодологические и биогеохимические основы гомеостаза морских экосистем».

Список литературы / References:

1. Санитарно-биологические исследования в прибрежной акватории региона Севастополя. Под общ. ред. О. Г. Миронова: ИнБЮМ НАН Украины. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009, 192 с. [Sanitary and biological investigations in coastal area of Sevastopol region. Eds. O.G. Mironov. Sevastopol: EKOSY-Gidrofizira, 2009, 192 p. (In Russ.)]
2. Vinogradov A.K., Bogatova Yu.I., Synegub I.A. *Ecology of Marine Ports of the Black and Azov Sea Basin*. Springer International Publishing AG, 2018, 412 p., doi: 10.1007/978-3-319-63062-5.
3. Соловьёва О.В. Роль биоты гидротехнических сооружений в формировании ассимиляционной ёмкости акватории (на примере бухт Севастополя). *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2015, № 4, с. 107-112. [Solovyova O.V. The role of the biota of hydraulic structures in the formation of the assimilation capacity of the water area (on the example of the bays of Sevastopol). *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2015, no. 4, pp. 107-102. (In Russ.)]
4. Трифонов О.В. Перифитон в технологическом процессе очистки сточных вод. *Водоочистка*, 2011, № 3, с. 22-26. [Trifonov O.V. Perifiton in the technological process of wastewater treatment. *Vodoochistka*, 2011, no. 3, pp. 22-26 (In Russ.)]
5. Saikia S.K. Review on Periphyton as Mediator of Nutrient Transfer in Aquatic Ecosystems. *Ecologia Balkanica*, 2011, vol. 3, iss. 2, pp. 65-78.
6. Mironova T.O., Muravjova I.P. The organic matter of silt aggregates on the breakwaters in the Bays of Sevastopol, Black Sea. *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 2007, vol. 13, pp. 139-146.
7. Лысак В.В. *Микробиология*. Минск: БГУ, 2005, 364 с. [Lysak V.V. *Mikrobiologiya*. Minsk.: BGU, 2005, 364 p. (In Russ.)]
8. *Практикум по микробиологии*. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия». 2005, 608 с. [Workshop on Microbiology. Ed. by A.I. Netrusov. M.: Publishing center "Academy", 2005, 608 p. (In Russ.)]

9. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биоплёнок. *Микробиология*, 2010, т. 79, № 4, с. 435-446. [Smirnova T.A., Didenko L.V., Azizbekyan R.R., Romanova Yu.M. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Mikrobiologiya*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 435-446. (In Russ.)]
10. Ерофеев В.Т., Федорцов А.П., Богатов А.Д., Федорцов В.А. Биокоррозия цементных бетонов, особенности её развития, оценки и прогнозирования. *Фундаментальные исследования*, 2014, № 12, ч. 4, с. 708-716. [Erofeev V.T., Fedortsov A.P., Bogatov A.D., Fedortsov V.A. Biocorrosion of cement concretes, features of its development, evaluation and forecasting. *Fundamental'nyye issledovaniya*, 2014, № 12, iss. 4, pp. 708-716. (In Russ.)]
11. Гончарова Е.Н., Василенко М.И. Биообрастание гидротехнических сооружений. *Энерго- и ресурсосберегающие экологически чистые химико-технологические процессы защиты окружающей среды: сборник докладов II Международной научно-технической конференции*, Белгород, 06-08 декабря 2016 года, с. 8-12. [Goncharova E.N., Vasilenko M.I. Biofouling of hydraulic structures. *Energo- i resursosberegayushchiye ekologicheski chistyye khimiko-tekhnologicheskiye protsessy zashchity okruzhayushchey sredy: reports of the II International Scientific and Technical Conference*, Belgorod, December 06-08, 2016, pp. 8-12. (In Russ.)]
12. Evstigneeva I.K., Tankovskaya I.N. Spatial Dynamics of Fouling Phytomass on Hydraulic Structures in the Black Sea (Crimea). *Power Technology and Engineering*, 2021, vol. 55, iss. 3, pp. 348-353, doi: 10.1007/s10749-021-01364-6.
13. Makita H. Iron-oxidizing bacteria in marine environments: recent progresses and future directions. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 2018, vol. 34, p. 110, doi: 10.1007/s11274-018-2491-y.
14. Ломакин П.Д., Чепыженко А.И., Гребнева Е.А. Структура полей океанологических величин в Камышовой бухте (Крым) в ноябре 2019 года. *Системы контроля окружающей среды*, 2020, № 2(40), с. 29-35. [Lomakin P.D., Chepyzhenko A.I., Grebneva E.A. The structure of the fields of oceanological quantities in Kamyshovaya Bay (Crimea) in November 2019. *Sistemy kontrolya okruzhayushchey sredy*, 2020, vol. 12(4), pp. 708-716, doi: 10.33075/2220-5861-2020-2-29-35. (In Russ.)]

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE HYDRAULIC STRUCTURES OF SOME SEVASTOPOL BAYS

Doroshenko Yu.V.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: julia_doroshenko@mail.ru
Received 29.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0576

Abstract. Hydraulic structures, which are constantly present in bays, are one of the factors affecting the condition of coastal waters. Microperiphyton, which is formed on hydraulic structures in coastal zones with varying degrees of anthropogenic and recreational pressure, has the greatest indicative value. Microbiological studies of periphyton significantly complement the characterization of the ecological state of the coast. This study presents data on the quantitative distribution of heterotrophic and hydrocarbon-oxidizing bacteria in the microperiphyton of silt deposits of the southern breakwater of Sevastopol Bay and the eastern breakwater of Kamyshovaya Bay. The total number of heterotrophic bacteria in the silt deposits of the southern breakwater generally ranged from 10^3 to 10^4 cells/ml, while that of the eastern breakwater mainly varied within 10^3 – 10^5 cells/ml. The results obtained indicate that the silty deposits in the considered water areas to the development of the analyzed groups of bacteria participating in the processes of self-purification of water areas, and their number does not depend on the depth. Data analysis showed that the number of heterotrophic bacteria in the eastern breakwater was higher than in the southern breakwater. Seasonal differences in the number of studied groups of bacteria were not revealed. It was found that the processes of self-purification of the marine environment from oil and petroleum products are more active on the outer side of the breakwater, and these processes are more pronounced on the southern breakwater.

Key words: heterotrophic and hydrocarbon-oxidizing bacteria, hydraulic structures, the breakwater, the Black Sea.

ВЛИЯНИЕ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИДИИ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Скуратовская Е.Н.¹, Алёмова А.С.²

¹ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: skuratovskaya@ibss-ras.ru;

² Воронежский государственный университет,
Университетская площадь, 1, г. Воронеж, 394018, РФ

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0577

Аннотация. Практически все компоненты нефти в большей или меньшей степени являются токсичными и оказывают отравляющее действие на водные организмы, а некоторые группы нефтяных углеводородов (НУ) могут аккумулироваться в органах и тканях и передаваться по пищевым цепям. В зависимости от продолжительности и масштаба загрязнения НУ может наблюдаться широкий диапазон ответных реакций – от физиолого-биохимических, морфологических и поведенческих аномалий на уровне организмов до структурных и функциональных перестроек в популяциях и сообществах. Изучение биохимического отклика в тканях двусторчатых моллюсков, обитающих в условиях повышенных концентраций НУ в эксперименте, необходимо для понимания механизмов реорганизации метаболизма и адаптивных реакций, возникающих в организме гидробионтов при воздействии токсикантов. В работе представлены результаты исследования влияния нефтяных углеводородов на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы (активность супероксиддисмутазы, каталазы, уровень перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков), активность амнотрансфераз – аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы гепатопанкреаса черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в условиях острого токсикологического эксперимента. Результаты эксперимента позволили установить, что НУ при концентрациях 0,5 мг/л (10 ПДК) и 1 мг/л (20 ПДК) не оказывают влияния на активность аминотрансфераз, однако стимулируют развитие окислительного стресса путем смещения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону интенсификации процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков; при концентрации 1 мг/л углеводороды нефти вызывают активацию супероксиддисмутазы и ингибирование активности каталазы. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы демонстрируют высокую чувствительность к НУ и могут использоваться наряду с другими рекомендованными параметрами для оценки функционального состояния моллюсков в условиях нефтяного загрязнения среды обитания.

Ключевые слова: нефтяные углеводороды, мидия *Mytilus galloprovincialis*, гепатопанкреас, прооксидантно-антиоксидантная система, аминотрансферазы.

ВВЕДЕНИЕ

К числу приоритетных загрязняющих веществ по критериям экологической опасности в воде и донных отложениях прибрежных акваторий Черного моря относятся нефтепродукты, хлорорганические соединения, тяжелые металлы, в значительно меньшей степени – синтетические поверхностно-активные соединения, фенолы и другие вещества [1-3]. Нефть поступает в окружающую среду при ее добыче, транспортировке, аварийных разливах, а также в результате естественных просачиваний из нефтеносных пластов. Загрязнение нефтяными углеводородами (НУ) водоемов в настоящее время представляет собой серьезную экологическую проблему. Период сохранения нефти в водной среде варьирует от нескольких дней до 10 лет и более [4,5]. Повсеместное распространение в водных объектах НУ, их активное участие в протекающих физико-химических и биохимических процессах, взаимодействие с водными организмами обуславливает важную роль наблюдений за содержанием нефтяных компонентов при оценке состояния водных экосистем. В связи с этим нефть и нефтепродукты включены в перечень загрязнителей, подлежащих систематическому наблюдению и контролю в рамках национальных и международных программ по защите окружающей среды [3,6]. Практически все компоненты нефти в большей или меньшей степени являются токсичными и оказывают отравляющее действие на водные организмы, а некоторые группы НУ могут аккумулироваться в органах и тканях и передаваться по пищевым цепям [4,5,7]. Степень интоксикации водных животных и растений углеводородами нефти зависит от концентрации и продолжительности воздействия вещества, температуры среды, освещенности, а также пола, возраста и размера организмов [3].

В зависимости от продолжительности и масштаба загрязнения НУ может наблюдаться широкий диапазон ответных реакций – от физиолого-биохимических, морфологических и поведенческих аномалий на уровне организмов до структурных и функциональных перестроек в популяциях и сообществах. Установлены видовые особенности реагирования организмов на присутствие нефти в водной среде. Показано, что большинство видов морской фауны проявляют повышенную чувствительность к действию нефти на ранних стадиях (эмбриональных и постэмбриональных) развития [5,8,9]. Особый интерес представляет изучение влияния НУ на организм на

субклеточном уровне с использованием молекулярных (биохимических) маркеров, изменение которых при воздействии токсикантов может быть связано с неблагоприятными последствиями для организмов в будущем. Изменения биохимических показателей отражают состояние обмена веществ и зачастую свидетельствуют о развитии компенсаторного ответа организма на воздействие загрязнителей, позволяют выявить механизмы влияния токсикантов на конкретные звенья метаболизма, определить основную стратегию и особенности структурно-функциональных изменений в организме при адаптации к присутствию загрязнителей [2,5,10-12].

Следует отметить, что подавляющее большинство исследований направлено на тестирование токсичности индивидуальных компонентов нефти, тогда как в естественных условиях, как правило, организмы подвергаются воздействию многокомпонентных смесей, к которым относятся сырая нефть, различные виды легкого и тяжелого топлива. Поэтому особенно важно изучать биологические эффекты смесей НУ, что позволит экстраполировать данные, полученные в эксперименте, на естественные условия обитания гидробионтов [10,13,14].

При оценке токсического действия загрязнителей на организм гидробионтов наиболее часто используют двусторчатых моллюсков рода *Mytilus*. По показателю выживаемости представители рода *Mytilus* обладают высокой токсикорезистентностью ко многим типам загрязнения. Наряду с этим, пороговая чувствительность по некоторым показателям физиологической активности этих моллюсков 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 в лабораторных условиях. В то же время повышенная чувствительность физиологических функций к действию токсикантов дает возможность с большой точностью определять пригодность водной среды для жизнедеятельности моллюсков [10,12-15].

На основании вышеизложенного цель работы заключалась в исследовании влияния нефтяных углеводородов на некоторые биохимические параметры гепатопанкреаса черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* в условиях острого токсикологического эксперимента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моллюсков собирали в межнерестовый период в июле 2020 г. с коллекторов мидийно-устричной фермы в акватории бух. Карантинная (г. Севастополь). Размер моллюсков варьировал от 50 до 60 мм. Мидий очищали от обрастаний и акклиматизировали 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 [10]. В аквариумы объемом 40 л добавляли дизельное топливо (ДТ) «Летнее», используемое для морского транспорта в прибрежных акваториях г. Севастополя. Воздействующая на мидий концентрация ДТ в воде аквариумов составила 0,5 мг/л (10 ПДК) и 1 мг/л (20 ПДК). Выбор концентраций ДТ был обусловлен тем, что в летний период в некоторых районах севастопольской акватории содержание НУ в воде достигает 0,5 мг/л (10 ПДК) и выше [1]. Продолжительность эксперимента составила 5 суток. Отбор экспериментальных животных осуществлялся на 3-е и 5-е сутки.

По окончании опыта проводили биологический анализ моллюсков. Из контрольной и экспериментальных групп отбирали по 15 экземпляров. Для биохимических исследований использовали гепатопанкреас. Образцы тканей несколько раз промывали холодным 0,85% физраствором, гомогенизировали, центрифугировали при 8000 g 15 минут. В супернатанте анализировали активность ключевых антиоксидантных (АО) 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 аспаратаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Активность СОД определяли в системе нитросиний тетразолиевый – феназинметасульфат – никотинамиддинуклеотид [16], активность каталазы (КАТ) – по реакции взаимодействия перекиси водорода с молибдатом аммония [17], содержание ТБКРП – по образованию окрашенного комплекса с тиобарбитуровой кислотой [18]. Уровень ОМБ анализировали на основе реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белка с 2,4-динитрофенилгидразином [19]. 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). Активность АСТ и АЛТ определяли с использованием стандартных наборов реактивов “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия). Биохимические показатели пересчитывали на 1 мг белка сырой массы ткани, концентрацию которого определяли с использованием стандартного набора реагентов “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия). Достоверность различий между выборками оценивали с применением U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

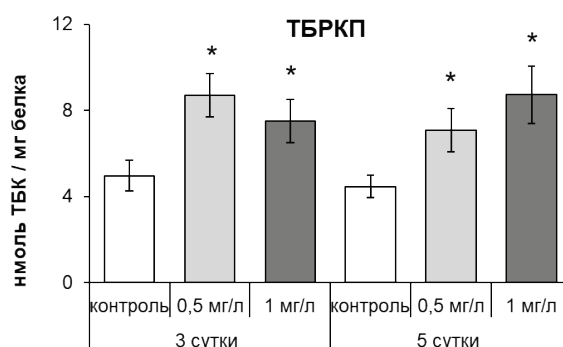


Рисунок 1. Содержание ТБКРП в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента
Примечание: *- различия достоверны по сравнению с контролем

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во время эксперимента мидии проявляли высокую резистентность к краткосрочному воздействию НУ, выживаемость животных составляла 100%. Содержание продуктов ПОЛ в гепатопанкреасе мидий во всех экспериментальных группах было достоверно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 1).

Уровень альдегидных продуктов нейтрального характера (D356) в двух экспериментальных группах и альдегидпроизводных основного характера (D430) у экземпляров из 2-й экспериментальной группы был достоверно выше по сравнению с контролем на 5-е сутки. Для остальных форм окисленных белков достоверных различий не обнаружено (рис. 2).

Активность СОД при концентрации 1 мг/л на 5-е сутки была достоверно выше, чем в контроле и у экземпляров 1-й экспериментальной группы (0,5 мг/л) ($p < 0,05$). Для КАТ отмечено достоверное снижение активности на 5-е сутки во 2-й экспериментальной группе (1 мг/л) по сравнению с контролем, 1-й экспериментальной группой (0,5 мг/л) и 3-м днем эксперимента ($p < 0,05$) (рис. 3).

Активность АЛТ и АСТ в гепатопанкреасе мидий в течение эксперимента не изменялась (рис. 4).

Учитывая ключевую роль свободнорадикальных процессов в механизмах токсичности широкого спектра загрязнителей, для биоиндикации и биотестирования качества водной среды широко применяют показатели проокислительно-антиокислительной системы (ПАС). Универсальным показателем окислительного стресса при действии отдельных токсикантов и комплексном загрязнении акваторий является увеличение в тканях гидробионтов содержания продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков [2,5,12,15]. Обнаруженное в наших исследованиях повышение содержания ТБКРП и уровня альдегидных

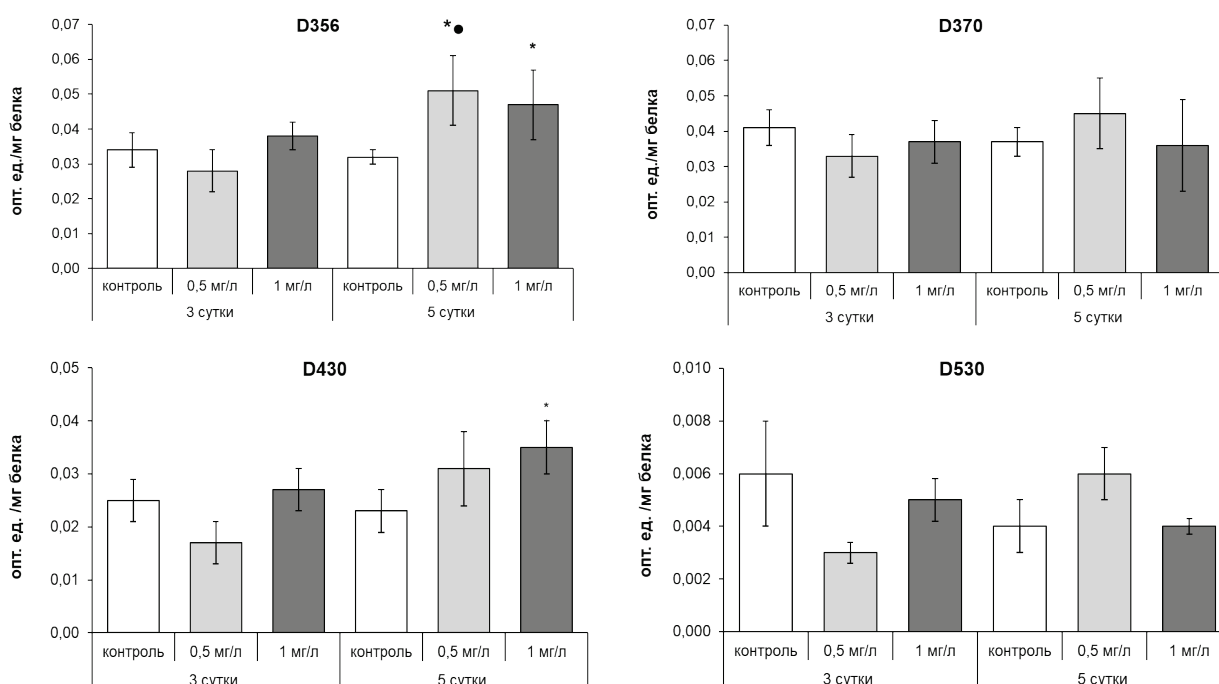


Рисунок 2. Уровень ОМБ в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента

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; *- различия достоверны по сравнению с контролем

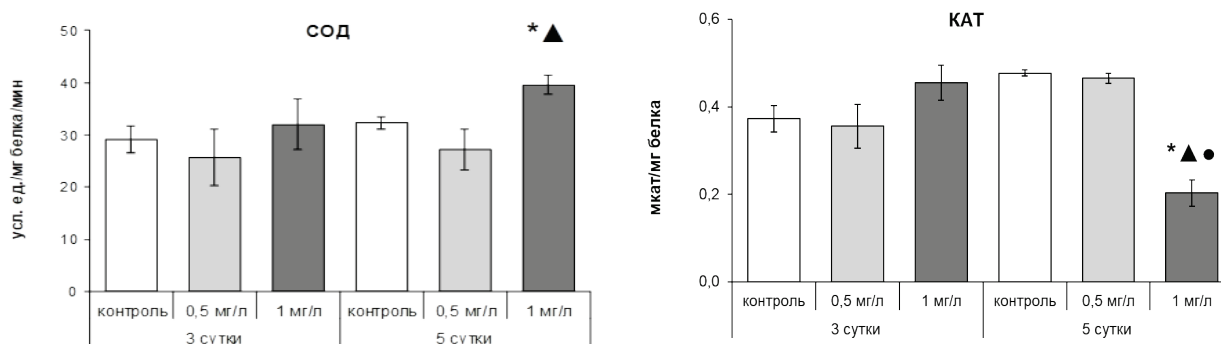


Рисунок 3. Активность антиоксидантных ферментов в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с контролем, ▲ – то же по сравнению с первой экспериментальной группой (0,5 мг/л); ● - то же по сравнению с 3-м днем эксперимент

продуктов нейтрального и основного характера (D356, D430) в гепатопанкреасе экспериментальных животных свидетельствует о том, что НУ при заданных концентрациях инициируют развитие окислительного стресса путем интенсификации процессов перекисного окисления липидов и белков. В то же время увеличение активности ключевого антиоксидантного фермента СОД на 5-й день эксперимента при максимальной концентрации (1 мг/л) может свидетельствовать о компенсаторном характере адаптивной ответной реакции на воздействие токсиканта, направленной на гдавление интенсивности свободнорадикального окисления. Однако снижение активности КАТ на фоне повышения активности СОД может свидетельствовать как об ингибировании фермента, расбалансировке согласованной работы СОД и КАТ, так и об увеличении активности других АО ферментов, выполняющих сходные с КАТ функции (глутатионпероксидазы и пероксидазы), а также значительном вкладе низкомолекулярных АО, обеспечивающих обезвреживание перекисей в гепатопанкреасе мидий при воздействии высоких концентраций НУ (20 ПДК).

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 [5,10,12,15,20]. Так, в условиях хронического загрязнения среды обитания *Dreissena Polymorpha* и *M. Galloprovincialis* мазутом было показано, что клетки гепатопанкреаса обладают более высоким уровнем антиоксидантной защиты по сравнению с жабрами. Отмечено достоверное повышение активности КАТ, СОД, глутатионредуктазы в гепатопанкреасе экспериментальных животных по сравнению с контролем. Количество конечных продуктов ПОЛ в жабрах и гепатопанкреасе как речных (*D. Polymorpha*), так и морских (*M. Galloprovincialis*) моллюсков в условиях загрязнения среды нефтепродуктами достоверно превышало аналогичные показатели контрольных экземпляров. Сравнительный анализ активности ферментов антиоксидантной системы экспериментальных и контрольных моллюсков (СОД, КАТ, глутатионредуктазы) показал, что повышение их активности, обеспечивающее снижение уровня активных форм кислорода в тканях в условиях загрязнения нефтепродуктами, сопровождается снижением активности глутатион-S-трансферазы, катализирующей утилизацию экзогенных ароматических соединений [15]. У мидий *M. edulis* из акваторий у побережья Испании не было зафиксировано достоверных различий в активности СОД между загрязненными НУ районами и относительно чистыми акваториями. При этом у моллюсков, собранных ближе к месту разлива нефтью, был отмечен достоверно повышенный уровень ПОЛ, что может свидетельствовать о прооксидантных эффектах нефти [20].

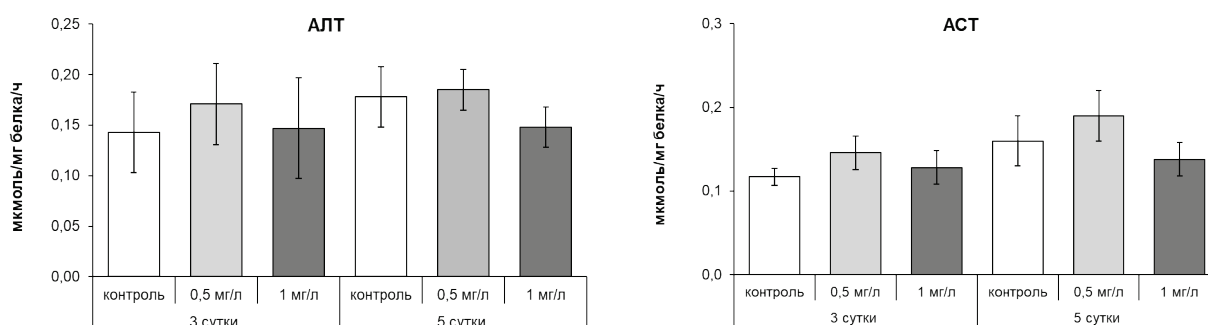


Рисунок 4. Активность аминотрансфераз в гепатопанкреасе мидий в условиях эксперимента

В биоиндикации и биотестировании качества водной среды наряду с показателями ПАС рекомендуется исследовать активность аминотрансфераз (АЛТ и АСТ), характеризующих состояние основных метаболических путей в организме. АЛТ и АСТ катализируют взаимные превращения аминокислот и α -кетокислот путем переноса аминогрупп, поэтому изменение их активности приводит к нарушению углеводного и белкового обмена. АЛТ и АСТ высокочувствительны к влиянию природных и антропогенных факторов и принимают участие в ответных реакциях организма на загрязнение окружающей среды [2,21-23]. Аминотрансферазы могут выступать в качестве биомаркеров стресса и тканевого повреждения [24]. В наших исследованиях активность аминотрансфераз в гепатопанкреасе мидий в течение эксперимента не изменялась, что указывает на отсутствие влияния заданных концентраций НУ на ключевые звенья углеводного и белкового метаболизма. Другими исследователями установлено повышение активности аминотрансфераз в гепатопанкреасе мидии *M. galloprovincialis*, обитающей в наиболее загрязненной НУ акватории по сравнению с относительно чистыми районами [21]. При длительном воздействии тяжелых металлов (кадмия и цинка) активность АСТ и АЛТ в гепатопанкреасе зеленой мидии *Perna viridis* повышалась [22]. В тканях пресноводных моллюсков родов *Planorbis*, *Physa*, *Biomphalaria* из вод с высоким уровнем загрязнения также отмечено повышение активности аминотрансфераз и содержания глюкозы. Выявленные особенности авторы объяснили интенсификацией глюконеогенеза, необходимого для энергетического обеспечения тканей моллюска в условиях антропогенного воздействия [23].

Таким образом, результаты эксперимента позволили установить, что НУ при концентрациях 0,5 мг/л (10 ПДК) и 1 мг/л (20 ПДК) не оказывают влияние на активность аминотрансфераз, однако стимулируют развитие окислительного стресса путем смещения проокислительно-антиокислительного равновесия в сторону интенсификации процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков; при концентрации 1 мг/л углеводороды нефти вызывают активацию супероксиддисумутазы и ингибирование активности каталазы. Показатели проокислительно-антиокислительной системы демонстрируют высокую чувствительность к НУ и могут использоваться наряду с другими рекомендованными параметрами для оценки функционального состояния моллюсков в условиях нефтяного загрязнения среды обитания.

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. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века. Под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова. Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН. Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018, 276 с. [*Sanitary and biological studies of the south-western Crimea coastal waters at the beginning of XXI century*. Eds: O.G. Mironov, S.V. Alyomov. Simferopol: Arial, 2018, 276 p. (In Russ.)]
2. 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.
3. Барабашин Т.О., Кораблина И.В., Павленко Л.Ф., Скрыпник Г.В., Короткова Л.И. Методическое обеспечение мониторинга загрязнения водных объектов Азово-Черноморского бассейна. *Водные биоресурсы и среда обитания*, 2018, т. 1, № 3-4, с. 9-27. [Barabashin T.O., Korablina I.V., Pavlenko L.F., Skrypnik G.V., Korotkova L.I. Methodological support of pollution monitoring of the Azov and Black seas water bodies. *Aquatic Bioresources & Environment*, 2018, vol. 1, no. 3-4, pp. 9-27. (In Russ.)]
4. Патин С.А. Нефть и экология континентального шельфа. ВНИРО, 2001, 247 с. [Patin S.A. *Oil and ecology of the continental shelf*. VNIRO, 2001, 247 p. (In Russ.)]
5. Алешко С.А. Действие нефтяных углеводородов на морские организмы на молекулярном уровне. *Известия ТИНРО*, 2007, т. 148, с. 247-261. [Aleshko S.A. Impact of petroleum hydrocarbons on marine organisms at molecular level. *Izv. TINRO*, 2007, vol. 148, pp. 247-261. (In Russ.)]
6. Постановление Правительства РФ № 681 от 9 августа 2013 г. «О государственном экологическом мониторинге и государственном фонде данных государственного экологического мониторинга». [Decree of the Government of the Russian Federation No. 681 of August 9, 2013 «On state Environmental Monitoring and the State Data Fund of State environmental Monitoring». (In Russ.)]
7. Каретникова Е.А., Жиркова А.Д. Миграция n-алканов дизельного топлива по трофической цепи: бактерии - инфузории. *Изв. РАН. Сер. Биол.*, 2005, вып. 3, с. 375-379. [Karetnikova E.A., Zhirkova A.D. Migration of n-alkanes in diesel fuel along the trophic chain: bacteria - ciliates. *Izv. RAS. Biological series*, 2005, vol. 3, pp. 375-379. (In Russ.)]
8. Teruhisa K., Masahiro N., Hiroshi K., Tomoko Y. Marine Life Research Group of Takeno, Kouichi O. Impacts of the Nakhodka heavy-oil spill on an intertidal ecosystem: an approach to impact evaluation using geographical information system. *Mar. Pollut. Bull.*, 2003, vol. 47, pp. 99-104.
9. Heintz R.A., Short J.W., Rice S.D. Sensitivity of fish embryos to weather crude oil: II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, vol. 18, pp. 494-503.

10. 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.)]
11. Немова Н.Н., Мешчерякова 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.)]
12. 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.
13. Скидченко В.С., Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Спектр изоформ кислой дезоксирибонуклеазы в тканях мидий *Mytilus edulis* в условиях модельной интоксикации нефтепродуктами. *Труда Карельского научного центра РАН*, 2012, вып. 2, с. 131-138. [Skidchenko V.S., Vysotskaya R.U., Nemova N.N. The range of acid deoxyribonuclease isoforms in the tissues of *Mytilus edulis* mussels in model experiments with petroleum hydrocarbon poisoning. *Proceeding of the Karelian scientific center of the RAS*, 2012, vol. 2, pp. 131-138. (In Russ.)]
14. Tim-Tim A.L.S., Morgado F., Moreira S., Rangel R., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M., Guilhermino L. Cholinesterase and glutathione S-transferase activities of three mollusk species from the NW Portuguese coast in relation to the 'Prestige' oil spill. *Chemosphere*, 2009, vol. 77, pp. 1465-1475.
15. Sukhareenko 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.
16. 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.
17. 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.)]
18. 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.)]
19. 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.)]
20. Sole M., Porte C., Biosca X. et al. Effects of the Aegean Sea oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 1996, vol. 113C, pp. 257-265.
21. Сигачева Т.Б., Чеснокова И.И., Гостюхина О.Л., Холодкевич С.В., Кузнецова Т.В., Андреев Т.И., Ковригина Н.П., Гаврюсева Т.В., Киринов М.П., Куракин А.С. Оценка рекреационного потенциала некоторых бухт города Севастополя с использованием методов биоиндикации. *Юг России: экология, развитие*, 2021, т. 16, № 1, с. 151-167. [Sigacheva T.B., Chesnokova I.I., Gostyukhina O.L., Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Andreenko T.I., Kovrigina N.P., Gavryuseva T.V., Kirin M.P., Kurakin A.S. Assessment of recreational potential of Sevastopol bays using bioindication methods. *South of Russia: ecology, development*, 2021, vol. 16, no. 1, pp. 151-167, doi: 10.18470/1992-1098-2021-1-151-167. (In Russ.)]
22. Mohite V.T., Lahir Y.K., Pathar M., Agwuoch S., Mane U.H. Study on the effects of exposure of sub lethal dose of cadmium and zinc on the enzymatic activity in the tissues of green mussel - *Perna viridis* (L) from Ratnagiri coast, Maharashtra. *Journal of ecophysiology and occupational health*, 2011, vol. 11, no. 3-4, pp. 131-140.
23. El-Khayat H.M.M., Hamid H.A., Gaber H.S., Mahmoud K.M.A., Flefel H.E. Snails and Fish as Pollution Biomarkers in Lake Manzala and Laboratory A: Lake Manzala Snails. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2015, vol. 6, no. 4, pp. 1-9.
24. Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 2000, vol. 247, pp. 295-311.

THE IMPACT OF PETROLEUM HYDROCARBONS ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS IN HEPATOPANCREAS OF THE BLACK SEA MUSSEL *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Skuratovskaya E.N.¹, Alyomova A.S.²

¹A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: skuratovskaya@ibss-ras.ru

²Voronezh State University
University Square, 1, Voronezh, 394018, Russia
Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0577

Abstract. Almost all oil components are more or less toxic and have a toxic effect on aquatic organisms, and some groups of petroleum hydrocarbons (PH) can accumulate in organs and tissues and transmitted through food chains. Depending on the duration and scale of PH pollution, a wide range of responses can be observed – from physiological and biochemical, morphological, behavioral anomalies at organism level to structural and functional rearrangements in populations and communities. The study of the biochemical response in tissues of bivalve mollusks living in conditions of elevated PH concentrations in the experiment is necessary to understand the mechanisms of metabolism reorganization and adaptive reactions that occur in the body of hydrobionts when exposed to toxicants. The paper presents the results of a study of the PH effect on the parameters of the prooxidant-antioxidant system parameters (superoxide dismutase and catalase activities, level of lipid peroxidation and oxidized proteins) and aminotransferase activities (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) in hepatopancreas of the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* in the acute toxicological experiment. The results of the experiment allowed to establish that PH at concentrations of 0.5 mg/l (10 MPC) and 1 mg/l (20 MPC) do not affect the activity of aminotransferases, but stimulate the development of oxidative stress by shifting the prooxidant-antioxidant balance towards the intensification of lipid peroxidation and protein oxidization; at the 1 mg/l concentration PH cause activation of superoxide dismutase and inhibition of catalase activity. Prooxidant-antioxidant system parameters demonstrate high sensitivity to PH and can be used along with other recommended parameters to assess the functional state of mollusks in conditions of oil environmental pollution.

Key words: petroleum hydrocarbons, mussel *Mytilus galloprovincialis*, hepatopancreas, prooxidant-antioxidant system, aminotransferases.

**РЕСПИРАТОРНЫЕ СВОЙСТВА КРОВИ *PLANILIZA HAEMATOCHEILUS*
(TEMMINCK & SCHLEGEL, 1845) И *ZOSTERISESSOR OPHIOCEPHALUS*
(PALLAS, 1814)
Солдатов А.А.^{1,2}**

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

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, 299053, г. Севастополь, РФ
Поступила в редакцию 03.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0578

Аннотация. Естественная подвижность организма сказывается на функциональном состоянии и развитии многих систем органов и тканей. Она затрагивает, прежде всего, системы кислородного обеспечения: респираторную, циркуляционную, кровь. Особый интерес представляют молекулярные комплексы, функциональные характеристики детерминированы на генетическом уровне. К ним следует отнести респираторные пигменты, гемоглобины в частности, которым и посвящена настоящая работа. Исследовали газотранспортные свойства крови высокоподвижной кефали-пиленгаса (*Planiliza haematocheilus*) и донного малоподвижного вида – бычка-травяника (*Zosterisessor ophiocephalus*). Кровь получали пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин. Кровь пиленгаса имела более высокую концентрацию гемоглобина и число эритроцитов. Различия в отношении гемоглобина составляли почти 40 % ($p < 0,01$), по эритроцитам около 2-х раз ($p < 0,01$) ($p < 0,001$). В отношении среднечеточного содержания гемоглобина (*MCH*) результаты были противоположны. Кровь пиленгаса отличалась низким сродством к кислороду и повышенной чувствительностью к рН. Величина P_{50} и значения эффекта Бора (r) у пиленгаса были на 25-26 % ($p < 0,01$) и в 2,7-2,8 раз ($p < 0,001$) соответственно выше, чем у травяника. Значения коэффициента Хилла (n), внутриклеточные концентрации нуклеотидтрифосфатов и Cl^- совпадали у обоих видов. Полученные различия отражают процесс адаптации организма пиленгаса к высокоподвижному образу жизни.

Ключевые слова: гемоглобин, эритроциты, кривые диссоциации крови, внутриэритроцитарная среда, *Planiliza haematocheilus*, *Zosterisessor ophiocephalus*.

ВВЕДЕНИЕ

Количественные значения концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови рыб имеют явно выраженную видовую специфику. Встречаются виды как с крайне низкими значениями данных показателей (эритроциты – $0,5-1,5 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$; гемоглобин – $50-70 \text{ г л}^{-1}$) [1,2], так и с крайне высокими (эритроциты – $3,0-4,2 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$; гемоглобин – $125-130 \text{ г л}^{-1}$) [3,4]. Эти различия в основном обусловлены уровнем естественной подвижности рыб. Пелагические, активно мигрирующие формы практически всегда имеют высокую кислородную емкость крови. Циркулирующая кровь донных, малоактивных видов, напротив, имеет низкий уровень пигмента и красных кровяных клеток. Данная закономерность отмечена в работах многих авторов [5-8]. Некоторые виды антарктических рыб, сочетающие низкую двигательную активность с существованием в переохлажденной среде ($-1,8^\circ\text{C}$), вообще не содержат в крови гемоглобина и эритроцитов [9].

Респираторные характеристики крови (кинетические характеристики связывания, чувствительность к рН, теплота оксигенации) в отношении рыб разной естественной подвижности не столь однозначны. Принято считать, что кровь у донных рыб обладает повышенным сродством к кислороду и низкой чувствительностью к рН [10]. Однако это наблюдается не всегда. В настоящем исследовании сравниваются гематологические показатели и кинетические характеристики связывания кислорода кровью рыб различной естественной подвижности: донного бычка-травяника и пелагического вида – кефали-пиленгаса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. Работа выполнена на взрослых половозрелых особях кефали-пиленгаса *Planiliza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) (длина – 22,7-36,5 см, вес – 350,6-515,3 г) (далее пиленгас) и бычка-травяника *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1814) (длина – 12,0-18,9 см, вес – 40,2-91,5 г) (далее травяник). Стадия зрелости гонад II-III. Первый является типичным пелагическим стайным видом, второй – донным [11].

Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 50 л с воздушной аэрацией. При транспортировке материала на значительные расстояния использовали полиэтиленовые мешки, атмосферу в которых заполняли чистым кислородом. После транспортировки животных рассаживали в аквариумы и бассейны объемом 200-1500 л, которые имели централизованные системы проточности воздушной аэрации и терморегуляции. Плотность посадки составляла 50-80 л на одну особь. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь. Температура воды поддерживалась на уровне $15 \pm 1^\circ\text{C}$. В данных условиях рыбу содержали в течение 30-45 суток с целью адаптации и снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой. В этот период, а также

в течение опыта особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6-7% от массы тела. В экспериментах использовали активно питающихся, подвижных особей.

Гематологические исследования. Пробы крови получали пункцией хвостовой вены. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (“Richter”, Венгрия). Концентрацию гемоглобина в крови определяли при помощи гемиглобинцианидного метода, используя стандартный набор реактивов (НПО “Биолар”). Количество эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева [12]. На основании полученных значений рассчитывали среднеклеточное содержание гемоглобина (MCH).

Респираторные характеристики крови. Кривые кислородного насыщения крови строили по методу Таккера в модификации Кляшторина и Саликзянова [13]. Измерения выполняли при PCO_2 в газовой среде тонометра – 4,0 и 10,7 гПа и температуре 15°C, параллельно регистрируя pH раствора. PO_2 в измерительной ячейке контролировали при помощи кислородного электрода Е 5046 (“Radiometer”, Дания), соединенного с кислородным модулем кислотнo-щелочного анализатора ОР-210 (“Radekis”, Венгрия). Содержание нуклеотидтрифосфатов (NTP) в клетках красной крови и растворах определяли посредством гидролиза лабильного фосфата [14]. Концентрацию Cl^- в эритроцитах определяли спектрофотометрически, используя наборы реактивов (“Lacheme”, Чехия). Эффект Бора (r) для цельной крови и гемолизатов рассчитывали по уравнению Дилла:

$$r = \frac{\Delta \lg P_{50}}{\Delta pH}, \quad (1)$$

где P_{50} – величина полунасыщения гемоглобина кислородом.

Коэффициент Хилла (n) оценивали, как tg угла наклона к оси абсцисс кривых диссоциации в логарифмической системе координат.

Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как $M \pm m$. В работе использовали стандартный пакет Grapher (версия 11).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гематологические характеристики циркулирующей крови представлены в таблице 1. Как видно, кровь высокоподвижного пиленгаса отличалась высокой концентрацией гемоглобина. В сравнении с травяником различия составляли более 40% ($p < 0,01$). Сходные отличия были установлены и в отношении числа эритроцитов в крови. У пиленгаса уровень клеток красной крови был почти в 2 раза выше ($p < 0,001$). В отношении среднеклеточного содержания гемоглобина (MCH) картина была обратной. Уровень пигмента в эритроцитах травяника на почти 15% превышал значения, полученные для пиленгаса ($p < 0,01$).

О степени родства цельной крови рыб к кислороду судили по величине ее полунасыщения (P_{50}) при PCO_2 – 4 гПа и температуре 15°C. Результаты представлены в таблице 2. Значения, полученные для пиленгаса, на 25-26% превышали величины, установленные для травяника ($p < 0,01$). Характер кооперативного взаимодействия субъединиц в молекуле гемоглобина отражает коэффициент Хилла. Можно констатировать, что эти характеристики совпадали у обоих видов. Различия не были статистически выражены. В то же время, чувствительность гемоглобина пиленгаса к изменению величины pH (изменения PCO_2 инкубационной среды 4,0→10,7 гПа, 15°C) была явно выше. Об этом судили по величине эффекта Бора. Различия составляли 2,7-2,8 раз ($p < 0,001$).

На кинетические характеристики связывания кровью кислорода могут оказывать существенное влияние параметры внутриэритроцитарной среды. В настоящем исследовании определили концентрацию Cl^- и уровень нуклеотидтрифосфатов (NTP) в клетках красной крови (табл. 2). Принципиальных различий установлено не было. Полученные значения были близки у обоих видов ($p > 0,05$).

Таблица 1. Гематологические характеристики крови пиленгаса и травяника

Показатели	n	Пиленгас	n	Травяник
Гемоглобин, г л ⁻¹	24	92,0±1,5	32	54,3±1,2
Эритроциты, л ⁻¹ (10 ¹²)	24	2,05±0,03	32	1,08±0,04
MCH, пг	24	44,9±0,5	32	51,4±1,4

Примечание: MCH – среднеклеточное содержание гемоглобина; n – число особей

Таблица 2. Кинетические характеристики связывания кислорода кровью и некоторые параметры внутриэритроцитарной среды у пиленгаса и травяника

Показатели	n	Пиленгас	n	Травяник
P_{50} , гПа	24	24,4±0,8	26	19,4±0,6
Коэффициент Хилла (n)	24	1,48±0,02	26	1,49±0,02
Эффект Бора (r)	24	-0,46±0,01	26	-0,17±0,01
NTP, ммоль л ⁻¹ Ег	24	7,94±0,19	6	7,82±0,42
Cl ⁻ , ммоль л ⁻¹ Ег	24	176,3±3,0	6	165,4±3,9

Примечание: n – число особей

ОБСУЖДЕНИЕ

Из результатов, представленных в настоящей работе, следует обратить внимание на следующие особенности респираторной функции крови пиленгаса в сравнении с травяником:

- высокую кислородную емкость крови, что отражает повышенная концентрация гемоглобина в крови и более высокое содержание циркулирующих эритроцитов;
- низкое сродство к кислороду и повышенная чувствительность к рН крови.

Относительно первой позиции можно констатировать, что она полностью совпадает с результатами, полученными на других видах морских и пресноводных рыб [5-8]. Организм высокоподвижных стайных видов, к которым можно отнести и пиленгаса, отличается особой организацией кислородотранспортных систем, обеспечивающих значительный приток кислорода к работающим скелетным мышцам. Рост кислородной емкости крови в данном случае оправдан с функциональной точки зрения.

Низкое сродство к кислороду, обнаруженное для цельной крови пиленгаса позволяет ей более полноценно разряжаться на тканевом уровне, что снижает нагрузку на циркуляционную систему (сердце) [15]. Такая кровь хуже насыщается на уровне респираторных поверхностей. Однако стайные виды практически не сталкиваются с дефицитом кислорода. Поэтому смещение кривых насыщения вправо обеспечивает необходимый адаптационный эффект. Донные, малоактивные виды, обитающие в прибрежных хорошо прогреваемых акваториях, напротив, довольно часто сталкиваются с внешней гипоксией. Повышение сродства крови к кислороду, в сочетании с общим угнетением скоростей обменных процессов в тканях, в этой ситуации является наиболее удачной стратегией адаптации.

Различия в сродстве цельной крови к кислороду часто не выявляются на уровне очищенных гемолизатов. Это позволяет рассматривать внутриэритроцитарную среду как один из факторов коррекции кислородосвязующих свойств крови. Известно, что NTP (АТР, GTP) являются основными аллостерическими модуляторами сродства гемоглобина к кислороду у костистых рыб [16-19]. Характерный для эритроцитов млекопитающих 2,3-дифосфоглицерат обнаружен только в клетках красной крови миног и рыб, обладающих бимодальным типом дыхания [18,20]. NTP фиксируют дезоксиконформацию гемоглобина, снижая его сродство к кислороду, повышая эффект Бора [21]. Участки связывания NTP с молекулой гемоглобина окончательно не определены [22]. Можно допустить, что отмеченные выше различия в сродстве крови к кислороду между пиленгасом и травяником могут определяться этими причинами.

Высокая чувствительность к рН (эффект Бора) крови пиленгаса позволяет повысить эффективность процесса деоксигенации крови на тканевом уровне в условиях локального тканевого ацидоза [16]. У донного травяника такая стратегия адаптации снизит эффективность процесса оксигенации крови на уровне респираторных поверхностей, что является приоритетным при обитании в придонных слоях воды с низким содержанием кислорода. Поэтому у него сохраняется низкая чувствительность к рН.

Различная чувствительность крови к рН (эффект Бора), установленная в данной работе, по-видимому, определяется особенностями первичной структуры белка. Показано, что около 60% протонов, высвобождаемых молекулой гемоглобина человека при оксигенации определяется Hisβ146 и Valα1 [23]. В гемоглобине рыб количество этих групп может изменяться [15,24,25]. В ряде случаев His заменяется на Phe, а Val на Ser, что приводит к ослаблению или полному исчезновению чувствительности пигмента к рН [23,26,27]. Снижение эффекта Бора можно также связать с диссоциацией комплекса Hb-NTP вследствие высокой концентрации Mg²⁺ в клетке, которая в настоящем исследовании не определялась. Таким образом, понижение чувствительности гемоглобина донных рыб к рН, по-видимому, носит комплексный характер и связано как с составом внутриклеточной среды, так и свойствами самого пигмента.

С другой стороны, установлено, что гемоглобиновая система рыб, независимо от уровня их подвижности обычно содержит два функционально различных компонента: один обладает высоким сродством к кислороду и низкой чувствительностью к рН, второй – пониженной связующей способностью и выраженным эффектом Бора [27-31]. Соотношение этих компонентов может меняться в зависимости от условий среды. Можно допустить, что

в гемоглобине донных рыб доминируют компоненты первого, а в гемоглобине пелагических рыб – второго типа. Действие эритроцитарной среды на процесс оксигенации пигмента в целом, в связи с этим, может иметь различную эффективность.

Таким образом, результаты сравнительного анализа показали, что респираторные характеристики крови высокоподвижного пиленгаса и малоподвижного травяника отражают процесс адаптации их к различным условиям среды и состоянию организма. Высокая кислородная емкость крови, низкое ее сродство к кислороду, повышенная чувствительность к рН позволяют доставлять к работающим мышцам пиленгаса значительные объемы окислителя, что важно при продолжительном активном плавании. У донного малоподвижного травяника, обитающего в воде с пониженным содержанием кислорода, в приоритете остается сам факт доставки кислорода. Этому способствует высокое сродство крови к нему и пониженная чувствительность к рН.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при частичной поддержке проекта РФФИ (№ 20-04-00037).

Список литературы / References:

1. Точилина Л.В. Гематологические показатели морских рыб в летний период. *Гидробиол. ж.*, 1991, т. 27, с. 63-66. [Tochilina L.V. Hematological indicators of marine fish in the summer period. *Hydrobiol. J.*, 1991, vol. 27, pp. 63-66. (In Russ.)]
2. Vossough G.H., Shahsavani D., Peyghan R. Some blood parameters of gold fish (*Carrasius auratus*). *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.*, 1997, vol. 52, pp. 70-78.
3. Rao S.K., Bhaskar B.R., Panduranga R.D., Durga P.Y.V. Haemograms of six marine teleosts from Visakhapatnam coast. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.*, 1989, vol. 55B, pp. 103-106.
4. Shuett D.A., Lehmann J., Goerlich R., Hamers R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. 1. Blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.*, 1997, vol. 13, pp. 83-89.
5. Коржуев П.А. Гемоглобин (сравнительная физиология и биохимия). М.: Наука, 1964, 287 с. [Korzhuev P.A. *Hemoglobin (comparative physiology and biochemistry)*. Moscow: Nauka, 1964, 287 p. (In Russ.)]
6. Коржуев П.А., Жаворонков В.И. Объем крови и количество гемоглобина у большеглазых тунцов. *Дыхательные белки некоторых групп современных животных*, 1979, с. 121-126. [Korzhuev P.A., Zhavoronkov V.I. Blood volume and the amount of hemoglobin in big-eyed tuna. *Respiratory proteins of some groups of modern animals*, 1979, pp. 121-126. (In Russ.)]
7. Kakuno A., Sezaki K., Ikeda Y. Comparative hematology among 33 fish species of Ostariophysi. *Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci. Japan*, 1996, № 8, pp. 15-27.
8. Lay P.A., Baldwin J. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlation with oxygen transport and nuclear volume. *Fish Physiol. Biochem.*, 1999, vol. 20, pp. 31-35.
9. Di Prisco G. Physiological and biochemical adaptations in fish to a cold marine environment. *Antarc. Commun.: Species, Struct. Surviv. Battaglia. Cambridge Univ. Press (UK)*, 1997, pp. 251-260.
10. Soldatov A.A. Oxygen-Dissociation Properties of Blood and Intraerythrocytic Medium Composition in Sea Fish with Different Motor Activity. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 1997, vol. 33, no. 6, pp. 534-539.
11. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. М.: Наука, 1964, 552 с. [Svetovidov A.N. *Fishes of the Black Sea*. Moscow: Nauka, 1964, 552 p. (In Russ.)]
12. Стенко М.И. Кровь. *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования*, М.: Медицина, 1975, с. 5-135. [Stenko M.I. Blood. *Handbook of clinical laboratory research methods*, M.: Medicine, 1975, pp. 5-135. (In Russ.)]
13. Кляшторин Л.Б., Саликзянов Р.Ф. Определение кривых кислородного насыщения крови рыб. *Биол. внутр. вод*, 1980, № 44, с. 68-71. [Klyashtorin L.B., Salimzyanov R.F. Determination of oxygen saturation curves of fish blood. *Biol. internal water*, 1980, no. 44, pp. 68-71. (In Russ.)]
14. Крикливый И.А., Рекун Г.М., Артюх В.П., Стародуб Н.Ф. Методы изучения функциональных свойств гемоглобина. *Методы молекулярной биологии*, Киев: Наук. думка, 1979, с. 191-201. [Kriklyviy I.A., Rekun G.M., Artyukh V.P., Starodub N.F. Methods of studying the functional properties of hemoglobin. *Methods of molecular biology*, Kiev: Nauk. dumka, 1979, pp. 191-201. (In Russ.)]
15. Soldatov A.A. Peculiarities of structure, polymorphism, and resistance to oxidation of fish hemoglobins (review). *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2002, vol. 38, no. 4, pp. 392-400.
16. Soldatov A.A. Effects of temperature, pH, and organic phosphates on fish hemoglobins (review). *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2003, vol. 39, no. 2, pp. 159-168.
17. Pelster B., Weber R.E. Influence of organic phosphates on the Root effect of multiple fish haemoglobins. *J. Exp. Biol.*, 1990, vol. 147, pp. 425-437.
18. Wells R.M.G., Baldwin J., Seymour R.S., Weber R.E. Blood oxygen transport and hemoglobin function in three tropical fish species from northern Australian freshwater billabongs. *Fish Physiol. Biochem.*, 1997, vol. 16, no. 3, pp. 247-258.
19. Val A.L., De Menezes G.C., Wood C.M. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *J. Fish Biol.*, 1997, vol. 52, no. 1, pp. 83-93.
20. Bartlett G.R. Phosphates in red cells of hagfish and a lamprey. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 73A, no. 1, pp. 141-145.

21. Fraboni P.J., Poluhovich J.J. Bohr-effect enhancement in *Anguilla rostrata* hemoglobin treated with erythrocytic organic phosphates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1988, vol. 115, no. 3. pp. 213-220.
22. Wurm Th., Albers C. Interaction of allosteric effectors (ATP, CO₂, H⁺) modulating oxygen affinity of the hemoglobin in the carp, *Cyprinus carpio*. *J. Comp. Physiol.*, 1989, vol. 159B, no. 3. pp. 255-261.
23. Barra D., Bossa F., Brunori M. Structure of binding sites for heterotropic effectors in fish haemoglobins. *Nature*, 1981, vol. 293, no. 5833, pp. 587-588.
24. Fago A., Bendixen E., Malte H., Weber R.E. The anodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. Molecular basis for allosteric effects in a Root-effect hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 25, pp. 15628-15635.
25. Mylvaganam S.E., Bonaventura C., Bonaventura J., Getzoff E.D. Structural basis for the Root effect in haemoglobin. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, vol. 3, no. 3. pp. 275-283.
26. D'Avino R., Caruso C., Schinina M.E., Rutigliano B., Romano M., Camardella L., Bossa F., Barra D., Di Prisco G. The amino acid sequence of the α and β chains of the two hemoglobins of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps neglecta*. *FEBS Lett.*, 1989, vol. 250, no. 1, pp. 53-56.
27. Gillen R.G., Riggs A. Structure and function of the isolated hemoglobins of the American eel, *Anguilla rostrata*. *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, no. 6. pp. 1961-1969.
28. Imsland A.K., Brix O., Naevdal G., Samuelsen E.N. Hemoglobin genotypes in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque), their oxygen affinity properties and relation with growth. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, vol. 116A, no. 2, pp. 157-165.
29. Riccio A., Tamburrini M., Carratore V., Di Prisco G. Functionally distinct haemoglobins of the cryopelagic Antarctic teleost *Pagothenia borchgrevinki*. *J. Fish Biol.*, 2000, vol. 57, pp. 20-32.
30. Samuelsen E.N., Imsland A.K., Brix O. Oxygen binding properties of three different hemoglobin genotypes in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque): Effect of temperature and pH. *Fish. Physiol. Biochem.*, 1999, vol. 20, no. 2, pp. 135-141.
31. Sauer J., Harrington J.P. Hemoglobins of the sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, vol. 91A, no. 1, pp. 109-114.

RESPIRATORY PROPERTIES OF BLOOD *PLANILIZA HAEMATOCEILUS* (TEMMINCK & SCHLEGEL, 1845) AND *ZOSTERISSESSOR OPHIOCEPHALUS* (PALLAS, 1814)

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 University St., Sevastopol 299053, Russia

Received 03.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0578

Abstract. The natural mobility of the organisms affects the functional state and development of many organ systems and tissues. It influences, first of all, oxygen supply systems: respiratory, circulatory, blood. Of particular interest are molecular complexes whose functional characteristics are determined at the genetic level. These include respiratory pigments, hemoglobin in particular, to which this work is devoted. The gas transport properties of the blood of a highly mobile mullet-pilengas (*Planiliza haematocheilus*) and a sedentary bottom species – grass goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) were studied. Blood was obtained by puncture of the caudal artery. Heparin was used as an anticoagulant. Pilengas' blood had a higher concentration of hemoglobin and the number of red blood cells. The differences in hemoglobin were almost 40% ($p < 0.01$), in erythrocytes about 2 times ($p < 0.01$) ($p < 0.001$). With respect to the mean cell hemoglobin content (MCN), the results were the opposite. Pilengas' blood was characterized by low affinity for oxygen and increased sensitivity to pH. The value of P50 and the values of the Born effect (r) in pilengas were 25-26% ($p < 0.01$) and 2.7-2.8 times ($p < 0.001$), respectively, higher than in grass goby. The values of the Hill coefficient (n), intracellular concentrations of nucleotide triphosphates and Cl⁻ coincided in both species. The differences obtained reflect the process of adaptation of the pilengas organism to a highly mobile lifestyle.

Key words: hemoglobin, erythrocytes, blood dissociation curves, intra-erythrocyte medium, *Planiliza haematocheilus*, *Zosterisessor ophiocephalus*.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *DUNALIELLA* ИЗ ГИПЕРСОЛЕННЫХ ОЗЕР КРЫМА

Шаповалова В.Е., Евстигнеев В.П., Гаджи А.В., Лантушенко А.О.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 15.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0579

Аннотация. В роде микроводорослей *Dunaliella* существует большое количество видов, сильно отличающихся по продукционным характеристикам, но схожих по внешнему виду. Разные виды *Dunaliella* имеют разные формы и размеры. Клетка водоросли может быть эллипсоидной, яйцевидной, почти сферической, грушевидной или веретенообразной. Размер клеток даже внутри вида изменчив, и различия связаны с условиями роста, например, количеством питательных веществ, интенсивностью света и концентрацией соли. Для идентификации таксономического статуса разных видов микроводорослей рода *Dunaliella* необходимы морфометрический и филогенетический анализы. Целью работы является морфометрический анализ диких штаммов микроводорослей рода *Dunaliella* из гиперсолёных озёр Крыма: Сасык-Сиваш, Сакского, Мойнакского и Аджиголь. С помощью визуализирующего проточного цитометра FlowCam 8400 был проведено исследование четырех популяций, в каждой анализировалось около 10 тысяч клеток, оценивалось 8 морфологических параметров. Обработка результатов проводилась с помощью программы для статистической обработки данных R. Для оценки степени делимости клеток *D. salina* и для построения соответствующей дискриминирующей функции использовался метод линейного дискриминантного анализа. Применяя пошаговый алгоритм построения дискриминантной функции, был установлен оптимальный набор наиболее показательных морфометрических характеристик достаточных для разделения совокупности клеток на группы по принадлежности их к тому или иному водоему.

Ключевые слова: *Dunaliella*, морфологический анализ, FlowCam, дискриминантный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Dunaliella – род зеленых одноклеточных микроводорослей, представляющих практическую ценность их использования в качестве перспективного промышленного источника β -каротина, глицерола и других натуральных биологически активных веществ. Физиологическое состояние клеток этого организма тесно связано с абиотическими факторами. Клетки микроводоросли могут иметь окрас от зеленого до буро-красного. *Dunaliella salina* – галофильный вид микроводоросли, который отличается повышенной толерантностью к экстремальным условиям солености, температуры и освещенности [1]. В условиях сильного стресса представители этого вида могут накапливать более 5% β -каротина в сухой биомассе [2]. Существуют разные виды микроводорослей рода *Dunaliella*, обладающих разным биотехнологическим потенциалом. В частности, *D. tertiolecta* – зеленая жгутиковая водоросль с высоким содержанием липидов.

Водоросли рода *Dunaliella* не имеют клеточной стенки, ее заменяет тонкая эластичная мембрана, поэтому клетки могут менять свой внешний вид в ответ на изменяющиеся факторы окружающей среды. Например, после осмотического шока клетки временно приобретают сферическую форму. В связи с этим внутривидовая изменчивость морфометрических характеристик клеток велика и может превосходить межвидовую, что создает ограничение в использовании морфометрических характеристик для определения принадлежности водоросли к тому или иному виду [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были исследованы дикие штаммы микроводоросли рода *Dunaliella*, отобранные из озёр Сасык-Сиваш, Аджиголь, Сакского озера, а также из водоемов близ Мойнакского озера и Сасык-Сиваша. Полевые изоляты были отобраны в августе 2021 года. Предварительный микроскопический анализ проводился на световом микроскопе Leica DM4B с увеличением $\times 1000$.

На рисунке 1 представлены микрофотографии микроводорослей из озёр в условиях высокой солености (до 240 г/л) и температуры (около 30°C), которые являются стрессовыми для данной культуры. В условиях стресса микроводоросль выделяет каротиноиды, приобретая окраску от желтого до бордового цвета. В пробах из озёр Сасык-Сиваш, Саки и водоема у озера Мойнаки преобладали клетки насыщенного бордового цвета, что может быть использовано в качестве классификационного признака принадлежности к *D. salina* [4].

Для получения альгологически чистой культуры, около 100 клеток из каждой пробы пересаживали на агар. Далее колония клеток, выращенных на агаре, пересаживалась в стерильные колбы со средой Ben-Amotz с соленостью 120 г/л. С помощью микроскопа Leica DM4 были оценены форма и размеры клеток микроводорослей (рис. 2).

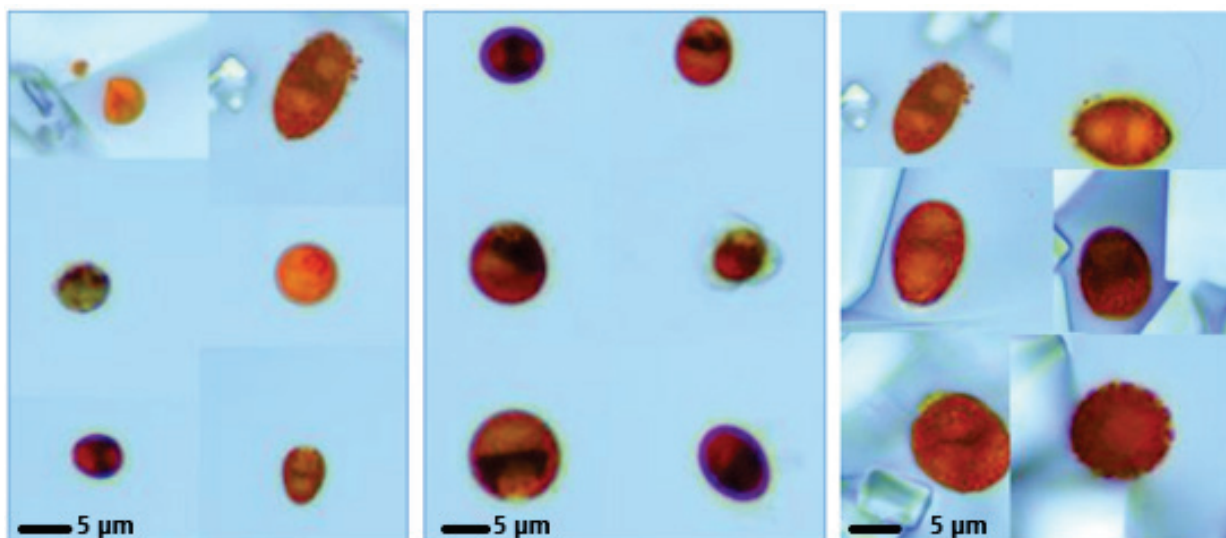


Рисунок 1. Микрофотографии водоросли из Сакского озера, озера Сасык-Сиваш и Мойнакского озера в условиях высокой концентрации соли и температуры (увеличение $\times 1000$)

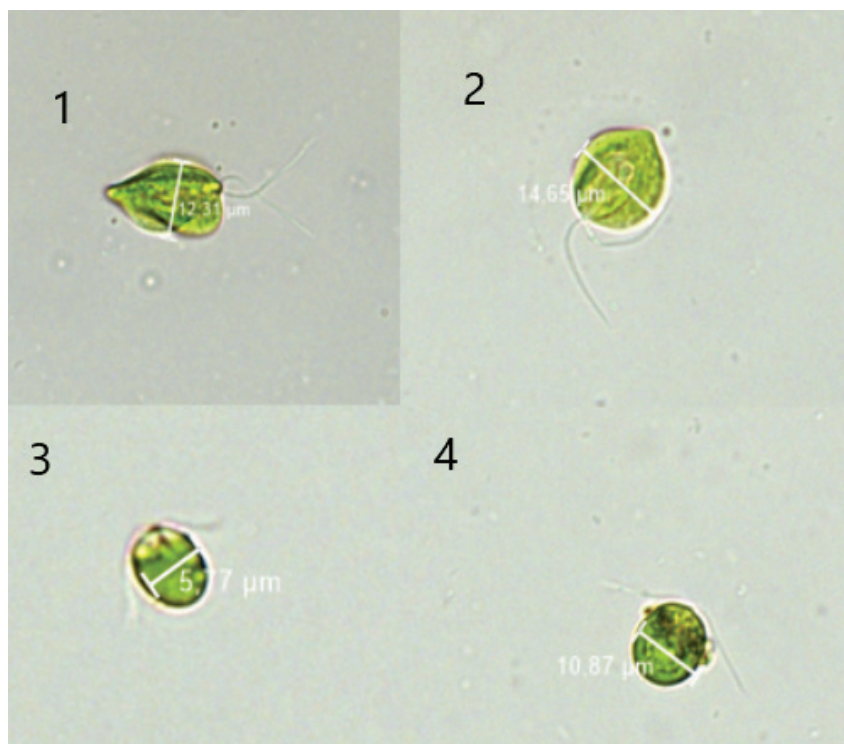


Рисунок 2. Фотографии микроводоросли, выращенной на агаре (увеличение $\times 1000$): 1 – Аджиголь (12,31 мкм), 2 – Мойнакское (14,65 мкм), 3 – Сакское (5,77 мкм), 4 – Сасык-Сиваш (10,87 мкм)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ размерных характеристик проводился с помощью проточного цитометра с возможностью визуализации FlowCam 8400. С помощью программного обеспечения VisualSpreadsheet5 были получены до 40 морфометрических параметров отдельных клеток, анализ которых в совокупности теоретически позволит дать количественную оценку сходства и различия между таксонами разного порядка, а также строить классификаторы для их автоматического разделения в будущем. Количество исследованных объектов в каждой пробе составило порядка 5 тысяч клеток. Было показано, что наиболее мелкоклеточные формы микроводоросли характерны для Сакского озера (средняя площадь $37,5 \pm 12,4$ мкм²), тогда как крупноклеточные формы в основном содержались в пробах из озера Мойнаки ($124,1 \pm 24,6$ мкм²). Для озера Аджиголь характерны клетки, сильно отличающиеся по своей форме и размерам ($87,8 \pm 46,1$ мкм²) (на основе цифровой библиотеки изображений) (табл. 1).

Таблица 1. Морфологические характеристики микроводорослей из гиперсолёных озёр, полученные с помощью цитометра FlowCam

Озеро	Средняя площадь, мкм ²	Средний диаметр, мкм	Средняя длина, мкм	Средняя ширина, мкм	Средний объем, мкм ³
Сасык-Сиваш	56,4 ± 25,3	8 ± 1,7	9,6 ± 1,8	8,1 ± 1,9	322,3 ± 259,6
Саки	37,5 ± 12,3	6,8 ± 1,1	7,9 ± 1,3	7,2 ± 1,2	167,2 ± 91,8
Мойнаки	124,1 ± 24,6	12,3 ± 1,2	15,7 ± 2,3	13 ± 1,9	878,8 ± 259,3
Аджиголь	87,8 ± 46,1	10 ± 3	12,5 ± 4,1	10,12 ± 3,3	590,6 ± 407,1

На рисунке 3 представлен скриншот из программы VisualSpreadsheet5, на котором изображены микрофотографии культуры из озера Аджиголь, сделанные с помощью цитометра FlowCam. Данные были отсортированы по размеру и на скриншоте показана выборка самых крупных клеток.

Далее проводился объективный статистический анализ совокупности наиболее показательных морфометрических параметров в среде R (<https://www.r-project.org>). К наиболее показательным были отнесены параметры с высоким уровнем изменчивости (коэффициент вариации C_v) их значений в пробах - длина, ширина, площадь, объем, округлость, биообъем (рис. 4).

Для оценки степени разделимости клеток *D. salina* и для построения соответствующей дискриминирующей функции использовался метод линейного дискриминантного анализа (пакет lda, <https://cran.r-project.org/web/packages/lda/index.html>). Применяя пошаговый алгоритм построения дискриминантной функции,

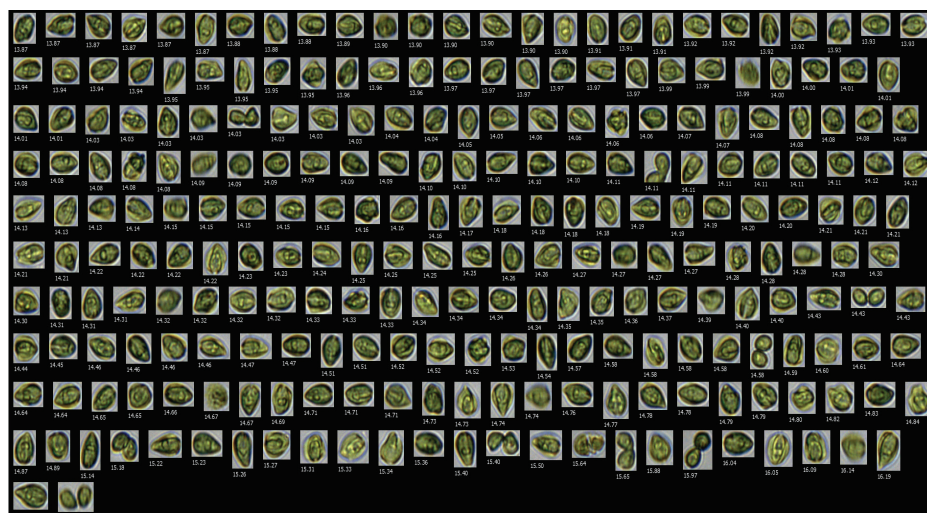


Рисунок 3. Фотографии культуры микроводорослей озера Аджиголь, полученные с использованием FlowCam.

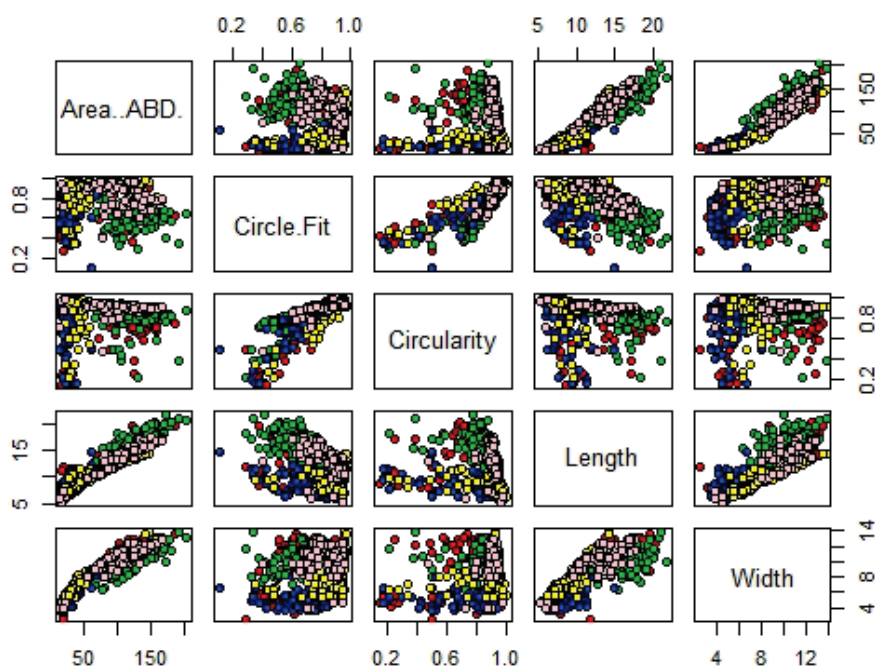


Рисунок 4. Графики рассеяния отдельных морфометрических характеристик клеток *D. Salina*

```
> importance(foo.rf, type=1)
              MeanDecreaseAccuracy
Area..ABD.          21.02687
Biovolume..Sphere.  20.58160
Circle.Fit          31.54215
Circularity          43.37620
Diameter..ABD.      21.33530
Length              24.98147
Volume..ABD.        21.21909
Width                35.04624
```

Рисунок 5. Наиболее показательные морфометрические характеристики, выделенные по результатам расчетов в среде R

был установлен оптимальный набор наиболее показательных морфометрических характеристик («importance» (рис. 5)) – признак округлости и площади (Circularity+Area), - достаточных для разделения (улучшение точности модели менее чем на 1%) совокупности клеток на группы по принадлежности их к тому или иному водоему.

Таким образом, использование линейного дискриминантного анализа позволило определить морфометрические признаки, с помощью которых можно установить принадлежность клеток к разным водным объектам. Сравнение результатов, полученных в данной работе, с классификацией, предложенной в [4], позволяет сделать заключение, что в озерах Саки, Сасык-Сиваш и в водоеме у озера Мойнаки обитают микроводоросли вида *D. salina*, а в озере Аджиголь присутствуют другие виды зеленых одноклеточных микроводорослей. Важно отметить, что для современной идентификации культур микроводорослей необходимо использовать, как морфометрический, так и молекулярно-генетический подход, который планируется реализовать в последующих исследованиях.

Список литературы / References:

1. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod.* К.: Наукова думка, 1973, 244 с. [Masyuk N.P. *Morfologiya, sistematika, ekologiya, geograficheskoe rasprostranenie roda Dunaliella Teod.* K.: Naukova dumka, 1973, 244 c. (In Russ.)]
2. Ben-Amotz A., Avron M. On those factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 1983, vol. 72, pp. 593-595.
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.
4. Borowitzka M.A., Siva C.J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J Appl Phycol.*, 2007, vol. 19, pp. 567-590.

COMPARATIVE STUDY ON MORPHOMETRICS OF MICROALGAE OF THE GENUS *DUNALIELLA* FROM HYPERSALTED LAKES OF CRIMEA

Shapovalova V.E., Evstigneev V.P., Gadzhi A.V., Lantushenko A.O.

Sevastopol State University

33 University St., Sevastopol 299053, Russia, e-mail: veshapovalova@sevsu.ru

Received 15.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0579

Abstract. Genus of microalgae *Dunaliella* includes a large number of species greatly differing by its product potential, but being similar by general physical appearance. In fact, different *Dunaliella* species differ much by cell shape and size. The algae cell can be ellipsoid, ovoid, almost spherical, pear-shaped or fusiform. Cell size is variable even within a species, and differences are related to growth conditions, such as the amount of nutrients, light intensity, and salt concentration. Morphometric and phylogenetic analyses are necessary to identify the taxonomic status of different species of microalgae of the genus *Dunaliella*. The aim of the work is a morphometric analysis of wild strains of microalgae of the genus *Dunaliella* from hypersalted lakes of the Crimea: Sasyk-Sivash, Saki, Moynak and Ajigol. With the help of the FlowCam 8400 visualizing flow cytometer, four populations were studied, about 10 thousand cells were analyzed in each, 8 morphological parameters were evaluated. The results were processed using a program for statistical data processing R. To assess the degree of separability of *D. salina* cells and to construct the corresponding discriminating function, the method of linear discriminant analysis was used. Applying a step-by-step algorithm for constructing a discriminant function, an optimal set of the most indicative morphometric characteristics sufficient to divide a set of cells into groups according to their belonging to a particular reservoir was established.

Key words: *Dunaliella*, morphological analysis, FlowCam, discriminant analysis.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2022 ГОД

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Агаева Г.А., Сафарли Г.Р., Годжаев Н.М. Молекулярное моделирование конформационной подвижности молекулы гиламбатина № 2, с. 194-196
- Апашева Л.М., Будник М.И., Смурова Л.А., Овчаренко Е.Н., Лобанов А.В., Савранский В.В., Турбин В.В., Розанцев М.В. Использование лазерного импульсного излучения и растворов эпопероксида для активации семян сахарной свеклы № 3, с. 374-378
- Багиров Р.М., Боброва Е.Ю., Гафарова Х.О., Багирова О.Ш. Комплексообразование ионов железа с грибными меланинами № 4, с. 525-529
- Борисова Е.Д., Кожемова Б.Э., Константинов О.О., Корепанова Е.А., Михеев В.М., Михнич А.В., Сухова В.И., Астанина П.Н., Коплак О.В., Аносов А.А. Влияние наночастиц феррита кобальта в гидрофильной оболочке на проводимость бислойных липидных мембран № 2, с. 185-193
- Вардеванян П.О., Шагинян М.А., Микаелян М.С., Григорян С.В. Исследование влияния ММ ЭМВ на комплексообразование Hoechst 33258 с биомакромолекулами № 1, с. 40-44
- Гасанова А.Э., Мусаев Н.А., Оджавердиева С.Я. Биоэлектрические эффекты отмывания клеток *Chara fragilis* от растворов фитокомпозиции одуванчик-зверобой-календулы № 1, с. 31-35
- Жигачева И.В., Крикунова Н.И., Генерозова И.П., Буцанец П.А., Васильева С.В., Расулов М.М. Тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами предотвращает дисфункцию митохондрий в условиях стресса № 1, с. 17-24
- Клочкова В.С., Лелеков А.С., Гудвилович И.Н. Динамика концентрации хлорофилла а и В-фикоэритрина в культуре *Porphyridium purpureum* в условиях светового и углеродного лимитирования № 4, с. 534-540
- Котюк П.Ф., Корниенко В.О. Влияние сочетанного действия переменного магнитного поля с наночастицами Fe_3O_4 (СГТ) на онтогенез и морфометрию кукурузы сахарной № 1, с. 45-49
- Кочарли Н., Гумматова С. Продукция активных форм кислорода при действии ультрафиолетового-В излучения на клетки дрожжей № 2, с. 199-203
- Кулешова Т.Э., Желначева П.В., Гасиева З.А., Галушко А.С., Панова Г.Г. Зависимость биоэлектрического потенциала в корнеобитаемой среде от формы азота в питательном растворе № 4, с. 546-551
- Набиев С.Р., Копылова Г.В., Щепкин Д.В. Влияние сердечного миозин-связывающего белка с на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия в миокарде № 1, с. 13-16
- Набиев С.Р., Никитина Л.В., Матюшенко А.М., Щепкин Д.В., Копылова Г.В. Исследование влияния актин-связывающих белков на изгибную жесткость актиновой нити с помощью метода оптической ловушки № 1, с. 9-12
- Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М. Азулены листовой поверхности как защитный оптический фильтр № 1, с. 36-39
- Семенова Е.В., Лобышев В.И. Электропроводность водных растворов аланина и валина, приготовленных итерационным методом разбавления с последующим интенсивным механическим воздействием № 3, с. 379-383
- Сергейчев К.Ф., Апашева Л.М., Лукина Н.А., Будник М.И., Овчаренко Е.Н., Лобанов А.В. Вода, активированная СВЧ-плазмой, как регулятор роста хвойных № 3, с. 369-373
- Сулов М.А. Применение метода ЯМР с парамагнитным допингом для оценки апопластного переноса воды в корнях интактных растений при действии абиотических стрессов № 4, с. 530-533
- Твердислов В.А. Нарушение симметрии – физическая основа совершения «полезной работы» биологическими молекулярными машинами № 4, с. 552-556
- Тимченко Н.Н., Головченко И.В. Влияние замораживания-оттаивания на температурное поведение гемоглобина № 4, с. 541-545
- Тимченко Н.Н., Головченко И.В. Температурное поведение гемоглобина № 3, с. 388-392

- Цай А.А., Васильева Т.И., Глушников В.А., Роденко Н.А.** Влияние импульсного магнитного поля на компоненты амилазной реакции № 3, с. 384-387
- Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Серяк Е.С.** Оценка пигментного состава микроводоросли *Porphyridium purpureum* по истинному спектру поглощения культуры с применением табличного процессора № 2, с. 204-208
- Шаев И.А., Яблокова Е.В., Новиков В.В.** Временная динамика продукции активных форм кислорода нейтрофилами после обработки в гипомагнитных условиях № 3, с. 363-368
- Яхно Т.А., Богданов С.А., Санин А.Г., Яхно В.Г.** Электронная микроскопия дисперсной фазы дистиллированной воды № 1, с. 25-30

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.** Трехмерная структура молекулы бета-лакторфина № 1, с. 76-80
- Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.** Влияние модуляторов на активацию рецептора NMDA № 3, с. 418-422
- Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.** Пространственная структура молекулы альфа-лакторфина № 1, с. 81-86
- Васильева М.А., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.** Моделирование репарации повреждений ДНК, индуцированных тяжелыми ионами в клетках млекопитающих № 4, с. 557-564
- Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.** Защитные свойства эритроцитов при гемолизе и их регуляция окислителями № 3, с. 413-417
- Демухамедова С.Д.** Теоретическое квантово-химическое моделирование структуры и свойств дипептида карнозина методом DFT № 2, с. 241-250
- Захаров Н.А., Коваль Е.М., Гоева Л.В., Шелехов Е.В., Алиев А.Д., Киселев М.Р., Матвеев В.В., Захарова Т.В.** Влияние альбумина яичного белка на биоминерализацию карбоната кальция в водных растворах № 1, с. 87-91
- Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.** Трехмерная структура пентапептидной молекулы Arg-Glu-Arg-Gly-Pro № 1, с. 70-75
- Клименко И.В., Астахова Т.Ю., Тимохина Е.Н., Лобанов А.В.** Димеризация фталоцианина алюминия в органической и водно-органической средах № 2, с. 230-234
- Колтовая Н.А., Душанов Э.Б.** Мутационный анализ структуры дрожжевой аргинин пермиазы Can1 № 4, с. 565-569
- Костюков В.В., Леонтьева С.В., Савенко Е.С., Савченко Е.В., Рыбакова К.А., Воронин Д.П.** Coumarin 337 in aqueous solution: interplay between excitation and hydration № 1, с. 61-69
- Костюков В.В., Леонтьева С.В., Савченко Е.В., Рыбакова К.А., Воронин Д.П.** Photoexcitation of Nile blue dye in aqueous solution: TD-DFT study № 2, с. 209-221
- Костюков В.В., Леонтьева С.В., Савченко Е.В., Рыбакова К.А., Воронин Д.П.** TD-DFT study of Toluidine blue O in aqueous solution: vibronic transitions and electronic properties № 3, с. 399-407
- Краснобаева Л.А., Якушевич Л.В.** Особенности структуры потенциального поля плазмиды pPF1 и их влияние на характер движения нелинейных конформационных возмущений – кинков № 1, с. 99-104
- Кручинин И.В., Яковенко Л.В.** Два конкурирующих механизма при агрегации *Dictyostelium discoideum* № 3, с. 393-398
- Кузнецов А.В., Курченко В.М., Воронин Д.П., Завьялова О.С.** Особенности связывания салациловой кислоты и аспирина с кислото-чувствительными ионными каналами *Trichoplax adhaerens* № 1, с. 50-60
- Марнаутон Н.А., Елфимов А.Б., Комиссарова Л.Х.** Исследование возможности выявления различий в развитии опухолевого процесса путем кластеризации с использованием алгоритма kMeans № 4, с. 570-573
- Муслов С.А., Зайцева Н.В., Корнеев А.А., Сеницын А.А.** Измерение и расчет характеристик упругости стенки общего желчного протока человека № 1, с. 92-98

- Сергеева Е.В., Фадеева М.В., Хавронюк И.С., Мамонтов А.А., Ершов А.Б., Кузнецов А.В. Опсины гребневика *Mnemiopsis leidyi* и сеть белок-белковых взаимодействий № 2, с. 222-229
- Стригин М.Б. Экологическая ниша как потенциальная яма, определяющая собственные значения волновой функции живого № 4, с. 574-582
- Терешкина К.Б., Лойко Н.Г., Терешкин Э.В., Коваленко В.В., Генералова А.А., Крупянский Ю.Ф. Структурные особенности кластеров ДНК-DPS при изменении концентрации 4-гексилрезорцина № 2, с. 235-240
- Чистюлин Д.К., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Баланева Н.Н., Чингизова Е.А., Новикова О.Д. Взаимодействие канала OmpF порина *Yersinia pseudotuberculosis* с норфлоксацином № 3, с. 408-412

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Аверин А.С., Тюрин Ф.В., Самодурова К.В., Старков В.Г., Андреева Т.В., Уткин Ю.Н. Эффекты кардиотоксинов кобры на папиллярной мышце и сердце крысы, перфузируемом по Лангендорфу, не связаны с выбросом адреналина № 2, с. 280-285
- Антонян А.П., Карапетян А.Г., Петросян Н.Г., Вардеванян П.О. Спектральные характеристики комплексов Hoechst 33258 с БСА № 2, с. 256-260
- Антонян А.П., Мовсесян З.О., Парсаданян М.А., Вардеванян П.О. Взаимодействие метилевого синего с одноцепочечными полинуклеотидами poly(rA) и poly(rU) и с двухцепочечным полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU) № 2, с. 251-255
- Бакурова Е.М. Особенности метаболизма эпителиальной опухоли при её мезенхимальном переходе № 4, с. 604-607
- Баушева Д.К., Шилягина Н.Ю., Воденев В.А., Деев С.М., Звягин А.В., Гурьев Е.Л. Получение люминесцентных тераностических нанокомплексов на основе антистоксовых нанопосфоров и рекомбинантных белков № 4, с. 628-633
- Беликов Н.Е., Демина О.В., Левина И.И., Лукин А.Ю., Сафинова А.Я., Петровская Л.Е., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Фотохромные лиганды для модификации катионов металлов и квантовых точек № 1, с. 113-122
- Беловолова Л.В., Беловолов М.И., Парамонов В.М., Беловолов М.М., Свистушкин М.В., Луничева А.А. Методика исследования вибрационной активности голосовых связок № 2, с. 314-319
- Большаков М.А., Самойлова А.В., Гостюхина А.А., Дорошенко О.С., Кутенков О.П., Зайцев К.В., Ростов В.В. Наносекундные микроволновые импульсы влияют на скорость пролиферации стволовых клеток № 1, с. 156-159
- Бутяев Р.В., Чернышев Д.А., Михайлец Э.С., Плотникова Л.В., Гарифуллин А.Д., Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Поляничко А.М. Применение метода главных компонент для анализа ИК спектров сыворотки крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями № 3, с. 462-466
- Генералов Е.А., Симоненко Е.Ю., Яковенко Л.В. Возможные молекулярные механизмы действия полисахаридов при вирусных заболеваниях № 4, с. 613-618
- Грачев Д.И., Медведева В.А., Шумаев К.Б., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Динитрозильные комплексы железа как ингибиторы перекисного окисления липидов № 4, с. 600-603
- Гребешкова Н.А., Глотов А.А., Роденко Н.А. Исследование воздействия импульсного магнитного поля на биологическую активность 1,1-Бис(1H-имидазол-1-ил) метанимина № 3, с. 476-480
- Гуценко О.И., Корниенко И.В., Анания А.А., Милютин Н.П., Внуков В.В. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 регулирует сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE и апоптоз в лейкоцитах крови при окислительном стрессе № 4, с. 608-612
- Ерофеев А.В., Грановский Н.В., Селиванова П.И., Шугаева А.И., Шаракшанэ А.С., Щербаков М.И., Мансфельд А.Д., Аносов А.А. Контроль параметров температурного распределения в предплечье человека при процедуре УВЧ-гипертермии методами пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии № 3, с. 486-492
- Жорина Л.В., Матвеев И.Д., Аникеев В.Н. Действие КВЧ излучения с длиной волны 5,6 мм на биообъекты *in vitro* и *in vivo* № 1, с. 152-155

- Казаринов К.Д., Малинин В.С., Щелконогов В.А., Чеканов А.В.** Разработка технологии исследования легочной сурфактантной системы с помощью электрической генерации капиллярных волн (экспресс метод) № 2, с. 293-296
- Касумов О.К., Бахышова М.Д., Гасанова Р.Б., Асланов Р.Б., Мельникова Л.А., Алиев Д.А.** Benzoate group attachment to TEMPO provides enhanced discrimination of liposomes fabricated using human lung normal and carcinoma cells № 2, с. 261-267
- Конькова М.С., Ершова Е.С., Вейко Н.Н., Кальянов А.А., Малиновская Е.М., Каменева Л.В., Вейко В.П., Костюк С.В.** Окислительная модификация ДНК плазмид способствует их проникновению в цитоплазму мезенхимных стволовых клеток человека № 3, с. 481-485
- Литвиненко А.Л., Некрасов В.М., Четвертак Е.В., Мальцев В.П.** Оценка чувствительности тромбоцитов крови человека к агонисту активации аденозиндифосфату методом сканирующей проточной цитометрии в условиях применения антитромбоцитарной терапии № 2, с. 286-292
- Малиновская Е.М., Савинова Е.А., Сергеева В.А., Ершова Е.С., Проскурнина Е.В., Каменева Л.В., Долгих О.А., Вейко Н.Н., Краевая О.А., Жиленков А.В., Трошин П.А., Костюк С.В.** Влияние водорастворимых производных фуллерена C_{60} на уровень окислительного стресса и на транскрипционную активность генов, регулирующих про- и антиоксидантную активность эмбриональных фибробластов легких человека, культивируемых *in vitro* № 2, с. 325-333
- Маммедзаде А.И., Маммедова А.Д., Касумов О.К.** Structure of silk fibroin nanoparticles: characterization of hydrophobic patches № 2, с. 268-272
- Масленикова О.М., Сибирев А.Л., Шипко М.Н., Степович М.А.** Особенности белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ № 3, с. 467-475
- Мельническая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Цистамин и цистин подавляют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки № 3, с. 451-457
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И., Симонян А.О.** Нейролептики подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах № 1, с. 127-136
- Муслов С.А., Сухочев П.Ю.** Упругие свойства кристаллов биосовместимых сплавов на основе TiNi с памятью формы № 1, с. 105-112
- Набережных Г.А., Сергеев А.А., Новикова О.Д.** Квантовые точки сульфида кадмия, полученные с использованием белков-поринов, каррагинанов, хитозанов и липополисахаридов № 3, с. 428-433
- Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Старикова Т.И., Сараджи Н.Г.** Пути реализации апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного пероксидом водорода, и их регулирование № 3, с. 440-445
- Никанорова Е.А., Варганова И.А., Медведев Я.И., Нагиба В.И.** Апоптоз лимфоцитов при воздействии комбинации физических факторов № 2, с. 334-338
- Новиковская М.В., Игнатьева М.М., Черенков И.А.** Влияние липополисахарида сальмонеллы на диффузию толудинового синего в альгинатном гидрогеле № 3, с. 458-461
- Пастухов А.А.** Термодинамическое моделирование систем с бензойной кислотой как “модельных систем” для фармацевтики № 4, с. 587-592
- Погорелов А.Г., Ипатов А.Л., Гулин А.А., Кузнецов А.Л., Станкевич А.А., Погорелова В.Н.** Спектрометрия раствора альбумина в электрохимически активированной воде № 4, с. 593-599
- Проскурнина Е.В., Созарукова М.М., Федорова М.В., Киселева М.В.** Анализ активности микросомальных редуктаз ткани яичников после криоконсервации методом активированной хемилюминесценции № 3, с. 434-439
- Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Черетаев И.В.** Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на показатели тканевого окислительного метаболизма № 4, с. 634-639
- Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Михлина Е.В., Рыжков И.И., Бондарь В.С.** Сенсорный композит нановолокна $\gamma-Al_2O_3$ / наноалмазы / Cu^{2+} с увеличенной каталитической активностью для детекции фенолов в водной среде № 3, с. 423-427
- Ронжин Н.О., Посохина Е.Д., Могильная О.А., Пузырь А.П., Гительзон И.И., Бондарь В.С.** Система цитохрома P450 может участвовать в светоизлучении высших грибов № 2, с. 320-324

- Рыбинская Т.В., Портнягина О.Ю., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Чингизова Е.А., Менчинская Е.С., Глазунов В.П., Чистюлин Д.К., Новикова О.Д.** Исследование амилоидогенного потенциала неспецифических поринов *Yersinia pseudotuberculosis* № 2, с. 273-279
- Слатинская О.В., Максимов Г.В.** Изменение конформации и распределения гемоглобина при изменении объема эритроцита № 2, с. 297-302
- Соловьева А.Г.** Влияние оксида азота на кинетические свойства ферментов антиоксидантной защиты крови при экспериментальной термической травме № 3, с. 446-450
- Текуцкая Е.Е., Гусарук Л.Р., Павлюченко И.И.** Степень окислительного повреждения ДНК и полиморфизм rs652438 гена MMR-12 при мультифакториальных заболеваниях в условиях оксидативного стресса № 1, с. 147-151
- Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.** Изменения секреторных процессов в щитовидной железе при сдвиге баланса дейтерия и протия в организме № 2, с. 310-313
- Ткаченко А.Л.** Аспекты применения информационных приложений в биофизической медицине № 1, с. 123-126
- Холявка М.Г., Ковалева И.Ю., Бруева М.С., Богомолов Д.Ю., Панкова С.М., Королева В.А., Артюхов В.Г.** *In silico* анализ особенностей пространственной организации молекул целлюлаз из различных продуцентов № 1, с. 137-146
- Чудакова Ю.М., Шмарина Г.В., Ершова Е.С., Мартынов А.В., Никитина С.Г., Костюк С.В.** Усиление окислительного стресса, уровня апоптоза и изменение в уровне экспрессии генов *BCL* и *BAX* у детей с тяжелой формой РАС № 4, с. 583-586
- Шошина И.И., Зеленская И.С., Бекренева М.П., Ляпунов С.И., Ляпунов И.С., Котова Д.А., Томиловская Е.С.** Контрастная чувствительность и микродвижения глаз как маркеры адаптации и реадaptации в модельном эксперименте по изучению влияния изменений гравитации № 4, с. 619-623
- Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Грачев Д.И., Насыбуллина Э.И., Пугаченко И.С., Рууге Э.К.** Новые варианты динитрозильных комплексов железа. антиоксидантное и антирадикальное действие № 4, с. 624-627
- Щелконогов В.А., Баранова О.А., Чеканов А.В., Казаринов К.Д., Шастина Н.С., Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Соловьева Э.Ю., Федин А.И., Сорокоумова Г.М.** Липосомальная форма с липоевой кислотой и карнозином: получение, антиагрегантное и антиоксидантное действие № 2, с. 303-309

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

- Бажина Е.В., Стасова В.В.** Особенности структуры кроны и строения побегов пихты сибирской разной сексуализации № 3, с. 505-510
- Бурдиян Н.В.** Распределение анаэробных бактерий в донных осадках в зависимости от окислительно-восстановительных условий и глубины (на примере прибрежной акватории Севастополя, Крым, Чёрное море) № 3, с. 511-515
- Гасюк О.А., Волченко Н.Н., Лазукин А.А., Самков А.А., Худокормов А.А.** Биоэлектрогенез микробных топливных элементов в присутствии *Shewanella oneidensis* MR-1 и некоторых тяжелых металлов № 3, с. 501-504
- Дорошенко Ю.В.** Микробиологическая характеристика гидротехнических сооружений некоторых бухт г. Севастополя № 4, с. 645-649
- Иванова Э.А.** Эко-генетическая стресс-устойчивость растений, как стратегия и тактика: супермолекулярно-протеомного, морфо-динамического дизайна физико-химической природы биологии развития № 1, с. 166-175
- Ильчук И.А., Захаревич Л.О., Никандров В.Н.** Влияние $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ на состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris* при различном содержании в питательной среде источника азота – KNO_3 № 2, с. 343-352
- Маторин Д.Н., Яковлева О.В., Тодоренко Д.А., Горячев С.Н., Алексеев А.А.** Использование замедленной флуоресценции хлорофилла водорослей для биотестирования загрязнений № 2, с. 339-342

- Скуратовская Е.Н., Алемова А.С.** Влияние нефтяных углеводородов на биохимические показатели черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* № 4, с. 650-656
- Солдатов А.А.** Респираторные свойства крови *Planiliza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845) и *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1814)..... № 4, с. 657-661
- Уфимцева М.А., Кузнецов А.В.** Экспресс-оценка размерных фракций планктона в акватории г. Севастополь зимой 2021-2022 гг: модельные исследования..... № 4, с. 640-644
- Фадеева М.В., Сергеева Е.В., Рыбакова К.А., Кузнецов А.В.** Характеристика семейства катионных TRPA1-каналов *Trichoplax* SP. H2 (Placozoa)..... № 3, с. 493-500
- Шаповалова В.Е., Евстигнеев В.П., Гаджи А.В., Лантушенко А.О.** Сравнительный анализ морфометрических характеристик микроводорослей рода *Dunaliella* из гиперсолёных озёр Крыма..... № 4, с. 662-665
- Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О.** Модельные системы для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты № 1, с. 160-165

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 7, № 4, 2022

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 7, No. 4, 2022

Рубрики в соответствии с номенклатурой научных специальностей:

Биологические науки (1.5)
1.5.2. Биофизика
1.5.8. Математическая биология, биоинформатика

Адрес редакции:

ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация
Тел. +7(8692) 43-51-10, e-mail: journal@sevbppc.ru

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе
ИП Крыховецкий-Кощеев Александр Андреевич
ОГРНИП 318920400019241
COLOR CITY Цифровая типография
ул. Борисова, 4, г. Севастополь, 299059, Российская Федерация

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018, выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Публикуемые материалы прошли процедуру рецензирования и экспертного отбора. Авторы несут ответственность за добросовестность фактов, цитат, имен собственных, географических названий и другой информации. Редакция не несет ответственности за нарушение авторами исключительных прав на результаты интеллектуальной деятельности третьих лиц. Мнение редакции может не совпадать с мнением автора. При перепечатке материалов ссылка на журнал «Актуальные вопросы биологической физики и химии» обязательна.

Учредитель:

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

Издатель:

ООО «Издательский центр РИОР»
ул. Полярная, д. 31в, стр. 1, Москва, 127214
(по договору № 66-22/ЭЗК-223 от 15.06.2022)

Главный редактор: Евстигнеев М.П.

Компьютерная верстка: Д.П. Воронин, В.А. Кальпа, Л.А. Глухов

