

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 9, № 1
2024**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 9, № 1
2024**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 9, No. 1, 2024**

Севастополь
2024

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, моделированию в биофизике, биоинформатике, медицинской биофизике, биофизической химии, биофизической экологии и биологическим ресурсам. 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

Ануфриева Е.В. (Севастополь);
Костюков В.В. (Севастополь);
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);
Пионтковский С.А. (Севастополь);
Ризниченко Г.Ю. (Москва);
Семенов К.Н. (Санкт-Петербург);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Холявка М.Г. (Воронеж);
Шейнман М. (Севастополь);
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

Editorial Board

Anufrieva E.V. (Sevastopol);
Hernandez Santiago A.A. (Puebla, Mexico);
Holyavka M.G. (Voronezh);
Kostjukov V.V. (Sevastopol);
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);
Piontkovski S.A. (Sevastopol);
Riznichenko G.Yu. (Moscow);
Semenov K.N. (Saint Petersburg);
Sheinman M. (Sevastopol);
Soldatov A.A. (Sevastopol).

Ответственный секретарь

Воронин Д.П. (Севастополь).

Executive Secretary

Voronin D.P. (Sevastopol).

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

СОДЕРЖАНИЕ

Том 9, № 1, 2024

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Е.А. Гребнева

Механизм образования редких таутомерных форм цитозина и гуанина при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом 7

В.А. Королева, С.М. Панкова, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Исследование модуляции каталитических свойств цистеиновых протеаз при действии УФ-излучения и температуры путем иммобилизации ферментов на хитозане 16

Н.Н. Тимченко, Е.В. Шупова

Взаимодействие гемоглобина с липосомами до и после замораживания-оттаивания и влияние растворов соли и сроков хранения на структуру гемоглобина 22

Н.К. Кочарли, С.Т. Гумматова

Антиоксидантные свойства аминокислот и роль долгоживущих радикалов в составе белков при действии ультрафиолетового-В излучения 28

А.А. Солдатов, Н.Е. Шалагина, В.Н. Рычкова, Т.А. Кухарева,**А.О. Лантушенко**Уровень окислительных процессов в эритроцитах морского ерша (*Scorpaena porcus*, L. 1758) в преднерестовый и нерестовый периоды годового цикла 34

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

М.В. Фадеева, М.И. Силаков, Д.П. Воронин, А.В. КузнецовИзучение гидроакустических воздействий на *Mnemiopsis leidyi* и *Danio rerio*: роль TRP-рецепторов 39**Г.А. Шабанов, А.А. Рыбченко, Е.А. Луговая**

Модель организации клеточной функциональной группы 45

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Г.А. Набережных, С.И. Бахолдина, В.Н. Давыдова, Т.Ф. Соловьева

Хитозаны и их ацилированные производные в липосомальной форме как потенциальные терапевтические препараты при эндотоксемии 55

В.А. Коломбет, В.Н. Лесных, А.В. Елистратов

«Навязанное мышление» как работа полу-рукотворного мозгового мультивибратора 61

Е.Р. Никитина, М.А. Чеботарева, Е.П. Шуколокова, Ю.А. Полина,**Л.Н. Катюхин**

Диагностический потенциал осмотической градиентной эктацитометрии 66

Н.Е. Беликов, А.Я. Сафинова, А.Ю. Лукин, Л.Е. Петровская, О.В. Демина, А.А. Ходонов

Исследование особенностей селективности взаимодействия аналогов ретиноидов с различными микробными родопсинами.....71

Э.С. Нерсисян, И.В. Клименко, А.В. Лобанов

Фотохимические свойства супрамолекулярных систем на основе β -циклодекстрина и тетрафенилпорфирина..... 81

Е.М. Малиновская, Е.А. Савинова, Е.С. Ершова, В.А. Сергеева, Л.В. Каменева, О.А. Краевая, П.А. Трошин, Н.Н. Вейко

Влияние двух водорастворимых производных фуллерена C_{60} на антиоксидантную активность и окислительный метаболизм клеток фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ), культивируемых *in vitro* 88

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, В.В. Яглов

Изменения продукции ионообменных белков при увеличении содержания дейтерия в организме 96

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ

Е.В. Проскурнина, С.В. Костюк, Е.А. Савинова, Е.С. Ершова, Л.В. Каменева, Н.Н. Вейко, М.А. Проскурнин, Н.Н. Шевченко, В.П. Сапрыкин, В.К. Иванов

Влияние нанопластика на выживаемость эмбриональных фибробластов легкого человека 101

А.А. Куликова, В.А. Габрин, Е.А. Саратовских, А.Т. Лебедев, Е.В. Голосов, Р.Н. Яруллин

Сравнение эффективности окисления нитрованных полимеров химическим способом и с помощью микроорганизмов 107

CONTENTS

Volume 9, No. 1, 2024

GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS

H.A. Grebneva

Mechanism of formation of rare tautomeric forms of cytosine and guanine when single-stranded RNA is irradiated with ultraviolet light 7

V.A. Koroleva, S.M. Pankova, M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov

Study of the catalytic properties modulation for cysteine proteases under the influence of UV radiation and temperature by immobilizing enzymes on chitosan 16

N.N. Timchenko, E.V. Shupova

Interaction of hemoglobin with liposomes before and after freezing-thawing and effect of salt solutions and of storage on the hemoglobin structure 22

N.K. Kocharli, S.T. Hummatova

Antioxidant characteristics of amino acids and the role of long-lived radicals in proteins under the influence of ultraviolet-B radiation 28

A.A. Soldatov, N.E. Shalagina, V.N. Rychkova, T.A. Kukhareva

The level of oxidative processes in erythrocytes of the *Scorpaena porcus* L. 1758 in the pre-spawning and spawning periods of the annual cycle 34

MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

M.V. Fadeeva, M.I. Silakov, D.P. Voronin, A.V. Kuznetsov

Study of hydroacoustic effects on *Mnemiopsis leidyi* and *Danio rerio*: the role of TRP-receptors 39

G.A. Shabanov, A.A. Rybchenko, E.A. Lugovaya

A model of organization of a cellular functional group 45

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

G.A. Naberezhnykh, S.I. Bakholdina, V.N. Davydova, T.F. Solov'eva

Chitosans and its acylated derivatives in liposomal form as potential therapeutic drugs for endotoxemia 55

V.A. Kolombet, V.N. Lesnykh, A.V. Elistratov

«Imposed thinking» as the work of a semi-artificial brain multivibrator 61

E.R. Nikitina, M.A. Chebotareva, E.P. Shukolyukova, J.A. Polina, L.N. Katiukhin

Diagnostic potential of osmotic gradient ektacytometry 66

- N.E. Belikov, A.Ya. Safinova, A.Yu. Lukin, L.E. Petrovskaya, O.V. Demina, A.A. Khodonov**
The study of the features of retinoid analogs interaction selectivity with various microbial rhodopsins 71
- E.S. Nersesyan, I.V. Klimenko, A.V. Lobanov**
Photochemical properties of supramolecular systems based on β -cyclodextrin and tetraphenylporphyrin..... 81
- E.M. Malinovskaya, E.A. Savinova, E.S. Ershova, V.A. Sergeeva, L.V. Kameneva, O.A. Kraevaya**
The effect of two water-soluble derivatives of fullerene C₆₀ on the antioxidant activity and oxidative metabolism of human embryonic lung fibroblasts (HELFL) cultured *in vitro* 88
- N.V. Yaglova, S.S. Oboernikhin, E.P. Timokhina, S.V. Nazimova, V.V. Yaglov**
Changes in production of ion-exchnging proteins with increased deuterium body content 96

BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES

- E.V. Proskurnina, S.V. Kostyuk, E.A. Savinova, E.S. Ershova, L.V. Kameneva, N.N. Veiko, M.A. Proskurnin, N.N. Shevchenko, V.P. Saprykin, V.K. Ivanov**
Effect of nanoplastic on viability of human embryonic lung fibroblasts.....101
- A.A. Kulikova, V.A. Gabrin, E.A. Saratovskikh, A.T. Lebedev, E.V. Golosov, R.N. Yarullin**
Comparison of the effectiveness of oxidation of nitrated polymers by chemical method and with the microorganisms 107

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ РЕДКИХ ТАУТОМЕРНЫХ ФОРМ ЦИТОЗИНА И ГУАНИНА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ

Гребнева Е.А.

Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина
ул. Р. Люксембург, 72, Донецк, 83114, РФ; e-mail: grebneva@gmail.com
Поступила в редакцию 18.06.2024

Аннотация. Для того, чтобы понять механизм образования мутаций в коронавирусах, необходимо разработать механизмы образования мутаций в одноцепочечных РНК. Мной были предложены полимеразно-таутомерные модели механизмов образования мишеных, немишеных и задерживающихся мутаций, образующихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом. Для построения полимеразно-таутомерных моделей УФ-мутагенеза в коронавирусах, в первую очередь необходимо найти редкие таутомеры, образующиеся при облучении молекул одноцепочечных РНК ультрафиолетовым светом. Впервые предложен механизм образования редких таутомерных форм цитозина и гуанина, входящих в одноцепочечную РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом. Ранее мной был предложен механизм образования редких таутомерных форм оснований двухцепочечной ДНК, образующихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом. В настоящей работе показано, что этот механизм справедлив и при образовании редких таутомерных форм оснований в одноцепочечной РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом. Одноцепочечная РНК находится в водной среде. При этом молекулы воды присоединяются к молекуле РНК с помощью водородных связей. Возможны три канала релаксации электронно-колебательных состояний. Образование редких таутомерных форм оснований РНК происходит при безызлучательной релаксации энергии возбуждения. Это приводит к сильным вынужденным колебаниям длин водородных связей и изменению таутомерных состояний оснований РНК. При облучении одноцепочечной РНК, связанной с молекулами воды водородными связями, могут образовываться все возможные таутомерные формы цитозина и гуанина, которые способны влиять на характер спаривания оснований. Показано, что возможно образование 7 редких таутомерных форм цитозина и 7 редких таутомерных форм гуанина, таких, которые способны влиять на характер спаривания оснований. Такие редкие таутомеры будут стабильными в одноцепочечной РНК.

Ключевые слова: ультрафиолетовый мутагенез, мутагенез вирусов, мутагенез коронавирусов, редкие таутомерные формы цитозина, редкие таутомерные формы гуанина, одноцепочечная РНК.

Вирусная частица состоит из нуклеиновой кислоты, покрытой защитной белковой оболочкой. Генетический материал вирусов очень разнообразен [1]. Если генетический материал бактерий, растений и животных всегда двухцепочечная ДНК, то генетический материал вирусов может представлять собой одноцепочечные или двухцепочечные молекулы ДНК, а также одноцепочечные или двухцепочечные молекулы РНК [2].

Коронавирус SARS-CoV-2 [3] – это штамм коронавируса, вызывающий COVID-19, острое респираторное заболевание, ответственное за пандемию COVID-19. Геномы коронавирусов представляет собой одноцепочечные РНК. Вирус SARS-CoV-2 содержит линейную одноцепочечную РНК длиной около 30 000 оснований [4]. В коронавирусе SARS-CoV-2 возникают мутации, часто это мутации замены оснований, когда молекулы гуанина и цитозина приводят к появлению молекул аденина и урацила соответственно [5]. Существует много тысяч вариантов SARS-CoV-2, которые были сгруппированы в несколько штаммов [6]. Эти варианты коронавируса SARS-CoV-2 появились в результате образования мутаций. В настоящее время в результате многочисленных мутаций COVID-19 превратился в сезонное респираторное заболевание, наряду с ОРВИ и гриппом и, скорее всего, останется с нами навсегда. Поэтому важно понимать, как образуются мутации в одноцепочечной РНК.

Общепринятой в настоящее время является полимеразная модель мутагенеза [7-11]. Полимеразная модель опирается на идею, что причиной образования мутаций являются случайные ошибки ДНК-полимераз, встраивающих напротив повреждений (например, циклобутановых пиримидиновых димеров) некомплементарные основания [7-10]. Другими словами, предполагается, что ДНК-полимераз, встраивают напротив циклобутановых пиримидиновых димеров такие канонические основания, которые не способны образовывать с матричными основаниями водородные связи. Однако многочисленные эксперименты показали, что любые полимеразы, даже специализированные и модифицированные, всегда встраивают только такие канонические основания, которые могут образовывать с матричными основаниями водородные связи [11,12].

В 1953 году Уотсон и Крик [11] высказали идею о том, что в основе явления спонтанного мутагенеза лежит свойство нуклеотидных оснований изменять свое таутомерное состояние, влияющее на характер спаривания оснований. В дальнейшем участие редких таутомерных форм в мутагенезе использовалось для объяснения спонтанного мутагенеза [12]. Однако, модели мутагенеза, опирающиеся на гипотезу о редких таутомерных формах, являются чисто физико-химическими, они игнорируют тот факт, что синтез ДНК происходит с участием различных ферментов. Существует еще одна гипотеза о природе мутагенеза, которая заключается в том, что

индуцированные ультрафиолетовым светом мутации происходят только после дезаминирования цитозина или 5-метилцитозина внутри циклобутанового пиримидинового димера [13]. Однако, как показывают экспериментальные данные, скорость дезаминирования слишком низка, чтобы вносить значительный вклад в мутагенез в *Escherichia coli* [14].

Мной были предложены полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза [15-39], опирающиеся на гипотезу Уотсона и Крика [11] о том, что в основе мутагенеза лежит способность оснований ДНК находиться в различных таутомерных формах и учитывающие тот факт, что мутации образуются при участии модифицированных или специализированных ДНК-полимераз. Мной был разработан механизм образования редких таутомеров оснований ДНК при облучении двухцепочечной молекулы ДНК ультрафиолетовым светом [16,27]. Для его обоснования, в частности, были использованы результаты выполненных нами с К. Б. Толпыго нескольких циклов работ, посвященных исследованию свойств возбужденных водородных связей в двухцепочечной молекуле ДНК [31].

Мной были предложены полимеразно-таутомерные модели механизмов образования мишенных мутаций замены оснований [15,26-29,32,33], мишенных инсерций [21,24,28], мишенных делеций [19,22,28] и мишенных комплексных инсерций [23,25,28]. Мной были разработаны механизмы образования немишенных (появляющихся на, так называемых, неповрежденных участках ДНК) мутаций замены оснований, появляющихся сразу после облучения [17,26], и задерживающихся немишенных мутаций [32]. Мной разработаны механизмы образования мишенных [29] и немишенных [32] задерживающихся мутаций замены оснований. Я показала, что 100% мутаций вызываются мутагенами [34] и разработала полимеразно-таутомерную модель риска образования злокачественных опухолей [34,36,37]. Кроме того, мной была разработана полимеразно-таутомерная модель образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза [18,35,38,39].

В ряде экспериментальных работ пары оснований ДНК, одно из которых находится в редкой таутомерной форме, были найдены в активных центрах ДНК-полимераз [9,10]. Эти данные являются прямым экспериментальным подтверждением идеи Уотсона и Крика [11] и полимеразно-таутомерных моделей [15-39].

Полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза [15-39] разработаны для двухцепочечной ДНК. В тоже время для построения полимеразно-таутомерных моделей мутагенеза всех типов вирусов, в первую очередь, необходимо разработать механизмы образования редких таутомерных форм оснований ДНК и РНК для одноцепочечных ДНК, одноцепочечных РНК и двухцепочечных РНК.

Механизм образования редких таутомерных форм оснований ДНК, при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом. Мной был разработан механизм образования редких таутомерных форм молекул, связанных между собой водородной связью, при облучении их ультрафиолетовым светом [15]. Этот механизм был использован для нахождения редких таутомерных форм оснований ДНК, образующихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом [15]. Различные таутомерные формы одной и той же молекулы различаются только тем, что к ним добавляются или от них удаляются один или несколько атомов водорода. В парах оснований двухцепочечной ДНК атомы водорода, участвующие в образовании водородных связей между основаниями ДНК, могут переходить к атому партнера по водородной связи только тогда, когда водородная связь уменьшается и сохраняется, когда водородная связь удлиняется [15]. При релаксации энергии ультрафиолетового кванта атом водорода в паре оснований ДНК, как правило возвращается в свое первоначальное положение. Редкие таутомерные формы, образующиеся в парах оснований ДНК, будут стабильными только тогда, когда длины водородных связей будут увеличены и такими сохраняются. Это происходит, например, если данные основания входят в состав циклобутановых димеров [15]. Как было показано [40-43], напротив циклобутановых пиримидиновых димеров нить ДНК искривляется и водородные связи между основаниями удлиняются или даже рвутся. Кроме того, редкие таутомерные формы будут стабильны в активных центрах ДНК полимераз [16].

Главная причина образования редких таутомерных форм оснований РНК – сильные вынужденные колебания. Для того, чтобы понять механизмы образования мутаций в коронавирусах, необходимо разработать механизмы образования редких таутомерных форм оснований РНК при облучении одноцепочечных РНК ультрафиолетовым светом. Мной был разработан механизм образования редких таутомерных форм оснований ДНК при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом [15,27]. Судьба ультрафиолетового кванта энергии, которую поглотила молекула РНК, существенным образом зависит, с одной стороны, от нуклеотидного состава соседних пар оснований, а с другой, от соотношения нижайших синглетного (короткоживущего) и триплетного (долгоживущего) уровней энергии различных оснований [15]. Наиболее вероятным процессом релаксации синглетного электронного уровня является излучение энергии [44]. Ясно, что никаких повреждений в молекуле ДНК при этом произойти не может. Для триплетного же уровня наиболее вероятным процессом релаксации является превращение энергии в энергию колебаний соседних атомов [44].

После облучения ДНК ультрафиолетовым светом, энергия, в конечном счете, локализуется на одном из оснований, приводя к возбуждению электронно-колебательных состояний [45]. Возможны три канала релаксации электронно-колебательных состояний. Во-первых, это передача энергии на соседнее основание, в том числе дробная с излучением части энергии. Эти процессы подробно рассмотрены в [18,35,38,39]. Отвлечемся пока от, безусловно важных процессов распространения энергии по цепочке ДНК [18,35,38,39], и будем считать, что все процессы распространения энергии окончены, и ультрафиолетовый квант локализован на одном из оснований. Они имеют большое влияние на вероятность образования мутаций и являются основой для объяснения «эффекта соседа» и механизма образования горячих и холодных точек УФ-мутагенеза [18,35,38,39]. Мы на них пока

останавливаться не будем. Имеется еще два канала релаксации возбуждения – излучение энергии или же безызлучательная релаксация. Если энергия излучится, то система просто вернется в основное состояние и молекула ДНК остается неповрежденной. Рассмотрим немного подробнее, какие процессы могут происходить в молекуле ДНК, поглотившей ультрафиолетовый квант энергии, при безызлучательной релаксации.

В молекуле ДНК безызлучательная релаксация возбуждения происходит в небольшом объеме 3-5 пар оснований [46,47]. Это приводит к сильному «локальному разогреву» и как результат к возбуждению нормальных колебаний оснований. За время порядка нескольких периодов этих колебаний (их периоды $\sim 10^{-14}$ - 10^{-12} сек. [48,49] колебательная система перейдет в равновесие. Колебания атомов оснований вызовут изменения расстояний между спаренными основаниями, другими словами, длин водородных связей. Рассчитаны вероятности изменения длин водородных связей R на расстояния от $\pm 0,1$ Å до $\pm 0,5$ Å при нескольких «мгновенных температурах» локального разогрева [50]. Рассчитаны формы потенциальных кривых для протонов всех трех водородных связей Уотсон-Криковской пары гуанин-цитозин для нескольких длин водородных связей [49,51].

Оказалось, что при уменьшении длины водородной связи на $0,2$ Å от равновесного положения протонный потенциал превращается в одноямный. По мере же удлинения водородной связи второй минимум становится все более явным. Динамика изменения формы протонного потенциала для широкого спектра изменения длины водородной связи дана в [52]. Кривые были рассчитаны для системы $(H_2O)_2$, имеющей параметры водородной связи, хорошо моделирующие водородные связи в парах оснований [52].

Водородные связи, типа тех, что образуются между основаниями ДНК, обладают следующим свойством. Атом водорода образует прочную валентную связь с одним из атомов – партнеров по водородной связи, а с другим – довольно слабую связь (рис. 1а). При изменении R длины водородной связи длина валентной связи (r) практически не изменяется. Зато расстояние от водорода до второго атома ($R-r$) меняется существенно [53]. Пусть длина водородной связи (R) уменьшилась так, что атом водорода оказался почти в центре водородной связи. Для этого достаточно изменения R на $0,4-0,5$ Å (рис. 1б). В этом случае он образует сильную связь с обоими атомами (рис. 1в). Поэтому, когда водородная связь начнет удлиняться, атом водорода может остаться и в новом положении (рис. 1д).

Если атомы водорода, участвующие в образовании водородных связей, будут возбуждены [54], то увеличится их эффективный радиус (на $\sim 0,1$ Å) и это еще больше увеличит вероятность того, что атом водорода останется у партнера по водородной связи.

Все эти процессы возможны, поскольку время жизни триплетного состояния $\sim 10^{-6}$ сек. [44], а время жизни возбужденной водородной связи $\sim 4 \cdot 10^{-9}$ сек. [55], в то же время характерные периоды атомных

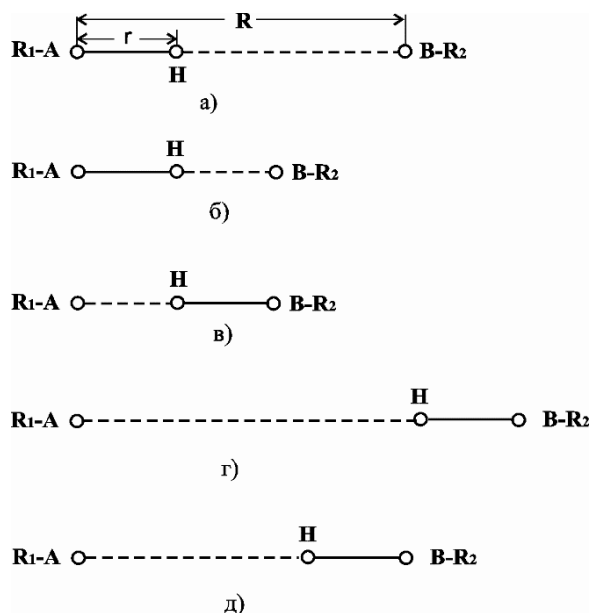


Рисунок 1. Схематическое изображение динамики водородной связи между молекулами оснований РНК и молекулами воды, приводящей к образованию новых таутомеров. Атомы и радикалы для всех трех водородных связей между молекулой цитозина и молекулами воды показаны на рисунке 2. Атомы и радикалы для всех трех водородных связей между молекулой гуанина и молекулами воды показаны на рисунке 3: а) изображение водородной связи между молекулами R_1-A и $B-R_2$, где r – длина валентной связи между A и атомом водорода H , R – длина водородной связи; б) молекулы, связанные водородной связью сблизились так, что атом водорода находится почти в центре между ними; в) атом водорода H образовал такую же сильную связь с BR_2 как и с R_1A ; г) водородная связь удлинилась, атом водорода H оказался валентно связанным с BR_2 ; д) длина водородной связи вернулась к своему равновесному значению, атом водорода теперь связан прочной валентной связью с молекулой BR_2 [15]

колебаний $\sim 10^{-14}$ сек. – 10^{-12} сек. [49,51]. Колебаний, существенно влияющих на длину водородной связи, произойдет не более нескольких десятков, пусть даже 100. Это даст время $\sim 10^{-10}$ сек., кроме того, за все время, пока будут происходить изменения длин водородных связей, атом водорода будет «размазан» приблизительно на $0,1 \text{ \AA}$ вдоль длины водородной связи. Во-вторых, как было показано в [56], в возбужденном состоянии потенциальные барьеры могут снижаться, а в-третьих, в ряде случаев новое положение протонов может оказаться стабильным [57]. А именно, стабильными будут редкие таутомеры G_1 и C_1 в паре G_1 - C_1 [57].

Редкие таутомерные формы цитозина и гуанина, образующиеся в одноцепочечной РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом. Одноцепочечная молекула РНК состоит из сахара-фосфатного остова, к которому присоединены основания РНК. Молекула РНК – это текст, записанный с помощью четырех букв. Роль букв играют молекулы, которые называются основаниями РНК. К основаниям РНК относятся гуанин, цитозин, аденин и урацил. Во время синтеза РНК они спариваются попарно с помощью водородных связей. Гуанин соединяется только с цитозином, а аденин соединяется только с урацилом. Это основа точного синтеза РНК [11].

Под воздействием различных мутагенов в молекуле РНК могут появляться различные повреждения. Повреждения РНК удаляются специальными репарационными механизмами. Если не все повреждения будут удалены, то они могут привести к мутациям в процессах репликации, или репарации. Мутацией называется стойкое изменение в молекуле ДНК или РНК, которое может быть унаследовано и передаваться потомкам данной клетки или организма.

Одноцепочечная РНК находится в водной среде. При этом молекулы воды присоединяются к молекуле РНК с помощью водородных связей. На рисунке 2а изображена молекула цитозина в канонической таутомерной форме. Различные таутомерные формы одной и той же молекула различаются только тем, что к ним присоединяются или от них удаляются один или несколько атомов водорода. Молекулы воды присоединяются ко всем молекулам цитозина. Однако в данной работе изучается процесс образования только тех редких таутомерных форм цитозина, которые могут приводить к мутациям. Поэтому в данной работе будут изучен процесс образования редких таутомерных форм молекулы цитозина, когда атомы водорода могут

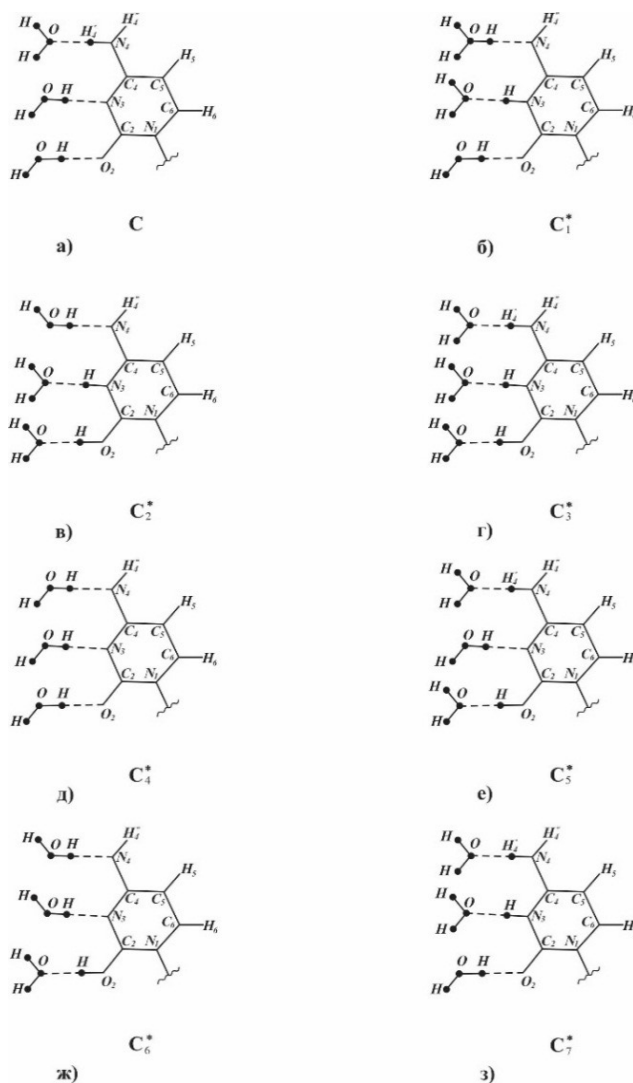


Рисунок 2. Редкие таутомеры основания РНК цитозина, которые могут образовываться в одноцепочечной РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом, и которые могут влиять на характер спаривания оснований

присоединяться или удаляться от N₄, N₃ или C₂ цитозина. Именно эти молекулы отвечают за спаривание цитозина с другими основаниями и, следовательно, за сохранение наследственной информации.

Легко видеть, что механизм образования редких таутомерных форм [15] справедлив и для молекул РНК. Молекулы ДНК и РНК различаются только тем, что у них немного различаются сахара-фосфатные остовы. Кроме того, в молекулах ДНК используются основания гуанин, цитозин, аденин и тимин, а в молекула РНК используются основания гуанин, цитозин, аденин и урацил. При облучении одноцепочечной РНК, связанной с молекулами воды водородными связями, могут образовываться все возможные таутомерные формы цитозина (рис. 2) и гуанина (рис. 3). Другими словами, образуется 7 новых редких таутомерных форм цитозина (рис. 2б-2з) и 7 новых редких таутомерных форм гуанина, которые могут влиять на характер спаривания оснований (рис. 3б-3з).

Основания, входящие в одноцепочечные РНК, находящиеся в редких таутомерных формах, не могут перейти в канонические таутомерные состояния из-за контакта с молекулами воды. В редких таутомерах оснований РНК, молекулы водорода связаны с основаниями РНК сильными валентными связями, а с молекулами воды они связаны слабыми водородными связями. А как показано в данной работе, для того чтобы оторвать или присоединить атом водорода, нужно затратить большое количество энергии. Следовательно, все редкие таутомерные формы цитозина и гуанина, образующиеся в одноцепочечной РНК, будут стабильными.

Эти выводы хорошо сочетаются с прямыми экспериментальными данными [9,10]. В работах [9,10] редкие таутомерные формы оснований ДНК были найдены в активных центрах ДНК-полимераз, ферментов, участвующих в синтезе молекул ДНК, которые встраивают основания напротив матричных оснований.

Выводы. Генетический материал вирусов очень разнообразен, он может представлять собой одноцепочечные или двуцепочечные молекулы ДНК или РНК. Геномы коронавирусов представляет собой одноцепочечные РНК. Коронавирус SARS-CoV-2 – это штамм коронавируса, вызывающий COVID-19, он содержит линейную одноцепочечную РНК [3]. В этих вирусах мутации возникают очень часто, что вызывает огромные трудности при создании высокоэффективных вакцин [6]. Поэтому важно изучить механизмы образования мутаций в коронавирусах. Для того, чтобы понять, как образуются мутации в коронавирусе SARS-CoV-2 необходимо изучить механизм образования мутаций в одноцепочечных РНК.

Автором были разработаны полимеразно-таутомерные модели образования различных мутаций, образующихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом [15-39]. Полимеразно-таутомерные модели ультрафиолетового мутагенеза основаны на идее Уотсона и Крика [11] о том, что в основе мутагенеза лежит способность оснований ДНК находиться в различных таутомерных формах. Различные

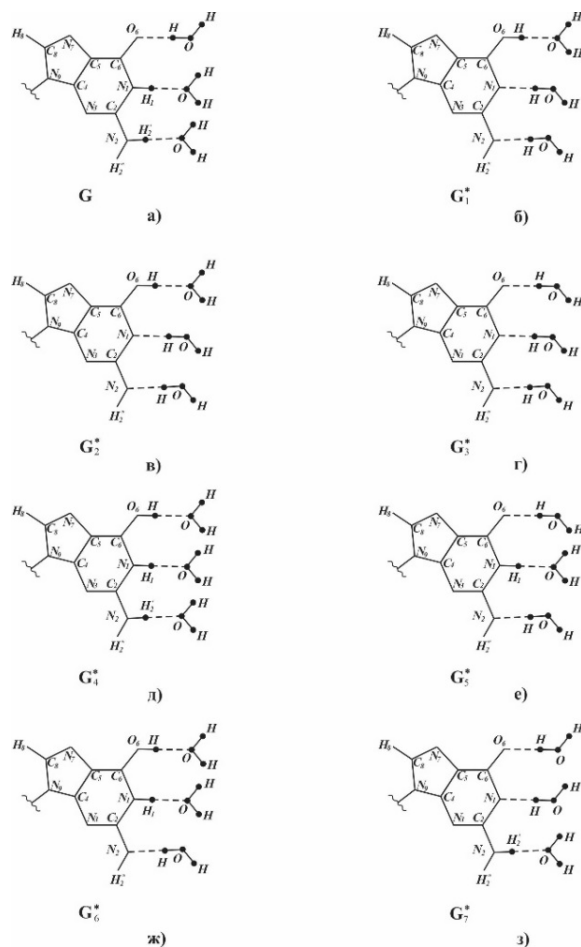


Рисунок 3. Редкие таутомеры основания РНК гуанина, которые могут образовываться в одноцепочечной РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом, и которые могут влиять на характер спаривания оснований

таутомерные формы одной и той же молекулы различаются только тем, что к ней присоединяются или от нее удаляются один или несколько атомов водорода. Был предложен механизм образования редких таутомерных форм оснований двухцепочечной ДНК, образующихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом [15]. Этот механизм [15] справедлив и при образовании редких таутомерных форм оснований РНК урацила и аденина, входящих в одноцепочечную РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом [58]. Было показано, что возможно образование семи стабильных редких таутомерных форм урацила и семи стабильных редких таутомерных форм аденина, таких, которые способны влиять на характер спаривания оснований [58].

Построена модель изменения таутомерных состояний в молекулах РНК цитозина и гуанина, входящих в одноцепочечную РНК при облучении ее ультрафиолетовым светом. Одноцепочечная РНК находится в водной среде. При этом молекулы воды присоединяются к молекуле РНК с помощью водородных связей. При облучении однонитевой РНК, связанной с молекулами воды водородными связями, могут образовываться все возможные таутомерные формы цитозина и гуанина, которые способны влиять на характер спаривания оснований. Показано, что возможно образование 7 редких таутомерных форм молекул РНК цитозина и 7 редких таутомерных форм гуанина, таких, которые способны влиять на характер спаривания оснований. Такие редкие таутомерные состояния будут стабильными. Эти выводы были подтверждены экспериментальными результатами [9,10]. Редкие таутомеры цитозина и гуанина в двухцепочечной ДНК устойчивы только тогда, когда они входят в состав повреждений, способных останавливать синтез ДНК, например, в состав цикlobутановых пиримидиновых димеров, или находиться в небольшой окрестности от них [15]. Исключение является только пара G₁-C₁ [57]. Как показано в данной работе, все редкие таутомеры цитозина и гуанина, входящего в одноцепочечную РНК, являются стабильными. Это различие в стабильности оснований ДНК и РНК в одноцепочечных и двухцепочечных ДНК и РНК может иметь большое практическое значение.

Список литературы / References:

1. Lawrence C.M., Menon S., Eilers B.J., Bothner B., Khayat R., Douglas T., Young M.J. Structural and functional studies of archaeal viruses. *Journal of biological chemistry*, 2009, vol. 284, no. 19, pp. 12599-12603.
2. Breitbart M., Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in microbiology*, 2005, vol. 13, no. 6, pp. 278-284.
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 536-544.
4. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews. Microbiology*, 2021, vol. 19, no. 3, pp. 155-170.
5. Rice A.M., Castillo Morales A., Ho A.T., Mordstein C., Muhlhausen S., Watson S., Cano L., Young B., Kudla G., Laurence D.H. Evidence for strong mutation bias in toward, and selection against, U content SARS-CoV-2: implication for vaccine design. *Molecular biology and evolution*, 2021, vol. 38, no. 1, pp. 67-83.
6. Koyama T., Platt D., Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bulletin of the World Health Organization. Bulletin of the world health organization*, 2020, vol. 98, no. 7, pp. 495-504.
7. Tang M., Pham P., Shen X., Taylor J.-S., O'Donnell M., Woodgate R., Goodman M. Roles of *Escherichia coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature*, 2000, vol. 404, no. 6781, pp. 1014-1018.
8. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions. *Mutation research*, 2002, vol. 510, no. 1, pp. 55-70.
9. Bebenek K., Pedersen L.C., Kunkel T.A. Replication infidelity via a mismatch with Watson-Crick geometry. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 5, pp. 1862-1867.
10. Wang W., Hellinga H.W., Beese L.S. Structural evidence for the rare tautomer hypothesis of spontaneous mutagenesis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108, no. 43, pp. 17644-17648.
11. Watson J.D., Grick F.H.C. The structure of DNA. *Cold spring Harbor symposia on quantitative biology*, 1953, vol. 18, pp. 123-131.
12. Podolyan Y., Gorb L., Leszczynski J. *Ab initio* study of the prototropic tautomerism of cytosine and guanine and their contribution to spontaneous point mutations. *International journal of molecular sciences*, 2003, vol. 4, no. 7, pp. 410-421.
13. Lee D.-H., Pfeifer G.P. Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *Journal of biological chemistry*, 2003, vol. 278, pp. 10314-10321.
14. Horsfall M.J., Borden A., Lawrence C.W. Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer. *Journal of bacteriology*, 1997, vol. 179, pp. 2835-2839.
15. Grebneva H.A. Nature and possible mechanisms formation of potential mutations arising at emerging of thymine dimers after irradiation of double-stranded DNA by ultraviolet light. *Journal of molecule structure*, 2003, vol. 645, pp. 133-143.
16. Grebneva H.A. A model for targeted substitution mutagenesis during SOS replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2006, vol. 47, no. 9, pp. 733-745.

17. Гребнева Е.А. Три источника потенциальных немишенных ультрафиолетовых мутаций. Сборник трудов VI Всеукраинской научно-технической конференции. *Материалы VI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы теоретической и прикладной биофизики, физики и химии»*. г. Севастополь, 26-30 апреля 2010, с. 15-18 [Grebneva H.A. Three sources of potential untargeted ultraviolet mutations. *Proceedings of the VI International Scientific and Technical Conference "Modern trends in theoretical and applied biophysics, physics and chemistry"*. Sevastopol, April 26-30, 2010, pp. 15-18 (In Russ.)].
18. Гребнева Е.А. Природа и механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза. *Доклады НАН Украины*, 2012, № 10, с. 181-187 [Grebneva H.A. Nature and mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis. *Dopovidi NAN Ukraine*, 2012, no. 10, pp. 181-187 (In Russ.)].
19. Гребнева Е.А. Механизм образования делеций при синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые цитозиновые димеры. *Материалы VIII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*, Севастополь, 23-27 апреля 2012 г., с. 88-90 [Grebneva H.A. The mechanism of deletion formation during the synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *Proceedings of the VIII International Scientific and Technical Conference "Modern trends in Biological Physics and Chemistry"*, Sevastopol, April 23-27, 2012, pp. 88-90 (In Russ.)].
20. Гребнева Е.А. Механизмы образования горячих и холодных пятен ультрафиолетовых мишенных мутаций замены оснований. *Материалы IX Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*, Севастополь, 23-27 апреля 2013 г., с. 18-20 [Grebneva H.A. Mechanisms of formation of hot and cold spots of ultraviolet targeted base substitution mutations. *Proceedings of the IX International Scientific and Technical Conference "Modern trends in Biological Physics and Chemistry"*, Sevastopol, April 23-27, 2013, p. 18-20 (In Russ.)].
21. Гребнева Е.А. Механизмы мишенных мутаций сдвига рамки считывания – появление инсерций при склонном к ошибкам или SOS синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Молекулярная биология*, 2014, т. 48, № 4, с. 531-542 [Grebneva H.A. Mechanisms of targeted frameshift mutations – insertion formation under error-prone or SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Molecular Biology*, 2014, vol. 48, no. 4, pp. 457-467 (In Russ.)].
22. Grebneva H.A. A polymerase – tautomeric model for targeted frameshift mutations: deletions formation during error-prone or SOS replication of double-stranded DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Journal of Photonic Materials and Technology*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 19-26.
23. Гребнева Е.А. Механизмы образования мишенных сложных инсерций при синтезе молекулы ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Доклады НАН Украины*, 2015, № 5, с. 145-154 [Grebneva H.A. Mechanisms for the formation of targeted complex insertions during the synthesis of a DNA molecule containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Dopovidi NAN Ukraine*, 2015, no. 5, pp. 145-154 (In Russ.)].
24. Гребнева Е.А. Механизмы образования мишенных инсерций при склонном к ошибкам или SOS-синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Материалы X Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*. Севастополь, 17-21 августа 2015, с. 70-74 [Grebneva H.A. Mechanisms of formation of targeted insertions during error-prone or SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Proceedings of the X International Scientific and Technical Conference "Modern trends in Biological Physics and Chemistry"*. Sevastopol, August 17-21 2015, pp. 70-74 (In Russ.)].
25. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерная модель механизма образования мишенных сложных инсерций при синтезе ДНК, содержащей *цис-син* циклобутановые тиминные димеры. *Материалы XI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии»* в 2 томах, Севастопольский государственный университет, т. 1, 298 с., Севастополь, 25-29 апреля 2016, с. 156-160 [Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model of the mechanism of formation of targeted complex insertions during the synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *Proceedings of the XI International Scientific and Technical Conference "Modern trends in Biological Physics and Chemistry"* in 2 volumes, Sevastopol State University, vol. 1, 298 p., Sevastopol April 25-29, 2016, pp. 156-160 (In Russ.)].
26. Grebneva H.A. A polymerase–tautomeric model for radiation-induced bystander effects: a model for untargeted substitution mutagenesis during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA containing thymine and adenine in rare tautomeric forms. *International journal of molecular biology: open access*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 1-14.
27. Grebneva H.A. A Polymerase-tautomeric model for targeted substitution mutations formation during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *International journal of molecular biology: open access*, 2016, vol. I, no. 1, pp. 1-16.
28. Grebneva H.A. *Polymerase-tautomeric model for ultraviolet mutagenesis: targeted base substitution and frameshift mutations caused by cis-syn cyclobutane thymine dimers*. Germany, LAP LAMBERT Academic Publishing, 2017, 132 p.
29. Grebneva H.A. A polymerase-tautomeric model for radiation-induced genomic instability: targeted delayed substitution mutations during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane cytosine dimers. *International journal of molecular biology: open access*, 2018, vol. 3, pp. 125-141.
30. Grebneva H.A. Paradigm change in mutagenesis: polymerase-tautomeric models for targeted, delayed and untargeted ultraviolet mutagenesis during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA, containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers. *International journal of molecular biology: open access*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 1-15.

31. Grebneva H.A. *Theory of thermal relaxation of the excitation energy of hydrogen bonds in DNA. Its contribution to ultraviolet mutagenesis*. Saarbrücken, Germany. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2019, 345 p.
32. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model for untargeted delayed base substitution mutations formation during error-prone and SOS replication of double-stranded DNA containing thymine and adenine in some rare tautomeric forms. *Journal of oncology research*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 24-37.
33. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric models for *A-rule* during error-prone and SOS synthesis of DNA containing *cis-syn* cyclobutane thymine dimers or thymines and adenines in some rare tautomeric forms. *Trends in cell & molecular biology*, 2019, vol. 14, pp. 51-68.
34. Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric cancer risk model: the formation of 100% mutations is due to exposure to mutagens. *Trends in cell & molecular biology*, 2020, vol. 15, pp. 13-28.
35. Гребнева Е.А. Метод предсказания относительных вероятностей образования *цис-син* циклобутановых пиримидиновых димеров и редких таутомерных форм оснований ДНК на любых сайтах двунитевой ДНК. *Физика и техника высоких давлений*, 2021, т. 31, № 3, с. 88-103 [Grebneva H.A. Method for calculating the relative probabilities of the formation of *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers and rare tautomeric forms of DNA bases at any sites of double-stranded DNA. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2021, vol. 31, no. 3, pp. 88-103 (In Russ.)].
36. Гребнева Е.А. Процент мутаций, образующихся под воздействием мутагенов. *Физика и техника высоких давлений*, 2022, т. 32, № 1, с. 101-113 [Grebneva H.A. The percentage of mutations that are formed under the influence of mutagens. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2022, vol. 32, no. 1, pp. 101-113 (In Russ.)].
37. Гребнева Е.А. Полимеразно-таутомерная модель риска образования злокачественных опухолей. *Физика и техника высоких давлений*, 2022, т. 32, № 4, с. 99-104 [Grebneva H.A. Polymerase-tautomeric model of the risk of malignant tumor formation. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2022, vol. 32, no. 4, pp. 99-104 (In Russ.)].
38. Гребнева Е.А. Модель образования горячих и холодных пятен ультрафиолетового мутагенеза на участке двухцепочечной ДНК *supF* гена. *Физика и техника высоких давлений*, 2023, т. 33, № 2, с. 101-111 [Grebneva E.A. A model for the formation of hot and cold spots of ultraviolet mutagenesis in the double-stranded DNA region of the *supF* gene. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2023, vol. 33, no. 2, pp. 101-111 (In Russ.)].
39. Гребнева Е.А. Интерпретация горячих пятен ультрафиолетового мутагенеза, образующихся на запаздывающей нити двухцепочечной ДНК *supF*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 2, с. 125-132 [Grebneva H.A. Interpretation of hot spots of ultraviolet mutagenesis formed on the lagging strand of *supF* double-stranded DNA. *Russian journal of biological physics and chemistry*, 2023, vol. 8, no. 2, pp. 125-132 (In Russ.)].
40. Raghunathan G., Kieber-Emmons T., Rein R., Alderfer J.L. Conformation features of DNA containing a *cis-syn* photodimer. *Journal of biological structure and dynamics*, 1990, vol. 7, no. 4, pp. 899-913.
41. Cooney M.G., Miller J.H. Calculated distortions of duplex DNA by a *cis, syn* cyclobutane thymine dimer are unaffected by a 3' TPA step. *Nucleic acids research*, 1997, vol. 25, no. 7, pp. 1432-1436.
42. McAteer K., Jing Y., Kao J., Taylor J.-S., Kennedy M.A. Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a *cis-syn* thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA. *Journal of molecular biology*, 1998, vol. 282, no. 5, pp. 1013-1032.
43. Yamaguchi H., van Aalten D.M., Pinak M., Furukawa A., Osman R.H. Essential dynamics of DNA containing a *cis-syn* cyclobutane thymine dimer lesion. *Nucleic acids research*, 1998, vol. 26, no. 8, pp. 1939-1946.
44. Barltrop J.A., Coyle J.D. *Excited states in organic chemistry*. Wiley, New York, 1978, 446 p.
45. Моссе И.Б. Радиогенетические эффекты в клетках эукариот. В кн. *Радиационный мутагенез и его роль в эволюции и селекции*. М.: Наука, 1987, с. 73-84 [Mosse I.B. Radiogenetics effects in eukaryotic cells. In: *Radiation mutagenesis and its role in evolution and selection*. М.: Nauka, 1987, pp. 73-83 (In Russ.)].
46. Векшин Н.Л. *Фотоника биологических структур*. Пушchino: Институт биологической физики АН СССР, 1988, 51 с. [Vekshin N.L. *Photonics of biological structures*. Pushchino: Institute of Biological Physics of the Academy of Sciences of the USSR, 1988, 51 p. (In Russ.)].
47. Векшин Н.Л. *Перенос возбуждения в макромолекулах*. Итоги науки и техники. Серия Радиационная химия. Фотохимия, т. 7. М.: ВИНТИ, 1989, 164 с. [Vekshin N.L. *Transfer of excitation in macromolecules*. Results of science and technology. Series Radiation Chemistry. Photochemistry, vol. 7. М.: VINITI, 1989, 164 p. (In Russ.)].
48. Гребнева Е.А., Толпыго К.Б. Влияние водородных связей между спаренными основаниями ДНК на колебания их боковых групп. *Украинский физический журнал*, 1989, т. 34, № 12, с. 1791-1796 [Grebneva H.A., Tolpygo K.B. Influence of the hydrogen bonds between paired bases of DNA on vibrations of the side groups. *Ukraine physical journal*, 1989, vol. 34, no. 12, pp. 1791-1796 (In Russ.)].
49. Tolpygo K.B., Grebneva H.A. Effect of the state of h-b-l hydrogen bond of the character of some atom vibrations in guanine-cytosine pair of the DNA molecule. *International journal of quantum chemistry*, 1996, vol. 57, no. 2, pp. 219-227.
50. Гребнева Е.А. Облучение ДНК ультрафиолетовым светом: потенциальные изменения и мутации. *Молекулярная биология*, 1994, т. 28, № 4, с. 805-812 [Grebneva H.A. The irradiation of DNA by ultraviolet light: potential alterations and mutations. *Molecular biology*, 1994, vol. 28, no. 12, pp. 805-812 (In Russ.)].
51. Гребнева Е.А., Толпыго К.Б. Электростатическое взаимодействие, протонный потенциал и свойства водородных связей в системе гуанин – цитозин. *Украинский физический журнал*, 1988, т. 33, № 10, с. 1456-1462 [Grebneva H.A., Tolpygo K.B. Electrostatic interaction; potential of proton and properties of hydrogen bonds in the system of guanine - cytosine. *Ukraine physical journal*, 1988, vol. 33, no. 10, pp. 1456-1462 (In Russ.)].

52. Гребнева Е.А. Протонные потенциалы для широкого спектра изменения длины водородной связи в димере воды. *Журнал структурной химии*, 1997, т. 38, № 3, с. 422-430 [Grebneva H.A. Proton potential for broad spectrum of hydrogen bond length in water dimer. *Zhurnal strukturnoi khimii*, 1997, vol. 38, no. 3, pp. 422-430 (In Russ.)].

53. Соколов Н.Д., Чулановский В.М. *Водородная связь*. М.: Наука, 1964, 340 с. [Sokolov N.D., Chulanovsky V.M. (Eds). *Hydrogen bond*. M.: Nauka, 1964, 340 p. (In Russ.)].

54. Ольховская Ж.П., Толпыго К.Б. Изменение состояния водородной связи при оптическом возбуждении спаренных оснований нуклеиновых кислот. *Украинский физический журнал*, 1970, т. 15, № 9, с. 1453-1458 [Olkhovskaya Zh.P., Tolpygo K.B. Alteration of hydrogen bond state under optical excitation of paired bases of nucleic asides. *Ukraine physical journal*, 1970, vol. 15, no. 9, pp. 1453-1458 (In Russ.)].

55. Grebneva H.A., Tolpygo K.B. The heat deexcitation of hydrogen bond protons in paired bases of DNA molecules. *Studia biophysica*, 1990, vol. 135, no. 2, pp. 115-120.

56. Данилов В.И., Михалева О.В., Слюсарчук О.Н., Стюарт Дж.Дж., Альдерфер Дж.Л. О новом механизме мутаций, индуцируемых УФ-светом. Теоретическое изучение двухпротонной фототаутомеризации в модельных парах оснований ДНК. *Биополимеры и клетка*, 1997, т. 13, № 4, с. 261-268 [Danilov V.I., Mikhaleva O.V., Slyusarchuk O.N., Stewart J.J., Alderfer J.L. On the new mechanism of mutations induced by UV-light. A theoretical study of the double-proton phototautomerism in a model base pair of DNA. *Biopolymers and cell*, 1997, vol. 13, no. 4, pp. 261-268 (In Russ.)].

57. Clementi E., Corongiu G., Detrich J., Chin S., Domingo J. Parallelism in study in DNA pairs as an example. *International journal of quantum chemistry: quantum chemistry symposium*, 1984, vol. 18, pp. 601-618.

Гребнева Е.А. Механизм образования редких таутомерных форм урацила и аденина при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом. *Физика и техника высоких давлений*, 2024, т. 34, с. 96-104 [Grebneva H.A. Mechanism of formation of rare tautomeric forms of uracil and adenine when single-stranded RNA is irradiated with ultraviolet light. *Fizika i tekhnika visokih davleniy*, 2024, vol. 34, pp. 96-104 (In Russ.)].

MECHANISM OF FORMATION OF RARE TAUTOMERIC FORMS OF CYTOSINE AND GUANINE WHEN SINGLE-STRANDED RNA IS IRRADIATED WITH ULTRAVIOLET LIGHT

Grebneva H.A.

Donetsk Institute of Physics and Technology named after A A. Galkina
R. Luxembourg St., 72, Donetsk, 83114, Russia; e-mail: grebneva@gmail.com
Received 18.06.2024

Abstract. In order to understand the mechanism of mutation formation in coronaviruses, it is necessary to develop mechanisms for the formation of mutations in single-stranded RNA. I have proposed polymerase-tautomeric models of the mechanisms of formation of targeted, untargeted and delayed mutations formed when double-stranded DNA is irradiated with ultraviolet light. To construct polymerase-tautomeric models of UV mutagenesis of coronaviruses, it is first necessary to find rare tautomers formed of RNA bases when single-stranded RNA molecules are irradiated with ultraviolet light. For the first time, a mechanism for the formation of rare tautomeric forms of cytosine and guanine included in single-stranded RNA when irradiated with ultraviolet light has been proposed. I proposed a mechanism for the formation of rare tautomeric forms of double-stranded DNA bases that are formed when double-stranded DNA is irradiated with ultraviolet light. This work shows that this mechanism is also valid for the formation of rare tautomeric forms of bases in single-stranded RNA when irradiated with ultraviolet light. Single-stranded RNA is found in an aqueous environment. In this case, water molecules are attached to the RNA molecule using hydrogen bonds. Three channels of relaxation of electronic vibrational states are possible. The formation of rare tautomeric forms of RNA bases occurs during nonradiative relaxation of excitation energy. This leads to strong forced fluctuations in the lengths of hydrogen bonds and changes in the tautomeric states of RNA bases. When single-stranded RNA, bound to water molecules by hydrogen bonds, is irradiated, all possible tautomeric forms, those that can influence the nature of base pairing, of cytosine and guanine can be formed. It has been shown that it is possible to form 7 rare tautomeric forms of cytosine and 7 rare tautomeric forms of cytosine, those that can influence the nature of base pairing. Such rare tautomers will be stable in single-stranded RNA.

Key words: ultraviolet mutagenesis, mutagenesis of viruses, mutagenesis of coronaviruses, rare tautomeric forms of cytosine, rare tautomeric forms of guanine, single-stranded RNA.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДУЛЯЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ ПУТЕМ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ НА ХИТОЗАНЕ

Королева В.А.¹, Панкова С.М.¹, Холявка М.Г.^{2,3}, Артюхов В.Г.²

¹ Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко
ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394006, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

² Воронежский государственный университет
Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ

³ Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Поступила в редакцию 12.07.2024

Аннотация. После иммобилизации на нерастворимых носителях энзимы становятся более устойчивыми к изменению значений температуры и к УФ-облучению. После сорбции бромелина, фицина и папаина на матрице хитозанов при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² каталитическая способность ферментов изменялась в меньшей степени, чем у их нативных форм. При 80 °С растворимый бромелин термически инактивировался на 72 %, в то время как иммобилизованный на средне- и высокомолекулярном хитозанах сохранял 60 и 66 % своей исходной активности. Нативный фицин полностью терял свою каталитическую способность при 70 °С, напротив, иммобилизованный фицин при данной температуре сохранял 70 % от исходной активности. При нагревании до 80 °С фицин как в нативном, так и в сорбированном состоянии полностью инактивировался. При 80 °С ферментативная активность нативного папаина снижалась на 68 % от исходной, а полная инактивация происходила при 90 °С. Папаин, иммобилизованный на средне- и высокомолекулярном хитозанах, сохранял соответственно 80 и 98 % своей активности при 80 °С и 45 и 57 % от начальной каталитической способности при 90 °С.

Ключевые слова: бромелин, фицин, папаин, иммобилизация, хитозан, УФ-облучение.

ВВЕДЕНИЕ

Папаинподобные пептидазы представляют собой мономерные глобулярные белки с молекулярными массами в диапазоне 25-35 кДа. Их структура состоит из L- и R-доменов. Активный центр папаинподобных энзимов расположен на границе раздела обоих доменов в виде V-образной щели [1]. Данные ферменты содержат каталитическую диаду, состоящую из ионной пары Cys-His⁺. Остатки Asn175 и Gln19 необходимы для правильной пространственной ориентации каталитической диады [2,3]. Важную роль в формировании нуклеофильного характера каталитической диады играет Trp177 [4].

Папаин (КФ 3.4.22.2) представляет собой эндолитический фермент, выделенный из латекса *Carica papaya*. Это одноцепочечный белок с молекулярной массой 23 кДа, состоящий из 212 аминокислот [5]. Фермент проявляет высокую протеолитическую активность в отношении белков, пептидов с короткой цепью, эфиров аминокислот и амидных связей и широко применяется в пищевой промышленности и медицине. Он преимущественно расщепляет пептидные связи, включающие основные аминокислоты, особенно аргинин, лизин и остатки фенилаланина [6]. Папаин сохраняет активность в температурном диапазоне до 50-60 °С и при pH 5-8.

Бромелин (КФ 3.4.22.4) – это протеаза, полученная из стебля и плодов *Ananas comosus*. Молекулярная масса – 23-25 кДа. Бромелин из стеблей содержит 212 аминокислот, из которых наиболее распространенными являются аланин и глицин, а гистидин и метионин присутствуют в наименьшем количестве [7]. Оптимальные величины pH и температуры для функционирования бромелина из стебля находятся в диапазоне pH 6,5–8,0 и 55–60 °С [8].

Фицин (КФ 3.4.22.3) принадлежит к цистеиновым протеазам семейства папаина, выделяется из латекса *Ficus* же. Однако ферменты могут различаться аминокислотами, выстилающими субстратсвязывающий карман и отвечающими за связывание боковых цепей аминокислот субстрата. Следовательно, они могут различаться по субстратной специфичности, расщепляя разные пептидные связи белков-субстратов [9]. Для молекулы энзима оптимум pH составляет 6-7, оптимальная температура – от 45 до 55 °С [10].

Применение ферментов в свободной (нативной) форме имеет ряд ограничений, например, их быстрая инактивация при воздействии высоких температур и УФ-излучения. На сегодняшний день в целях повышения устойчивости ферментов масштабно применяют методы иммобилизации на различных полимерных носителях. С помощью иммобилизации можно придать энзимам новые свойства и сделать их устойчивыми даже к жестким условиям. Хитозан – природный полиаминосахарид, получаемый путем деацетилирования хитина. Данный полимер нетоксичен, биосовместим и биоразлагаем [11]. Он широко применяется в различных областях медицины (лечение раневых поверхностей) и фармакологии (доставка лекарств в микрочастицах) [12-15].

Целью работы было изучение влияния УФ-света и температуры на активность бромелина, фицина и папаина, нативных и сорбированных на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны бромелин, фицин и папаин (Sigma-Aldrich), субстратами для гидролиза служили бычий сывороточный альбумин (БСА) и азоказеин (Sigma-Aldrich), носителями для иммобилизации – хитозаны с молекулярной массой 200 кДа, степень деацетилования (СД) 82 % (среднемолекулярный) и 350 кДа, СД = 95 % (высокомолекулярный). Иммобилизацию ферментов на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом. Зависимость каталитической способности нативных и иммобилизованных бромелина, фицина и папаина от температуры исследовали в диапазоне от 25 до 90 °C [16].

Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании раствора или суспензии в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете (20 ± 1 °C) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 минут. Доза облучения составляла соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м². Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После УФ-облучения раствора бромелина в дозе 151 Дж/м² наблюдалось увеличение активности фермента на 86 % по сравнению с контрольным образцом. При действии дозы 453 Дж/м² каталитическая способность фермента соответствовала первоначальному уровню и сохранялась в его пределах при дальнейшем УФ-облучении препарата в диапазоне доз 755-4530 Дж/м². При использовании дозы 6040 Дж/м² зарегистрировано снижение активности свободного бромелина на 15 %. После иммобилизации бромелина на матрице высокомолекулярного хитозана колебания его протеолитической активности наблюдались в пределах 2-3 % во всем диапазоне используемых нами доз. После иммобилизации бромелина на матрице среднемолекулярного хитозана при УФ-облучении в дозе 151 Дж/м² детектировано увеличение каталитической способности на 11 %, при облучении в диапазоне доз 453-6040 Дж/м² дальнейшее изменение активности фермента не зарегистрировано (рис. 1).

Ферментативная активность нативного и иммобилизованного на хитозане бромелина в зависимости от температуры образцов представлена на рисунке 2. В ходе исследований было установлено, что для растворимого бромелина диапазон рабочих температур находится между 50 и 70 °C, после иммобилизации на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов – от 40 до 70 °C. При 80 °C свободный фермент сохранял 28 % от своей исходной каталитической способности, в то время как сорбированный на среднемолекулярном хитозане фермент сохранял порядка 60 % активности от максимального значения, а иммобилизованный на высокомолекулярном – 66 %. Иммобилизация бромелина на средне- и высокомолекулярном хитозанах не привела к сдвигу температурного оптимума, но увеличила термостабильность фермента. Можно сделать предположение о том, что связывание с матрицей хитозана предотвращает преждевременную денатурацию белка.

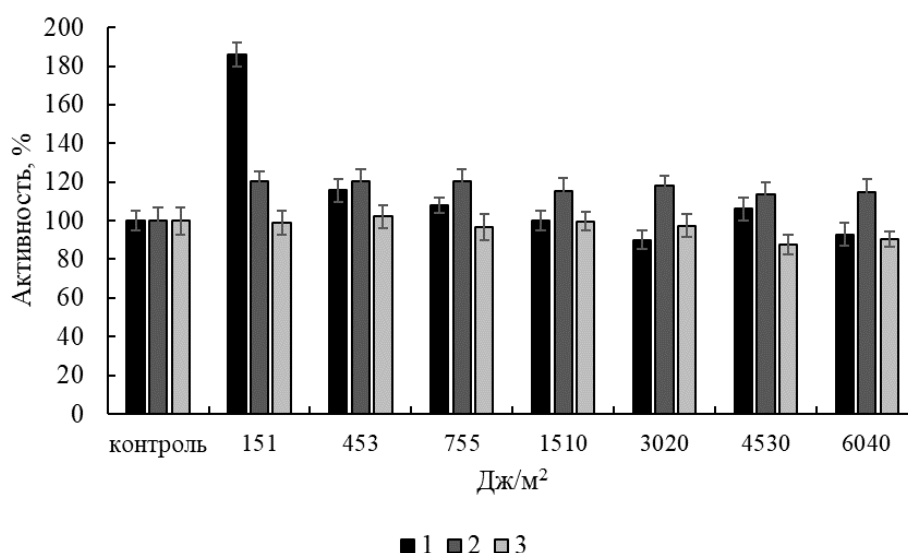


Рисунок 1. Зависимость каталитической активности бромелина (%) от дозы УФ-излучения, где:
1 – нативный фермент,
2 – фермент, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане,
3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

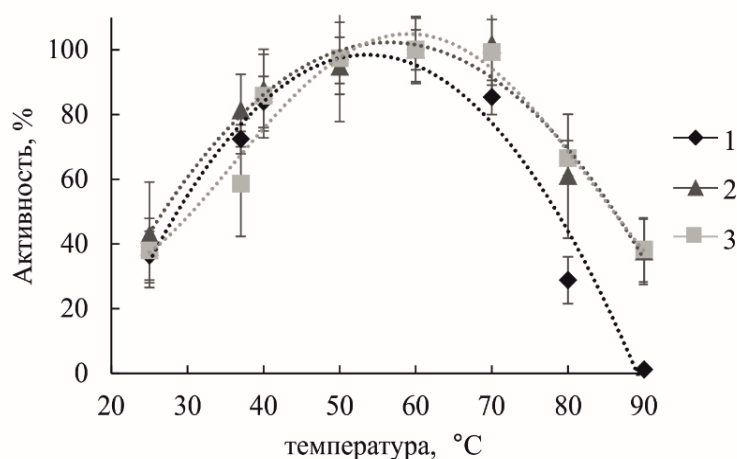


Рисунок 2. Зависимость каталитической активности бромелина (%) от температуры инкубации, где:
 1 – нативный фермент (ромб),
 2 – фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане (треугольник),
 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане (квадрат)

Далее, при УФ-облучении раствора свободного фицина в дозах от 151 до 1510 Дж/м² выявлено незначительное снижение активности, но, начиная с 3020 Дж/м² и увеличивая дозу до 4530 и 6040 Дж/м², мы зарегистрировали статистически значимое снижение каталитической способности свободного фицина на 11, 12 и 17 % соответственно. После иммобилизации фицина на матрице среднемoleкулярного хитозана наблюдалась тенденция к снижению каталитической активности препарата после УФ-облучения в дозе 151 Дж/м². При последующем облучении в диапазоне доз 453-6040 Дж/м² каталитическая способность фицина поддерживалась на относительно постоянном уровне. После иммобилизации фицина на матрице высокомолекулярного хитозана при УФ-облучении фермент сохранял свою активность на исходном уровне и снижения каталитической способности не было зарегистрировано во всем исследуемом диапазоне доз (рис. 3).

В ходе следующих наших экспериментов было установлено, что диапазон рабочих температур для свободного фицина, иммобилизованного на матрицах средне- и высокомолекулярного хитозанов, находится между 37 и 60 °C, однако, при 70 °C свободный энзим был полностью термически инактивирован, в то время как сорбированный на хитозане 200 и 350 кДа фермент сохранял порядка 70 % активности от нативного. При инкубации при 80 °C происходила инактивация иммобилизованного фицина. Каталитическая активность свободного и иммобилизованного фицина в зависимости от температуры представлена на рисунке 4.

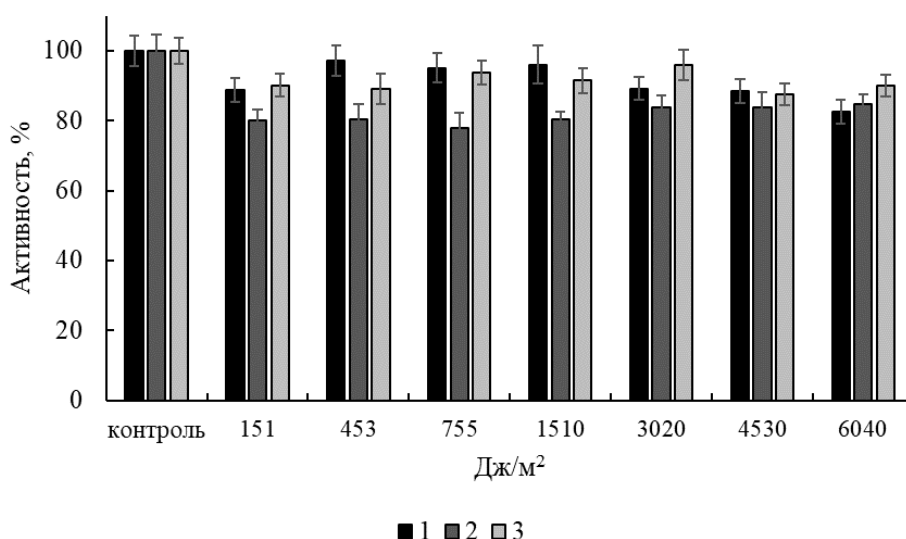


Рисунок 3. Влияние УФ-света на каталитическую активность (%) свободного и иммобилизованного на матрице хитозана фицина:
 1 – свободный фицин,
 2 – фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане,
 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

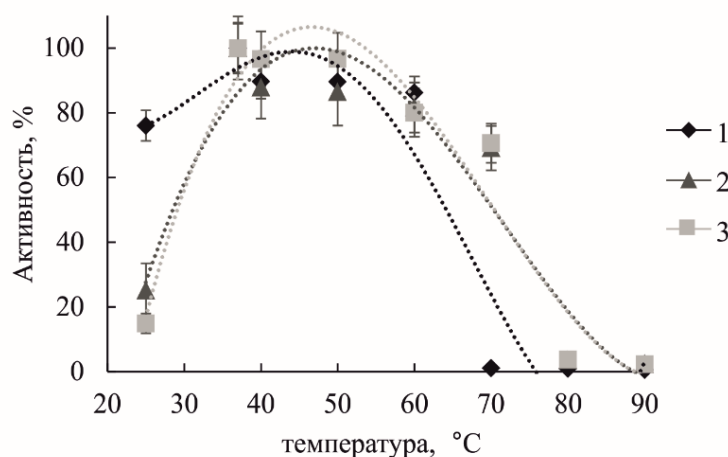


Рисунок 4. Зависимость каталитической активности фицина (%) от температуры инкубации, где:

- 1 – нативный фермент (ромб),
- 2 – фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане (треугольник),
- 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане (квадрат)

После воздействия дозы УФ-света 453 Дж/м^2 на раствор папаина выявлено снижение каталитической способности энзима на 32 % по сравнению с контрольным (необлученным) образцом. При повышении дозы облучения от 755 до 6040 Дж/м^2 фермент сохранял свою активность на относительно постоянном уровне 65-75 % от первоначального значения. После иммобилизации папаина на матрице средне- и высокомолекулярного хитозанов при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м^2 каталитическая способность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы. В частности, после адсорбции на среднемoleкулярном хитозане при воздействии УФ-света во всем изучаемом нами диапазоне доз активность папаина колебалась в пределах $\sim 5\%$, а после образования комплекса с высокомолекулярным хитозаном активность биокатализатора даже увеличивалась на 13-27 % от его первоначального уровня (рис. 5).

Оптимальная температура для функционирования папаина, иммобилизованного на хитозанах с массами 200 и 350 кДа, была аналогична таковой для растворимого фермента – 60°C . При 80°C ферментативная активность нативного папаина снижалась до 68 % от исходной, а полная инактивация наблюдалась при 90°C (рис. 6). Напротив, папаин, иммобилизованный на обоих типах хитозана, сохранял соответственно 80 и 98 % своей активности при 80°C , а также 45 и 57 % своей начальной каталитической способности при 90°C . Эти данные свидетельствуют о том, что адсорбция на хитозане повышает термостабильность папаина, по-видимому, путем ограничения конформационной подвижности белка, что предотвращает его преждевременную денатурацию.

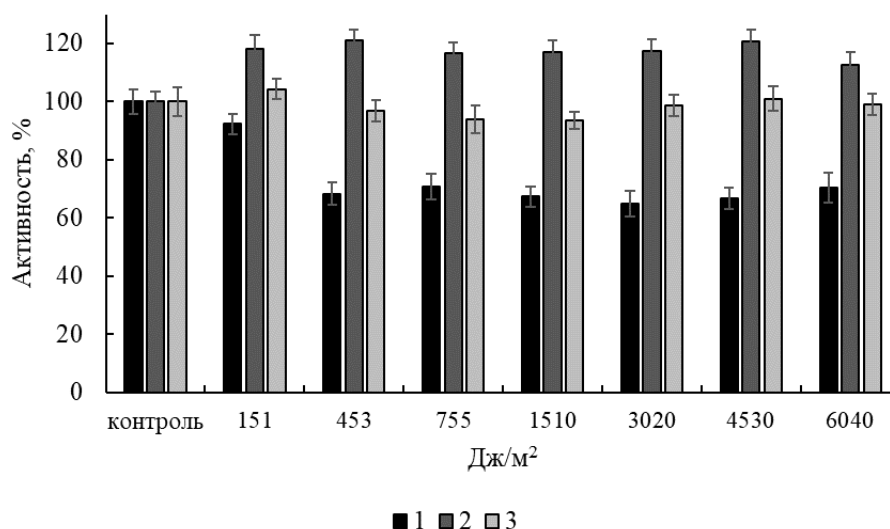


Рисунок 5. Влияние УФ-света на каталитическую активность (%) свободного и иммобилизованного на матрице хитозана папаина:

- 1 – свободный папаин,
- 2 – фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане,
- 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

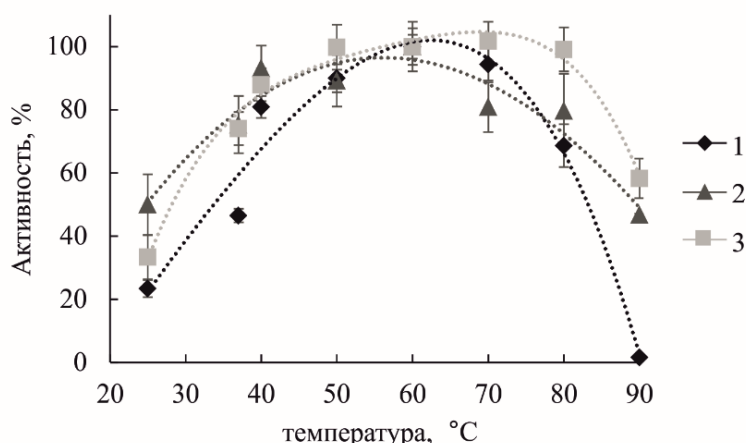


Рисунок 6. Зависимость каталитической активности папаина (%) от температуры инкубации, где:

- 1 – нативный фермент (ромб),
 2 – фермент, иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане (треугольник),
 3 – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане (квадрат)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммобилизованные на средне- и высокомолекулярном хитозанах бромелин, фицин и папаин имеют ряд преимуществ по сравнению с их свободной формой. Показано, что энзимы становятся более устойчивыми к изменению значений температуры и к УФ-облучению. При воздействии УФ-света в диапазоне доз 151-6040 Дж/м² колебания каталитической активности иммобилизованного бромелина были выражены в меньшей степени, чем у его растворимой формы. Свободный фицин незначительно снижал каталитическую способность в дозах свыше 3020 Дж/м². После иммобилизации фермента на матрице хитозана выявлена стабилизация его каталитической способности во всем диапазоне доз. После адсорбции папаина на матрице носителя при воздействии доз от 151 до 6040 Дж/м² протеолитическая активность фермента изменялась в меньшей степени, чем у его растворимой формы.

При 80 °C растворимый бромелин термически инактивировался на 72 %, в то время как иммобилизованный на средне- и высокомолекулярном хитозанах сохранял 60 и 66 % своей исходной активности. Нативный фицин полностью терял свою каталитическую способность при 70 °C, напротив, иммобилизованный фицин при данной температуре сохранял 70 % от исходной активности. При нагревании до 80 °C фицин как в нативном, так и в сорбированном состоянии термоинактивировался. При 80 °C ферментативная активность нативного папаина снижалась на 68 % от исходной, а полная инактивация происходила при 90 °C. Папаин, иммобилизованный на средне- и высокомолекулярном хитозанах, сохранял соответственно 80 и 98 % своей активности при 80 °C и 45 и 57 % при 90 °C.

Список литературы / References:

1. Novinec M., Lenarcic B. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *BioMolecular Concepts*, 2013, vol. 4, no. 3, pp. 287-308, doi: 10.1515/bmc-2012-0054.
2. Menard R., Carriere J., Laflamme P., Plouffe C., Khouri H.E., Vernet T., Tessier D.C., Thomas D.Y., Storer A.C. Contribution of the glutamine 19 side chain to transition-state stabilization in the oxyanion hole of papain. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, pp. 8924-8928, doi: 10.1021/bi00101a002.
3. Vernet T., Tessier D.C., Chatellier J., Plouffe C., Lee T.S., Thomas D.Y., Storer A.C., Menard R. Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, pp. 16645- 16652.
4. Gul S., Hussain S., Thomas M.P., Resmini M., Verma C.S., Thomas E.W., Brocklehurst K. Generation of nucleophilic character in the Cys25/His159 ion pair of papain involves Trp177 but not Asp158. *Biochemistry*, 2008, vol. 47, pp. 2025-2035.
5. Tsuge H., Nishimura T., Tada Y., Asao T., Turk D., Turk V., Katunuma N. Inhibition Mechanism of Cathepsin L-Specific Inhibitors Based on the Crystal Structure of Papain-CLIK148 Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, vol. 266, no. 2, pp. 411-416, doi: 10.1006/bbrc.1999.1830.
6. Amri E., Mamboya F. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2012, vol. 8, no. 2, pp. 99-104, doi: 10.3844/ajbbsp.2012.99.104.
7. Ritonja A., Rowan A.D., Buttler D.J., Rawlings N.D., Turk V., Barrett A.J. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.*, 1989, vol. 247, no. 2, pp. 419-424, doi: 10.1016/0014-5793(89)81383-3.
8. Bhattacharya R., Bhattacharyya D. Preservation of natural stability of fruit “bromelain” from *Ananas comosus* (pineapple). *J. Food Biochem.*, 2009, vol. 33, no. 1, pp. 1-19.
9. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32,

pp. 160-164, doi: 10.1093/nar/gkh071.

10. Панкова С.М., Холявка М.Г., Кондратьев М.С., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Артюхов В.Г. Изучение процессов УФ-модификации фицина, свободного и иммобилизованного на матрице хитозана. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2020, т. 60, № 4, с. 411-417 [Pankova S.M., Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Vyshkvorkina Yu.M., Lukin A.N., Artyukhov V.G. Investigation of UV modification processes for free and immobilized on the chitosan matrix ficin. *Radiation biology. Radioecology*, 2020, vol. 60, no. 4, pp. 411-417 (In Russ.)].

11. Biro E., Nemeth A.S., Sisak C., Feczko T., Gyenis J. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2008, vol. 70, no. 6, pp. 1240-1246, doi: 10.1016/j.jprot.2007.11.005.

12. Pankova S.M., Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Lukin A.N., Artyukhov V.G., Vyshkvorkina Y.M. Studies of the processes of the trypsin interactions with ion exchange fibers and chitosan. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2021, vol. 47, no. 3, pp. 765-776, doi: 10.1134/S1068162021030146.

13. Ol'shannikova S.S., Red'ko Y.A., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2022, vol. 55, no. 11, pp. 1240-1244.

14. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение*. Учебное пособие: Воронеж, 2017 [Holyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilizovannyye biologicheskie sistemy: biofizicheskie aspekty i prakticheskoe primeneniye*. Uchebnoye posobie: Voronezh, 2017 (In Russ.)].

15. Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. *Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ*. Учебное пособие: Воронеж, 2017 [Holyavka M.G., Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. *Praktikum po biotekhnologii: immobilizovannyye biologicheskie ob"ekty v sisteme laboratornykh rabot*. Uchebnoye posobie: Voronezh, 2017 (In Russ.)].

16. Holyavka M., Koroleva V., Olshannikova S., Artyukhov V., Faizullin D., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, vol. 180, pp. 161-176.

17. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A. Physical, chemical, and kinetic properties of trypsin-based heterogeneous biocatalysts immobilized on ion-exchange fiber matrices. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2017, vol. 51, no. 8, pp. 702-706.

STUDY OF THE CATALYTIC PROPERTIES MODULATION FOR CYSTEINE PROTEASES UNDER THE INFLUENCE OF UV RADIATION AND TEMPERATURE BY IMMOBILIZING ENZYMES ON CHITOSAN

Koroleva V.A.¹, Pankova S.M.¹, Holyavka M.G.^{2,3}, Artyukhov V.G.²

¹ Voronezh State Medical University named after. N.N. Burdenko
Studencheskaya, St., 10, Voronezh, 394006, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

² Voronezh State University
Universitetskaya Sq., 1, Voronezh, 394018, Russia

³ Sevastopol State University
Universitetskaya, St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 12.07.2024

Abstract. After immobilization on insoluble supports, enzymes become more resistant to changes in temperature and UV irradiation. After the sorption of bromelain, ficin and papain on a chitosan matrix when exposed to doses from 151 to 6040 J/m², the catalytic ability of the enzymes changed to a lesser extent than that of their native forms. At 80 °C, soluble bromelain was thermally inactivated by 72%, while immobilized on medium and high molecular weight chitosans retained 60 and 66% of its original activity. Native ficin completely lost its catalytic ability at 70 °C; on the contrary, immobilized ficin at this temperature retained 70% of its original activity. When heated to 80 °C, ficin, both in its native and adsorbed states, was completely inactivated. At 80 °C, the enzymatic activity of native papain decreased by 68% of the initial value, and complete inactivation occurred at 90 °C. Papain immobilized on medium- and high-molecular-weight chitosans retained, respectively, 80 and 98% of its activity at 80 °C and 45 and 57% of the initial catalytic ability at 90 °C.

Key words: bromelain, ficin, papain, immobilization, chitosan, UV irradiation.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОГЛОБИНА С ЛИПОСОМАМИ ДО И ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ И ВЛИЯНИЕ РАСТВОРОВ СОЛИ И СРОКОВ ХРАНЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ГЕМОГЛОБИНА

Тимченко Н.Н., Шупова Е.В.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 15.07.2024

Аннотация. Несмотря на хорошую изученность гемоглобина его продолжают изучать. В проблемах консервирования крови важным является изучение вопроса криповреждения гемоглобина. Концентрирование солевых растворов при вымерзании воды является одним из основных факторов криповреждения белков. К настоящему времени накоплен значительный объем оригинальных исследований, посвященных изучению влияния этого фактора на белки. Определяя методом гель-хроматографии распределение белков по молекулярным массам в растворах с различной концентрацией NaCl, установили, что положение максимумов на кривых фракционирования свежих растворов HbA в 1,5M NaCl соответствует одной и той же фракции - 64 кД. При фракционировании свежих растворов HbA в 1,9M NaCl положение максимума для HbA не изменяется. Сохраняется тетрамерная структура молекулы гемоглобина. При аналогичных исследованиях растворов гемоглобина при увеличении сроков хранения от 1 до 5 дней при +4 градусах Цельсия появление фракций с молекулярным весом 36 кДа наблюдается при 2M NaCl, что соответствует результатам для свежих растворов гемоглобина. Гемоглобин распадается на димеры. Таким образом, увеличение сроков хранения растворов гемоглобина не приводит к меньшей устойчивости гемоглобина к действию концентрированных растворов солей. По-видимому, это связано с тем, что с течением хранения растворов гемоглобина увеличивается содержание деокси- и метгемоглобина за счёт уменьшения содержания оксигемоглобина. Способность гемоглобина диссоциировать на димеры увеличивается при обработке гемоглобина одним молем ПМБ (меркурия бензоата), модифицирующим SH-остаток цистеина F9(93)β, находящийся вблизи от α₁β₂-контакта. Замораживание-оттаивание гемоглобина не приводит к значительным изменениям во взаимодействии с липосомами.

Ключевые слова: гемоглобин, растворы соли, срок хранения.

Гемоглобин может находиться в нескольких формах в зависимости от валентности гема и наличия в молекуле лиганда. Так, деокси-гемоглобин (восстановленный) имеет железо со степенью окисления +2 и, как показано с помощью метода дифракции рентгеновских лучей, 6-я валентность этого железа свободна. При присоединении к нему кислорода образуется оксигенированная форма гемоглобина (феррогемоглобин). Деокси-гемоглобин может также реагировать с CO и NO с образованием соответственно карбокси- и нитрогемоглобина. При действии на гемоглобин ряда окислителей (феррицианид калия, нитриты, хиноны и др.) происходит окисление железа со степенью окисления +2 до железа со степенью окисления +3 с образованием мет-гемоглобина (ферригемоглобина), не способного к переносу кислорода. В зависимости от pH среды различают кислую и щелочную формы гемоглобина, содержащие в качестве 6-го лиганда соответственно молекулу воды или гидроксид-ион; мет-гемоглобин способен реагировать с рядом лигандов, образуя соответствующие виды гемоглобинов [1]. Присоединение кислорода к деокси-гемоглобину и превращение в другие производные сопровождаются характерными изменениями спектра поглощения в видимой области [2]. Общим свойством спектров всех производных гемоглобина является наличие интенсивной полосы в области 400-420 нм с миллиэквивалентным коэффициентом светопоглощения от 120 до 190. Эту полосу называют полосой Sore. Возникновение её обусловлено переносом электронов в порфириновой структуре. Другие особенности спектра зависят от того, в какой валентности находится железо гема и в каком оно состоянии – низко- или высокоспиновом. Гемоглобин можно представить в виде системы, в которой составляющие его компоненты подвергаются обратимой модификации в результате специфического взаимодействия друг с другом. Свойства его изолированных частей гема, глобина, отдельных цепей глобина очень отличаются от тех, которыми они обладают в молекуле гемоглобина. Гем в отсутствие глобина не способен присоединять кислород. Лишь сочетание с глобином меняет его свойства, превращая трудно растворимый и химически инертный гем в хорошо растворимую форму, способную обратимо присоединять кислород. В свою очередь гем оказывает большое влияние на химические и физико-химические свойства глобина. При сочетании гема с альфа- и бета-цепями глобина происходит изменение их конформации и возникает специфическая для них вторичная и третичная структура. Это обуславливает объединение содержащих гем полипептидных цепей с образованием нативной четвертичной структуры молекулы гемоглобина [1]. Несмотря на хорошую изученность гемоглобина его продолжают изучать [3]. В проблемах консервирования крови важным является изучение вопроса криповреждения гемоглобина. Концентрирование солевых растворов при вымерзании воды является одним из основных факторов криповреждения белков. К настоящему времени накоплен значительный объем оригинальных исследований, посвященных изучению влияния этого фактора на белки. Исследования изменения

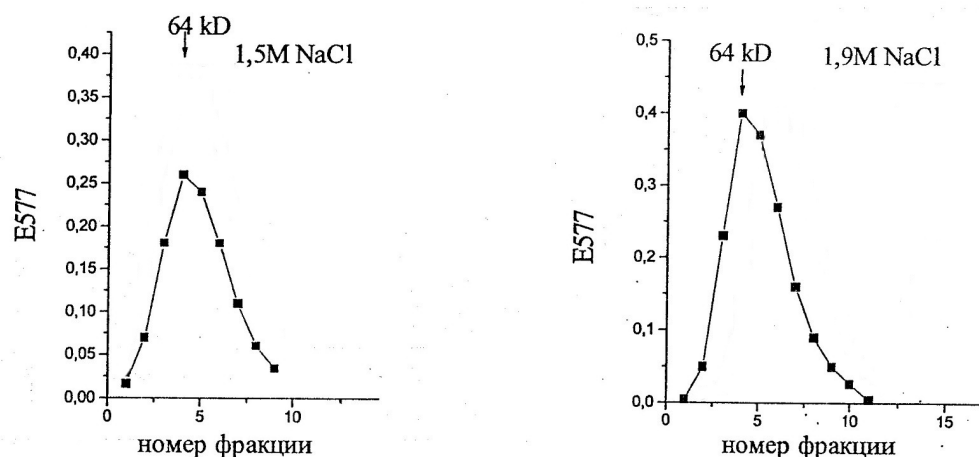


Рисунок 1. Кривые фракционирования свежих растворов гемоглобина в 1,5М и 1,9М NaCl

спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрированных растворах натрия хлорида, в частности, с помощью метода спектрофотометрии были проведены авторами [4]. При концентрации соли 2,6М происходит увеличение оптической плотности растворов при длине волны 325 нм, что является, по-видимому, следствием агрегации белка, особенно значительно это проявляется при 4М. При концентрациях соли более 1,6–2,6М по данным спектрофотометрии изменяется состояние триптофановых, тирозиновых и фенилаланиновых остатков, и, вероятно, происходят внутримолекулярные конформационные изменения белка. Натрия хлорид при концентрации в растворе 1–1,6М оказывает, по-видимому, лишь общее электростатическое влияние на конформацию БСА, не вызывая значительного изменения его внутренней конформации. Увеличение светорассеяния может быть обусловлено как внутримолекулярными изменениями, так и агрегацией белковых молекул. Денатурация БСА в растворах натрия хлорида наступает при концентрации более 4,6М. Однако ей предшествуют предденатурационные изменения белка при концентрации соли примерно от 1,6 до 2,6М и более. Моисеев В.А. с соавторами [5] при изучении влияния гиперконцентраций солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади отметили, что при высоких концентрациях солей параметры спектров поглощения при различных рН становятся характерными для необратимо денатурированного белка: резко увеличивается светорассеяние, наблюдается сдвиг λ_{max} спектров поглощения. Процесс денатурации носит характер двух- или трехступенчатого процесса. По мере повышения концентрации соли в растворе иммуноглобулин испытывает обратимые (при 8,5% концентрации натрия хлорида), а затем необратимые (при 18% концентрации натрия хлорида) конформационные превращения. Эксперименты по определению структуры и функции изолированной цитохромоксидазы в присутствии солей, проведенные Розановой Е.Д. с соавторами, показали, что в концентрированных солевых растворах наблюдаются конформационные переходы, сопровождающиеся снижением ферментативной активности [6]. Для фермента, встроенного в липосомы, концентрации солей, при которых наблюдается конформационный переход, ниже, чем для фермента, находящегося в растворе [7]. Определяя методом гель-хроматографии распределение белков по молекулярным массам в растворах с различной концентрацией NaCl, мы установили, что положение максимумов на кривых фракционирования свежих растворов HbA в 1,5М NaCl соответствует одной и той же фракции – 64 кД (рис. 1). При фракционировании свежих растворов HbA в 1,9М NaCl положение максимума для HbA не изменяется (рис. 1). Значит, сохраняется тетрамерная структура молекулы гемоглобина. При аналогичных исследованиях растворов гемоглобина при увеличении сроков хранения от 1 до 5 дней при +4 градусах Цельсия появление фракций с молекулярным весом 36 кДа наблюдается при 2М NaCl, что соответствует результатам для свежих растворов гемоглобина. Значит, гемоглобин распадается на димеры. Таким образом, увеличение сроков хранения растворов гемоглобина не приводит к меньшей устойчивости гемоглобина к действию концентрированных растворов солей. По-видимому, это связано с тем, что с течением хранения растворов гемоглобина увеличивается содержание деокси- и метгемоглобина за счёт уменьшения содержания оксигемоглобина. Способность гемоглобина диссоциировать на димеры увеличивается при обработке гемоглобина одним молем ПМБ (меркурия бензоата), модифицирующим SH-остаток цистеина F9(93) β , находящийся вблизи от $\alpha_1\beta_2$ -контакта [8]. По-видимому, распаду тетрамера гемоглобина на димеры предшествует ослабление гидрофобных взаимодействий в молекуле гемоглобина. Мы проводили исследование влияния замораживания до -196 градусов Цельсия и оттаивания на структуру гемоглобина. Замораживание-оттаивание растворов гемоглобина приводит к конформационным изменениям в молекулах этих белков. После замораживания-оттаивания белков происходит смещение «ноля» первой производной спектра поглощения (ППСП) растворов гемоглобина в коротковолновую область (рис. 2). Это свидетельствует об увеличении доступности растворителю поглощающих хромофоров, в данном случае, тирозиновых аминокислотных остатков, так как изменения в форме ППСП происходят в области 277 нм, соответствующей поглощению тирозиновых аминокислотных остатков, которые располагаются в

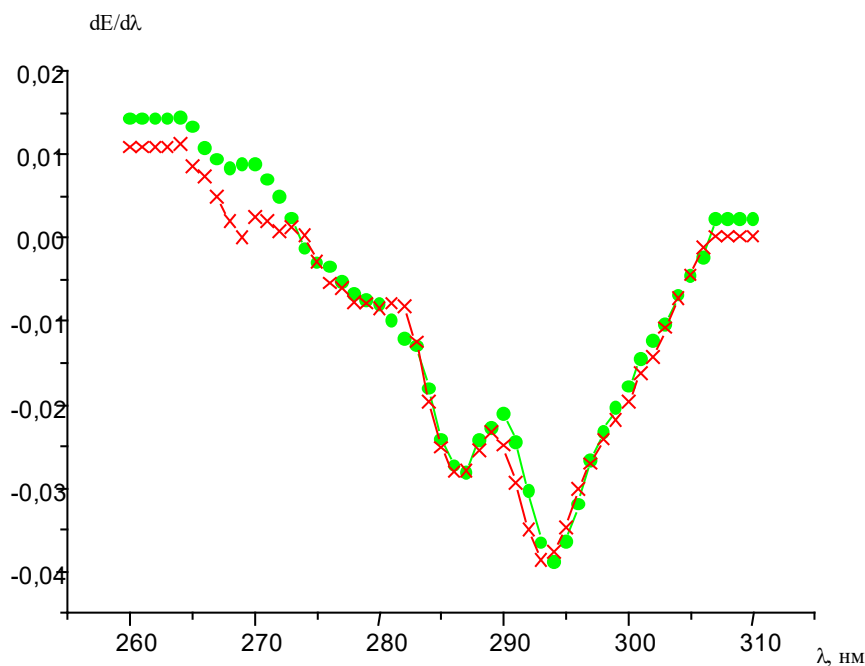


Рисунок 2. ПСП раствора гемоглобина до и после замораживания-оттаивания; • – до замораживания-оттаивания, × – после замораживания-оттаивания

полярных областях. Таким образом, замораживание-оттаивание растворов гемоглобина приводит к конформационным изменениям, затрагивающим преимущественно полярные области белковых глобул. Так как, предположительно, молекула гемоглобина пластична, то после замораживания-оттаивания одни части молекулы становятся более доступны растворителю, а другие, наоборот, сворачиваются. Поэтому мы делаем вывод, что после замораживания-оттаивания происходят процессы, затрагивающие также и гидрофобные участки молекулы гемоглобина. Одним из методов изучения распределения по белковой макромолекуле полярных и неполярных групп является взаимодействие органических красителей с белками. Связывание бромтимолового синего (БТС) гемоглобином приводит к уменьшению интенсивности спектра поглощения при 615 нм. Определяли параметры связывания красителя оксигемоглобином до и после замораживания-оттаивания (табл. 1). Концентрация свободного БТС в растворе больше при связывании БТС гемоглобином после замораживания, чем до замораживания (рис. 3). Число участков сорбции БТС гемоглобином после замораживания оказалось меньше, чем до замораживания (табл. 1). Так как связывание анионного красителя с белком при $\text{pH} \geq \text{pI}$ осуществляется посредством гидрофобных взаимодействий, то меньшее сорбирование БТС на поверхности молекулы гемоглобина после замораживания по сравнению с до замораживанием при $\text{pH} 7,2$ говорит о том, что доступная

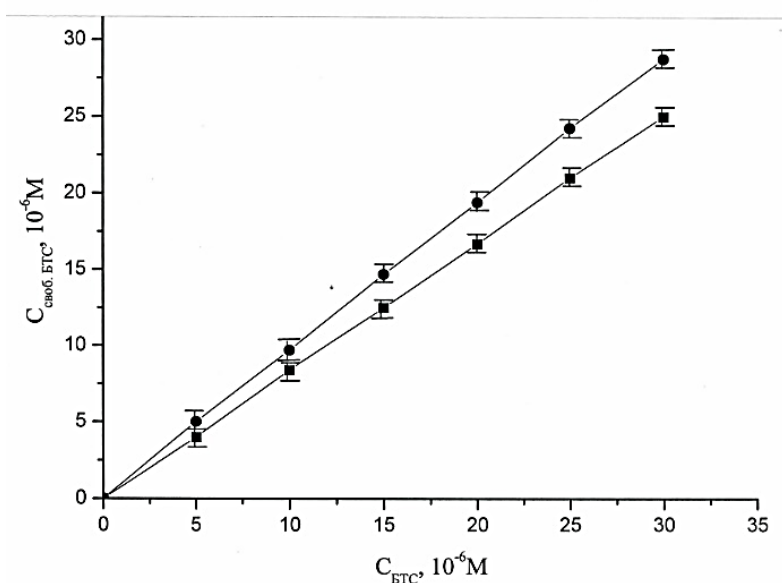


Рисунок 3. Зависимость концентрации несвязанного (свободного) БТС от общей концентрации БТС в растворах гемоглобина с БТС (квадратики – до замораживания-оттаивания, кружочки – после замораживания-оттаивания)

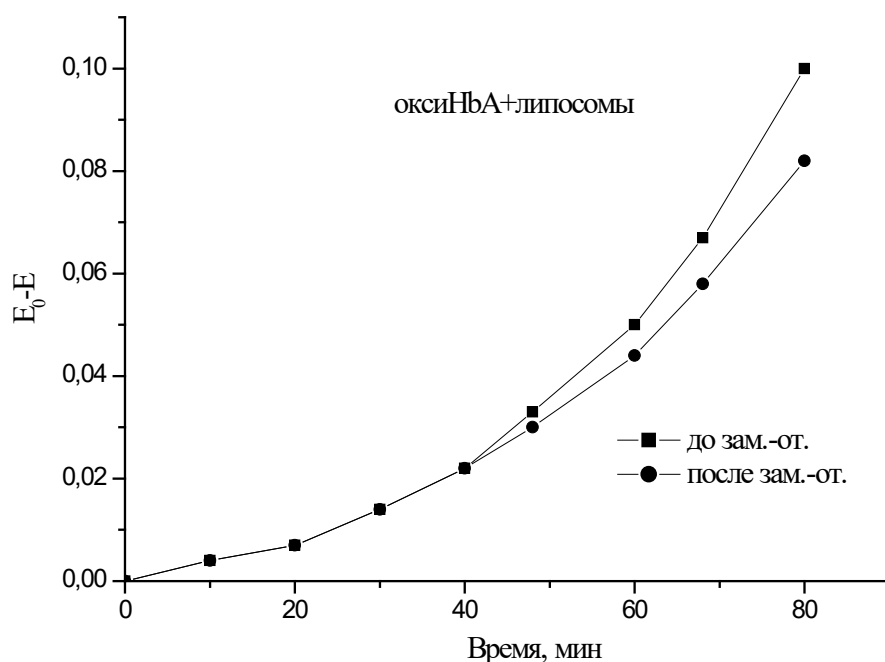


Рисунок 4. Кинетика взаимодействия окси HbA до и после замораживания-оттаивания с липосомами

красителю гидрофобная поверхность молекулы гемоглобина меньше после замораживания, чем гидрофобная поверхность гемоглобина до замораживания. После замораживания число гидрофобных центров сорбции БТС молекулой гемоглобина, доступных этому красителю, меньше. Таким образом, именно в отношении доступных центров связывания БТС на поверхности молекулы гемоглобина сделан нами вывод о том, что доступная гидрофобная поверхность гемоглобина меньше после замораживания, чем гидрофобная поверхность гемоглобина до замораживания.

В настоящее время известно, что гемоглобин взаимодействует с эритроцитарными и искусственными мембранами. Достаточно подробно изучено взаимодействие гемоглобина А с модельными липосомальными мембранами. Ранее были предприняты попытки [9, 10] практического применения липосом со связанным гемоглобином А. Представляет интерес определить, есть ли различие до замораживания-оттаивания и после в связывании гемоглобина с липосомами, так как известно, что взаимодействие белков с ними осуществляется также и посредством гидрофобных связей. Нами была исследована кинетика взаимодействия оксиHbA с модельными липосомальными мембранами, сформированными из фосфатидилхолина (ФХ) и кардиолипина (КЛ) по определению изменения интенсивности поглощения гемоглобина в полосе Соре (414 нм). Характер зависимости изменения интенсивности спектра поглощения в полосе Соре от времени для оксиHbA представлен на рисунке 4. Нами проведено изучение влияния замораживания до -196 градусов Цельсия и оттаивания на взаимодействие гемоглобина с липосомальными мембранами. Получили зависимости изменения интенсивности спектра поглощения в полосе Соре от времени для гемоглобина после замораживания-оттаивания (рис. 4). При изучении кинетики взаимодействия белков с липосомами каждую экспериментальную зависимость изменения оптической плотности от времени аппроксимировали экспонентой

$$E_0 - E = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\lambda}\right), \quad (1)$$

где:

- E_0 – начальная оптическая плотность;
- E – оптическая плотность в момент времени t ;
- A – амплитуда кинетической фазы;
- t – время;
- λ – кинетическая константа.

Таблица 1. Параметры связывания оксигемоглобином органического красителя бромтимолового синего при pH 7,2

Белок	Число мест связывания красителя на молекуле белка, n	Константа диссоциации комплекса белок-краситель k_d , $10^{-5}M$
до замораживания-оттаивания	$5,1 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,05$
после замораживания-оттаивания	$3,2 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,04$

Таблица 2. Кинетические параметры связывания до и после замораживания-оттаивания гемоглобина А и фетального гемоглобина с липосомами

Белок	до или после зам.-от.	А	λ
HbA	до зам.-от.	0,006±0,001	31,96±2,74
	после зам.-от.	0,005±0,001	34,048±2,84

Взаимодействие гемоглобина с липидами включает адсорбцию гемоглобина на поверхности липидных везикул, встраивание фрагмента белковой молекулы в бислой, изменение конформации белка. Комплексообразование обусловлено электростатическим взаимодействием гемоглобина с полярными головками КЛ и ФХ, а также связано с проникновением (встраиванием) белков во внутреннюю область липидного бислоя, и с гидрофобным взаимодействием гемоглобина с липидами. Кроме того, известно, что при взаимодействии окси- и метгемоглобина с липидами в модельных и природных мембранах эти формы гемоглобина принимают участие в инициации процесса перекисного окисления липидов. Индукция перекисного окисления липидов в модельных системах сопровождается превращением оксигемоглобина в метформу. Не наблюдается существенного различия между до и после замораживания-оттаивания гемоглобина в кинетике связывания с липосомами (табл. 2). Связь гемоглобина с липосомами осуществляется посредством гидрофобных взаимодействий [11,12]. Так как кинетическая константа λ в экспоненте, описывающей взаимодействие гемоглобина с липосомами больше после замораживания-оттаивания гемоглобина (табл. 2), то экспонента растёт медленнее по сравнению с до замораживания-оттаивания. Вероятно, ослабление гидрофобных взаимодействий перед распадом тетрамера гемоглобина на димеры в концентрированных растворах соли, меньшее сорбирование красителя БТС на поверхности молекулы гемоглобина после замораживания-оттаивания и меньшее участие гидрофобных взаимодействий в связи гемоглобина с липосомами после замораживания-оттаивания имеют общую тенденцию в ослаблении молекулы гемоглобина во всех случаях. В целом, можно сделать вывод, что, по-видимому, после замораживания-оттаивания молекула гемоглобина становится менее устойчивой и происхождение ослабления устойчивости сходно с тем, что наблюдается при распаде гемоглобина на димеры в концентрированных растворах соли.

Список литературы / References:

1. Moschandreou T.E. *Blood cell – an overview of studies in hematology*. Western university, Canada, 2012, 362 p.
2. Bettermann E. *The blood and its third element*. 2018.
3. Kara O., Soysal P., Kiskac M., Smith L., Karismaz A., Kazancioglu R. Investigation of optimum hemoglobin levels in older patients with chronic kidney disease. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2022, vol. 34, pp. 55-62.
4. Морозова Т.Ф., Грек А.М., Коптелов В.А., Моисеев В.А., Луговой В.И. Изменение спектральных свойств БСА в концентрированных растворах хлористого натрия. *Криобиология и криомедицина*, 1982, № 10, с. 22-27 [Morozova T.F., Grek A.M., Koptelov V.A., Moiseev V.A., Lugovoy V.I. Change of spectrum properties of BSA in concentrate solutions of sodium chloride. *Cryobiologiya i cryomedicina*, 1982, no. 10, p. 22-27. (In Russ.)].
5. Моисеев В.А., Морозова Т.Ф., Микулинский Ю.Е. Влияние гиперконцентрации солей на конформационное состояние иммуноглобулина лошади. *Криобиология и криомедицина*, 1980, № 7, с. 51-53 [Moiseev V.A., Morozova T.F., Mikulinskiy Yu. E. Influence of hyperconcentration of salines on the conformational state of horse immunoglobulins. *Cryobiologiya i cryomedicina*, 1980, no. 7, p. 51-53 (In Russ.)].
6. Розанова Е.Д., Науменко Е.И., Моисеев В.А. Влияние замораживания-отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы. *Украинский биохимический журнал*, 1985, т. 57, № 1, с. 61-64 [Rozanova E.D., Naumenko E.I., Moiseev V.A. Influence of freezing-thawing on the structure and function of cytochromoxidase. *Ukrainskiy biochimicheskij zhurnal*, 1985, vol. 57, no. 1, pp. 61-64 (In Russ.)].
7. Розанова Е.Д., Науменко Е.И., Моисеев В.А., Репин Н.В. Структурно-функциональные характеристики цитохромоксидазы, встроенной в липосомы, в растворах хлорида натрия. *Украинский биохимический журнал*, 1994, № 3, с. 44-49 [Rozanova E.D., Naumenko E.I., Moiseev V.A. The structure-functional characteristics of cytochromoxidase inbuilding in liposomes, in sodium chloride solutions. *Ukrainskiy biochimicheskij zhurnal*, 1994, no. 3, pp. 44-49 (In Russ.)].
8. Эйхгорн Г. *Неорганическая химия*. М.: Мир, 1978, т. 2, 736 с. [Eihgorn G. *Non-organic chemistry*. М.: Mir, 1978, vol. 2, 736 p. (In Russ.)].
9. Xi J., Guo R., Guo X. Interactions of hemoglobin with lecitin liposomes. *Colloid and polymer science*, 2006, vol. 284, pp. 1139-1145.
10. Zhu K., Wang L., Xiao Y., Zhang X., You G., Chen Y., Wang Q., Zhao L., Zhou H., Chen G. Nanomaterial-related hemoglobin-based oxygen carriers, with emphasis on liposome and nano-capsules, for biomedical applications: current status and future perspectives. *Journal of nanobiotechnology*, 2024, vol. 22, no. 336.
11. Taguchi K., Nagao S., Yamasaki K., Sakai H., Seo H., Maruyama T., Otagiri M. Biological responsiveness and metabolic performance of liposome-encapsulated hemoglobin (hemoglobin vesicles) in apolipoprotein E-deficient mice after massive intravenous injection. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 2015, vol. 38, no. 10, pp. 1606-1616.
12. Awasthi V.D., Garcia D., Klipper R., Goins B.A., Phillips W.T. Neutral and anionic liposome-encapsulated hemoglobin: effect of postinserted polyethylene glycol-distearoylphosphatidylathanolamine on distribution and circulation kinetics. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2004, vol. 309, no. 1, pp. 241-248.

INTERACTION OF HEMOGLOBIN WITH LIPOSOMES BEFORE AND AFTER FREEZING-THAWING AND EFFECT OF SALT SOLUTIONS AND OF STORAGE ON THE HEMOGLOBIN STRUCTURE

Timchenko N.N., Shupova E.V.

Sevastopol State University

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

Received 15.07.2024

Abstract. In spite of the fact that hemoglobin has been highly researched, it's still being studied. In the blood conservation problems, it is important to study the issue of freezing damage of hemoglobin. Concentrating of saline solutions during water freezing is one of the prime factors in protein freezing damage. Considerable amount of original studies devoted to the effect this factor has on protein, has been accumulated by now. Using a size-filtration method to proteins determine distribution by molecular weight in solutions with different NaCl concentration, it was determined that the position of maxima on the fractionation curves of fresh HbA solutions in 1.5 M NaCl corresponds to the same fraction - 64 kDa. When fractionating fresh HbA solutions in 1.9M NaCl, the maximum position for HbA does not change. Tetrameric structure of the hemoglobin molecule is retained. Through similar studies of hemoglobin solutions, as the storage is increased from 1 to 5 days at +4 Celsius degree and the salt concentrations is 2M, appearance of fractions with a molecular weight of 36 kDa is observed, it corresponds to results of fresh hemoglobin solutions. Hemoglobin falls into dimers. Thus, the increased storage of hemoglobin solutions not results in lower resistance of hemoglobin to the action of concentrated saline solutions. Apparently, this is related to the fact that as hemoglobin solutions are stored, the content of deoxy- and ferrihemoglobin increases owing to the decrease of the oxyhemoglobin content. The ability of hemoglobin to dissociate into dimers grows up when hemoglobin is treated with one mole of PMB (mercury benzoate), modifying the SH residue of cysteine F9(93) β located close to the $\alpha_1\beta_2$ - contact. Freezing-thawing of hemoglobin not leads to significant changes in the its interaction with liposomes.

Key words: hemoglobin, salt solutions, storage.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ И РОЛЬ ДОЛГОЖИВУЩИХ РАДИКАЛОВ В СОСТАВЕ БЕЛКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО-В ИЗЛУЧЕНИЯ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

ул. Бахтияра Вахабзаде, 23, г. Баку, 1148, Республика Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru

Поступила в редакцию 18.07.2024

Аннотация. В настоящей работе изучены антиоксидантные свойства аминокислот и роль долгоживущих радикалов в составе белков при действии ультрафиолетового-В (УФ-В) излучения. Методом хемилюминесценции и с использованием флуоресцентного зонда кумарин-3-карбоновой кислоты (7-ОН-ККК) установлено, что белки альбумин (БСА) и глицин (ГЛЦ) являются природными антиоксидантами, которые способны предотвращать образование гидроксильных радикалов при воздействии УФ-В излучения. В концентрации 0,1мМ-0,5мМ эти белки являются перехватчиками ОН-радикалов. С использованием флуоресцентного зонда обнаружено, что при указанных концентрациях (0,1мМ-0,5мМ) также наблюдается уменьшение количества АФК по сравнению с высокими концентрациями этих белков, что повидимому связана с образованием долгоживущих радикалов белка (ДЖРБ) в большем количестве под действием УФ-В-излучения, сопровождающаяся генерацией АФК.

Ключевые слова: свободные радикалы, окислительный стресс, антиоксиданты, долгоживущие радикалы белка, УФ-В излучение.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия растущие знания выявили двойную роль АФК в физиологии клеток, показав, что они служат основным источником клеточного повреждения, а также функционируют как важные сигнальные молекулы в различных биологических процессах. Наше понимание гомеостаза АФК и клеточных сигнальных путей, опосредованных АФК, предполагает, что это древние и высоко-консервативные механизмы, общие для большинства организмов [1].

Одним из наиболее значимых повреждающих факторов среды, действующих на биологические макромолекулы, являются АФК. АФК, представляют собой группу свободных радикалов, реакционноспособных молекул и ионов, образующихся из O_2 . Такие формы кислорода индуцируются разнообразными физическими, химическими и биологическими факторами: УФ и ионизирующим излучением, присутствием химических мутагенов и канцерогенов, а также естественным и, особенно, нарушенным аэробным клеточным метаболизмом. Брусовым и др. было показано, что тепловое воздействие приводит к образованию АФК в водных растворах [2].

Тем не менее при нормальных физиологических условиях АФК в клетке, в первую очередь перекись водорода (H_2O_2), играют сигнально-регуляторную роль в разных биологических процессах как вторичный мессенджер. Последние данные о роли H_2O_2 в клеточной сигнализации млекопитающих представлены в обзорах. Изменение ее содержания под действием различных физических факторов может быть важным элементом лечебного воздействия и адаптации организма к влиянию неблагоприятных факторов среды [3]. Высокая реакционная способность АФК при определенных условиях делает их чрезвычайно токсичными для биологических систем на всех уровнях организации - молекулярного, клеточного и организменного.

Активные формы кислорода во всех живых организмах производятся и быстро убираются многоуровневыми ферментными системами. Они могут переходить из одной формы в другую и существовать то в виде свободных радикалов, то в виде соединений, не обладающих электронным спином. Из первых важнейшими являются супероксидный ($O_2^{\cdot-}$) или в протонированной форме-гидроперекисный ($HO_2^{\cdot}$) и гидроксильный ($OH^{\cdot}$) радикалы. Из вторых – озон (O_3), синглетный кислород ($^1O_2$) и перекись водорода (H_2O_2). Активные формы кислорода могут порождать, регулировать и обрывать цепные реакции [4]. Поскольку радикалы АФК, как правило, короткоживущие, то об их появлении обычно судят по увеличению содержания перекиси водорода или органических пероксидов, которые появляются в результате дисмутации (рекомбинации) радикалов. В биосистемах перекись водорода способна через поры проникать в мембрану клеток и выступать как вторичный мессенджер [5].

Реактивные формы азота и кислорода (РНС/АФК) играют двойную роль как токсичные и полезные соединения для системы организма. В более низких концентрациях они оказывают благоприятное воздействие и участвуют в различных физиологических процессах, таких как окислительно-восстановительная регуляция, мутагенные реакции, клеточные сигнальные пути и иммунная функция, в то время как на более высоком уровне эти реактивные виды вызывают нитрозативный и окислительный стресс [6].

Кроме того, постоянный источник АФК в организме млекопитающих или наличие других радикальных продуктов, например, долгоживущие радикалы белка, может существенно осложнить терминацию окислительного стресса. Кроме повреждающей, АФК играют в организме млекопитающих важную сигнально-регуляторную роль [7,8]. Даже если избыточные АФК не контролируются защитными антиоксидантными системами, избыток АФК не только вызывает геномные мутации, но также вызывает необратимую

окислительную модификацию белков (окисление и перекисное окисление белков), липидов и гликанов (конечные продукты липоксидации и гликирования), нарушая их функцию и способствуя заболеванию клеток [9].

Некоторыми авторами получены данные, свидетельствующие о том, что белки являются главной мишенью в клетках при воздействии наиболее реакционной формы АФК -гидроксильных радикалов, более чувствительной, чем ДНК и липиды. ДЖРБ могут являться источниками образования АФК в окружающей водной среде, поддерживая условия длительного протекания окислительного стресса в биологических системах и служат посредниками в переносе окислительных повреждений на другие клеточные компоненты, включая ДНК [3,10,11].

Диан Р.Т. и др. показали, что под действием тепла в водных растворах образуются АФК [12]. Есть все основания полагать, что образование H_2O_2 является причиной лечебного воздействия. Высокое содержание в клетках белков делает их второй после воды основной мишенью воздействия АФК. При действии высоких доз ионизирующего излучения в присутствии кислорода АФК, образующиеся в результате радиолиза воды, продуцируют ДАФБ, включающие в себя долгоживущие белковые радикалы и гидропероксиды белков [12]. Образование долгоживущих белковых радикалов показано для многих белков под действием гамма- λ , рентгеновского и ультрафиолетового излучений, а также ряда химических соединений [11]. Было установлено, что долгоживущие белковые радикалы вызывают мутации и трансформации клеток и в небольших количествах образуются в клетках животных и растений при нормальной жизнедеятельности. Ранее было показано, что ДАФБ являются источниками вторичных свободных радикалов, которые вызывают дальнейшее окисление биомолекул (белков, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и др.). Радиационно-индуцированные ДАФБ могут генерировать АФК в течение длительного времени, оказывая генотоксическое действие на ДНК [13] что может быть причиной длительного окислительного стресса после прекращения воздействия ионизирующего излучения.

Одним из важнейших классов низкомолекулярных биологически важных соединений являются L-аминокислоты. В настоящее время антиоксидантные свойства этих веществ и их роль в физико-химических процессах, сопутствующих окислительному стрессу в биологических системах, остается не совсем ясной. Литературные данные свидетельствуют о способности отдельных аминокислот к снижению повреждающих и патологических эффектов, обусловленных окислительным воздействием различной природы на разных уровнях организации. Например, показана способность L-цитруллина и L-аргинина к элиминации супероксид анион-радикала, что приводит к нормализации работы сердечной мышцы при воздействии окисляющих факторов [14]. Установлено, что пролин является эффективным перехватчиком синглетного кислорода и предотвращает клеточную гибель при окислительном стрессе. Показана способность гистидина к перехвату пероксильных радикалов, предотвращению карбоксилирования белков и образования белковых сшивок [15]. Ряд аминокислот предотвращают образование 8-оксогуанина в ДНК путем защиты гуанина от одноэлектронного окисления до гуанил-радикал-катиона [16].

H_2O_2 генерируется в клетках при нормальных, а также при широком спектре стрессовых условий, таких как засуха, охлаждение, УФ-облучение, воздействие интенсивного света, ранения и проникновение патогенов.

Широко признано, что в реакции растений на УФ-В участвуют различные АФК, выступающие как в качестве сигнальных, так и в качестве повреждающих агентов. В результате наблюдается повышенная антиоксидантная активность и большее количество продуктов окислительного повреждения мембран [17].

В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что белки являются главной мишенью в клетках при воздействии наиболее реакционноспособной формы АФК – гидроксильных радикалов, более чувствительной, чем ДНК и липиды. ДЖРБ могут являться источниками образования АФК в окружающей водной среде, создавая условия для длительного протекания окислительного стресса в биологических системах, и служат посредниками в переносе окислительных повреждений на другие клеточные компоненты, включая ДНК [11,14].

Цель работы заключалась в исследовании антиоксидантных свойств некоторых аминокислот, а также свойств долгоживущих радикалов в составе белков при действии ультрафиолетового-В (УФ-В) излучения. Исследование антиоксидантных свойств аминокислот для оценки их роли в окислительно-восстановительных процессах в клетках. Исследование образования и свойств долгоживущих радикалов белка под воздействием УФ-В излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерение собственной хемилюминесценции (ХЛ) растворов белков альбумина и глицина проводили на квантометрической хемилюминесцентной установке [18]. Измерение хемилюминесценции во всех образцах проводилось в течении 60 секунд, снимался показатель интенсивности ХЛ. Определение гидроксильных радикалов осуществляли с помощью их реакции с ККК, продукт гидроксилирования которой – 7-ОН-ККК – является удобным флуоресцентным зондом для определения образования этих радикалов. Опытные образцы с ККК облучали УФ- В при дозе, и определяли флуоресценцию. Флуоресценцию 7-ОН-ККК измеряли на спектрофлуориметре «Varian Cary Eclipse 2007». Источником УФ-В излучения служила ртутная лампа ПРК-4. Растворы белков облучали в кварцевых пробирках на расстоянии 10 см от ртутной лампы ПРК-4 дозой $1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм², $2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм², $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм², $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм².

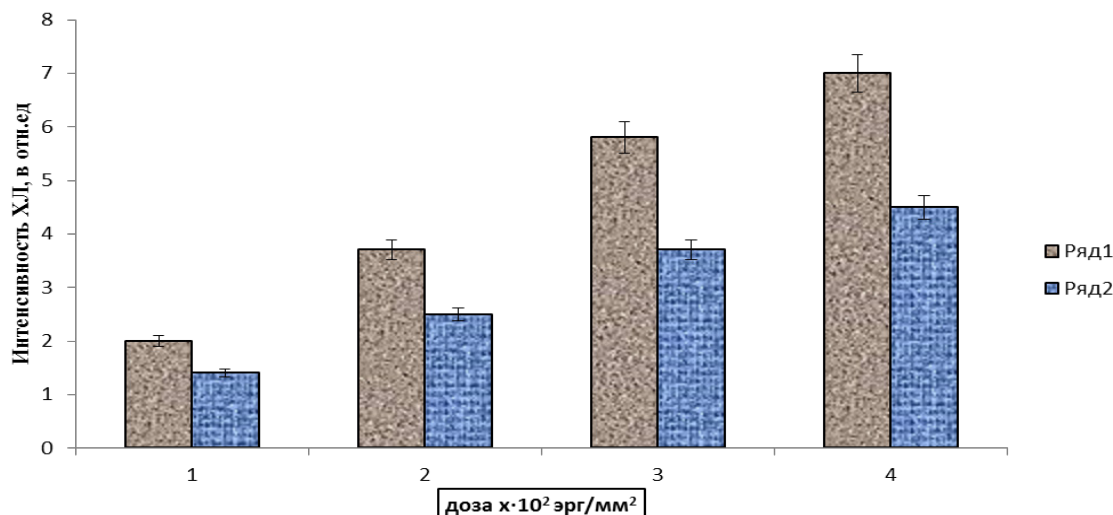


Рисунок 1. Зависимость интенсивности хемилюминесценции облученного раствора альбумина (10 мкМ) и глицина (5 мкМ) от дозы УФ-В излучения. (1.1,2·10² эрг/мм²; 2.2,4·10² эрг/мм²; 3.3,6·10² эрг/мм²; 4.4,8·10² эрг/мм²)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

АФК в организме возникают как при нормальном клеточном метаболизме, так и при воздействии разных физико-химических факторов. При достижении АФК уровня, превышающего возможности их нейтрализации антиоксидантной системой клетки, они вызывают окислительный стресс и оказывают повреждающее действие на биологические молекулы. Хемилюминесцентные методы являются наиболее чувствительными для обнаружения и исследования ДАФБ [11,13,19].

Для альбумина и глицина существенный защитный эффект проявляется уже при 20 мкМ концентрации аминокислот. В случае альбумина при этой концентрации наблюдается незначительное уменьшение интенсивности ХЛ, а в случае с глицином на 20% по сравнению с контролем. Контролем служили необлученные растворы альбумина и глицина. Увеличение интенсивности ХЛ при концентрации 0,1 мМ для альбумина составляет около 30%, для глицина 50%. Однако эти аминокислоты проявляют заметный защитный эффект в концентрации 1мМ.

На рисунке 2 показана зависимость интенсивности ХЛ растворов альбумина и глицина от концентрации белков. Интенсивность ХЛ растворов была максимальна при 10 мкМ альбумина и 5 мкМ глицина.

Эти концентрации белков использовали для определения интенсивности ХЛ их облученных растворов (рис. 1), и времени полужизни ДАФБ по уменьшению величины ХЛ после воздействия УФ-В излучения.

Установлено, что после воздействия УФ-В излучения происходит генерация ДАФБ БСА и ГЛЦ, зависящая от их концентрации.

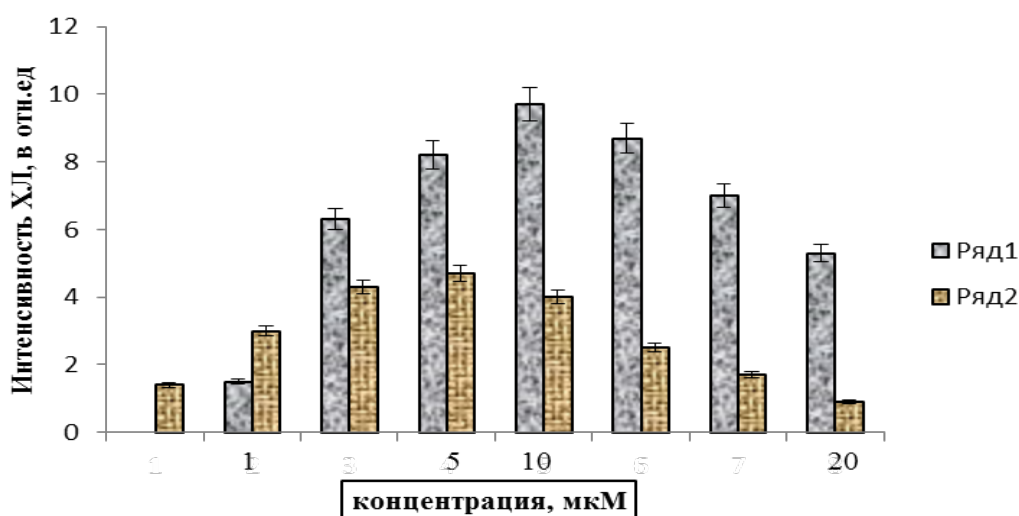


Рисунок 2. Концентрация белка, мкМ; ряд 1 - БСА, ряд 2 – Глицин

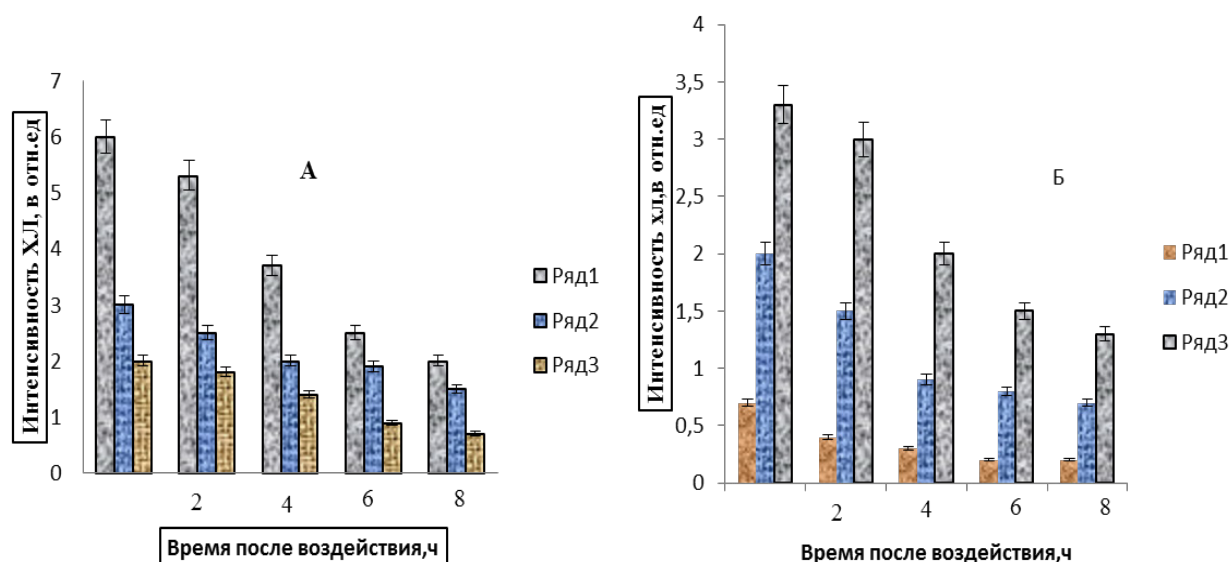


Рисунок 3. Изменение интенсивности ХЛ растворов (А) БСА (10 мкМ) и (Б) ГЛЦ (5 мкМ) при различной продолжительности инкубации после воздействия УФ-излучения. Ряд 1 – $1,2 \cdot 10^2$ эрг/мм²; Ряд 2 – $2,4 \cdot 10^2$ эрг/мм²; Ряд 3 – $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм²

Определили период полужизни ДАФБ (рис. 3, 4) по уменьшению интенсивности ХЛ со временем после облучения. Основной закон радиоактивного распада имеет вид: $N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$.

Средний период полураспада $T_{2/1}$ соответствует двукратному уменьшению интенсивности ХЛ: $N_0/2 = N_0 \cdot e^{-\lambda T_{2/1}}$. Следовательно, период полужизни ДАФБ равняется $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda$. Интенсивность хемилюминесценции экспоненциально уменьшается от времени после воздействия [3].

Период полужизни радикалов БСА и ГЛЦ составил около 4 часов и после действия УФ-В излучения увеличивается интенсивность ХЛ.

С помощью флуоресцентного зонда ККК продукт гидроксилирования которого 7-ОН-ККК интенсивно флуоресцирует, измерили образование гидроксильных радикалов в растворах БСА и ГЛЦ после воздействия на них УФ-В излучения. После воздействия УФ-В излучения содержание 7-ОН-ККК составляет $5,0 \pm 0,5$ нМ для БСА и $8,0 \pm 0,6$ нМ для ГЛЦ.

При воздействии высоких доз ионизирующего излучения в присутствии кислорода АФК, образующиеся в результате радиолитического распада воды, продуцируют долгоживущие радикалы белков (ДЖРБ). Установлено, что ДЖРБ являются источником вторичных свободных радикалов, вызывающих дальнейшее окисление белков и других биомолекул, включая ДНК. При высоких дозах облучения они могут длительное время продуцировать генерацию АФК и оказывать генотоксическое действие на ДНК. Длительная генерация АФК под действием ДЖРБ может

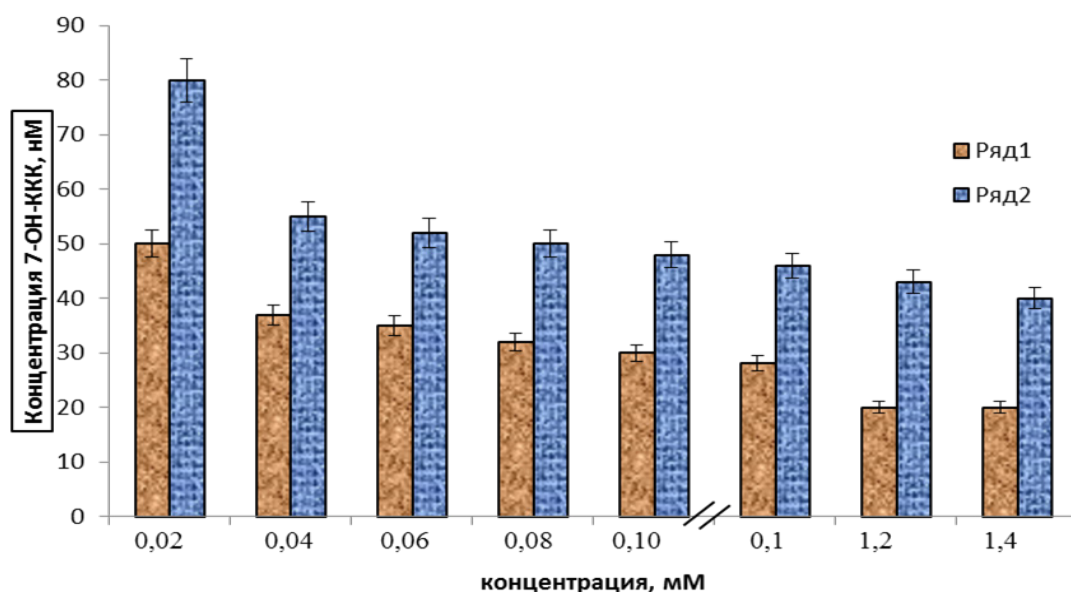


Рисунок 4. Зависимость выхода гидроксильных радикалов от концентрации БСА и ГЛЦ после воздействия УФ-В излучения в дозе $3,6 \cdot 10^2$ эрг/мм². Ряд 1-БСА; Ряд 2-ГЛЦ

быть причиной возникновения продолжительного окислительного стресса после прекращения воздействия ионизирующей радиации. Нейтрализация АФК, продуцируемых ДЖРБ, введением в организм некоторых природных антиоксидантов способна прерывать окислительный стресс, обусловленный этим фактором [3,13].

Список литературы / References:

1. Hong Y., Boiti A. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants*, 2024, vol. 13, no. 3, p. 312, doi: 10.3390/antiox13030312.
2. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла. *Докл. РАН*, 2002, т. 384, с. 821-824 [Bruskov V.I., Masalimov Zh.K., Chernikov A.V. Obrazovanie aktivnyh form kisloroda v vode pod dejstviem tepla. *Dokl. RAN*, 2002, vol. 384, pp. 821-824 (In Russ.)].
3. Иванов В.Е., Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих форм белков сыворотки крови под действием тепла. *Альманах клинической медицины*, 2014, т. 17, № 31, с. 17-20 [Ivanov V.E., Karp O.E., Popova N.R., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Bruskov V.I. Obrazovanie dolgozhivushhih form belkov syvorotki krovi pod dejstviem tepla. *Al'manah klinicheskoy mediciny*, 2014, vol. 17, no. 31, pp. 17-20 (In Russ.)].
4. Gebicki S., Gebicki J.M. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem. J.*, 1993, vol. 289, pp. 743-749.
5. Беловолова Л.В. Активные формы кислорода в водных средах. *Оптика и спектроскопия*, 2020, т. 128, вып. 7, с. 923-942 [Belovolova L.V. Aktivnye formy kisloroda v vodnyh sredah. *Optika i spektroskopija*, 2020, vol. 128, iss. 7, pp. 923-942 (In Russ.)].
6. Chaudhary P., Janmeda P. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem.*, 2023, vol. 11, no. 1158198, doi: 10.3389/fchem.2023.1158198.
7. Hernandez-Garcia D., Wood C.D., Castro-Obregon S., Covarrubias L. Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, vol. 49, no. 130143.
8. Voeikov V.L. Reactive oxygen species -(ROS) pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal and pathologic physiology of living systems. *J. Altern. Complement Med.*, 2006, vol. 12111-12118.
9. Checa J., Aran J.M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J. Inflamm. Res.*, 2020, vol. 13, pp. 1057-1073, doi: 10.2147/JIR.S275595.
10. Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Масалимов Ж.К. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла. *Биофизика*, 2003, т. 48, № 6, с. 942-950 [Bruskov V.I., Chernikov A.V., Gudkov S.V., Masalimov Zh.K. Thermal activation of the reducing properties of seawater anions. *Biofizika*, 2003, vol. 48, no. 6, pp. 942-950 (In Russ.)].
11. Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Usacheva A.M., Bruskov V.I. Guanosine and inosine (riboxin) eliminate the longlived protein radicals induced by X-ray radiation. *Dokl Biochem Biophys*, 2007, vol. 413, pp. 50-53 (In Russ.)].
12. Dean R.T., Gieseg S., Davies M.J. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci*, 1993, vol. 18, no. 11, pp. 437-441.
13. Karp O.E., Gudkov S.V., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Genotoxic effect of long-lived protein radicals in vivo generated by X-ray irradiation. *Dokl Biochem Biophys*, 2010, vol. 434, pp. 250-253.
14. Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation.
15. Деккер И.А., Лайвси С.А., Чжоу С. Переоценка антиоксидантного действия очищенного карнозина. *Биохимия*, 2000, т. 65, № 7, с. 766-770 [Dekker I.A., Lajvsi S.A., Chzhou S. Pereocenka antioksidantnogo dejstviya ochishhennogo karnozina. *Biohimija*, 2000, vol. 65, no. 7, pp. 766-770 (In Russ.)].
16. Milligan J.R., Tran N.Q., Ly A., Ward J.F. Peptide repair of oxidative DNA damage. *Biochem.*, 2004, vol. 43, pp. 5102-5108.
17. Kataria S., Jajoo A., Guruprasad K.N. Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, vol. 137, pp. 55-66.
18. Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Роль оксида азота при действии УФ-В излучения на клетки дрожжей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, №1 [Kocharli N.K., S.T.Gummatova Rol' oksida azota pri dejstvii UF-V izlucheniya na kletki drozhzhej. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 1 (In Russ.)].
19. Карп О.Э., Иванов В.Е., Попова Н.Р., Куликов Д.А. Образование долгоживущих радикалов белков сыворотки крови млекопитающих при воздействии лазерного излучения и тепла. *Современные проблемы науки и образования*, 2013, № 6 [Karp O.E., Ivanov V.E., Popova N.R., Kulikov D.A. Obrazovanie dolgozhivushhih radikalov belkov syvorotki krovi mlekopitajushhih pri vozdeystvii lazernogo izlucheniya i tepla. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2013, no. 6 (In Russ.)].

ANTIOXIDANT CHARACTERISTICS OF AMINO ACIDS AND THE ROLE OF LONG-LIVED RADICALS IN PROTEINS UNDER THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLET-B RADIATION

Kocharli N.K, Hummatova S.T.

Bakhtiyar Vakhazade St., 23, Baku, 1148, Republic of Azerbaijan; email: sam_bio@mail.ru

Received 18.07.2024

Abstract. In this work, the antioxidant properties of amino acids and the role of long-lived radicals in the composition of proteins under the action of ultraviolet-B (UV-B) radiation were studied. By employing the chemiluminescence method and the fluorescent probe coumarin-3-carboxylic acid (7-OH-CCA), it was shown that the amino acids albumin (BSA) and glycine (GLY) are natural antioxidants capable of preventing the formation of hydroxyl radicals when exposed to UV-B light. At doses of 0.1 mM to 0.5 mM, these proteins play role as OH radical scavengers. With the aid of the fluorescent probe, it was found that at the designated concentrations (0.1 mM to 0.5 mM) there is a reduction in the amount of ROS compared to higher concentrations of these proteins. This is apparently connected to the increased production of long-lived protein radicals (LLPR) under UV-B radiation, which is accompanied by the generation of ROS.

Key words: *free radicals, oxidative stress, antioxidants, long-lived protein radicals, UV-B radiation.*

УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЭРИТРОЦИТАХ МОРСКОГО ЕРША (*SCORPAENA PORCUS*, L. 1758) В ПРЕДНЕРЕСТОВЫ И НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОДЫ ГОДОВОГО ЦИКЛА

Солдатов А.А.^{1,2}, Шалагина Н.Е.¹, Рычкова В.Н.¹, Кухарева Т.А.¹, Лантушенко А.О.²

¹ ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

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

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию 23.07.2024

Аннотация. Исследовали функциональное состояние циркулирующих эритроцитов у особей морского ерша (*Scorpaena porcus*, L. 1758), находящихся в преднерестовом и нерестовом состоянии. Акцент сделан на изучении митохондрий клеток. В работе применяли методы проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Все измерения цитометрических показателей эритроцитов проводились на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм), а также конфокальном микроскопе Stellaris 5 (Leica, Germany). Установлено, что в период нереста значительно возрастал мембранный потенциал митохондрий эритроцитов. Об этом свидетельствовал рост флуоресценции родамина 123 (R123). В сравнении с преднерестовым состоянием различия составляли 54.7 %. Это сопровождалось повышением содержания активных форм кислорода в клетке. Интенсивность флуоресценции 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA) повышалась на 55.6 %. Заметных изменений флуоресценции ДНК-красителя (SYBR Green I) не отмечали. По данным конфокальной микроскопии (окраска R123) эритроциты морского ерша содержали как одиночные митохондрии, так и их агрегаты. В среднем на клетку приходилось 5-6 митохондрий. Доля агрегатов не превышала 26 %. Заметных различий между преднерестовой и нерестовой группами рыб по этим показателям не отмечали. Общее заключение – в нерестовый период усиливаются окислительные процессы в циркулирующих эритроцитах морского ерша. Обсуждаются причины, лежащие в основе данного явления.

Ключевые слова: проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, эритроциты, нерест, *Scorpaena porcus*.

ВВЕДЕНИЕ

Принято считать, что эритроциты костистых рыб отличаются низкой устойчивостью к процессу окисления [1]. Процесс оксигенации гемоглобина часто сопровождается переходом пигмента в окисленное состояние (ферри-форма, метгемоглобин) [2]. При этом показано, что процессы восстановления гемоглобина в ядерных эритроцитах, напротив, более эффективны, чем у высших позвоночных. Об этом свидетельствует высокоэффективная NADH-метгемоглобинредуктаза (цитохром *b₅*-редуктаза, КФ 1.6.2.2), которая сопрягает NADH с цитохромом *b₅* при восстановлении гемоглобина [3], а также антиоксидантный ферментный комплекс эритроцита. Активность ферментов последнего превышает известную для млекопитающих [4]. Данный парадокс остается открытым до настоящего времени.

Отмечено, что переход гемоглобина в ферри-форму связан с изменением функционального состояния организма рыб на протяжении годового цикла и приурочен к нерестовому периоду [5]. Показано, что процессы эритропоэза активны только в нерестовый и постнерестовый периоды: в течение 2-3 месяцев [6]. В этот момент генерируется молодая эритроцитарная масса, которая затем на протяжении года постепенно стареет [5]. Эффективность ее молекулярных систем падает, что и приводит к усилению окислительных процессов в клетках красной крови. Определенное влияние могут оказывать и половые гормоны, титр которых повышается на момент нереста [7]. Чтобы принять эту точку зрения необходимо исследовать процессы окисления в эритроцитах рыб именно в состоянии нереста. Этому и посвящено настоящее исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. Работа выполнена на взрослых половозрелых особях морского ерша (*Scorpaena porcus*, Linnaeus 1758) (длина тела – 110-145 мм, вес – 50-80 г) в преднерестовом и постнерестовом состоянии, при стадии зрелости гонад IV и V-V1 соответственно. Дифференцирование состояния гонад проводили по методике [8].

Рыбу перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 50 л с воздушной аэрацией. После транспортировки особей рассаживали в бассейны объемом 100-150 л, которые имели централизованные системы проточности. Плотность посадки составляла 20-30 л на одну особь. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь. В данных условиях рыбу содержали в течение 4-5 суток с целью адаптации и снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой.

Отбор проб крови. Кровь получали при помощи стерильного шприца (2 мл) пункцией хвостовой артерии. В качестве антикоагулянта применяли гепарин («Richter», Венгрия). Часть крови (1/3 объема) использовали для

проведения гематологических исследований и изготовления препаратов для конфокальной микроскопии. Оставшийся объем подвергали центрифугированию при 500 g с целью отделения клеток крови от плазмы. Плазму и верхний слой клеток (лейкоциты) удаляли, а оставшийся объем трижды отмывали в среде следующего состава: 128 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 15 mM л Трис, 2,2 mM D-глюкозы (pH 7,8) [9]. Полученную взвесь использовали в дальнейшем при проведении проточной цитометрии. В работе применяли рефрижераторную центрифугу Eppendorf Centrifuge 5424 R.

Проточная цитометрия. Все измерения цитометрических показателей эритроцитов проводились на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм).

Для оценки однородности клеточной массы готовую суспензию эритроцитов окрашивали ДНК-красителем *SYBR Green I* (Sigma Aldrich, США): финальная концентрация в пробе 10 мкл л⁻¹, время инкубации составляло 40 мин в темноте. Флуоресценцию красителя анализировали на канале *FL1* (экстинкция – 497 нм, эмиссия – 521 нм). Характер распределения клеток во взвеси классифицировали на основании их относительного размера: по величине прямого рассеяния FSC и бокового рассеяния SSC.

Способность эритроцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода оценивали по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (*DCF-DA*, Sigma Aldrich, USA). Для этого 1 мл суспензии эритроцитов инкубировали с 10 мкл раствора *DCF-DA* в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкл л⁻¹. Флуоресценцию красителя анализировали на канале *FL1* (экстинкция – 485 нм, эмиссия – 525 нм).

Изменения мембранного потенциала митохондрий в эритроцитах контролировали, оценивая интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных родамином 123 (*R123*) (Molecular Probes, USA). Эритроциты окрашивали *R123* в течение 40 мин. Концентрация красителя в пробе составляла 10 мкл л⁻¹. Интенсивность флуоресценции красителя определяли на канале *FL1* (экстинкция – 508 нм, эмиссия – 528 нм).

Конфокальная микроскопия. В работе использовали конфокальный микроскоп Stellaris 5 (Leica, Germany). Окраску клеточной суспензии проводили при помощи красителя *R123*, инкубация длилась 30 минут. Просмотр препаратов осуществляли при длине волны лазера 530 нм. Число митохондрий оценивали как количество светящихся точек, приходящихся на одну клетку. При этом учитывали размеры очага свечения. Крупные из них рассматривали как агрегаты, образовавшиеся в результате слияния нескольких митохондриальных единиц. На каждом препарате просматривали не менее 500 эритроидных клеток. На основании полученных данных определяли среднюю величину, приходящуюся на одну особь морского ерша.

Статистические сравнения выполнены на основе непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как $M \pm m$. В работе использовали стандартный пакет Grapher (версия 11).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проточная цитометрия. Результаты исследований с применением метода проточной цитометрии представлены на рисунке 1. Интенсивность флуоресценции с использованием *SYBR Green I* в циркулирующих эритроцитах морского ерша в преднерестовый и нерестовый периоды находилась на уровне 1650-1950 у.е. Имеющие различия не были статистически значимы ($p > 0,05$). Заметный рост отмечали в отношении флуорохрома *R123*. В преднерестовый период значения интенсивности флуоресценции находились на уровне 488 ± 27 у.е. У нерестовой группы рыб этот показатель достигал 755 ± 104 у.е., что на 54,7 % выше ($p < 0,05$). Явно выраженную тенденцию роста значений в период нереста отмечали и в отношении флуорохрома *DCF-DA*. Различия между преднерестовой и нерестовой группами рыб достигали 55,6%. Однако они не достигали статистически значимого уровня в виду значительной вариабельности значений, полученных в отношении нерестовой группы.

Конфокальная микроскопия. Препараты крови (мазки) морского ерша, предварительно окрашенные флуорохромом *R123* исследовали при длине волны лазера 530 нм. Результаты представлены на рисунке 2. Как видно, эта процедура позволяла выявлять в клетках красной крови как одиночные митохондриальные единицы (рис. 2а), так и их агрегаты (рис. 2б). В среднем на клетку приходилось 5-6 митохондрий. Доля агрегатов не превышала 26%. Заметных различий между преднерестовой и нерестовой группами рыб не отмечали ($p > 0,05$).

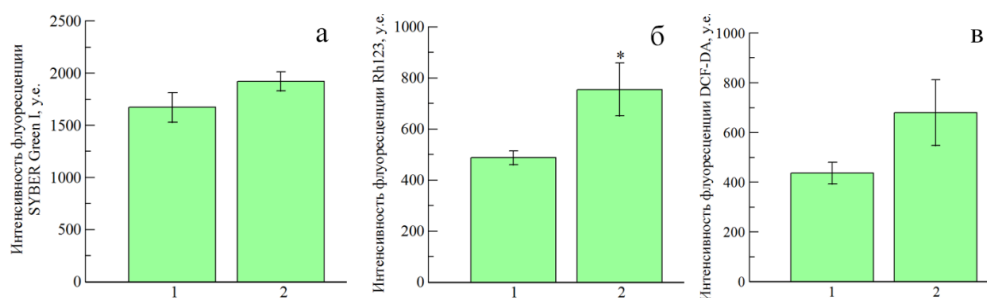


Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции эритроцитарных взвесей морского ерша окрашенных *SYBR Green I* (а), *R123* (б) и *DCF-DA* (в) (1 – преднерестовая группа рыб; 2 – нерестовая группа рыб; * – различия достоверны при $p < 0,05$)

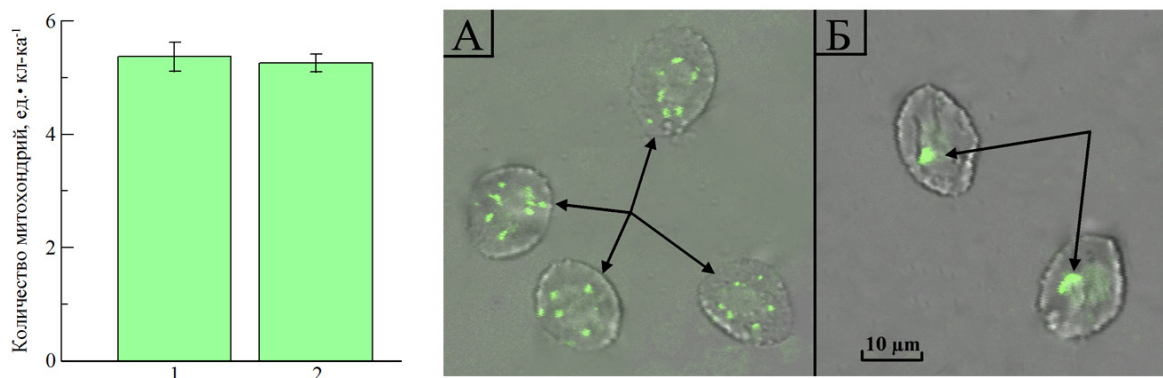


Рисунок 2. Число митохондриальных единиц в циркулирующих эритроцитах морского ерша (окраска при помощи *R123*; А – одиночные митохондрии; Б – агрегаты митохондрий; 1 – преднерестовая группа рыб; 2 – нерестовая группа рыб)

ОБСУЖДЕНИЕ

Проточная цитометрия. Одним из выявленных эффектов настоящего исследования явился рост интенсивности флуоресценции родамина *R123* в эритроцитах морского ерша, находящегося в состоянии нереста. Данная реакция отражает усиление процесса поляризации внутренней мембраны митохондрий клеток. Известно, что накопление *R123* в клетках происходит вследствие взаимодействия красителя с мембранными белками данного органоида [10] в соответствии с потенциалом Нернста [11]. Чрезмерный рост мембранного потенциала митохондрий обычно сопряжен с продукцией активных форм кислорода (АФК) и усилением окислительных процессов в клетках [12]. Косвенным свидетелем развития этих состояний явился рост флуоресценции *DCF-DA*. Чрезмерная продукция АФК может приводить к развитию необратимых изменений в клеточных системах и их последующей деградации. Чаще всего эти процессы затрагивают клеточное ядро. О функциональном состоянии данной структуры в настоящей работе судили по флуоресценции *SYBR Green I*.

Витальный краситель *SYBR Green I* относится к группе флуорохромов повышенной яркости и обладает высоким сродством к двухцепочной молекуле ДНК [13]. Часто используется для визуализации клеточных ядер [14]. Изменение интенсивности флуоресценции *SYBR Green I* многие связывают с функциональной активностью данной структуры [15]. В нашем случае заметных изменений флуоресцентного потока в эритроцитах морского ерша при переходе в состояние нереста не происходило. Это означает, что усиление окислительных процессов в клетках красной крови не затрагивало состояние клеточных ядер.

Конфокальная микроскопия. Как уже отмечалось, препараты циркулирующей крови морского ерша окрашивались при помощи *R123*, что позволяло визуализировать митохондриальные единицы в эритроцитах. При этом были выявлены мелкие структуры, которые, по-видимому, соответствуют одиночным митохондриям и крупные, по характеру организации напоминающие их агрегаты. Способность митохондрий к ассоциации хорошо известна [16]. Она определяется присутствием ряда факторов: митофузинов (MFN1, MFN2), ответственных за слияние внешних мембран органоида; белка OPA-1, способствующего слиянию внутренней мембраны и формированию крист [16,17]. Считается, что образование крупных агрегатов митохондрий повышает эффективность их функционирования [18]. Возможен и обратный процесс, который находится под контролем Drp1-фактора, действие которого направлено на деление митохондрий, пероксисом; деградацию старых митохондриальных единиц и их апоптоз [19]. В нашем случае заметных изменений числа митохондрий в клетках красной крови не отмечали. Различия не были статистически выражены. Не изменялась и доля агрегатов, что исключает взаимный переход митохондриальных единиц в более крупные ассоциаты и обратно.

Таким образом, переход организма морского ерша в состояние нереста сопровождался ростом мембранного потенциала митохондрий циркулирующих эритроцитов. Об этом свидетельствовало увеличение интенсивности флуоресценции родамина 123 на фоне повышения потока флуоресценции от *DCF-DA*. Последнее отражало рост содержания активных форм кислорода в клетке. Это основной эффект перехода организма морского ерша в состояние нереста. Заметных изменений флуоресценции *SYBR Green I* не отмечали. По данным конфокальной микроскопии (окраска *R123*) эритроциты морского ерша содержали как одиночные митохондрии, так и их агрегаты. В среднем на клетку приходилось 5-6 митохондрий. Доля агрегатов не превышала 26 %. Статистически значимых различий между преднерестовой и нерестовой группами рыб по этим показателям не регистрировали.

Работа выполнена при поддержке проекта РНФ № 23-24-00061.

Список литературы / References:

1. Maestre R., Pazos M., Medina I. Involvement of methemoglobin (MetHb) formation and heme loss in the pro-oxidant activity of fish hemoglobins. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, vol. 57, iss. 15, pp. 7013-7021, doi: 10.1021/jf9006664.

2. Blair B., Barlow C., Martin E., Schumaker R., McIntyre J. Methemoglobin determination by multi-component analysis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) possessing unstable hemoglobin. *Methods*, 2020, vol. 7, no. 100836, doi: 10.1016/j.mex.2020.100836.
3. Jensen F.B., Nielsen K. Methemoglobin reductase activity in intact fish red blood cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integr. Physiol.*, 2018, vol. 216, pp. 14-19, doi: 10.1016/j.cbpa.2017.11.004.
4. Woo S.P.S., Liu W., Au D.W.T. et al. Antioxidant responses and lipid peroxidation in gills and erythrocytes of fish (*Rhabdosargus sarba*) upon exposure to *Chattonella marina* and hydrogen peroxide: Implications on the cause of fish kills. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2006, vol. 336, pp. 230-241, doi: 10.1016/j.jembe.2006.05.013.
5. Soldatov A.A. Cases of a Spontaneous Increase in Methemoglobin Concentration in Fish Blood during the Annual Cycle. *Inland Water Biology*, 2023, vol. 16, no. 4, pp. 769-775, doi: 10.1134/S1995082923040181.
6. Soldatov A.A., Rychkova T.A., Kukhareva T.A., Rokotova A.G. Cellular Composition of Erythroid Forms in the Blood and Head Kidney of the Golden Grey Mullet (*Chelon auratus* Risso, 1810) during Annual Cycle. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2023, vol. 59, no. 4, pp. 1331-1340, doi: 10.1134/S0022093023040257.
7. Pottinger T.G., Pickering A.D. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. *Fish. Physiol. Biochem.*, 1987, vol. 3, iss. 3, pp. 121-127, doi: 10.1007/BF02180413.
8. Holden M.J., Raitt D.F.S. Method of resource investigations and their application. *Manual of fisheries science. FAO Fish. Tech. Pap.*, 1975, vol. 115, pp. 1-214.
9. Tiisonen K., Nikinmaa M. Short communication substrate utilization by carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *J. Exp. Biol.*, 1991, vol. 161, no. 1, pp. 509-514, doi: 10.1242/jeb.161.1.509.
10. Nicholls D., Ward M. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.*, 2000, vol. 23, no. 4, pp. 166-174, doi: 10.1016/s0166-2236(99)01534-9.
11. Toescu E.C., Verkhatsky A. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining. *Eur. J. Physiol.*, 2000, vol. 440, no. 6, pp. 941-947, doi: 10.1007/s004240000390.
12. Sokolov E.P., Markert S., Hinzke T., Hirschfeld C., Becher D., Ponsuksili S., Sokolova I.M. Effects of hypoxia-reoxygenation stress on mitochondrial proteome and bioenergetics of the hypoxia-tolerant marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of proteomics*, 2019, vol. 194, pp. 99-111, doi: 10.1016/j.jprot.2018.12.009.
13. Kiltie A.E., Ryan A.J. SYBR Green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, no. 14, pp. 2945-2946, doi: 10.1093/nar/25.14.2945.
14. Lee J. The distribution of cytoplasm and nuclei within the extra-radical mycelia in *Glomus intraradices*, a species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycobiology*, 2011, vol. 39, no 2, pp. 79-84, doi: 10.4489/MYCO.2011.39.2.079.
15. Cerca F., Trigo G., Correia A., Cerca N., Azeredo J., Vilanova M. SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of *Staphylococcus epidermidis*, using flow cytometry. *Can. J. Microbiol.*, 2011, vol. 57, no. 10, pp. 850-856, doi: 10.1139/w11-078.
16. Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., Griffin E.E., Fraser S.E., Chan D.C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell. Biol.*, 2003, vol. 60, iss. 2, pp. 189-200, doi: 10.1083/jcb.200211046.
17. Ahuja G., Korsching S. Zebrafish olfactory receptor ORA1 recognizes a putative reproductive pheromone. *Communicative & Integrative Biology*, 2014, vol. 7, iss. 5, pp. e970501-e970501-4, doi: 10.4161/19420889.2014.970501.
18. Zhao G-J., Lu Z-Q., Yao Y-M. Advances in mitochondrial fusion-fission and Ca^{2+} signaling in mammals (Review). *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 2010, vol. 41, iss. 3, pp. 171-176.
19. Zhang H., Wang P., Bisetto S., Yoon Y., Chen Q., Sheu S.S., Wang W. A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovasc. Res.*, 2017, vol. 113, pp. 160-170.

THE LEVEL OF OXIDATIVE PROCESSES IN ERYTHROCYTES OF THE *SCORPAENA PORCUS* L. 1758 IN THE PRE-SPAWNING AND SPAWNING PERIODS OF THE ANNUAL CYCLE**Soldatov A.A.^{1,2}, Shalagina N.E.¹, Rychkova V.N.¹, Kukhareva T.A.¹**¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas of RAS
Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru² Sevastopol State University
University St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 23.07.2024

Abstract. The functional state of circulating erythrocytes in individuals of the *Scorpaena porcus*, L. 1758 in the pre-spawning and spawning state was studied. The emphasis is on the study of the mitochondria of cells. The methods of flow cytometry and confocal microscopy were used in the work. All measurements of cytometric parameters of erythrocytes were carried out on a Cytomics FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, USA) equipped with a single-phase argon laser (wavelength 488 nm), as well as a Stellaris 5 confocal microscope (Leica, Germany). It was found that the membrane potential of erythrocyte mitochondria increased significantly during the spawning period. This was evidenced by an increase in the fluorescence of rhodamine 123 (*R123*). Compared with the pre-spawning condition, the differences were 54.7%. This was accompanied by an increase in the content of reactive oxygen species in the cell. The fluorescence intensity of 2-7-dichlorofluorescein diacetate (*DCF-DA*) increased by 55.6%. No noticeable changes in the fluorescence of the DNA dye (*SYBR Green I*) were noted. According to confocal microscopy (*R123* stain), the erythrocytes of the *Scorpaena porcus* contained both single mitochondria and their aggregates. On average, there were 5-6 mitochondria per cell. The share of aggregates did not exceed 26%. There were no noticeable differences between the pre-spawning and spawning groups of fish in these parameters. The general conclusion is that during the spawning period, oxidative processes in the circulating erythrocytes of the *Scorpaena porcus* increase. The underlying causes of this phenomenon are discussed.

Key words: flow cytometry, confocal microscopy, erythrocytes, spawning, *Scorpaena porcus*.

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОАКУСТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА *MNEMIOPSIS LEIDYI* И *DANIO RERIO*: РОЛЬ TRP-РЕЦЕПТОРОВФадеева М.В.¹, Силаков М.И.², Воронин Д.П.¹, Кузнецов А.В.²¹ Севастопольский государственный университет

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

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

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

Поступила в редакцию 15.07.2024

Аннотация. Гидроакустические сигналы являются важным фактором окружающей среды, влияющим на поведение морских организмов. Механизмы восприятия этих сигналов остаются малоизученными. Исследовали реакцию гребневи́ков *Mnemiopsis leidyi* и рыб *Danio rerio* на импульсные звуковые воздействия, с акцентом на потенциальную роль TRP-каналов как механорецепторов. Создана установка, позволяющая подавать кратковременные (10 мс) звуковые импульсы в диапазоне 0-30 кГц мощностью 5 Вт. Наблюдали за индуцированной биолюминесценцией мнемии́псисов и поведенческими реакциями зебрафиш. Гребневики люминесцировали зелено-голубым светом, а рыбы проявляли реакцию испуга на ударное воздействие. Мнемии́псисы демонстрировали избирательность в восприятии акустических сигналов различной частоты. Зебрафиш показывали угнетение стайного поведения и двигательной активности при длительном звуковом воздействии. Биоинформационный анализ выявил 1 TRP-канал у *M. leidyi* и 6 у *D. rerio*, имеющих различные количества анкириновых повторов. Анализ белок-белковых взаимодействий позволил предложить модель трех путей передачи механического сигнала в клетке. Гидродинамический удар приводит к люминесценции гребневи́ков и вздрагиванию рыб, что может быть связано с первым путем трансдукции – распространением сигнала вдоль цитоплазматической мембраны. Длительное звуковое воздействие нарушает стайное поведение *D. rerio*, что, вероятно, сопряжено с более сложными механизмами ответа, включающими второй и/или третий путь трансдукции в цитоплазму и ядро клетки. Обнаружено, что специфические лиганды могут модулировать чувствительность катионных TRP-каналов. Молекулярное моделирование показало наличие как специфических, так и неспецифических участков связывания на исследуемых белках.

Ключевые слова: звуковые импульсы, TRP-каналы, механорецепция, *Mnemiopsis leidyi*, *Danio rerio*, гидроакустика, биоакустика.

ВВЕДЕНИЕ

Хотя физика звука в воде аналогична таковой в воздухе, плотность морской воды выше, именно поэтому звук распространяется в воде в 4,5-4,6 раза быстрее, чем в воздухе (1530 м/с против 330-340 м/с). В результате, например, звук частотой 100 Гц имеет длину волны 3,43 м в воздухе, а в воде – 15,3 м. С другой стороны, звук как физическое явление может быть описан в терминах дискретных частиц, что открывает новые возможности для исследования его взаимодействия с объектами нанометрового масштаба [1,2], в частности, с механочувствительными ионными каналами TRP-семейства (Transient Receptor Potential), т.к. такие каналы открываются под фиксированным механическим воздействием [3]. Эти каналы играют ключевую роль в восприятии механических стимулов, в том числе акустических, у многих организмов-гидробионтов [4].

Напомним, что гидроакустика, изучает распространение звука в водной среде, а биоакустика исследует звуковую коммуникацию живых организмов. Многие гидробионты, от простейших планктонных форм до активно движущихся рыб, обладают специализированными органами слуха и механочувствительными сенсорами, которые позволяют им воспринимать акустические сигналы в водной среде [5-8]. Понимание особенностей восприятия звука различными гидробионтами важно для оценки возможных последствий антропогенного акустического загрязнения водных экосистем, а также для изучения естественных звуковых ландшафтов и акустических сцен, в которых обитают водные организмы [9].

Для оценки влияния гидроакустических воздействий на водные организмы была создана и испытана экспериментальная установка, способная генерировать звуковые импульсы длительностью 10 мс и мощностью до 5 Вт в диапазоне 0-30 кГц. В данном исследовании изучали реакции гребневи́ков *Mnemiopsis leidyi* и рыб *Danio rerio* на такие звуковые стимулы, уделяя особое внимание роли TRP-рецепторов в механизмах восприятия акустических сигналов. В дополнение к одноклеточным организмам [10], рассмотрены возможные пути распространения сигналов от сенсоров к актуаторам у многоклеточных биологических моделей.

МЕТОДИКА

Выполнено 7 экспериментов на 30 гребневи́ках и 12 опытов на 10 рыбах. Исследования на мнемии́псисах осуществляли с ноября 2023 г. по апрель 2024 г., а на зебрафиш с февраля по май 2023 года. Гребневи́ков

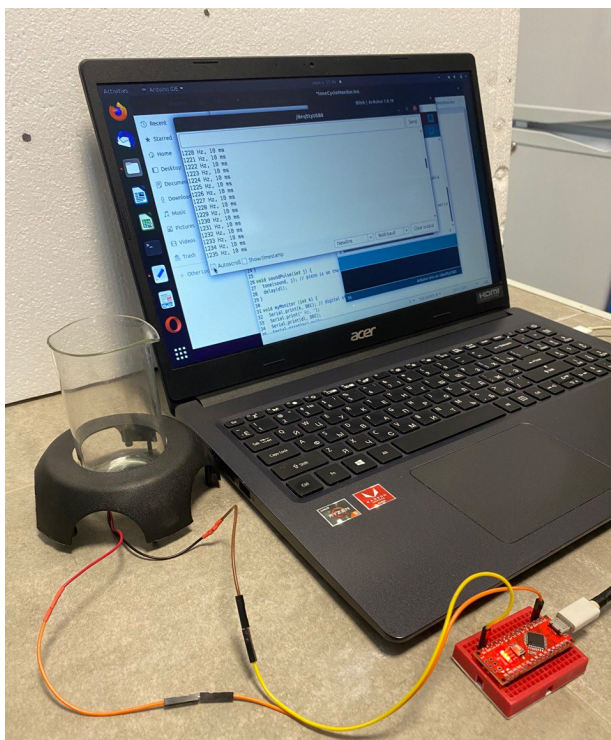


Рисунок 1. Экспериментальная установка для выявления частот, на которых люминесцируют мнемииписы

помещали в стеклянные стаканчики объемом по 150 мл с морской водой (18 ‰), а рыб запускали в аквариумы по 35 л или в каналы размером 100х6х3 см, наполненные пресной водой. Опыты проводили при температуре около 20 °С. Подопытных животных обрабатывали звуком баззера SFM-20 мощностью 5 Вт в бесконечном цикле с инкрементом и декрементом на интервале от 0 до 30 кГц и приращением 1 Гц длительностью 10 мс. Общий вид установки для гребневиков, включающей персональный компьютер и микроконтроллер, представлен на рисунке 1. Программное обеспечение написано на языках C++ и Processing. Поиск ортологов TRP-каналов у *M. leidyi* и *D. rerio* осуществляли по аминокислотной последовательности NompC-механорецептора *D. melanogaster* с использованием процедуры pBLASTp. Анкириновые повторы выявляли благодаря ресурсу SMART. Филогенетическое дерево TRP-каналов построено с помощью программы ClustalW2. Сеть белок-белковых взаимодействий изучали на сервере STRING. Пространственные модели белков конструировали с помощью Phyer2, докинг осуществляли с применением SwissDock.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как гребневики, так и рыбы реагировали мгновенно на механический удар по стенке сосуда, вспышкой света или вздрагиванием, соответственно. В случае звукового импульсного воздействия мнемииписы вспыхивали чаще и интенсивнее в диапазоне низких (2-4 кГц), средних (13-18 кГц) и высоких (24-29 кГц) частот с двумя «глухими» зонами между ними (рис. 2). Отмечено угнетение стайного поведения и двигательной активности у зебрафиш при длительном звуковом воздействии (18 суток).

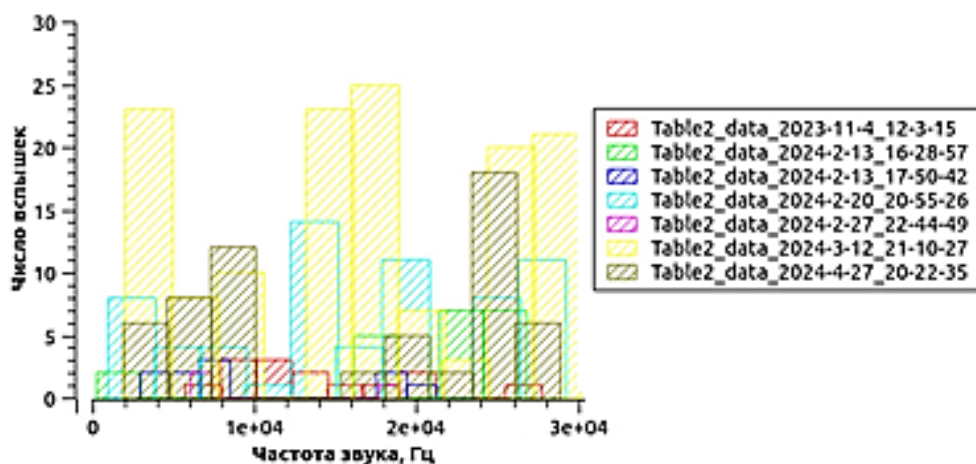


Рисунок 2. Распределение вспышек люминесценции мнемииписов по частотам в разных экспериментах

Таблица 1. Результаты поиска и краткая характеристика TRP-каналов у *M. leidy* и *D. rerio*

Объект исследования	ID	Длина, аа	Число анкириновых повторов
<i>M. leidy</i>	AFK83798.1	860	3
<i>D. rerio</i>	NP_001007066.1	1115	14
	ACI26674.1	1115	14
	XP_017213756.1	1115	24
	XP_021325831.1	985	15
	XP_009295606.1	1107	15
	NP_001007067.1	1120	15

С помощью методов биоинформатики найден 1 TRP-канал у *M. leidy* и обнаружено 6 механочувствительных рецепторов у *D. rerio* (табл. 1).

У *M. leidy* аннотирован белок AFK83798.1 (ML234550a-PA) с трансмембранными альфа-спиралями, которые формируют один каналобразующий домен располагаясь, начиная с позиции 400 аа, по направлению к С-концу полипептидной цепи. Найденный белок включает в себя три анкириновых повтора, находящихся в позициях 125-155, 205-239, 240-275, некоторые из которых участвуют в белок-белковых взаимодействиях (рис. 3).

Два протеина, NP_001007066.1 и NP_001007067.1, из шести соответствующих белков *D. rerio* также аннотированы (табл. 1). При рассмотрении протеина NP_001007066.1 обнаружены 14 анкириновых повторов, начинающиеся в позиции 50 аа и заканчивающиеся в позиции 600 аа. Можно видеть трансмембранные участки, которые образуют каналобразующий домен, находясь в позициях 710-740, 785-815, 816-846, 860-890, 920-950 (рис. 4).

При сравнении белков NP_001007066.1 и NP_001007067.1 *D. rerio* отмечено, что у протеина NP_001007067.1, также начинающегося с позиции 50 аа, имеется 15 анкириновых повторов, а не 14 (рис. 5, табл. 1). В обоих белках присутствует по 5 трансмембранных α -спиралей (рис. 4, 5).

Сравнение аминокислотных последовательностей механочувствительных белков у зебрафиш (табл. 1) выявило наибольшее отличие между протеинами NP_001007066.1 и NP_001007067.1. Филогенетические отношения между TRP-каналами *D. rerio* представлены на рисунке 6.

Проведенный анализ графа ближайших соседей протеина AFK83798.1 (рис. 7а), выявил участие соседских белков в возможном процессировании звука с уровнем ошибки $2,8 \times 10^{-6}$.

После сравнения результатов докинга изучаемых протеинов с низкомолекулярными лигандами, как анальгетики – аспирин и салициловая кислота, так и анестетиком – диклонином, а также дальнейшего анализа

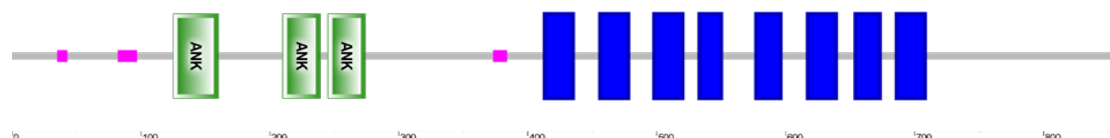


Рисунок 3. Доменная структура белка AFK83798.1 *Mnemiopsis leidy*



Рисунок 4. Доменная структура белка NP_001007066.1 *Danio rerio*



Рисунок 5. Доменная структура белка NP_001007067.1 *Danio rerio*



Рисунок 6. Филогенетическое дерево для механочувствительных TRP-каналов зебрафиш

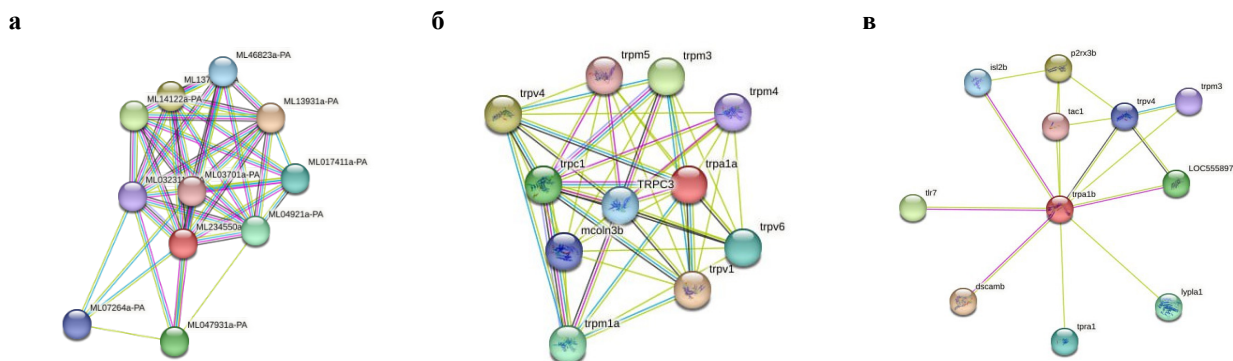


Рисунок 7. Сеть белок-белковых взаимодействий графов ближайших соседей первого порядка механосенсоров:

- а) AFK83798.1 у *M. leidy*;
 б) NP_001007066.1 у *D. rerio*;
 в) NP_001007067.1 у *D. rerio*



Рисунок 8. Феноменологическая модель трех путей трансдукции механического сигнала

белковых соседей TRP-каналов (рис. 7), была предложена модель трех путей проведения механического сигнала в клетке от сенсоров к актуаторам (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Считается, что большинство рыб улавливают движение частиц, т.к. обладают соответствующими рецепторами [11]. Национальная служба морского рыболовства США (NMFS), а также другие агентства в настоящее время рассматривают значение 150 дБ в качестве уровня звукового давления, который может привести к возникновению поведенческих эффектов, включая реакции испуга у рыб [12]. Мы проводили исследования в каналах на модельной рыбке *D. rerio*, которая хорошо себя чувствует в небольших аквариумах и которая слышит гораздо лучше, чем большинство других видов рыб [6]. Данные о «слухе» *M. leidy* отсутствуют. В наших экспериментах мнемнопсисы отвечали биолюминесценцией, а зебрафиш – реакцией испуга на ударную волну. При длительном звуковом воздействии у зебрафиш, как и у некоторых других видов рыб, отмечены нарушение стайного поведения и снижение двигательной активности. Сообщалось, что килька чувствительна к звуковому давлению, тогда как скумбрия, вероятно, чувствительна только к движению частиц [6]. В работе [13] наблюдали за поведением косяков дикой кильки *Sprattus sprattus* и скумбрии *Scomber scombrus* в тихом прибрежном месте, используя эхолот. Рыб подвергали воздействию коротких последовательностей повторяющихся импульсивных звуков, имитирующих удары сваебойного молота. Стаи шпрот в отличие от скумбрии ночью распадались, а отдельные рыбы не реагировали на звуки сваебойки. С другой стороны, биолюминесценция и лизис мнемнопсисов часто наблюдаются в лабораторных условиях без видимых причин [14].

Проведенные эксперименты показали, что и гребневики *Mnemiopsis leidy*, и рыбы *Danio rerio* демонстрируют мгновенные реакции на механические стимулы, – удар по стенке сосуда. В то же время, реакции на звуковые импульсы имели более сложный характер. В случае гребневики *M. leidy* было обнаружено, что вспышки их биолюминесценции наблюдались преимущественно в 3 частотных диапазонах: низких (2-4 кГц), средних (13-18 кГц) и высоких (24-29 кГц) частот, с «глухими» зонами между ними (рис. 2). Это может указывать на избирательность в восприятии акустических сигналов различной частоты данным организмом. У рыб *D. rerio* звуковое воздействие в течение нескольких суток приводило к угнетению стайного поведения и снижению двигательной активности. Это свидетельствует о негативном влиянии интенсивного звука на поведение и физиологическое состояние этих рыб.

Биоинформатический анализ позволил выявить у *M. leidy* один продукт гена, кодирующего потенциальный механочувствительный TRP-канал (белок AFK83798.1), а у *D. rerio* – шесть продуктов таких генов (табл. 1). Изучение доменной структуры найденных белков показало наличие трансмембранных участков, формирующих каналаобразующий домен, и от 3 до 24 анкириновых повторов, вовлеченных в протеин-белковые взаимодействия (рис. 3-5). Дальнейший анализ белок-белковых взаимодействий (рис. 7) позволил предложить

феноменологическую модель трех возможных путей трансдукции механического сигнала в клетке – от сенсоров (TRP-каналов) к актуаторам (рис. 8). Такая модель учитывает как прямое воздействие механического стимула на TRP-канал, так и опосредованные пути передачи сигнала с вовлечением сигнальных белков.

Оказалось, что специфические лиганды модулируют чувствительность катионных TRP-каналов. Молекулярный докинг показал, что на исследуемых протеинах помимо мишеней присутствуют также неспецифические сайты связывания (данные не приведены). Возможно поэтому, высокие концентрации аспирина и салициловой кислоты (1 мМ) приводят к аномальному поведению объектов исследования, а именно к лизису *M. leidy* и к состоянию аффекта у *D. rerio*. Тем не менее, при слабом гидродинамическом ударе гребневика люминесцируют, а рыбы вздрагивают, что можно связать с первым путём трансдукции (рис. 8), т.е. с распространением сигнала по цитоплазматической мембране за время, порядка от нескольких миллисекунд до секунд. В случае длительного звукового воздействия наблюдали нарушение стайного поведения *D. rerio*, что, по нашему мнению, связано с ответом по второму и/или третьему пути трансдукции (рис. 8). Полученные данные согласуются с представлениями о том, что поведенческие реакции связаны с распространением потенциала действия по мембране нейронов [15], а ответные физиологические реакции на внешние стимулы обусловлены событиями, происходящими в цитоплазме клеток и в их ядре [16-18].

Дискретность восприятия звука мнемипсисом и быстрая передача сигнала по первому пути трансдукции, предположительно вдоль цитоплазматической мембраны от TRP-канала к фотопротеинам, что приводит к билюминесценции, подтверждена экспериментально с помощью, разработанной нами установки (рис. 1) и соответствующего ПО. Это позволяет определять возбуждающие частоты, на которые гребневик *Mnemiopsis leidy* отвечает вспышкой. Полученные результаты расширяют понимание механизмов восприятия акустических сигналов у гидробионтов и роли в этом процессе механочувствительных TRP-рецепторов. Данные о влиянии звуковых воздействий на поведение и физиологию *M. leidy* и *D. rerio* важны для оценки последствий антропогенного акустического загрязнения водных экосистем.

Благодарности: Авторы выражают глубокую благодарность коллективам Отдела физиологии животных и биохимии и Отдела ихтиологии ФИЦ ИнБЮМ за плодотворные обсуждения и предоставленную возможность проведения исследований. Особую признательность авторы выражают рецензенту за ценные замечания, которые позволили значительно улучшить рукопись.

Список литературы / References:

1. Scott A.C. Dynamics of Davydov solitons. *Phys. Rev. A*, 1982, vol. 26, p. 578.
2. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И. Применение принципа попадания в радиобиологию. М., 1968 [Timofeev-Resovsky N.V., Ivanov V.I., Korogodin V.I. Application of the hit principle in radiobiology. M., 1968 (In Russ.)].
3. Himmel N.J., Cox D.N. Transient receptor potential channels: current perspectives on evolution, structure, function and nomenclature. *Proc. Biol. Sci.*, 2020, vol. 287, no. 1933, 20201309.
4. Кузнецов А.В., Втюрина Д.Н. Пространственная реконструкция TRPC-механорецепторов гребневика *Mnemiopsis leidy* A. Agassiz, 1865. *Молекулярная биология*, 2023, т. 57, № 4, с. 726-735 [Kuznetsov A.V., Vtyurina D.N. Spatial reconstruction of TRPC mechanoreceptors of the ctenophore *Mnemiopsis leidy* A. Agassiz, 1865. *Molecular biology*, 2023, vol. 57, no. 4, pp. 726-735 (In Russ.)]
5. Коллин С.П., Маршалл Н.Дж. Сенсорная обработка в водной среде. Спрингер, 2003 [Collin S.P., Marshall N.J. *Sensory processing in an aquatic environment*. Springer, 2003 (In Russ.)].
6. Поппер А.Н., Фэй Р.Р. Обнаружение и обработка звука рыбами: критический обзор и основные вопросы исследования. (2 части). *Мозг, поведение и эволюция*, 1993, т. 41, № 1, с. 14-25 [Popper A.N., Fay R.R. Sound detection and processing in fish: A critical review and key research questions. (2 parts). *Brain, behavior and evolution*, 1993, vol. 41, no. 1, pp. 14-25 (In Russ.)].
7. Стивенс М. Сенсорная экология, поведение и эволюция. Издательство Оксфордского университета, 2013 [Stevens M. *Sensory ecology, behavior and evolution*. Oxford University Press, 2013 (In Russ.)].
8. Уэбб Дж.Ф., Фэй Р.Р., Поппер А.Н. Биоакустика рыб. Спрингер, 2008 [Webb J.F., Fay R.R., Popper A.N. *Bioacoustics of fish*. Springer, 2008 (In Russ.)].
9. Popper A.N., Hawkins A.D. An overview of fish bioacoustics and the impacts of anthropogenic sounds on fishes. *J. Fish. Biol.*, 2019, vol. 94, no. 5, pp. 692-713.
10. Kuznetsov A.V. Intercellular and Intracellular Networks: Signal Processing and Evolution. *Archives in Neurology and Neuroscience*, 2023, vol. 15, iss. 5, art. no. ANN.MS.ID.000875 (3 p.).
11. Popper A.N., Hawkins A.D. The importance of particle motion to fishes and invertebrates. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2018, vol. 143, no. 1, p. 470.
12. Caltrans. *Technical guidance for assessment and mitigation of the hydroacoustics effects of pile driving on fish*. Sacramento, CA, 2015, p. 532.
13. Hawkins A.D. Examining fish in the sea: A European perspective on fish hearing experiments. In A.N. Popper & R.R. Fay (Eds.), *Perspectives on auditory research*, 2014, NY: Springer. pp. 247-267.
14. Chang J.J. Analysis of the luminescent response of the ctenophore, *Mnemiopsis leidy*, to stimulation. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1954, vol. 44, no. 3, pp. 365-394.

15. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 1952, vol. 117, no. 4, pp. 500-544.
16. Hughes-Fulford M. Signal transduction and mechanical stress. *Sci STKE*, 2004, no. 249, p. RE12.
17. Iqbal J., Sun L., Zaidi M. Complexity in signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010, vol. 1192, pp. 238-244.
18. Cheng X., Case L.B. Phase separation in chemical and mechanical signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2023, vol. 85, p. 102243.

STUDY OF HYDROACOUSTIC EFFECTS ON *MNEMIOPSIS LEIDYI* AND *DANIO RERIO*: THE ROLE OF TRP-RECEPTORS

Fadeeva M.V.¹, Silakov M.I.², Voronin D.P.¹, Kuznetsov A.V.^{1,2}

¹ Sevastopol State University

University St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas of RAS

Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Received 15.07.2024

Abstract. Hydroacoustic signals are an important environmental factor affecting the behavior of marine organisms. The mechanisms of perception of these signals remain poorly understood. We investigated the response of the ctenofora *Mnemiopsis leidyi* and the fish *Danio rerio* to pulsed sound stimuli, with emphasis on the potential role of TRP channels as mechanoreceptors. An experimental setup delivering short duration (10 ms) sound pulses in the 0-30 kHz range with a power of 5 W was created. The induced bioluminescence of *mnemiopsis* and behavioral responses of zebrafish were observed. The ctenofora luminesced with green-blue light, while the fish exhibited a startle reaction to the shock. *Mnemiopsis* showed selectivity in the perception of acoustic signals of different frequencies. Zebrafish showed suppression of schooling behavior and locomotor activity under prolonged sound exposure. Bioinformatics analysis revealed 1 TRP channel in *M. leidyi* and 6 in *D. rerio* having different numbers of ankyrin repeats. Analysis of protein-protein interactions allowed us to propose a model of three pathways of mechanical signal transduction in the cell. Hydrodynamic shock leads to ctenofora luminescence and fish startle, which may be related to the first pathway of transduction – signal propagation along the cytoplasmic membrane. Prolonged sound exposure disrupts the swarming behavior of *D. rerio*, which probably involves more complex response mechanisms involving the second and/or third transduction pathway into the cytoplasm and cell nucleus. It has been found that specific ligands can modulate the sensitivity of cationic TRP channels. Molecular modeling showed the presence of both specific and nonspecific binding sites on the investigated proteins.

Key words: sound impulses, TRP-channels, mechanoreception, *Mnemiopsis leidyi*, *Danio rerio*, hydroacoustics, bioacoustics.

МОДЕЛЬ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГРУППЫ

Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Луговая Е.А.

НИЦ «Арктика» ДВО РАН

ул. Карла Маркса, 24, г. Магадан, 685000, РФ; e-mail: neurokib@mail.ru

Поступила в редакцию 29.07.2024

Аннотация. В работе предложена концептуальная модель, в которой для каждой функции – от клеточных до организменных, на основании потребностей выстраивается частотный кластер (группа), состоящий из нервных, глиальных или любых других клеток, организующим фактором которых является одна частота механических микровибраций клеток, а функциональное состояние такой группы определяется их суммарной амплитудой. Для регистрации спектра акустических сигналов головы был разработан опытный образец медицинского аппарата «Регистратор спектра акустического поля головного мозга РС АЭГ-01». Аппарат посредством пьезокерамических датчиков вибраций регистрировал суммарную ритмическую активность отдельно для правого и левого полушария и производил её спектральный анализ высокого разрешения в диапазоне частот от 0,13 до 27 Гц. Получившиеся с левого и правого полушария 8400 центральных частот с соответствующими амплитудами спектральной оценки, сворачивались в две спектральные матрицы размером 24 x 175 частотных ячеек. Время суммации сигнала по каждой спектральной ячейке было выбрано 160 сек – длительность информационного кадра. В работе представлены примеры регистрации и анализа клеточных групп кожного, вкусового, висцерального, когнитивного анализаторов. В заключении выделены основные принципы построения модели организации клеточной функциональной группы - механические вибрации на низких частотах распространяются в средах организма практически без затухания, экспрессия генов и синтез белков являются источниками механических микровибраций, откликаются на механические микровибрации избирательно только на своей частоте.

Ключевые слова: клеточная функциональная группа, механические микровибрации.

ВВЕДЕНИЕ

В работах Бехтерева В.М., Ливанова М.Н. [1,2] было показано, что множество клеток живого организма, где бы они не находились, если они выполняют одну задачу, то работают синхронно. Это утверждение легло в основу множества физиологических исследований и подтвердило этот принцип. Такие объединения клеток – функциональные группы, составляют основу для регуляции физиологических функций в висцеральной и соматической сферах, формировании когнитивных групп нейронов при психической деятельности, поддержании разнообразных системных функций внутренних органов и организма в целом. Однако рядом авторов, при использовании микроэлектродных отведений показано, что существование такой клеточной группы, клетки которой могут быть разбросаны в самых разнообразных отделах ЦНС, в прямую не связано с импульсной активностью нервных клеток, при этом когерентность группы сохраняется даже при их полном молчании [3-5]. В динамике такие группы могут мгновенно переключаться и «зажигаться» как елочные гирлянды. До сих пор проблема формирования таких функциональных клеточных групп является «темной материей» нейрофизиологии [6-8].

Наличие в организме постоянного источника «динамического тонуса» или «фоновой адаптационной потенции» для каждой его функции - от синтеза белка в клетке до организменного уровня представляется крайне важным. Организм должен на основе прошлого опыта всегда прогнозировать свое состояние на будущее в некотором интервале времени. Это необходимо для эффективной реакции функций организма на изменения внешней среды, поведения в целом и выживания. В этом плане осциллирующий принцип строения активирующей системы мозга, способной длительно сохранять состояние функций без внешних воздействий, представляется важным и эволюционно оправданным. Принцип «активного мозга» дополняет и совершенствует общепризнанную рефлекторную парадигму функционирования нервной системы – «реактивный мозг» [9-12].

П.К. Анохину принадлежит концепция «специфичности неспецифической активации». Он утверждал, что каждый тип мотивации обеспечивается возбуждением собственной неспецифической активирующей системы, обладающей особой химической специфичностью [13].

Начиная с обобщающей монографии Г. Мэгун [14] сложилось представление, что физиологический подход в оценке состояния и регуляции функций требует изучения регулирующих или модулирующих влияний из спонтанно активных ретикулярных активирующих структур мозга, а их функциональную гетерогенность можно рассматривать как самостоятельный сложный нейрофизиологический механизм.

Ю.Г. Кратин, D.F. Stabbs (1966-1976), не отрицая всех предыдущих воззрений на рефлекторные принципы в выделении биологически значимых сигналов, приносят значение частотной настройки резонансных контуров, образованных специфическими и неспецифическими системами мозга. Такой частотно-резонансный подход, утверждает наличие и информационное взаимодействие осциллирующих элементов мозга, возможности когерентных отношений в группах клеток [15-17].

В наших исследованиях был сделан вывод, что энергия колебаний как наиболее простая форма аккумуляции энергии, используется природой для формирования неспецифическими ретикулярными структурами мозга фонового адаптационного потенциала – многочастотной матрицы множества функциональных состояний. Важнейшим признаком активности такой системы должно быть наличие в ней достаточно длительных периодических режимов, формирующих пространственную организацию и функциональное состояние – динамический тонус вышележащих мозговых структур, нижележащих периферических эффекторов и организма в целом [18].

Миллиарды мелких клеток ретикулярной активирующей системы представляют собой своеобразный «бульон», в котором присутствуют и важны все виды передачи информации – механические микровибрации, химическая, электрическая, синаптическая нервная – а не разрозненные клетки и сети, окутанными только нервными проводниками, синаптическими связями. Любая клетка организма, глиальная и нервная клетка, в частности, обладают значительно большими функциями, что позволяет взглянуть на мозг с разнообразных, часто неожиданных позиций.

Любую, вновь исследуемую, систему управления в организме сейчас мы старательно подводим под синаптическую передачу в нервной системе. Мы находимся в «плёну» парадигмы наиболее совершенной нервной передачи информации. Тем не менее, один из основателей сравнительной физиологии, эволюционного подхода к передаче информации Х.С. Коштыянец (1951) утверждал, что в живом организме имеют место и функционируют совместно абсолютно все – новые и более простые, старые механизмы передачи информации. Новые механизмы не только замещают, но и встраиваются в старые, которые продолжают функционировать совместно, каждый на своем месте [19].

В предыдущих исследованиях мы обратили внимание, что в организме человека до сих пор существует древнейший механизм передачи информации – механические микровибрации клеток. На примере многочастотной фотостимуляции зрительного анализатора, нами было доказано, что помимо регистрируемых ЭЭГ реакций, можно выделить механизм микровибраций, который участвует в рефлекторной деятельности головного мозга [20] и управлении физиологическими функциями [21].

Цель настоящей работы показать и исследовать основные принципы для моделирования организации функциональных клеточных групп, в основе которых лежат механические микровибрации клеток, как наиболее простая и древняя форма «донервной» передачи информации и аккумуляции энергии, которая используется природой для формирования фонового адаптационного потенциала «активного мозга».

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Дизайн настоящего исследования носил «учебный» характер. Предусматривалось получение предварительных результатов и проверки выдвинутых гипотез с целью планирования и проведения последующих широкомасштабных исследований. Для решения различных задач исследовались практически здоровые люди. Всего обследовано 120 человек в возрасте от 35 до 70 лет. Критерием включения являлось наличие заключения о состоянии пациента. Критерием исключения – наличие в анамнезе любых соматических или психических заболеваний.

Для регистрации спектра акустических сигналов головы был разработан опытный образец медицинского аппарата под названием «Регистратор спектра акустического поля головного мозга РС АЭГ-01». Аппарат посредством датчиков вибраций регистрировал суммарную ритмическую активность отдельно для правого и левого полушария и производил её спектральный анализ высокого разрешения [22,23]. В качестве датчиков механических микровибраций использовались пьезокерамические пластины, залитые в силиконовую оболочку. Диаметр каждого датчика составлял 60 мм, высота 30 мм, вес 95 гр. Датчик прижимался к голове со стандартным давлением собственного веса (промышленный металлический аналог такого датчика – пьезоэлектрический акселерометр СА-YD-109 для полосы частот 0,1-1000 Гц).

Правый и левый датчики располагались в височно-теменных областях левого и правого полушария. Такая схема расположения датчиков микровибраций позволяла надёжно снимать суммарную ритмическую активность левого и правого полушария головы в диапазоне частот от 0,13 до 27,0 Гц. Расположение датчиков на голове человека показано на рисунке 1. Датчики контактировали с головой через стандартную одноразовую стерильную медицинскую шапочку. Средняя амплитуда сигнала на выходе таких датчиков составляла 20 мкВ. С акустических датчиков электрические сигналы поступали на входы двухканального усилителя (любой стандартный усилитель постоянного тока, усилителя ЭЭГ). Цифровая фильтрация и спектральный анализ при быстром Фурье преобразовании имели свои особенности. Весь диапазон изучаемого сигнала от 0,1 до 27 Гц был разбит на 4200 полос, центральные частоты которых образуют геометрическую прогрессию с $q=2^{1/24}$ с опорной частотой 27,005 Гц, при этом спектральные гармоники, попавшие в одну из 4200 полос, интегрировались по амплитуде. Получившиеся с левого и правого полушария 8400 центральных частот с соответствующими амплитудами спектральной оценки, сворачивались в две спектральные матрицы размером 24 x 175 частотных ячеек. Время суммации сигнала по каждой спектральной ячейке было выбрано 160 сек – длительность информационного кадра [18]. Такая суммация определяет нацеленность на выделение процессов только «длительной активности» мозга. Статистическая обработка результатов исследования проводилась на персональном компьютере с помощью приложения Microsoft Excel, при выполнении расчетов использовали пакет прикладных программ «Статистика



Рисунок 1. Расположение пьезокерамических датчиков механических микровибраций на голове человека

6.0». Из числа основных характеристик относительной статистики для каждого вариационного ряда полученных результатов исследования вычисляли средние арифметические величины (M), средние квадратичные отклонения (σ), относительные величины и доверительный интервал (P), корреляция между парой функций (r). При осуществлении сравнительного анализа групп применяли t -критерий Стьюдента, коэффициент парной ранговой корреляции Спирмена (R), достоверности коэффициента корреляции. Нулевая гипотеза о различиях между признаками анализируемых выборок принималась при $p \leq 0,05$.

Программное обеспечение для сбора и обработки информации с получением на выходе двух матриц множества функциональных состояний с общим количеством спектральных ячеек 8400, было зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 26.07.2016 г., Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016618291 [24].

Глюкоза крови измерялась с помощью глюкометра «OneTouchSelectPlusFlex». Для количественной оценки генетического материала и экспрессии генов использовался высокоскоростной прибор для проведения ПЦР с возможностью регистрации продуктов в режиме реального времени – C1000 Touch (CFX), Bio-RAD (USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Механические колебания клеток, как наиболее простая и древняя форма «донервной» передачи и аккумуляции энергии, используется природой для формирования структурами мозга фонового адаптационного потенциала «активного мозга» – многочастотной матрицы множества функциональных состояний. Механические микровибрации – самая энергомалозатратная форма передачи энергии, распространяется на ультранизких частотах без затухания, а частотный код придает ей функциональную специфичность. Была предложена концептуальная модель, в которой для каждой функции – от клеточных до организменных, выстраивается на основании потребностей частотный кластер (группа), состоящий из нервных, глиальных или любых других клеток, организующим фактором которых является одна частота, а функциональное состояние такой группы определяется амплитудой механических микровибраций клеток [20,21].

Выстраиваемая нами модель предполагает, что единичным осциллятором - вибратором в такой системе является клетка, способная при экспрессии синтеза белка излучать в окружающее пространство механические

микровибрации с частотой специфичной для конкретного гена, либо возбуждаться при воздействии на клетку внешних вибраций той же частоты [6,7,25-28]. Микровибрации ультранизких частот (до 30 Гц) способны распространяться по всему телу практически без затухания. Любая клетка «видит» и может «реагировать» на состояние других клеток целостного организма на языке частот. При этом, нервная клетка способна возбуждаться на нескольких частотах, и при необходимости мгновенно их запоминать, соматическая – работает только на одной специфической частоте [29,30].

Для каждой функции – от организменных до клеточных, выстраивается на основании потребностей частотные функциональные группы, состоящие из множества нервных, глиальных и соматических клеток, организующим фактором для которых является одна частота, а функциональное состояние определяется суммарной колебательной энергией частотного кластера - амплитудой его активности. Таким образом, модель постулирует, что за каждой частотой, генерируемой и регистрируемой в центральной нервной системе, лежит функциональная группа из множества сонастроенных клеток и свойственная ей функция, когнитивный образ или вектор поведения.

Такая модель корректно решает задачи «глобального доступа» и синхронизации работы нервных и соматических клеток в одной функционально-частотной группе вне зависимости от ее расположения в пространстве, наличия и траектории нервных проводников. Клеточные одночастотные группы (ФУГ) тесно связаны между собой в функциональные модули, обеспечивают иерархию в их организации и целостность организма, представляют потенциально громадный набор когнитивных образов (КОГ), соматических и висцеральных функциональных групп, конкурирующих потребностей и векторов поведения [14,15].

Модель формирует представление о последовательном возникновении в функциональной клеточной группе разнообразных и мало зависимых механизмов передачи информации - от механических микровибраций клеток, химической передачи к нервной синаптической. Нервная импульсная активность возникает в пределах уже сформированного частотного клеточного кластера только при ее биологической значимости - нарастании достаточной колебательной энергии механических микровибраций. При этом, строящиеся на этой «донервной» основе нейронные синаптические сети внутри и между различными частотными кластерами, выделяют и морфологически закрепляют наиболее значимые прицельные связи, которые обеспечивают иерархию функций, память и целостность организма.

Приведем примеры получения частот функциональных клеточных групп и некоторых способы их получения.

1. Нами было обнаружено, что любое (механическое, химическое, температурное) раздражение участков кожи (от слабого до сильного) ведет к появлению в частотном спектре новой спектральной гармоникой измененной амплитуды [31]. Картирование различных участков кожи показало их высокую частотную специфичность, популяционную устойчивость. Для формирования системы координат частотной матрицы кожной чувствительности тела по оси ординат были отложены томы (32 дерматомы от С1 до К), по оси абсцисс, внутри каждого дерматома – семь участков выхода кожных нервов - моды (три на передней поверхности тела, три на задней и один на боковой). Таким образом, для активирующей системы мозга в многочастотную матрицу множества функциональных состояний была вписана соматическая система координат «Схема тела» (8400 функциональных групп кожного анализатора) [18]. На рисунке 2 приведен пример появления аномально высокой спектральной гармоникой на частоте 6,396 Гц при локальном раздражении участка кожи на дерматоме L5 (передняя область голени, дистальнее верхушки надколенника). Использовался химический раздражитель мазь «Финалгон». По аналогии, можно получить спектр любой из 8400 ячеек матрицы множества функциональных состояний кожного анализатора. Такой подход открывает возможности для создания технологической платформы для проведения множества физиологических и медицинских исследований по функционально топической диагностике заболеваний внутренних органов и систем организма, картированию любых функций, очагов патологии, стадий воспалительного процесса, опухолей и т.п. [32-34]. «Схема тела» в спектре непрерывной ритмической активности головного мозга является ярким примером концепции «активного мозга», осознания своего собственного «Я» и ориентации в пространстве, развития элементов сознания [33,35].

2. Любую функцию можно представить в виде графика функционального состояния во времени. Добровольцу в течение трех месяцев проводили измерение содержания глюкозы в крови. График в виде цельной линии представлен на рисунке 3. Всего было сделано 12 измерений. Часть измерений проводилось натощак, часть после приема сладкого. Синхронно с измерениями глюкометра проводилась регистрация акусто-энцефалограммы – три кадра по 160 сек, которые при обработке усреднялись. В результате спектрального анализа было получено 12 матриц множества функциональных состояний, каждая из которых содержала 8400 спектральных ячеек. Был проведен кросс-корреляционный анализ, где каждый такой график сравнивался с реальным графиком глюкозы крови с измерением попарно коэффициента корреляции. Был выбран один единственный график из 8400, который был максимально похож на график глюкозы крови и имел максимальный коэффициент корреляции. Это оказалась спектральная ячейка 0,295 Гц в левом полушарии с коэффициентом корреляции $r = 0,96$. На рисунке 3 такой график выполнен пунктирной линией, значения амплитуды выведены справа по оси абсцисс. Так можно измерять содержание глюкозы в крови (как и любую другую функцию) неинвазивно, по анализу ритмической активности головного мозга. Таким образом, амплитуда спектральной гармоникой частотой 0,295 Гц отражает состояние функциональной группы клеток, ответственных за функцию поддержания глюкозы в крови. Результаты воспроизводимы для других пациентов ($p=0,85$).

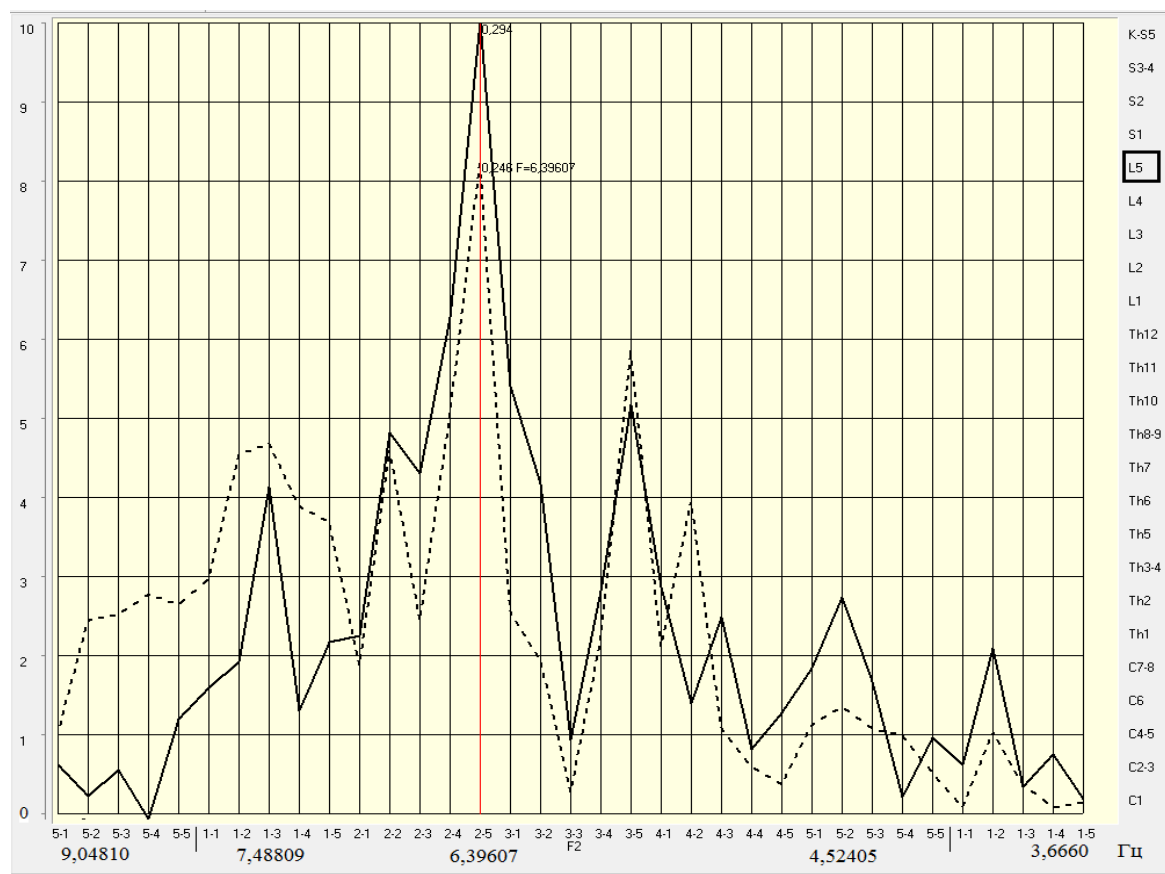


Рисунок 2. В результате раздражения участка дерматомы L5 мазью «Финалгон» был зарегистрирован всплеск повышения амплитуды спектральной гармоник 6,396 Гц в правом полушарии. По оси ординат частота в Гц, по оси абсцисс слева – амплитуда в отн. ед., справа номера дерматомов. Цельная линия графика огибающей спектра – правое полушарие, пунктирная – левое полушарие

3. Добровольцу предъявлялась буква «А», размером 20 см, напечатанная на белом картоне. Испытуемый должен был произнести про себя название буквы и обвести ее контур взглядом так, как будто ее написал. Примерно на 10сек глаза закрывались, следовало расслабление, и далее все повторялось на протяжении кадра записи информации, который был равен 160 сек. Таким образом, испытуемый получал многократное предъявление зрительного образа буквы «А». Перед каждым предъявлением буквы «А» испытуемому записывался кадр «Фон», длительностью 160 сек, с закрытыми глазами в расслабленном состоянии. В разные дни и время исследование повторялось не менее 10 раз. Полученные за 160 сек кадры суммировались и по разнице с показателями «Фона» выделялся многопериодический паттерн, характерный для буквы «А» (доминирующие частоты 0,15495 Гц; 3,61129 Гц). Программный блок анализа амплитуд спектра «обучался» выделенному паттерну, формировалось правило - «Буква А». Далее испытуемому в разные дни и время повторно записали «Фон», а затем предъявили букву «А». Всего 20 предъявлений. Блок анализа спектра в выборке из 20 кадров успешно определил спектр буквы «А» 18 раз ($p = 0,9$). В фоновом состоянии не было ни одного ложного срабатывания на спектр буквы «А». Разработанное правило распознавания образа буквы А успешно работало только на одном добровольце. Применение к другим добровольцам резко снижало вероятность распознавания до $p=0,5$ [18].

4. Добровольцу в разные дни и время предъявлялись 5 образов – фотографий знакомых и незнакомых лиц. Перед каждым исследованием регистрировался Фон – 160 Сек и сразу шла регистрация с предъявлением одного из образов. В результате анализа, для каждого образа была выделена ведущая спектральная гармоника с максимальной амплитудой: Фото 1 – 6,008 Гц; Фото 2 – 6,977 Гц; Фото 3 – 7,065 Гц; Фото 4 – 6,92 Гц; Фото 5 – 7,01 Гц. Предъявление этих фотографий добровольцу в течении последующих трех месяцев показали те же результаты. Образы были запомнены. Автоматическое распознавание образов, предъявленных вразнобой дало вероятность правильного результата $p=0,85$. Замена фотографии на мысленное воспоминание образа давало так же положительный результат исследования. Предъявление тех же фотографий другому добровольцу дало совершенно другие частоты, которые в последующем сохранялись только у него. Вероятно, полученный текущий опыт фиксируется мгновенно и сохраняется молекулярными механизмами строго индивидуально.

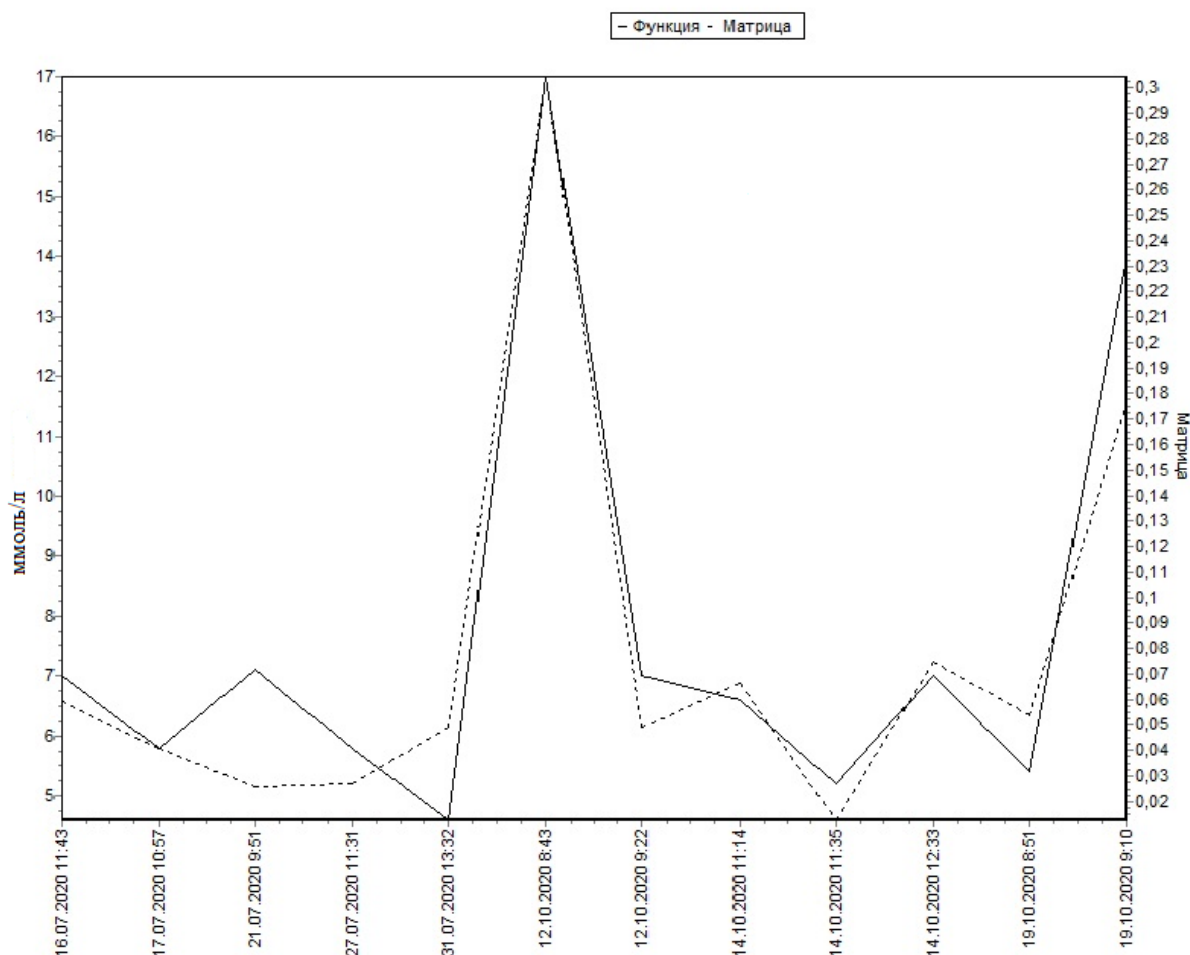


Рисунок 3. Результат кросс-корреляционного анализа функции глюкозы крови по 12 измерениям в различные дни и время у одного добровольца (цельная линия, показания глюкометра) и подобранная функция одна из 8400 в матрице множества функциональных состояний (пунктирная линия). Коэффициент корреляции между двумя функциями $-0,96$. По оси ординат – дата и время замеров. По оси абсцисс слева – показания глюкозы в крови, справа – амплитуда выбранной спектральной функции в отн. ед.

5. Испытуемому давалась таблетка с выраженным вкусом мяты. Таблетка рассасывалась под языком в течение 160 сек. Исследование повторялось не менее 10 раз в разные дни и время. Перед раздражением вкусового анализатора испытуемому снимался «Фон». При раздражении вкусового анализатора таблеткой «Мята» формируется диффузный многопериодический паттерн. Блок анализа спектра в выборке из 20 кадров предъявления вкуса «Мята» успешно определил его спектр 17 раз ($p = 0,85$). При фоновом исследовании не было ни одного ложного срабатывания. Ведущие спектральные гармоники для вкуса мяты: 0,1303 Гц; 3,7890 Гц сохранялись у всех испытуемых [18].

ВЫВОДЫ

Биологические микровибрации – важнейший транспортный ресурс живых организмов и катализатор обмена веществ, важнейший компонент целостности и условие жизнедеятельности организма [36,37]. Поэтому функциональное состояние клетки напрямую связано с амплитудой ее микровибраций. Отсутствие вибраций – смерть клетки, максимальная амплитуда вибраций – высокая функциональная активность.

В работе предлагается концептуальная «Модель организации клеточной функциональной группы», которая базируется и будет совершенствоваться с учетом следующих основных положений:

- механические микровибрации в ультразвуковом диапазоне частот распространяются в различных средах практически без затухания и на относительно большие расстояния;
- точечный источник микровибраций расположенный в любом месте организма может быть услышан абсолютно всеми клетками, а энергозатраты такой системы передачи информации, в отличие от биохимических, минимальны [37];
- доказано, что клетка может реагировать на механические микровибрации, не имея специализированных рецепторов [38];
- внешняя энергия механических колебаний может на определенной частоте резонировать с рядом биохимических процессов в клетке, в том числе, вызывая экспрессию только определенного для этой частоты

гена, а при экспрессии гена - излучать вибрации на этой определенной частоте, формируя когерентную систему с другими клетками группы [25-28];

- нервная, глиальная клетки могут отзываться на несколько частот вибраций и входить соответственно в различные функциональные группы, создавая более сложные механизмы взаимодействия клеточных групп. Соматическая клетка может работать только на одной частоте, которая определяется геном и продукцией одного белка;

- потенциал поляризации и частота разрядов нервной клетки – самостоятельный информационный механизм, требующий дополнительного изучения в плане взаимодействия с механическими вибрациями клетки. Электрическое поле и механические микровибрации физически разной природы. Нервный и синаптический канал информации зависит, но напрямую не связан с частотой и амплитудой механических микровибраций нервной клетки. Частота и амплитуда механических микровибраций клетки – продукт генома, древнего эпигенетического механизма взаимодействия клетки с окружающей средой;

- каждой функции, начиная от клеточного уровня экспрессии генов, синтеза белков и кончая организменным уровнем, эволюция поставила в соответствие одну и только одну частоту активации функциональной группы (ФУГ), характерную для всей популяции вида (схема тела, висцеральный анализатор, эмоции, обоняние и вкус). Исключение составляют только когнитивные функциональные группы (КОГ), группы, связанные со зрительными и слуховыми образами, каждая из которых получена из индивидуального опыта, имеет стабильную частоту привязки к образу только для одного организма. Чем более «кортиколизована функциональная группа» - тем более индивидуальны ее спектральные вибрационные характеристики;

- клеточные элементы функциональной группы или их объединений, поддерживающих одну функцию организма, разбросаны по всему мозгу и телу, поэтому искать их топографические скопления бессмысленно. Объединяющим принципом или системообразующим фактором является синхронизация элементов группы на одной частоте. Исполнительным механизмом этого объединения является феномен микровибраций, выбранный эволюцией как самое простое начало всего живого. На ультранизких частотах микровибрации обладают всепроникающей способностью и распространяются практически без затухания, с относительно большой скоростью и минимальными энергозатратами. Кроме того, полученная со стороны функциональной группы общая механическая энергия в виде микровибрации, является поддерживающим вкладом в энергию самой клетки, ее функционального состояния. Все осциллирующие элементы одной функциональной группы – клетки, стремятся к выравниванию общей колебательной энергии до одинакового уровня;

- центральная частота функциональной группы обладает очень высокой стабильностью, которую мы определяем как точность с «пятым знаком после запятой». Это связано с очень большим числом осциллирующих элементов, которые слабо связаны и каждый из которых примерно настроен на одну частоту. В таких «неточных» системах общая частота генерации усредняется и ее точность прямо зависит от числа элементов. При числе элементов в десятки и сотни тысяч, центральная частота оказывается соизмерима с точностью кварцевого генератора. Это позволяет на небольшом отрезке частот, например от 0,1 до 30 Гц, разместить до сотни тысяч спектральных гармоник [39];

- механические микровибрации живой клетки и организация на этой основе клеточных функциональных групп является древнейшим механизмом до-нервной передачи информации и накопления колебательной энергии, базой для «непрерывной активности» мозга и ее адаптивной регуляции;

- функциональная группа клеток на основе механических микровибраций – универсальный механизм, эволюционное приобретение, существующее для любых физиологических функций организма на всех его уровнях и охватывающее все анализаторные системы, включая когнитивные функции.

Список литературы/ References:

1. Бехтерев В.М. *Распределенные системы. Проводящие пути мозга*. Казань: типография Имперского университета, 1893, т. 4, 192 с. [Bekhterev V.M. *Distributed systems. The pathways of the brain*. Kazan: printing house of the Imperial University, 1893, vol. 4, 192 p. (In Russ.)].
2. Ливанов М.Н. *Пространственная организация процессов головного мозга*. М.: Наука, 1972, 181 с. [Livanov M.N. *Spatial organization of brain processes*. M.: Nauka, 1972, 181 p. (In Russ.)].
3. Calma J., Arduini A. Spontaneous and induced activity in pyramidal units. *J. Neurophysiol.*, 1954, vol. 17, pp. 321-332.
4. Ливанов М.Н. Нейрокинетика. *Проблемы современной нейрофизиологии*, М.-Л., 1965, с. 37-42 [Livanov M.N. *Neurokinetics. Problems of modern neurophysiology*, M.-L., 1965, pp. 37-42 (In Russ.)].
5. Жадин М.Н. *Биофизические механизмы формирования электроэнцефалограммы*. М.: Наука, 1984, 195 с. [Zhadin M.N. *Biophysical mechanisms of electroencephalogram formation*. M.: Nauka, 1984, 195 p. (In Russ.)].
6. Анохин К.В. Когнитом: в поисках фундаментальной нейронаучной теории сознания. *Журнал высшей нервной деятельности*, 2021, т. 71, № 1, с. 39-71 [Anokhin K.V. Cognitom: in search of a fundamental neuroscientific theory of consciousness. *Journal of Higher Nervous Activity*, 2021, vol. 71, no 1, pp. 39-71, doi: 10.31857/S0044467721010032 (In Russ.)].
7. Сварник О.Е. *Активность мозга: специализация нейрона дифференциация опыта*. М.: Институт психологии РАН, 2016, 190 с. [Svarnik O.E. *Brain activity: neuron specialization and differentiation of experience*. M.: Institute of Psychology of the Russian Academy of Sciences, 2016, 190 p. (In Russ.)].

8. Крушинский Л.В. *Биологические основы рассудочной деятельности: эволюционный и физиолого-генетический аспекты поведения*. Монография. Москва: Издательство Московского университета, 1977, 272 с. [Krushinsky L.V. *Biological foundations of intellectual activity: evolutionary and physiological-genetic aspects of behavior*. Monograph. M.: Moscow University Press, 1977, 272 p. (In Russ.).]
9. Hawkins J., Blakeslee S. On Intelligence. Times Books, 2004. *Artificial Intelligence*, 2005, vol. 169, no. 2, pp. 192-195, doi: 10.1016/j.artint.2005.10.011.
10. Friston K.J., Stenhan K.E. Free-energy and the brain. *Synthese*, 2007, vol. 159, no. 3, pp. 417-458, doi: 10.1007/s11229-007-9237-y.
11. Friston K. The free-energy principle: a unified brain theory? *Nat. Rev. Neurosci.*, 2010, vol. 11, pp. 127-138.
12. Матюшкин Д.П. К вопросу о физиологическом механизме мышления. *Вестник СПбГУ*, 2010, сер. 3, вып. 1, с. 103-107 [Matyushkin D.P. On the question of the physiological mechanism of thinking. *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2010, series 3, iss. 1, pp. 103-107 (In Russ.).]
13. Анохин П.К. *Биология и нейрофизиология условного рефлекса*. Москва: Медицина, 1968, 548 с. [Anokhin P.K. *Biology and neurophysiology of conditioned reflex*. Moscow: Medicine, 1968, 548 p. (In Russ.).]
14. Мэгул Г. *Бодствующий мозг*. М.: Изд. Иностранной литературы, 1965, 212 с. [Magun G. *The waking brain*. M.: Ed. Foreign literature, 1965, 212 p. (In Russ.).]
15. Stabbs D.F. Frequency and the brain. *Life Sci.*, 1976, vol.18, pp. 1-14.
16. Кратин Ю.Г. Резонансная настройка анализаторной системы мозга как результат дифференцирования сигналов. *Журн. высш. нервн. деятельности*, 1966, т. 16, вып. 3, с. 426-436 [Kratin Yu.G. Resonant tuning of the brain analyzer system as a result of signal differentiation. *Journal of Higher Education. nervous. activities*, 1966, vol. 16, iss. 3, pp. 426-436 (In Russ.).]
17. Кратин Ю.Г. Принцип фильтрации и резонансной настройки циклических нервных контуров в теории ВНД. *Успехи физиол. наук*, 1986, т. 17, № 2, с. 31-55 [Kratin Yu.G. The principle of filtration and resonant tuning of cyclic nerve circuits in the theory of GNI. *Successes of physiological sciences*, 1986, vol. 17, no. 2, pp. 31-55 (In Russ.).]
18. Шабанов Г.А., Максимов А.Л., Рыбченко А.А. *Функционально-топическая диагностика организма человека на основе анализа ритмической активности головного мозга*. Владивосток: Дальнаука, 2011, 206 с. [Shabanov G.A., Maksimov A.L., Rybchenko A.A. *Functional and topical diagnostics of the human body based on the analysis of rhythmic activity of the brain*. Vladivostok: Dalnauka, 2011, 206 p. (In Russ.).]
19. Коштойанц Х.С. *Основы сравнительной физиологии. Том 1*. М.: Издательство АН СССР, 1950, 524 с. [Koshtoyants H.S. *Fundamentals of comparative physiology. Volume 1*. Moscow: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1950, 524 p. (In Russ.).]
20. Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Лебедев Ю.А., Припатинская Е.А. Изучение взаимосвязи микровибраций головы человека с ритмической активностью центральной нервной системы, вызванной фотостимуляцией. *Современные проблемы науки и образования*, 2020, № 5 [Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Lebedev Yu.A., Pripotinskaya E.A. Studying the relationship of micro-vibrations of the human head with the rhythmic activity of the central nervous system caused by photostimulation. *Modern problems of science and education*, 2020, no. 5, doi: 10.17513/spno.30145 (In Russ.).]
21. Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Луговая Е.А. Модель организации физиологических функций организма человека на основе спектрального анализа акустоэнцефалограммы. *Сб. научных трудов VII Съезда биофизиков России, Т.2*. Краснодар: Типография ФГБУ ВО «Куб ГТУ», 2023, с. 223 [Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Lugovaya E.A. Model of the organization of physiological functions of the human body based on spectral analysis of acousto-encephalogram. *Collection of scientific papers of the VII Congress of Biophysicists of Russia, Vol. 2*. Krasnodar: Printing house of the Federal State Budgetary Educational Institution "Kub GTU", 2023, p. 223, doi: 10.26297/SbR6.2023.001 (In Russ.).]
22. Патент на полезную модель № 202454 Российская Федерация, СПК52 А61В 5/0476. *Регистратор спектра микровибраций головного мозга*. Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Лебедев Ю.А., Зубков И.А.; заявитель и патентообладатель НИЦ «Арктика» ДВО РАН (RU) - № 2020125873; Приоритет 04.08.2020; опубл. 18.02.2021, бюл. № 5 [Utility Model Patent No. 202454 Russian Federation, SEC 52 A61B 5/0476. *Registrar of the spectrum of micro-vibrations of the brain*. Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Lebedev Yu.A., Zubkov I.A.; applicant and patent holder of SIC "Arctic" FEB RAS (RU) - No. 2020125873; Priority 08/04/2020; publ. 02/18/2021, bul. no. 5. (In Russ.).]
23. Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Лебедев Ю.А., Луговая Е.А. Регистратор спектра акустического поля головного мозга человека. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2021, т. 24, № 3, с. 28-36 [Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Lebedev Yu.A., Lugovaya E.A. Registrar of the spectrum of the acoustic field of the human brain. *Biomedical radioelectronics*, 2021, vol. 24, no. 3, pp. 28-36, doi: 10.18127/j15604136-202103-03 (In Russ.).]
24. Рыбченко А.А., Шабанов Г.А., Лебедев Ю.А., Зубков И.А., Фейгин С.А. *Приложение для анализа медицинских данных и конвертирования БД МЭГИ в открытые форматы*. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016618291. Правообладатель ФГБУН НИЦ «Арктика» ДВО РАН (RU). Заявка № 2016615622 от 01.06.2016. Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 26.07.2016 г. [Rybchenko A.A., Shabanov G.A., Lebedev Yu.A., Zubkov I.A., Feigin S.A. *Application for analyzing medical data and converting MAGI databases into open formats*. Certificate of state registration of a computer program No. 2016618291. The copyright holder of the Federal State Budgetary Scientific Research Center "Arctic" FEB RAS (RU). Application No. 2016615622 dated 06/01/2016. Registered in the Register of Computer Programs on 07/26/2016. (In Russ.).]

25. San J., Chen J., Wang N. Force-induced gene upregulation does not follow the weak power law but depends on H3K9 demethylation. *Science Advances*, 2020, vol. 6, no.14, doi: 10.1126/sciadv.aay9095.
26. Alvarez Z., Kolberg A., Stapp S. Bioactive scaffolds with enhanced supramolecular motion promote recovery from spinal cord injury. *Science*, 2021, vol 374, iss. 6569, pp. 848-856, doi: 10.1126/science.abh3602.
27. Buehler M.J. Viral Counterpoint of the Coronavirus Spike Protein (2019-nCoV). *ACS Nano*, 2019, doi: 10.1021/acsnano.9b02180.
28. Матюшкин Д.П. Клеточный подход к оценке интегративных функций и иерархической организации мозга человека и животных. *Философские вопросы биологии и медицины*, М., 1986, с. 83-91 [Matyushkin D.P. Cellular approach to the assessment of integrative functions and hierarchical organization of the human and animal brains. *Philosophical questions of biology and medicine*, М., 1986, pp. 83-91 (In Russ.)].
29. Балабан П.М., Бородинова А.А. Нейрогенетические технологии исследования механизмов хранения памяти. *Российский Физиол. Журнал им. И.М.Сеченова*, 2019, т. 105, № 11, с. 1392-1405 [Balaban P.M., Borodina A.A. Neurogenetic technologies for the study of memory storage mechanisms. *Russian Physiol. I.M.Sechenov Magazine*, 2019, vol. 105, no. 11, pp. 1392-1405, doi: 10.1134/S0869813919110025 (In Russ.)].
30. Borodina A.A., Balaban P.M. Epigenetic Regulation as a Basis for Long-Term Changes in the Nervous System: In Search of Specificity Mechanisms. *Biochemistry*, 2020, vol. 85, no. 9, pp. 994-966, doi: 10.1134/S006979200900023.
31. Шабанов Г.А., Маркина Л.Д., Рыбченко А.А. Спектральный анализ реакции электрической активности коры большого мозга человека на локальное раздражение кожного анализатора. *Образование и медицинская наука XXI века*, Владивосток: ВГМУ, 2000, с. 16-18 [Shabanov G.A., Markina L.D., Rybchenko A.A. Spectral analysis of the reaction of the electrical activity of the human cerebral cortex to local irritation of the skin analyzer. *Education and medical science of the XXI century*, Vladivostok: VGMU, 2000, pp.16-18 (In Russ.)].
32. Шабанов Г.А. *План строения тела в спектре интегральной ЭЭГ*: тез. докл. XVII съезда физиологов России, Ростов-на-Дону, 14-18 сентября, 1998 г. Ростов-на-Дону, 1998, с. 302 [Shabanov G.A. Body structure plan in the spectrum of integral EEG: thesis of the XVII Congress of Physiologists of Russia, Rostov-on-Don, September 14-18, 1998, p. 302 (In Russ.)].
33. Szczot M., Nickolls A.R., Lam R.M., Chesler A.T. The Form and Function of PIEZO2. *Annu. Rev. Biochem.*, 2021, vol. 90, pp. 507-534, doi: 10.1146/annurev-biochem-081720-023244.
34. Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Луговая Е.А. Модель построения системы координат «схема тела» на основе спектрального анализа акустоэнцефалограммы. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2023, с. 37-38 [G.A. Shabanov, A.A. Rybchenko, E.A. Lugovaya. A model for constructing a coordinate system "body diagram" based on spectral analysis of an acousto-encephalogram. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, 134 p., pp. 37-38 (In Russ.)].
35. Пуанкаре А. *Наука и метод*. О науке. М.: Наука, 1983 [Poincare A. Science and method. About science. Moscow: Nauka, 1983 (In Russ.)].
36. Волчек О.Д., Алексина Л.А. Использование вибрации и виброакустики в медицине. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова*, 2011, т. 18, № 1, с. 12-21 [Volchek O.D., Aleksina L.A. The use of vibration and vibroacoustics in medicine. *Scientific notes of St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P.Pavlov*, vol. 18, no. 1, 2011, pp. 12-21 (In Russ.)].
37. Зинкин В.Н. Биофизические основы действия акустических колебаний. *Системный анализ в медицине (САМ 2016)*, Материалы X междунар. научн.конф. Благовещенск, 2016, с. 13-17 [Zinkin V.N. Biophysical foundations of the action of acoustic vibrations. *System analysis in medicine. (SAM 2016)*, Materials of the X International Scientific Conference. Blagoveshchensk, 2016, pp. 13-17 (In Russ.)].
38. Насонов Д.Н. *Прямое влияние слышимых звуков на нервные клетки изолированных спинномозговых ганглиев*. ДАН СССР, 1950, т. 71, № 5, с. 985-987 [Nasonov D.N. *The direct effect of audible sounds on the nerve cells of isolated spinal ganglia*. DAN USSR, 1950, vol. 71, no. 5, pp. 985-987 (In Russ.)].
39. Бутенин Н.В. *Элементы теории нелинейных колебаний*. М: Наука, 1962, 193 с. [Butenin N.V. *Elements of the theory of nonlinear oscillations*. Moscow: Nauka, 1962, 193 p. (In Russ.)].

A MODEL OF ORGANIZATION OF A CELLULARFUNCTIONALGROUP

Shabanov G.A., Rybchenko A.A., Lugovaya E.A.

Scientific Research Center«Arktika» FEB RAS

Karl Marx St., 24, Magadan, 685000, Russia; e-mail: neurokib@mail.ru

Received 29.07.2024

Abstract. The paper proposes a conceptual model in which, based on needs for each function – from a cell's to the entire body's, a frequency cluster (group) that consists of nerve, glial or any other cells is built with one frequency of the cells' mechanical micro-vibrations as their organizing factor, and the total sum of the rate amplitude as the factor suggesting the functional state of such a group. To register the spectrum of the head acoustic signals, a prototype of the medical device of «RSAEG-01 Brain Field Acoustic Spectrum Recorder» was developed. The device is equipped with vibration piezoceramic sensors and designed to recorder the total rhythmic activity, separately for the right and left hemispheres, with its further high-resolution spectral analysis performed in the frequency range from 0.13 to 27 Hz. The resulting 8400 central frequencies from the left and right hemispheres with the corresponding amplitudes of the spectral estimation were converted into two spectral matrices with the size of 24x175 frequency cells. The signal summation time for each spectral cell was elected to be 160 seconds which implied the duration field of the data frame. The paper presents examples of registration and analysis for cellular groups of skin, gustatory, visceral, and cognitive analyzers. In conclusion, basic principles of building a model of organization of a cellular functional group are emphasized: mechanical vibrations at low frequencies spread in environments of an organismal most without fading; being sources of mechanical microvibrations, gene expression and protein synthesis respond to the microvibrations selectively, only at their frequencies.

Key words: cellular functional group, mechanical microvibrations.

ХИТОЗАНЫ И ИХ АЦИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЕ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ПРИ ЭНДОТОКСЕМИИ

Набережных Г.А., Бахолдина С.И., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100-летия Владивостока, 159, г. Владивосток, 690022 РФ; e-mail: naber1953@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2024

Аннотация. Стратегия терапии шока основывается на удалении избыточного количества липополисахаридов (ЛПС) и/или блокировании связывания эндотоксина с рецепторами на клетках-мишенях. Ранее нами показано, что природные поликатионы хитозаны, образуют стабильные комплексы с анионными ЛПС и снижают токсическое действие ЛПС. В данной работе проведён сравнительный анализ защитных свойств низкомолекулярного хитозана (Х-НМ, 5,5 кДа) и его ацилированного производного (Ац-Х-НМ) в растворах и в составе фосфолипидных липосом при внутрибрюшинном (в/б) и пероральном (п/о) введении мышам при индукции эндотоксемии. Эндотоксемию моделировали в/б введением мышам ЛПС из *Escherichia coli* 055:B5 (7,5 мг/кг). Х-НМ и Ац-Х-НМ получали обработкой коммерческого хитозана. Хитолипосомы получали сорбцией Х-НМ и Ац-Х-НМ на липосомах, предварительно сформированных из лецитина, холестерина и дицетилфосфата. Установлено, что, введение Ац-Х-НМ повышает в 1,36-2 раза устойчивость липосом к агрессивному воздействию сред, моделирующих условия в некоторых отделах желудочно-кишечного тракта. Методом ИФА, показано, что комплекс ЛПС с ацилированным хитозаном снижает индукцию ФНО- α в крови человека на 40% по сравнению с ЛПС и комплекс не влияет на способность эндотоксина стимулировать клетки крови к выработке ИЛ-6. Профилактическое семикратное пероральное и двукратное внутрибрюшинное введение липосомальных форм хитозанов снижает токсическое действие эндотоксина на организм мышей и достоверно увеличивает выживаемость (85-100 %) животных в эксперименте.

Ключевые слова: хитозан, липополисахарид, липосомы, эндотоксемия.

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательный сепсис и септический (эндотоксический) шок являются серьезной клинической проблемой. Они дают высокий процент летальных исходов даже в странах с развитой системой здравоохранения [1]. В последние годы наблюдается заметный прогресс в понимании молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе грамотрицательного сепсиса и эндотоксического шока [1,2]. Проблемы возникают в результате накопления в крови организма-хозяина эндотоксинов (липополисахаридов – ЛПС), которые высвобождаются из клеток бактериального патогена вследствие системной бактериальной инфекции или инъекции лекарственного препарата, загрязненного ЛПС. Попадая в организм ЛПС, стимулирует иммунную систему хозяина путём взаимодействия с рецепторами иммунокомпетентных клеток и вызывает синтез провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления. Действие ЛПС на организм определяется его концентрацией. При поступлении в организм в больших количествах эндотоксин может вызвать чрезмерную активацию иммунокомпетентных клеток, индуцировать неконтролируемую продукцию цитокинов и системный воспалительный ответ, который в течение нескольких дней приводит к множественной органной недостаточности, сепсису и септическому шоку [1]. Дополнительный потенциальный источник эндотоксинов в организме – популяция бактерий, которые обитают в кишечнике. При концентрации эндотоксина в кровотоке в 2-3 раза большей, чем нормальная суточная концентрация ЛПС, и в 30-50 раз меньшей, чем при сепсисе, развивается хроническое субклиническое воспаление (т.н. «метаболическая эндотоксемия»), которое является причиной многих заболеваний, преследующих современного человека таких как, ожирение, диабет, атеросклероз, ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера, множественный склероз, тяжелая депрессия [2]. В отечественной литературе этот феномен известен под названием «эндотоксиновая агрессия». Существует теория, которая рассматривает эндотоксин, как универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных [3].

Токсическим центром молекулы ЛПС является е-гликолипидный фрагмент, названный липидом А, который, играет центральную роль в активации эндотоксином синтеза провоспалительных цитокинов в иммунокомпетентных клетках [4]. Стратегия терапии шока основывается на удалении избыточного количества ЛПС и/или блокировании связывания эндотоксина с рецепторами на клетках-мишенях. Липид А в силу своей анионной природы является основным сайтом связывания поликатионов с молекулой ЛПС. Он представляет собой потенциальную мишень для соединений с антиэндотоксической активностью. На основе этих данных возникло решение исследовать хитозан в качестве вещества, нейтрализующего эндотоксическую активность ЛПС и в силу этого создания на его основе специфического препарата для терапии эндотоксического шока. Хитозан – поликатионный линейный полисахарид, полимерная цепь которого состоит из β -1,4-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. Ранее нами показано, что природные поликатионы – хитозаны, образуют стабильные комплексы с анионными ЛПС и снижают их токсическое действие [5].

Ранее нами было изучено взаимодействие ЛПС хитозаном и его производными: высокомолекулярным хитозаном (80 кДа), низкомолекулярным хитозаном (15 кДа), ацилированным низкомолекулярным хитозаном (5,5 кДа) и ацилированными ди-, три- и тетраолигохитозанами. Аффинность взаимодействия ЛПС с хитозаном возрастает при введении в его молекулу длинноцепочечного жирнокислотного остатка. ЛПС-связывающая активность N-моноацилированных хитоолигосахаридов, падает в ряду: олигохитозан $\rightarrow$ тетра $\rightarrow$ три $\rightarrow$ дисахаридные производные [6]. Изучение взаимодействия ЛПС с анионными липосомами покрытыми хитозаном и его производными: высокомолекулярным хитозаном (300 кДа), с различной степенью N-алкилирования, его кватернизованными производными, N-ацилированным низкомолекулярным хитозаном (Ац-Х-НМ) показало, что наиболее эффективно с липосомами взаимодействует N-ацилированный низкомолекулярный хитозан [7].

Анализ взаимодействия ЛПС с хитолипосомами показал, что ЛПС-связывающая активность уменьшается в ряду липосом: покрытых гидрофобными производными хитозана $>$ покрытых незамещенными хитозанами $>$ свободными липосомами. Аффинность взаимодействия ЛПС с липосомальной формой хитозана возрастает по сравнению со свободными липосомами. Методами компьютерного моделирования показано, что при модификации липидного бислоя липосом Ац-Х-НМ происходит усиление связывания ЛПС с липосомами за счет образования дополнительных водородных и ионных связей между молекулой хитозана и ЛПС [7].

Важным представляется способ введения в организм человека и животных антиэндотоксиновых препаратов. При пероральном введении липосомальных форм хитозана, его протективное действие может увеличиваться при взаимодействии с эпителием желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) за счет мукоадгезивных свойств хитозанов. В настоящей работе проведен сравнительный анализ защитных свойств при эндотоксиновом шоке низкомолекулярных олигохитозан (Х-НМ) и их ацилированных производных (Ац-Х-НМ) в водных растворах и в составе липосом при внутривенном (в/в) и пероральном (п/о) введении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы ЛПС из *Escherichia coli* 055:B5, N-гидроксисукцинимидный эфир биотинамидогексановой кислоты, конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена («Sigma», США), мембраны для ультрафильтрации («Millipore», США). Все остальные реактивы имели классификацию «х.ч.» («Реахим», Россия) и использовались без дополнительной очистки.

Для буферных систем использовали растворы, содержащие 0,01 М $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$, pH 5,5 (буфер А) и буфер А, содержащий 0,5% -ный желатин (буфер Б).

Получение низкомолекулярного хитозана, N-3-гидрокситетрадеcanoил-хитозана и их меченных биотином производных описано ранее в работе [6].

Получение липосом, нагруженных Х-НМ, Ац-Х-НМ. Кратко описано в работе [7]. Моноламеллярные липосомы готовили методом гидратации липидной пленки ацетатным буфером А (pH 5,5), полученной из яичного фосфатидилхолина, холестерина и дицетилфосфата (молярное соотношение 2 : 1,5 : 0,2). Смесь встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой бане в течение 10 мин при 45° и многократно пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 200 нм. К аликватам липосом (0,1 мл, 1 мг/мл фосфолипидов) добавляли растворы хитозанов или их производных в разных концентрациях (7,5–1000 мкг/мл), смесь инкубировали в течение ночи при 37° и несвязавшийся хитозан отделяли центрифугированием при 20 000 g.

Определение количественных характеристик связывания хитозанов и их производных с липосомами. Хитозаны, меченные флуоресцеином, добавляли в одинаковой концентрации (125 мкг/мл) к аликватам липосом (0,1 мл, 1 мг/мл фосфолипидов). Хитозаны, не связавшиеся с липосомами, отделяли центрифугированием при 20000 g, отмывая липосомы буфером А. Флуоресценцию связавшихся хитозанов определяли в растворе после лизиса липосом 2 % тритоном X-100 в трех параллельных пробах. Связывание (в %) рассчитывали из отношения концентраций связанного к внесённому в реакцию хитозану. Концентрации определяли по флуоресценции из калибровочной кривой, и расчёт проводили на моносахаридное звено с учетом среднего содержания заместителей.

Определение размеров липосом нагруженных Х-НМ и Ац-Х-НМ. Гидродинамические диаметры и ζ -потенциалы липосом и их комплексов с хитозаном измеряли с помощью прибора ZetaSizerNanoZS (Malvern, Великобритания) при температуре 25°C, фиксированном угле рассеяния 173° и длине волны лазера 633 нм. Стабильность полученных липосом при хранении, проверяли гель-хроматографией на АСТА-FPLC хроматографе на колонке Superose 6 HR 10/30.

Определение ЛПС-связывающей активности хитозанов, включенных в липосомы. К липосомам, содержащим одинаковые количества хитозанов или их производных, добавляли ЛПС, меченный флуоресцеином (Ф-ЛПС) в различных концентрациях (3–100 мкг/мл в буфере Б). Смеси инкубировали в течение ночи при 37°C и Ф-ЛПС, несвязавшийся с липосомами, отделяли центрифугированием при 20000 g, отмывая липосомы буфером Б. Флуоресценцию связавшихся ЛПС определяли в растворе после лизиса липосом 2 % тритоном X-100 и рассчитывали относительную интенсивность флуоресценции.

Определение устойчивости липосом в условиях ЖКТ. Использовали среды моделирующие физиологические растворы [8]: 1) 0,7% раствор HCl (pH 1,2), содержащий 0,32% пепсина (желудок); 2) 0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,8), содержащий 8 мМ дезоксихолата Na (ДОХ) (доуденум, двенадцатиперстная кишка); 3) 0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,8), содержащий 0,01% раствор панкреатина, где липазы активированы добавлением 5 мМ CaCl_2 (тонкий кишечник). К образцу липосом, нагруженных флуоресцеин-Ац-Х-НМ

добавляли эквивалентный объем модельной жидкости и инкубировали полученную смесь 1 час и 24 часа при 37°C. Центрифугировали образцы 15 мин при 25000 g, удаляли супернатант, неразрушенные липосомы лизировали при разбавлении осадка 0,05 М трис-НСl буфером (pH 7,8) с 10% додецилсульфата Na (ДСН) до исходного объема и анализировали интенсивность флуоресценции раствора.

Модель эндотоксемии. Модель экспериментальной эндотоксемии создавали путём внутрибрюшинного (в/б) введения (мышам BALB/c летальной дозы (LD₁₀₀) ЛПС из *Escherichia coli* 055:B5 (6,25 ± 0,5 мг/кг). Наблюдение за животными проводили в течение 120 часов.

Время выживания мышей. Защитный эффект хитозана оценивали по проценту выживаемости (%) мышей BALB/c, которым вводили ЛПС LD₁₀₀(6,25 ± 0,5 мг/кг). Процент выживаемости рассчитывали по формуле: (количество выживших мышей/общее количество выживших и погибших мышей) × 100%. Мышей распределили на 5 групп (n = 10 в каждой группе): I – (контрольная) в/б вводили свободные липосомы вместе с ЛПС в дозе LD₁₀₀; II - вводили Ац-Х-НМ в растворе в дозе 5 мг/кг (2 раза в/б в день); III – вводили Х-НМ или Ац-Х-НМ или липосомы, нагруженные Ац-Х-НМ (в/б в дозе 5 мг/кг) мышам одновременно с ЛПС в дозе ЛД₁₀₀; IV - вводили Х-НМ или Ац-Х-НМ или липосомы, нагруженные Ац-Х-НМ (в дозе 5 мг/кг в/б) затем через 2 часа вводили ЛПС (в дозе ЛД₁₀₀, в/б); V группе мышей вводили Х-НМ или Ац-Х-НМ в растворе или липосомы, нагруженные Ац-Х-НМ в течение 7 дней (ежедневно, в дозе 2,5 мг/кг перорально), а затем вводили ЛПС в дозе LD₁₀₀.

Продукция фактора некроза опухоли альфа и интерлейкинов 6. Способность ЛПС и его комплексов с хитозанами индуцировать синтез фактора некроза опухоли (ФНО-α) и интерлейкина-6 в опытах *in vitro* была определена на основе следующей методики. Человеческая венозная кровь была помещена в 5 мл стерильные пробирки, содержащие 150IU гепарина, разбавлена 1:5 в стерильной среде 199 (Sigma, США), содержащей 300 мг/л L-глутамин (Sigma, США) и 50мкг/мл гентамицина («Белмедпрепарат», Белоруссия). Разбавленная кровь (0,1 мл) была перенесена в стерильный 96-луночный планшет (Costar) и инкубирована с ЛПС, хитозанами или комплексами ЛПС-Х-НМ - (37°C, 5% CO₂). Через 24 часа супернатанты были собраны и цитокины определены с помощью специфической тест-системы (ООО «Цитокин», Россия). Для индукции использовали растворы с концентрациями: ЛПС – 100 и 10 нг/мл; хитозана – 100 и 10 нг/мл; и комплекса ЛПС-ХН – (1:1 в/в) 200 и 20 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика липосом нагруженных Х-НМ и Ац-Х-НМ. Из данных спектрофотометрических измерений следовало, что почти весь хитозан (85%), введенный в реакцию, был включен в липосомы. Соотношение хитозана к фосфолипидам в липосомах составило 1:1600 моль/моль. Методами динамического светорассеяния и лазерного доплеровского электрофореза показано, что исходные липосомы имели узкое распределение по размерам, средний диаметр 250 нм и поверхностные ζ-потенциалы -20 мВ (табл. 1).

Липосомы, содержащие хитозан, увеличивали диаметр до 618 нм и меняли потенциал до +32 мВ. Появление положительного заряда на поверхности протеоллипосом, покрытых хитозаном, может играть важную роль в усилении адгезивных свойства липосом по отношению к муциновому слою слизистых поверхностей организма.

Установлено, что, введение Ац-Х-НМ повышает в 1,36-2 раза устойчивость липосом к агрессивному воздействию сред, моделирующих условия в некоторых отделах желудочно-кишечного тракта (рис. 1). Раствор, содержащий дезоксихолат натрия, в наибольшей степени воздействовал на хитоллипосомы.

Проведен сравнительный анализ защитных свойств хитозана (Х-НМ, 5,5 кДа) и Ац-Х-НМ в растворах и в составе фосфолипидных липосом при внутрибрюшинном (в/б) и пероральном (п/о) введении мышам при индукции эндотоксемии.

Профилактическое семикратное пероральное или двукратное внутрибрюшинное введение липосомальных форм Ац-Х-НМ снижает токсическое действие эндотоксина на организм мышей и достоверно увеличивает выживаемость (85-100 %) животных в эксперименте.

Хитозан обладал слабой цитокин-индуцирующей активностью, активация клеток и синтез ими интерлейкина и ФНО-α наблюдалось только при действии ацилированного хитозана и при действии Х-НМ отношении ИЛ-6. Как видно из полученных данных (рис. 2а, б), ЛПС в комплексе с хитозаном потерял способности индуцировать продукцию ИЛ-6 и ФНО *in vitro*. В случае комплекса ЛПС с хитозаном 80 кДа, наблюдается небольшое (на 20 %) увеличение синтеза ФНО-α. Для комплекса ЛПС с Ац-Х-НМ наблюдалось снижение его способности стимулировать синтез ФНО-α по сравнению с исходным ЛПС на 40%.

Таблица 1. Размер липосом и хитозан-липосом

№ образца	Размер (нм) – % (по интенсивности)	
липосомы	250±32	88%
	>4 мкм	12%
Ац-Х-НМ-липосомы	618±128	68±2%
	153±52	16±13%
	>4 мкм	15%±15%

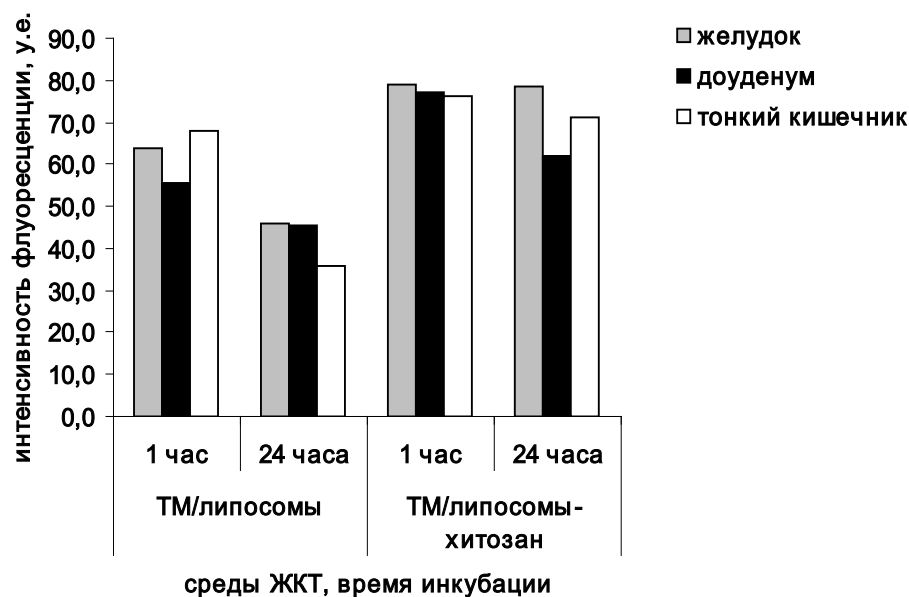


Рисунок 1. Флуоресценция Ф-Ац-Х-НМ (у.е.) в липосомах после инкубации в течение 1 ч и 24 ч при 37°C в средах, моделирующих условия ЖКТ: желудок (пепсин, 0,32% раствор), дуоденум, двенадцатиперстная кишка (деоксихолат натрия, 4мМ раствор); тонкий кишечник (панкреатин, 0,01% раствор)

Было показано, что комплекс ЛПС-Ац-Х-НМ сохраняет способность индуцировать ФНО- α , но индукция биосинтеза ФНО- α комплексом ЛПС-Ац-ХН была ниже, чем у исходного ЛПС. Связывание ЛПС со всеми исследованными хитозанами практически не влияло на способность эндотоксина стимулировать клетки крови к выработке ИЛ-6. Незначительное изменение способности ЛПС к синтезу интерлейкинов в результате комплексообразования с хитозанами [9], вероятно, можно объяснить тем, что взаимодействие ЛПС с хитозаном не вызывает конформационных перестроек эндотоксина, что, как было показано ранее, вызывает существенные изменения в способности ЛПС к индукции цитокинов. Исследования *in vivo* [10] показывают, что активация макрофагов и летальная токсичность липосом с включенными ЛПС или липид А уменьшаются на 100 и 10 раз соответственно. Доза липосом, тип везикул и путь введения, по-видимому, не влияет на этот эффект.

Таблица 2. Влияние Х-НМ, Ац-Х-НМ и их липосомальных форм на выживаемость мышей линии BALB/c при эндотоксемии

Группа	Время введения	Группа препаратов	Выживаемость, %
I	1-кратное в/б введение ЛПС	Липосомы	20
II	2-кратное в/б введение 5 мг/кг	Ац-Х-НМ	80
III	2-кратное в/б введение 5 мг/кг, вместе с ЛПС	Х-НМ	27
		Ац-Х-НМ	25
		Ац-Х-НМ+липосомы	30
IV	2-кратное в/б введение 5 мг/кг, за 2 ч до ЛПС	Х-НМ	66
		Ац-Х-НМ	73
		Х-НМ+липосомы	90
		Ац-Х-НМ+липосомы	100
V	7-кратное п/о введение 2,5 мг/кг, затем ЛПС	Х-НМ	50
		Ац-Х-НМ	66
		Х-НМ+липосомы	76
		Ац-Х-НМ+липосомы	85

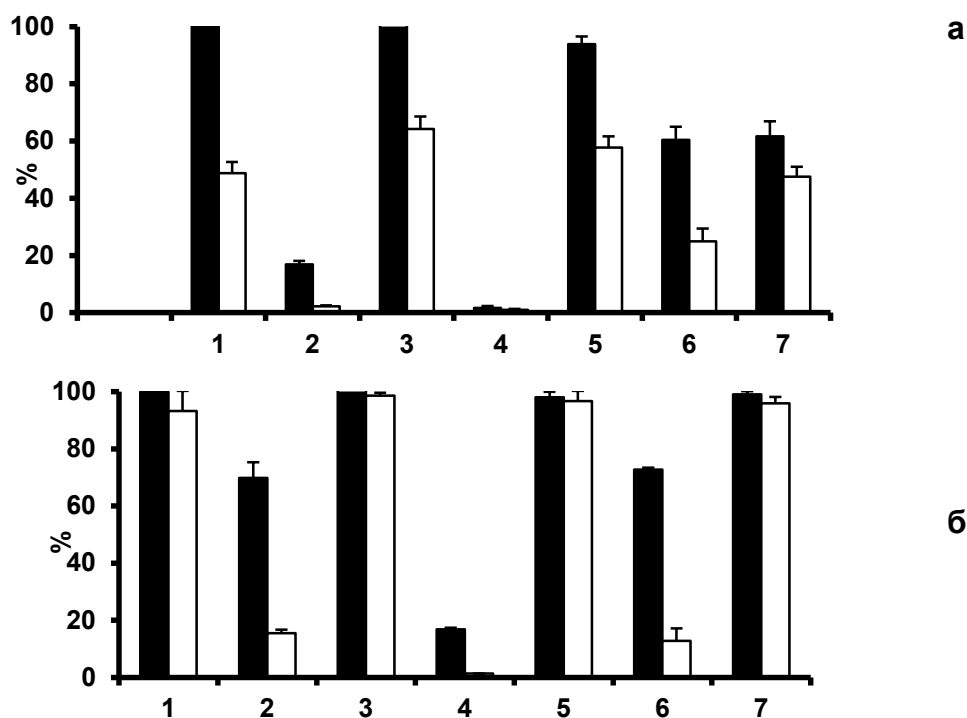


Рисунок 2. Уровень фактора некроза опухоли (ФНО- α) (а) и интерлейкина-6 (б), индуцированный: 1 – ЛПС; 2 – Хитозаном 80 кДа, 2% NAc; 3 – Комплексом ЛПС-ХН; 4 – Хитозаном 80 кДа, 15% NAc; 5 – Комплексом ЛПС-Хитозаном 80 кДа; 6 – Ац-Х-НМ; 7 – Комплексом ЛПС-Ац-Х-НМ;

■ СЛПС= 100 нг/мл; СХ-Н = 100нг/мл

□ СЛПС= 10 нг/мл; СХ-Н = 10нг/мл

Уровень синтеза цитокинов под действием ЛПС из *E. coli* 055 при наибольшей концентрации эндотоксина (100 нг/мл) был принят за 100%

Таким образом, профилактическое семикратное пероральное и двукратное внутривентральное введение липосомальных форм хитозанов снижает токсическое действие эндотоксина на организм мышей и достоверно увеличивает выживаемость (85-100%) животных в эксперименте. Липосомальные формы ацилированных хитозанов проявляли самую высокую активность по сравнению с неацилированными хитозанами и могут рассматриваться как перспективные препараты для снижения эндотоксического действия липополисахаридов.

Список литературы / References:

1. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, vol. 420, pp. 885-891, doi: 10.1038/nature01326.
2. Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J., Kuiper J. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 16, no. 3, pp. 379-414, doi: 10.1128/CMR.16.3.379-414.2003.
3. Яковлев М.Ю. Эндотоксиновая агрессия как пред болезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных. *Успехи соврем. биол.*, 2000, т. 123, № 1, с. 31-40 [Yakovlev M.Yu. Endotoxin aggression" as a pre-disease or a universal factor in the pathogenesis of human and animal diseases. *Advances Modern Biology.*, 2003, vol. 123, no. 1, pp. 31-40 (In Russ.)].
4. Andersson J., Melchers F., Galanos C., Luderitz O. The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A is the mitogenic part of the molecule. *J. Exp. Med.*, 1973, vol. 137, no. 4, pp. 943-53, doi: 10.1084/jem.137.4.943.
5. Yermak I.M., Davidova V.N., Gorbach V.I., Luk'yanov P.A., Solov'eva T.F., Ulmer A.J., Buwitt-Beckmann U., Rietschel E.T., Ovodov Yu.S. Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide-chitosan complexes. *Biochimie*, 2006, vol. 88, pp. 23-30, doi: 10.1016/j.biochi.2005.07.004.
6. Набережных Г.А., Горбач В.И., Лихацкая Г.Н., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф. Взаимодействие хитозанов и N-ацелированных производных хитозанов с липополисахаридами грамотрицательных бактерий. *Биохимия*, 2008, т. 73, № 4, с. 530-541 [Naberezhnykh G.F., Gorbach V.I., Likhatskaya G.N., Davydova V.N., Solovova T.F. Interaction of chitosan and N-acylated chitosan derivatives with lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, no. 4, pp. 530-541 (In Russ.)].
7. Набережных Г.А., Горбач В.И., Лихацкая Г.Н., Братская С.Ю., Соловьева Т.Ф. Взаимодействие ацилированных и n-алкилированных хитозанов, включенных в липосомы, с липополисахаридом грамотрицательных бактерий. *Биохимия*, 2013, т. 78, № 3, с. 398-406 [Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Likhatskaya G.N., Davydova V.N., Solovova T.F. Interaction of chitosan and N-acylated chitosan derivatives with lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, no. 4, pp. 530-541 (In Russ.)].

8. Мустафин Р.И., Ситенкова (Буховец) А.В., Фотаки Н. Особенности проведения предиктивного теста “растворение”. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 2017, т. 18, № 1, с. 156-162 [Mustafin R.I., Sitenkova (Bukhovets) A.V., Fotaki N. Features of the predictive “dissolution” test. *Development and registration of medicines*, 2017, vol. 18, no. 1, pp. 156-162 (In Russ.)].
9. Shih H-Jen, ChangChao-Yuan, Chiang M., Long LeVan, Hsu H-Jen, HuangChun-Jen. Simultaneous Inhibition of Three Major Cytokines and Its Therapeutic Effects: A Peptide-Based Novel Therapy against Endotoxemia in Mice. *J Pers Med.*, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 436-442, doi: 10.3390/jpm11050436.
10. Dijkstra J., Ellors J.W., Ryan J.L. Altered In Vivo Activity of Liposome-Incorporated Lipopolysaccharide and Lipid A. *Inf. Immunity*, 1989, vol. 57, no. 11, pp. 3357-3363, doi: 10.1128/iai.57.11.3357-3363.1989.

CHITOSANS AND ITS ACYLATED DERIVATIVES IN LIPOSOMAL FORM AS POTENTIAL THERAPEUTIC DRUGS FOR ENDOTOXEMIA

Naberezhnykh G.A., Bakholdina S.I., Davydova V.N., Solov'eva T.F.

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS

100 let Vladivostoku Ave., 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: naber1953@mail.ru

Received 09.07.2024

Abstract. Shock treatment strategies rely on removing excess LPS and/or blocking endotoxin binding to receptors on target cells. We have previously shown that natural polycations chitosans form stable complexes with anionic LPS and reduce its toxic effect. In this work, a comparative analysis of the protective properties of chitosan (Ch-L-MW, 5,5kDa) and its acylated derivative (Ac-Ch-LMW) in solutions and as part of phospholipid liposomes with intraperitoneal (i.p.) and oral (p.o.) administration was carried out in mice during the induction of endotoxic shock. Endotoxemia was modeled by intravenous administration of LPS from *Escherichia coli* 055:B5 (7.5 mg/kg) to mice. Ch-L-MW and Ac-Ch-L-MW were obtained by treating commercial chitosan. Chitoliposomes were obtained by sorption of Ch-LMW and Ac-Ch-L-MW on liposomes pre-formed from lecithin, cholesterol and dicetyl phosphate. It has been established that the introduction of Ac-Ch-L-MW increases by 1.36-2 times the resistance of liposomes to the aggressive effects of environments simulating conditions in some parts of the gastrointestinal tract. Using ELISA, it was shown that the complex of LPS with acylated chitosan reduces the induction of TNF- α in human blood by 40% compared to LPS, and the complex does not affect the ability of endotoxin to stimulate blood cells to produce IL-6. Thus, preventive seven-time oral and two-time intraperitoneal administration of liposomal forms of chitosans reduces the toxic effect of endotoxin on the body of mice and significantly increases the survival rate (85-100%) of animals in the experiment.

Key words: chitosan, lipopolysaccharide, liposomes, endotoxemia.

«НАВЯЗАННОЕ МЫШЛЕНИЕ» КАК РАБОТА ПОЛУ-РУКОТВОРНОГО МОЗГОВОГО МУЛЬТИВИБРАТОРА

Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, РФ; e-mail: v.kolombet@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.07.2024

Аннотация. Разъясняется вероятный механизм мышления человека. Теоретической основой статьи является широко известное экспериментальное выявление в головном мозге пары отдельных, но тесно взаимодействующих т.н. дорзальной и вентральной сетей внимания (DAN и VAN), реализующих внимание, во-первых, поддерживающее выбранную сознанием цель (лейтмотив), и, во-вторых, переключающее сознание на отвлекающие стимулы. Идея нашей статьи состоит в быстром возвращении от VAN к DAN, что приводит к возникновению колебаний (работы своеобразного мультивибратора в мышлении): это уже не свободное, а «навязанное» мышление. Создание и поддержание «навязанного мышления» реализуется после согласия испытуемого на выполнение алгоритма цепного вербального теста, где исходный случайно выбранный лейтмотив испытуемый поддерживает выписыванием слов-ассоциаций к этому лейтмотиву (DAN), а по завершении выписывания ассоциаций в любой удобный испытуемому момент (это момент перехода от DAN к VAN), испытуемый переключается на выписывание ассоциаций уже к последнему записанному слову (это момент перехода от VAN к DAN). Обычно выполнение теста занимает не более получаса. Обработка результатов теста производится программой на языке Python – для английских слов существуют оценки, извлекающие количественные значения «тональности» из смысла слов, экспериментального материала качественной природы. Оказывается, в мышлении проявляется цикл из восьми последовательных колебаний, сканирующий широкий диапазон тональности (настроения). Предложенный метод может использоваться для контроля психического статуса испытуемых и при подборе методик лечения пациентов.

Ключевые слова: внимание, настроение, цепной вербальный тест, дорзальная сеть внимания, DAN, вентральная сеть внимания, VAN, тональность, моноцикл, мультивибратор, мультицикл, механизм мышления, шизофрения, депрессия, «навязанное мышление».

В огромном числе работ, последовавших за посвящённой «описанию двух сетей внимания в мозге – целенаправленной и управляемой внешними стимулами» [1] – множеством экспериментаторов при изучении головного мозга были подробно исследованы две отдельные, но тесно связанные сети (networks) внимания – эндогенная дорзальная и экзогенная вентральная, кратко обозначаемые как DAN и VAN (рис.1). Огрубляя, можно сказать, что система DAN направлена на поддержание и сопровождение цели, захватившей внимание, а система VAN, получив внешний отвлекающий стимул, просто срывает работу DAN.

Можно заикнуть мышление, подав в момент VAN сигнал с выхода DAN снова на вход DAN и таким способом образовать моноцикл, по-русски – одновибратор. Последовательность сцепленных одновибраторов представляет собой периодические колебания, что выглядит как проявление работы мультивибратора (рис. 2).

Этот мультивибратор, как выяснилось, состоит у человека из немного отличающихся моноциклов, и заметно более полное повторение возникает лишь через 8 моноциклов, т.е. мультивибратор формирует мультицикл (рис. 3). Причиной сворачивания последовательности моноциклов в мультицикл может оказаться проявившееся в созданном нами цепном вербальном тесте [2] сопутствующее небольшое, но существенное дискретное изменение настроения при каждом переходе к следующему моноциклу [2-6]. По-видимому, дискретные скачки настроения выполняют роль храповика; они выглядят способом сканирования широкого диапазона настроений.

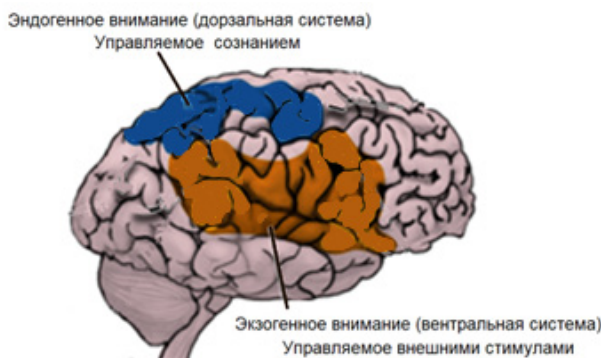


Рисунок 1. Иллюстрация к теме статьи [1]

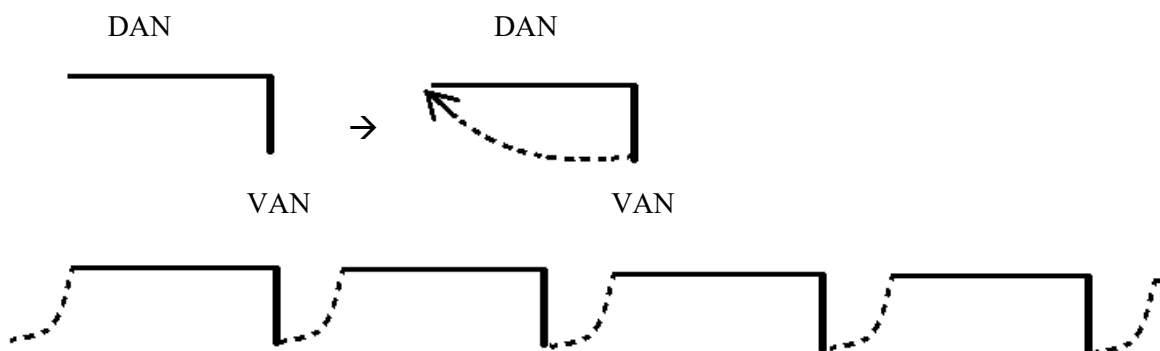


Рисунок 2. Схемы, поясняющие образование моноцикла и мультивибратора в мышлении

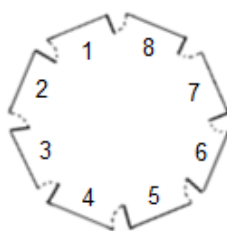


Рисунок 3. Мультицикл в мышлении

Создание и поддержание «навязанного мышления» реализуется после согласия испытуемого на выполнение алгоритма цепного вербального теста, где исходный случайно выбранный лейтмотив испытуемый поддерживает выписыванием слов-ассоциаций к этому лейтмотиву, а по завершении выписывания ассоциаций в момент (это момент перехода от DAN к VAN) на выписывание ассоциаций уже к последнему записанному слову, т.е. снова к этапу DAN. Обычно выполнение теста занимает не более получаса. В таблице 1 и на рисунке 4 дан пример выполнения цепного вербального теста, где DAN создаёт серии вербальных ассоциаций на темы, привлёкшие внимание. Это пример «мышления, навязанного» цепным вербальным тестом.

Таблица 1. Цепной вербальный тест № 069: имя тестирующегося – Unit

Строки	Оценка «тональности» строки
кот: домашний, сфинкс, мачкинс, рысь, манул, вислоухий, дикий, бешеный, заразный, болезненный	-0,65
болезненный: ковид, рана, порез, перелом, треск, воспоминание, слова, действие, бег, ходьба, спортивная	-0,27
спортивная: боулинг, бейсбол, гольф, футбол, баскетбол, волейбол, фрисби, бег, пешая, быстрота	0
быстрота: работа, скорость, эффективность, хорошость, спортсмен, кассир, бармен	0,67
бармен: Алкоголь, напитки, еда, вода, заказы, готовка, газировки, безалкогольный, добрый, работающий	0,53
работающий: Строитель, клерк, доктор, тракторист, фермер, программист, повар, полицейский, смотрящий, боксёр, судья	0
судья: суд, решение, тюрьма, свобода, мир, осуждение, разочарование, судимость.	-0,73
судимость: убийство, воровство, кража, погоня, сталкерство, слежка, подделывание, обман, подкидывание, закладки	-0,82
закладки: Книги, Нелегал, запоминание, замечание, помощь, закрепление, учение, заставление,, память.	-0,23



Рисунок 4. Представления результата цепного вербального теста №069. Справа – итог: трасса настроения в мультицикле

См. программу на языке Python для численной оценки «тональности» цепи вербальных ассоциаций, т.е. для получения количественных значений из смысла слов – экспериментального материала качественной природы:

```
import nltk
from nltk.sentiment.vader import SentimentIntensityAnalyzer

# Инициализируем анализатор тональности
sid = SentimentIntensityAnalyzer()

# Список английских слов для анализа
words = ["Cars, Rabbit, Plastic, Teddy Bear, Toy Soldiers"]
# Проходимся по каждому слову, оцениваем его тональность и выводим результат
for word in words:
    ss = sid.polarity_scores(word)
    print(f"{word}: {ss}")
```

Оказалось, что мышление человека разбивается на четвёрку возможных реализаций мультицикла (рис. 5).

Секторы №2 ÷ №4 мультицикла, окрашенные на рисунках 4-6 в теплые цвета, концентрируются возле жёлтого сектора №3 (сектора максимума положительного настроения), а сектора холодных цветов №5 ÷ №7 окружают синий сектор №6 (сектор максимума негативного настроения). Особое значение имеют верхняя и нижняя точки мультицикла: в них нередко происходит «сбой» обычной работы «храповика»; тогда он начинает действовать во встречном направлении [2-6].

Рисунок 6 – это предварительный итог анализа цепных вербальных тестов, выполненных многими сотнями анонимных волонтеров: мы предположили наличие характерных положений точек старта тестов у здоровых людей и у людей с психическими аномалиями.



Рисунок 5. Результаты цепных вербальных тестов выявляют четвёрку характерных фрагментов мышления: благодушие, стресс, подавленность и норму. Аналогично Рисунку 4 мультициклы изображены как разноцветные восьмисекторные круги



Рисунок 6. Здоровое мышление может отличаться в цепном вербальном тесте от мышления при характерных ментальных аномалиях наличием предпочтительного крупного смещения позиции старта теста

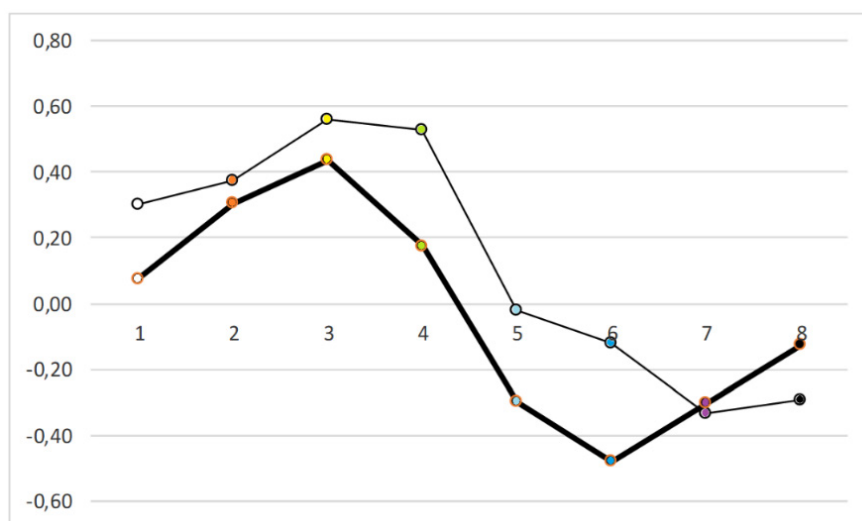


Рисунок 7. Изменения в восьмёрке тональностей (настроений). Нижняя волна (контроль) – итог усреднения значений тональности по результатам четырёх недель однократных ежевечерних тестов. Верхняя кривая (опыт) – итог усреднения по разделённым 4-недельным интервалам времени первым неделям трёх 5-недельных циклов, когда лечащий врач вводил в начале недели (и цикла) своему пациенту (нашему волонтеру) очередную порцию галоперидола деканоата. Настроения пациента в состояниях №1÷№6 улучшились, однако в затронутых депрессией состояниях №7 и №8 улучшения не произошло.

Рисунок 7 – это пример воздействия галоперидола деканоата – химического препарата с редко гидролизующейся эфирной связью, расположенной между галоперидолом в водной среде и закиснувшемся в масле «жирным» деканоатом. После внутримышечного введения дозы масляного раствора галоперидола деканоата около месяца в кровотоке пациента выделяются молекулы галоперидола, отщепляющиеся от гидролиза с поверхности раздела фаз вода/масло. В результате почти полугодового опыта – добровольного ежевечернего выполнения теста больным шизофренией, проходившим поддерживающее лечение в психоневрологическом диспансере, а именно, введения ему один раз в пять недель дозы галоперидола деканоата – мы смогли предположить, что на фоне эйфории, очевидной у больного в первые дни после укола, *скрыта депрессия*. Мы предположили также, что в столь парадоксальной ситуации вроде бы повеселевшего (рис. 7) больного следует параллельно лечить ещё и от депрессии, (по-видимому, стандартными антидепрессантами на основе селективных ингибиторов обратного захвата серотонина и норадреналина).

Работа выполнена по госзаданию ИТЭБ РАН, № регистрации 075-00224-24-03.

Список литературы / References:

1. Corbetta M., Shulman G.L. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nat Rev Neurosci.*, 2002, vol. 3, no. 3, pp. 201-215, doi: 10.1038/nrn755. PMID: 11994752.
2. Коломбет В. Трансфизические миры. В кн.: В. Коломбет. Трансфизические миры. Происхождение имён. М.: КРОН-ПРЕСС, 2001, 864 с. [Kolombet V. *Transphysical worlds*. In the book: V. Kolombet. *Transphysical worlds*. The origin of names. M.: KRON-PRESS, 2001, 864 p. (In Russ.)].
3. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Психоанализ как биофизический метод. *Известия Института инженерной физики*, 2023, № 4 (70), с. 2-5 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. Psychoanalysis as a biophysical method. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2023, no. 4 (70), pp. 2-5 (In Russ.)].
4. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Коломбет В.В. Представление структуры естественного интеллекта в биофизическом психоанализе. *Известия Института инженерной физики*, 2024, № 1 (71), с. 13-17 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Kolombet V.V. Representation of the structure of natural intelligence in biophysical psychoanalysis. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 1 (71), pp. 13-17 (In Russ.)].
5. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Перспектива исследования психоактивных веществ в биофизическом психоанализе. *Известия Института инженерной физики*, 2024, № 2 (72), с. 49-56 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. The perspective of the study of psychoactive substances in biophysical psychoanalysis. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 2 (72), pp. 49-56 (In Russ.)].
6. Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В. Перспектива физиологических исследований в биофизическом психоанализе. *Известия Института инженерной физики*, 2024, № 3 (73), с. 88-98 [Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V. The perspective of physiological research in biological psychoanalysis. *Izvestiya Instituta ingzhenernoy fiziki*, 2024, no. 3 (73), pp. 88-98 (In Russ.)].

«IMPOSED THINKING» AS THE WORK OF A SEMI-ARTIFICIAL BRAIN MULTIVIBRATOR

Kolombet V.A., Lesnykh V.N., Elistratov A.V.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
Institutskaya str., 3, Pushchino, Moscow region, Russia 142290; e-mail: v.kolombet@rambler.ru

Received 13.07.2024

Abstract. The probable mechanism of human thinking is explained. The theoretical foundation of the article is based on the well-known experimental identification in the brain of a pair of separate but closely interacting so-called dorsal and ventral attention networks (DAN and VAN), which implement attention that, on the one hand, supports a consciously chosen goal (leitmotif) and, on the other hand, shifts consciousness to distracting stimuli. The idea of our article is centered on the rapid return from VAN to DAN, which leads to the emergence of oscillations (the operation of a kind of multivibrator in thinking): this is no longer free thinking but "imposed" thinking. The creation and maintenance of "imposed thinking" is realized after the subject agrees to perform the algorithm of the chain verbal test, where the initially randomly chosen leitmotif is supported by the subject through writing down associative words related to this leitmotif (DAN). Upon completion of the association writing, at any convenient moment for the subject (this is the moment of transition from DAN to VAN), the subject switches to writing associations related to the last recorded word (this is the moment of transition from VAN to DAN). Typically, the test takes no more than half an hour. The processing of the test results is carried out using a program in Python – there are assessments for English words that extract quantitative values of "tonality" from the meaning of words, which is experimental material of a qualitative nature. It turns out that thinking manifests a cycle of eight sequential oscillations, scanning a wide range of tonalities (moods). The proposed method can be used for monitoring the mental status of subjects and for selecting treatment methods for patients.

Key words: *attention, mood, chain verbal test, dorsal attention network, DAN, ventral attention network, VAN, tonality, monocycle, multivibrator, multicycle, mechanism of thinking, schizophrenia, depression, «imposed thinking».*

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОСМОТИЧЕСКОЙ ГРАДИЕНТНОЙ ЭКТАЦИТОМЕТРИИ

Никитина Е.Р., Чеботарева М.А., Шуколюкова Е.П., Полина Ю.А., Катюхин Л.Н.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
просп. Тореза, 44, г. Санкт-Петербург, 194223, РФ; e-mail: elena.nikitina@bk.ru

Поступила в редакцию 15.07.2024

Аннотация. Деформируемость эритроцитов является ключевым фактором, определяющим кровоток в микроциркуляции. Любое снижение деформируемости эритроцитов может влиять на сопротивление кровотоку, снижение перфузии и насыщения кислородом органов и тканей, а, следовательно, и на их повреждение. Эритроциты все чаще признаются в качестве биомаркеров различных заболеваний. Изначально такими заболеваниями были наследственные и приобретенные анемии. По мере развития диагностических методов и научных исследований, круг заболеваний расширился и в него вошли патологии, которые в первую очередь не связаны с эритроцитами: воспаления, сердечно-сосудистые нарушения, диабет 1 и 2 типа, онкология. Однако, в настоящее время тесты, которые могли бы установить связь между факторами, определяющими тяжесть системного патологического состояния и свойствами эритроцитов, отсутствуют. А в качестве таких маркеров используются обычные показатели эритроцитов. Недавние исследования выявили многообещающий потенциал функциональных тестов, включая реологию эритроцитов. Одним из таких тестов является метод осмотической градиентной эктацитометрии. Он позволяет провести оперативную и информативную оценку деформируемости эритроцитов и считается «золотым стандартом» для измерения их деформируемости.

Ключевые слова: осмотическая градиентная эктацитометрия, деформируемость эритроцитов, диагностический потенциал.

Эритроциты, являющиеся самыми многочисленными клетками крови, способны оказывать наибольшее влияние на реологию крови [1]. Деформируемость эритроцитов является ключевым фактором, определяющим кровоток в микроциркуляции. Во время транспорта по сосудам эритроциты подвергаются вызванному кровотоком напряжению сдвига и окислительному стрессу. Благодаря уникальным биохимическим и биофизическим свойствам эритроцитов, определяющих их функциональность, они противостоят этим условиям. Еще в 70-х годах прошлого века ученые начали проводить эксперименты по анализу деформируемости эритроцитов, в которых использовались микротрубочки [2] и реоскопы [3]. Позднее, в 80-х годах Бессисом и Мохандасом [4] был разработан метод, способный измерять деформацию эритроцитов – эктоцитометрия. Этот метод направлен на исследование деформационных свойств и установление нарушений в мембранах эритроцитов. Оксигенация клеток и тканей организма зависит не только от способности гемоглобина связывать и отдавать кислород, но и от реологических свойств крови, которые определяются способностью эритроцитов деформироваться, поскольку их функции реализуются через свободную поверхность мембран. Деформируемость эритроцитов, является одним из главных показателей их функционального состояния. Именно благодаря этому свойству, а также высокому отношению площади к объему, эритроциты способны проникать через сеть тончайших капилляров и эффективно транспортировать газы.

Среди факторов, влияющих на деформируемость эритроцитов можно выделить следующие: концентрация гемоглобина в эритроците, температура, осмотическое давление, истощение запасов АТФ, концентрация NO, нарушение белково-липидных взаимодействий. Мембрана эритроцитов представляет собой сложную структуру, состоящую из липидного бислоя, связанного с мембранным каркасом на основе спектрина/актина, который придает эритроцитам уникальные свойства деформируемости и механической стабильности. Поддержание оптимальной формы эритроцита, обеспечивающей адекватное участие клетки в газообмене, достигается также за счет стабильности катион-транспортных систем клетки и хорошо сбалансированной молекулярной организации белкового и липидного компонентов мембраны эритроцита. Нарушение деформируемости эритроцитов, повышенная вязкость крови, гиперагрегация приводят к снижению капиллярного кровотока, ишемии и гипоксии органов и тканей, что играет важную роль в патогенезе различных заболеваний.

Ранее для оценки деформируемости эритроцитов использовались такие экспериментальные методы как центрифугирование [5], фильтрация [6], реоскопия [7]. Аспирация микропипеткой и морфометрия эритроцитов в потоке все еще используются для оценки деформируемости [8-10]. Однако, они либо недостаточно информативны, либо трудоемки по выполнению. В настоящее время метод осмотической градиентной эктацитометрии, позволяющий провести оперативную и информативную оценку деформируемости эритроцитов, считается «золотым стандартом» для измерения деформируемости [11,12]. Осмотическая градиентная эктацитометрия является очень чувствительным методом. При гематологических заболеваниях, когда изменяется морфология эритроцитов, их строение и, особенно, соотношение поверхности к объему клетки, этот метод является очень информативным [11-14].

Изначально эктацитометрия использовалась для исследования наследственных нарушений мембран эритроцитов, таких как серповидно-клеточная и гемолитическая анемия [15,16], когда деформируемость эритроцитов была значительно снижена. С развитием метода эктацитометрии его начали использовать в

клинической диагностике этих заболеваний [17]. Были обнаружены другие факторы, способствующие снижению деформационных свойств эритроцитов. Например, выяснилось, что деформируемость эритроцитов зависит от железа: при дефиците железа она снижается, а хрупкость эритроцитов возрастает [18]. Было обнаружено, что фракция мембраносвязанного гемоглобина влияет на реологию и метаболизм эритроцитов [19]. Livshits с коллегами (2023) показали, что общее содержание и вариативное распределение гемоглобина тесно связаны с присутствием Ca^{2+} во внеклеточной среде, и любое колебание уровня Ca^{2+} может существенно влиять на мембранную фракцию гемоглобина. Также как и колебания уровня Ca^{2+} в цитозоле влияют на примембранный пул гемоглобина, что приводит к массовому переносу гемоглобина в цитозоль клетки [19]. Lamis с соавторами (2021) обнаружили снижение деформируемости и повышение осмотической резистентности эритроцитов из-за более высокой экспрессии белка Band3 и более сильного взаимодействия Band3 с аквапорином [20].

В настоящее время деформируемость эритроцитов определяется исключительно физическими методами с использованием различных методик, таких как атомно-силовая микроскопия [21], оптический метод [22], микрофлюидная фильтрация [23], лазерная дифрактометрия [24] и прямая визуализация изменения формы клеток под действием потока в проточной камере [25].

Преимущества эктацитометрии по сравнению с другими методами исследования включают чувствительность, точность и простоту использования. Принцип метода эктацитометрии заключается в том, что образцы крови подвергаются воздействию определенного напряжения сдвига и осмотического градиента с регистрацией картины лазерной дифракции, генерируемой суспензией эритроцитов. По мере увеличения напряжения сдвига форма эритроцитов меняется с круглой на эллиптическую. Индекс удлинения (EI) выражается в условных единицах, отражающих отношение между наименьшим и наибольшим диаметрами для дифракционного изображения [26]. Кривые осмотического градиента (осмосканы) отражают деформируемость эритроцитов как непрерывную функцию осмоляльности суспензионной среды. Изображение осмоскана, полученное методом эктацитометрии, показано на рисунке 1.

Осмоскан имеет несколько информативных параметров. К ним относятся $EI_{\max}$ – индекс максимального удлинения или показатель максимальной деформируемости эритроцитов в ответ на возрастающее напряжение сдвига; $EI_{\min}$ – минимальный индекс удлинения, показатель отношения поверхности к объему.

Устойчивость эритроцитов к сдвигу определялась минимальной ($O_{\min}$) и максимальной (O_{hyper}) осмоляльностями, которые клетки могли переносить при сдвиге; разница между ними (ΔO) – диапазон осмотической устойчивости. Общая устойчивость эритроцитов к напряжению сдвига во всем диапазоне переносимых осмоляльностей определялась как площадь под кривой (A_{uc}) [25], которая является косвенным показателем деформируемости эритроцитов.

Считается, что осмоскан также может предоставлять косвенную информацию о возрасте эритроцитов, морфологии (как статической, так и в потоке), а также об окислительно-восстановительном состоянии эритроцитов [27]. Эктацитометрия в настоящее время за рубежом широко используется для диагностики наследственных нарушений мембраны эритроцитов, таких как наследственный сфероцитоз, наследственный

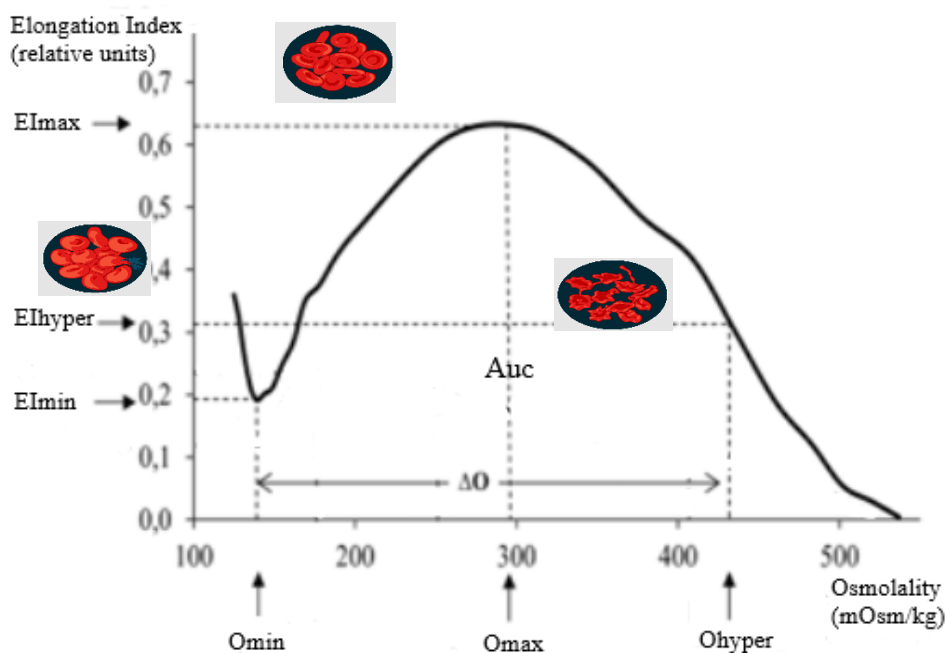


Рисунок 1. Осмоскан, полученный методом осмотической градиентной эктацитометрии при напряжении сдвига 30 Па. Ось ОХ – Osmolality (mOsm/kg) - осмоляльность (мОсм/кг); ось ОУ – Elongation Index – индекс удлинения (условных единиц)

эллиптоцитоз и наследственный пиропойкилоцитоз [28-30]. Она зарекомендовала себя как полезный и надежный тест в диагностике наследственных гемолитических анемий, связанных с мутациями в белках цитоскелета, ионных каналах, метаболических ферментах и гемоглобине (Hb), поскольку каждая патология приводит к характерному сдвигу кривой осмоскана [7].

В связи с развитием метода осмотической градиентной эктацитометрии были проведены исследования и установлено снижение деформируемости эритроцитов при различных типах диабета [31], ишемических повреждениях [32] сердечно-сосудистых заболеваниях [33,34] и онкологии [35,36]. Старение эритроцитов, также связано с метаболическими и структурными изменениями [37], которые приводят к ремоделированию клеточной мембраны и изменению состава цитоплазмы [38] и, в конечном счете, к снижению деформируемости.

Однако, несмотря на многочисленные преимущества метода эктацитометрии, такие функциональные тесты в настоящее время доступны только в нескольких клинических лабораториях на Западе, а оборудование для их проведения в стандартизированных условиях ограничено. В Российской Федерации данная методика не используется, по-видимому, по двум причинам: во-первых, недостаточная информированность о наличии такой методики и, во-вторых, очень высокая стоимость прибора (эктацитометра). С использованием осмотического градиентного эктацитометра, созданного сотрудниками нашей группы, мы исследовали деформируемость эритроцитов гибернаторов – сусликов (*Spermophilus pygmaeus*) в различные сезоны года [39] и в динамике выхода из спячки (при различных температурах тела животного). Были выявлены адаптивные изменения деформируемости эритроцитов и гематологических показателей сусликов в активный период. Мы впервые обнаружили сезонную изменчивость деформируемости эритроцитов сусликов, которая соответствовала весенне-летней активности животных и подготовке к спячке. Анализ деформируемости эритроцитов при малом сдвиговом напряжении позволил установить изменения вязкоупругих свойств мембран эритроцитов сусликов в разные сезоны года. В данной работе был использован подход для анализа индекса деформируемости при низких скоростях сдвига, что расширяет возможности лазерной эктацитометрии для оценки микровязкости клеточных мембран. Нами проводилось исследование деформируемости эритроцитов экспериментальных животных (крыс) под влиянием диабета и лекарственных препаратов от нейропатических болей при сахарном диабете; при индуцированной ишемии/реперфузии и препарате для ее лечения. Мы заметили, что деформируемость эритроцитов крыс, сниженная при сахарном диабете 1 типа восстанавливалась при применении лекарств от нейропатической боли. Мы обнаружили, что осмотическая градиентная эктацитометрия чувствительна к изменению течения заболевания и к лечению (неопубликованные данные). Поскольку нарушения реологии крови являются отличительной чертой патофизиологии большого количества заболеваний, мы полагаем, что эктацитометрию можно использовать в РФ как инструмент для диагностики тяжести различных заболеваний и в процессе лечения (для коррекции лечения). Более того, в описании к лекарственным препаратам отсутствуют данные по действию препаратов на реологию крови. Выбирая препараты для лечения больных, необходимо учитывать если не их способность улучшать, то, по крайней мере, не оказывать отрицательного влияния на реологические свойства крови, такие как деформируемость. Таким образом, анализ деформируемости эритроцитов может стать ценным дополнением к другим методам диагностики заболеваний, а мониторинг свойств эритроцитов с помощью эктацитометра может помочь в диагностике и оценке эффективности проводимого лечения.

Работа выполнена в рамках Госзадания N 075-00264 24 00.

Список литературы / References:

1. Pop G.A., Duncker D.J., Gardien M., Vranckx P., Versluis S., Hasan D., Slager C.J. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine. *Netherlands Heart Journal*, 2002, no. 10, pp. 512-516.
2. Goldsmith H.L., Frank J.M., MacIntosh C. Flow behaviour of erythrocytes. Rotation and deformation in dilute suspensions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1972, no. 182, pp. 351-384.
3. Fischer T.M., Stohr-Lissen M., Schmid-Schonbein H. The red cell as a fluid droplet: tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science*, 1978, no. 202, pp. 894-896, doi: 10.1126/science.715448.
4. Bessis M., Mohandas N., Feo C. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. *Blood Cell*, 1980, vol. 6, no. 3, pp. 315-327.
5. Corry W.D., Meiselman H.J. Centrifugal method of determining red cell deformability. *Blood*, 1978, vol. 51, no. 4, pp. 693-701.
6. Chien S. Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability. *Blood Cells*, 1980, no. 3, pp. 71-99.
7. Mohandas N., Clark M.R., Jacobs M.S., Shohet S.B. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *Journal of Clinical Investigation*, 1980, no. 66, pp. 563-573, doi: 10.1172/JCI109888.
8. Linderkamp O., Nash G.B., Wu P.Y., Meiselman H.J. Deformability and intrinsic material properties of neonatal red blood cells. *Blood*, 1986, vol. 67, pp. 1244-1250, doi: 10.1182/blood.V67.5.1244.1244.
9. Relevy H., Koshkaryev A., Manny N., Yedgar S., Barshtein G. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*, 2008, vol. 48, pp. 136-146, doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01491.x.
10. Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schifflers R.M., Kaestner L., van Wijk R. Squeezing for life – properties of red blood cell deformability. *Frontier Physiology*, 2018, no. 9, p. 656, doi: 10.3389/fphys.2018.00656.
11. Clark M.R., Mohandas N., Shohet S.B. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood*, 1983, no. 61, pp. 899-910.

12. Cynober T., Mohandas N., Tchernia G. Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. *Journal Laboratory Clinical Medicine*, 1996, no. 128, pp. 259-269.
13. Bילו Y.Y., Abdalla S.S. Effects of selected flavonoids on deformability, osmotic fragility and aggregation of human erythrocytes. *Clinical Hemorheology Microcirculation*, 1998, no. 18, pp. 165-173.
14. Finkelstein A., Talbot H., Töpsu S., Cynober T., Garçon L., Havkin G., Kuypers F. Comparison between a camera and a fourquadrant detector, in the measurement of red blood cell deformability as a function of osmolality. *Journal of Medical Bioenetics*, 2013, no. 2, pp. 62-65.
15. Bessis M., Mohandas N. Laser Diffraction Patterns of Sickle Cells in Fluid Shear Fields. *Blood Cells*, 1977, no. 3, pp. 229-239.
16. Clark M.R., Mohandas N., Shohet S.B. Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells. *Journal of Clinical Investigation*, 1980, no. 65, pp. 189-196, doi: 10.1172/JCI109650.
17. Johnson R.M., Ravindranath Y. Osmotic scan ektacytometry in clinical diagnosis. *Journal Pediatric Hematology and Oncology*, 1996, no. 18, pp. 122-129.
18. Anderson C., Aronson I., Jacobs P. Erythrocyte Deformability is Reduced and Fragility increased by Iron Deficiency. *Hematology*, 1999, vol. 4, no. 5, pp. 457-460.
19. Livshits L., Peretz S., Bogdanova A., Zoabi H., Eitam H., Barshtein G., Galindo C., Feldman Y., Pajic-Lijakovic I., Koren A., Gassmann M., Levin C. The Impact of Ca²⁺ on Intracellular Distribution of Hemoglobin in Human Erythrocytes. *Cells*, 2023, vol. 12, no. 18, p. 2280, doi: 10.3390/cells12182280.
20. Lamis R.J.S., Chiueh T.-S., Tsai C.-H., Lo H.-R., Wei S.-C., Chao Y.-C. Identification and Quantification of Anti-Gp.Mur Antibodies in Human Serum Using an Insect-Cell-Based System. *Diagnostics*, 2021, no. 11, p. 966, doi: 10.3390/diagnostics11060966.
21. Sergunova V., Leesment S., Kozlov A., Inozemtsev V., Platitsina P., Lyapunova S., Onufrievich A., Polyakov V., Sherstyukova E. Investigation of Red Blood Cells by Atomic Force Microscopy. *Sensors*, 2022, no. 22, p. 2055, doi: 10.3390/s22052055.
22. Brandao M.M., Fontes A., Barjas-Castro M.L., Barbosa L.C., Costa F.F., Cesar C.L., Saad S.T. Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: Application to the study of drug response in sickle cell disease. *European Journal Haematology*, 2003, no. 70, pp. 207-211, doi: 10.1034/j.1600-0609.2003.00027.x.
23. Islamzada E., Matthews K., Guo Q., Santoso A.T., Duffy S.P., Scott M.D., Ma H. Deformability based sorting of stored red blood cells reveals donor-dependent aging curves. *Lab on a Chip*, 2020, no. 20, pp. 226-235, doi: 10.1039/C9LC01058K.
24. Rabai M., Meiselman H.J., Wenby R.B., Dettlerich J.A., Feinberg J. Analysis of light scattering by red blood cells in ektacytometry using global pattern fitting. *Biorheology*, 2012, no. 49, pp. 317-328, doi: 10.3233/BIR-2012-0616.
25. Faustino V., Rodrigues R.O., Pinho D., Costa E., Santos-Silva A., Miranda V., Amaral J.S., Lima R. A Microfluidic Deformability Assessment of Pathological Red Blood Cells Flowing in a Hyperbolic Converging Microchannel. *Micromachines*, 2019, no. 10, p. 645, doi: 10.3390/mi10100645.
26. Mohandas N., Clark M.R., Jacobs M.S., Groner W., Shohet S.B. Ektacytometric analysis of factors regulating red cell deformability. *Blood Cells*, 1980, no. 6, pp. 329-334.
27. Van Cromvoirt A.M., Fenk S. et al. Donor Age and Red Cell Age Contribute to the Variance in Lorrca Indices in Healthy Donors for Next Generation Ektacytometry: A Pilot Study. *Frontier Physiology*, 2021, no. 12, p. 639722, doi: 10.3389/fphys.2021.639722.
28. Da Costa L., Suner L., Galimand J., Bonnel A., Pascreau T., Couque N., Fenneteau O., Mohandas N. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2016, vol. 56, no. 1, pp. 9-22.
29. Johnson R.M., Ravindranath Y. Osmotic scan ektacytometry in clinical diagnosis. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 1996, vol. 18, no. 2, pp. 122-129.
30. Lazarova E., Gulbis B., Oirschot B.V., van Wijk R. Next-generation osmotic gradient ektacytometry for the diagnosis of hereditary spherocytosis: interlaboratory method validation and experience. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017, vol. 55, no. 3, pp. 394-402.
31. Skinner S., Connes P. et al. Altered blood rheology and impaired pressure-induced cutaneous vasodilation in a mouse model of combined type 2 diabetes and sickle cell trait. *Microvascular Research*, 2019, no. 122, pp. 111-116, doi: 10.1016/j.mvr.2018.11.014.
32. Nash G.B. Blood rheology and ischaemia. *Eye (London)*, 1991, vol. 5, no. 2, pp. 151-158, doi: 10.1038/eye.1991.29.
33. Toth K., Mezey B., Juricskay I., Simor T., Javor T. Hemorheologic parameters during the 6 months following myocardial infarct. *Orvosi Hetilap*, 1990, vol. 131, no. 14, pp. 727-730.
34. Tikhomirova I., Petrochenko E., Muravyov A., Malysheva Y., Petrochenko A., Yakusevich V., Oslyakova. Microcirculation and blood rheology abnormalities in chronic heart failure. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2017, vol. 65, no. 4, pp. 383-391, doi: 10.3233/CH-16206.
35. Caimi G., Carlisi M., Montana M., Gallà E., Lo Presti R., Hopps E., Siragusa S. Erythrocyte deformability and hemorheological profile in multiple myeloma. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2018, vol. 68, no. 1, pp. 25-34, doi: 10.3233/CH-170267.

36. Sengoz T., Kilic-Toprak E. et al. Hemorheology and oxidative stress in patients with differentiated thyroid cancer following I-131 ablation/metastasis treatment. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2020, vol. 74, no. 2, pp. 209-221, doi: 10.3233/CH-190717.
37. Livshits L., Barshtein G., Arbell D., Gural A., Levin C., Guizouarn H. Do We Store Packed Red Blood Cells under “Quasi-Diabetic” Conditions? *Biomolecules*, 2021, no. 11, p. 992, doi: 10.3390/biom11070992.
38. Bosman G.J., Lasonder E., Groenen-Dopp Y.A., Willekens F.L., Werre J.M., Novotny V.M. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *Journal of Proteomic*, 2010, no. 73, pp. 396-402, doi: 10.1016/j.jprot.2009.07.010.
39. Katiukhin L.N., Chalabov S.I., Bekshokov K.S., Pokhmelnova M.S., Klichkhanov N.K., Nikitina E.R. Seasonal changes in blood rheology in little ground squirrels. *Journal of Experimental Zoology (A) Ecology and Integrative Physiology*, 2023, vol. 339, no. 5, pp. 474-486, doi: 10.1002/jez.2693.

DIAGNOSTIC POTENTIAL OF OSMOTIC GRADIENT EKTACYTOMETRY

Nikitina E.R., Chebotareva M.A., Shukolyukova E.P., Polina J.A., Katiukhin L.N.

Sechenov Institute of evolutionary physiology and biochemistry

Toreza Ave., 44, St.-Petersburg, 194223, Russia; e-mail: elena.nikitina@bk.ru

Received 15.07.2024

Abstract. The deformability of erythrocytes is a key factor determining blood flow in the microcirculation. Any decrease in the deformability of erythrocytes can affect resistance to blood flow, a decrease in perfusion and oxygen saturation of organs and tissues, and, consequently, their damage. Red blood cells are increasingly recognized as biomarkers for various diseases. Initially, such diseases were hereditary and acquired anemia. With the development of diagnostic methods and scientific research, the range of diseases has expanded to include pathologies that are not primarily associated with red blood cells: inflammation, cardiovascular disorders, type 1 and type 2 diabetes, oncology. However, at present, there are no tests that could establish a connection between the factors that determine the severity of the systemic pathological condition and the properties of red blood cells. And the usual indicators of red blood cells are used as such markers. Recent studies have revealed the promising potential of functional tests, including erythrocyte rheology. One of these tests is the method of osmotic gradient ektacytometry. It allows for a rapid and informative assessment of the deformability of erythrocytes and is considered the “gold standard” for measuring their deformability.

Key words: osmotic gradient ektacytometry, erythrocyte deformability, diagnostic potential.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНАЛОГОВ РЕТИНОИДОВ С РАЗЛИЧНЫМИ МИКРОБНЫМИ РОДОПСИНАМИ.

Беликов Н.Е.¹, Сафинова А.Я.^{1,2}, Лукин А.Ю.², Петровская Л.Е.³, Демина О.В.¹,
Ходонов А.А.¹

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

² МИРЭА – Российский технологический университет
просп. Вернадского, 78, г. Москва, 119571, РФ

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: lpetr65@yahoo.com;

Поступила в редакцию 17.07.2024

Аннотация. На основе результатов собственных исследований было проанализировано влияние отдельных типов модификации хромофорной группы на структуру и функцию 2 представителей микробных родопсинов: бактериородопсина (BRh) и протееородопсина (TRh). Была протестирована способность избранной группы ретиноидов к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с указанными представителями микробных родопсинов, а также, были определены особенности их взаимодействия с апобелками и параметры их фотохимических и функциональных свойств. Было установлено, что, в случае бактериородопсина из *H. salinarum*, замена триметилциклогексенового кольца в природном хромофоре на 4-оксо- Ret2, 4-фторфенильный Ret3 или юлолидиновый Ret4 аналоги не блокирует возможность образования аналогов бактериородопсина (ABRh), однако, для апобелка из протееородопсина TRh было зафиксировано образование искусственных пигментов только из Ret2, Ret3 аналогов ретиналя (4-оксо-ATRh, F-Phe-ATRh). Впервые обнаружен фотоиндуцированный обратимый гидролиз протонированной альдиминной связи для F-Phe-ATRh. Создана модель, имитирующая спектральные свойства микробных родопсинов на основе юлолидинового аналога Ret4.

Ключевые слова: микробные родопсины, бактериородопсин, тундра-родопсин, изомеры и аналоги ретиналя, модификации хромофора, свойства аналогов микробных родопсинов.

ВВЕДЕНИЕ

Ретиналь-содержащие белки подразделяются на несколько семейств, основными группами из которых являются зрительные пигменты палочек и колбочек высших животных и микробные родопсины. В последнее время широко развернуты исследования структуры и функций ретиналь-содержащих белков: бактериородопсина и новых представителей класса микробных родопсинов, которые участвуют в ряде таких важных фотобиологических процессов, как светозависимый транспорт ионов H^+ , Cl^- , Na^+ ; и в фототаксисе. Более 1000 представителей этих хромопротеинов были найдены во всех биологических царствах – от высших животных до архей, грибов, водорослей, эубактерий и вирусов [1-11]. Их основная функция состоит в преобразовании кванта света, точнее его энергии, в физический или химический сигнал (рис. 1) [1-11].

Микробные родопсины (бактериородопсин BRh из экстремального галофила *Halobacterium salinarum* и тундра родопсин TRh из *Exiguobacterium sibiricum*). Молекулы ретиналь-содержащих белков имеют следующие общие особенности: 1) они представляют собой мембранные белки, состоящие из семи α -спиральных трансмембранных тяжей (7ТМ), соединенных между собой петлями; 2) в качестве хромофорной группы они содержат определенный изомер альдегида витамина А – ретиналя (*all-E*- в пигментах микроорганизмов и *11Z*- в зрительных пигментах), который соединен с белком через протонированную альдиминную связь с ϵ -аминогруппой остатка Lys; 3) их общая функция связана с преобразованием энергии светового кванта в различные химические или физиологические ответы [1,2].

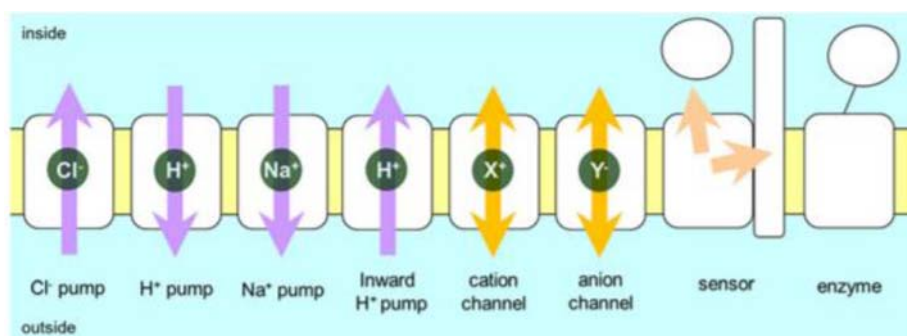


Рисунок 1. Функции микробных родопсинов; прямой светуправляемый транспорт Cl^- , H^+ , Na^+ , обратный светуправляемый транспорт H^+ , светуправляемые катионные и анионные каналы, трансмембранные сенсоры и активируемые светом ферменты [2]

Хорошо известно, что хромофорной группой микробных родопсинов является протонированный альдимин *all-E*-изомера ретиналя с ε -аминогруппой определенного остатка Lys полипептидной цепи белка, то при определении степени влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретиналя часто проводят сравнение оптических параметров исходного белка мишени с параметрами его моделей – протонированных альдиминов ретиналя и его аналогов с простейшими аминами (чаще с *n*-бутиламином в органических растворителях). Природа и структура молекул хромофоров и их аналогов определялась выбором конкретной мишени, которую планировалось модифицировать: для BRh и TRh – фрагмент полиеновой цепи ретинаида, (содержащий систему 4 C=C-связей с *E*-конфигурацией с 2 метильными группами, сопряженную с терминальной формильной группой, которая обеспечивает эффективное взаимодействие полиенового лиганда с ε -аминогруппой остатков Lys216 или Lys225) (табл. 1).

Фотохимия и фотофизика молекулы BRh были предметом интенсивных исследований [1-11]. Поглощение кванта света адаптированной к свету формой BRh (LA) (B-state, $\lambda_{\max}$ 568 нм, ε 63,000 M⁻¹ см⁻¹), которая содержит хромофор в виде *all-E-15-anti*-протонированный альдимин ретиналя, запускает сверхбыстрый фотоцикл (время оборота 15–30 мс), в котором BRh претерпевает цикл спектральных переходов, сопровождающихся изомеризацией и реизомеризацией полиеновой цепи хромофора, сопряженной с депротонированием и репротонированием альдиминной связи, причем в ходе фотоцикла происходят значительные конформационные изменения белковой части молекулы BRh, особенно на стадиях образования и релаксации ключевого интермедиата M₄₁₂ ($\lambda_{\max}$ 412 нм, ε 45,000 M⁻¹ см⁻¹) и последующих интермедиатов.

Для практической реализации задач нанобиофотоники необходимо создание технологий получения фотопереключаемых компонентов с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами на основе новых модифицированных представителей микробных родопсинов. Направленные изменения фотохимических свойств микробных родопсинов могут быть достигнуты путем использования следующих подходов:

- 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы белка методами сайт-специфичного мутагенеза;
- 2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги;
- 3) сочетанием вышеперечисленных методов [3-9].

Замена природного ретиналя на его аналоги – один из наиболее перспективных подходов к изучению особенностей участка связывания хромофора у различных групп микробных родопсинов. Успешное применение данного метода было продемонстрировано ранее для хорошо изученного светозависимого протонного насоса бактериородопсина (BRh) из экстремально галофильного микроорганизма *Halobacterium salinarum*, на котором в течение последних 50 лет был апробирован широкий арсенал современных методов исследования для определения взаимосвязи структура–функция. Искусственные ABRh были получены с целым рядом модификаций молекулы его хромофора [3-11]. Процедура направленной модификации хромофора позволяет варьировать в широких пределах как положение максимума поглощения основного состояния пигмента, так и другие важные фотохимические параметры.

Ранее было установлено, что протеродопсин (тундра-родопсин) (TRh) из психротрофного микроорганизма *Exiguobacterium sibiricum* также обладает структурой, типичной для семейства микробных родопсинов, включая наличие семи α -спиральных сегментов и молекулы ретиналя в *all-E*-конфигурации, ковалентно связанной с остатком K225 посредством протонированной альдиминной связи. К особенностям строения протеродопсина TRh относятся:

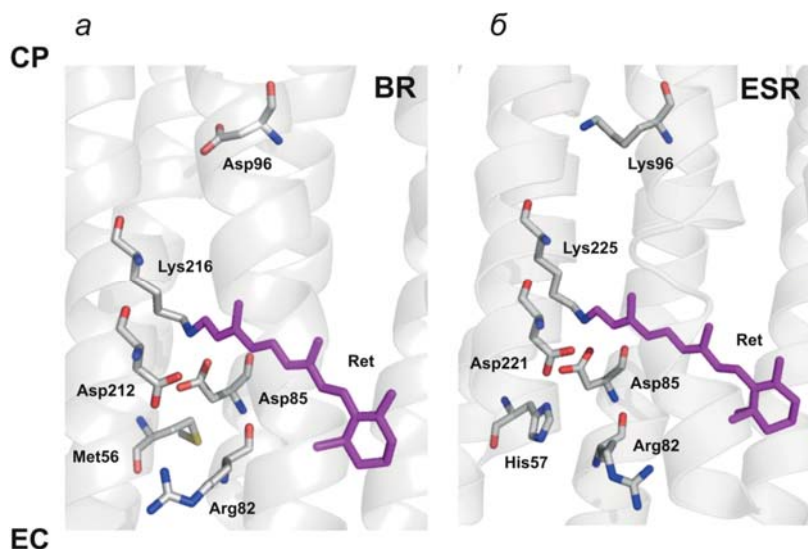


Рисунок 2. Пространственные структуры BRh (а) и TRh (б). Показаны участки молекул, расположенные вблизи основания Шиффа, с использованием координат 3D-структур 1C3W и 4HYJ из банка PDB соответственно

- 1) наличие нестандартного донора протонов для основания Шиффа – остатка K96 – и его расположение в гидрофобной полости ближе к поверхности белка;
- 2) нарушение α -спиральной структуры в средней части спирали F;
- 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85;
- 4) наличие ряда специфических особенностей фотоцикла TRh, включая освобождение протона на поздних стадиях фотоцикла, ускоренное образование М-подобного интермедиата и сдвиг его рК в щелочную область рН;
- 5) отсутствие спектральных различий в формах TRh, адаптированных к свету и темноте [18,19].

В отличие от бактериородопсина (BRh), остаток R82 в молекуле TRh удален от основания Шиффа и не образует водородной связи с акцептором протонов D85, соответственно не оказывая существенного воздействия на его свойства. Также обнаружено наличие ряда специфических особенностей фотоцикла TRh, включая освобождение протона на поздних стадиях фотоцикла, ускоренное образование интермедиата М и сдвиг его рК в щелочную область рН. Существование ряда отличий в механизмах фотоцикла и протонного транспорта TRh от других ретиналь-содержащих белков делает интересным и актуальным сравнительное изучение влияния типа модификации их хромофорных групп на спектральные параметры этих белков и на их функционирование [18,19].

Изучение взаимодействия представителей апобелков из семейства микробных родопсинов с аналогами ретиналя (Ret2 – Ret4) и свойства полученных искусственных пигментов. Конкретная цель данной работы состояла в исследовании влияния отдельных типов модификации хромофорной группы (замены триметилциклокксенового кольца в природном хромофоре на 4-оксо-Ret2, 4-фторфенильный Ret3 или юлолидиновый Ret4 аналоги) на структуру и функцию двух представителей микробных родопсинов: хорошо изученного бактериородопсина (BRh) из экстремального галофильного микроорганизма *Halobacterium salinarum* и нового объекта – протеородопсина (тундра-родопсина) (TRh) из психротрофного микроорганизма *Exiguobacterium sibiricum* [19], выделенного из почвы тундры возрастом 3 млн лет (рис. 2).

Для мишеней из ряда микробных родопсинов была использована стратегия селективного самопроизвольного ковалентного связывания молекулы-зонда с целевым хромофор-связующим сайтом белка по принципу самораспознавания [3,4,6-9]. Среди ряда возможных модификаций хромофорной группы у выбранных в качестве мишеней представителей микробных родопсинов в рамках настоящей работы были отобраны структурные модификации молекулы хромофора, представленные в таблице 1. Если для объекта сравнения – бактериородопсина (BRh) данные аналоги ABRh были уже успешно испытаны нами в ранних работах [3,4,6-11], то для второго белка – TRh из *Exiguobacterium sibiricum* подобные работы были вообще неизвестны и являются пионерскими [18-21].

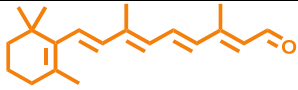
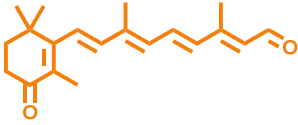
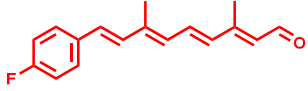
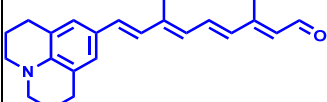
Спектры поглощения полученных препаратов ABRh и ATRh были исследованы при помощи стационарной и импульсной спектроскопии в диапазоне 250-700 нм. Анализ кинетики процесса образования искусственных пигментов на основе ATRh показал, что для одних и тех же аналогов ретиналя (Ret2 – Ret4) процесс их встраивания в молекулу протеородопсина TRh в мицеллах *n*-додецил- β -D-мальтопиранозида (DDM, буфер А), рН 8,0 происходил на порядок быстрее, чем для соответствующих пигментов на основе препаратов апомембран, содержащих бактериоопсин (BO) из *H. salinarum* [18-21].

В качестве первого аналога хромофорной группы микробных родопсинов был использован 4-оксоретиналь Ret2 [10-14]. Данный выбор был обусловлен следующими обстоятельствами:

- 1) этот аналог был одним из первых, протестированных в процессе реконструкции искусственных пигментов на основе бактериоопсина (1974 г) и одним из самых популярных вариантов (всего 27 публикаций);
- 2) для реализации идеи одного из первооткрывателей BRh проф. Д. Оестерхельта (Германия) (обнаружения возможности увеличения времени жизни ключевого интермедиата M_{412} BRh фотоцикла под действием на препарат белка диэтилового эфира при низкой температуре) в середине 80-х годов д-ром Всеволодовым Н.Н. (Ин-т биофизики клетки РАН) была создана технология получения серии фотохромных и голографических материалов на основе ABRh для нужд нанобиофотоники и биомолекулярной электроники, где был применен 4-оксо-ABRh, в качестве элементной базы прототипов оптической и голографической памяти, известных как пленки «Биохром». Лучшие варианты с 4-оксо-ABRh позволяли фиксировать время жизни ключевого M_{412} интермедиата (изображение) до нескольких суток. Проведенные нами исследования позволили выявить влияние белковой матрицы различной природы на свойства полученных искусственных пигментов 4-оксо-ABRh и 4-оксо-ATRh. Исходный 4-оксоретиналь (Ret2) был синтезирован окислением природного *all-E*-ретиналя (Ret1), как описано нами ранее [12].

4-оксоретиналь (Ret2) при добавлении к суспензии апомембран, содержащих бактериоопсин (BO) из *H. salinarum* достаточно быстро $\text{trac}1/2 \sim 5$ мин образовывал 4-оксо-ABRh. При рН 6,5 спектр поглощения полученного препарата 4-оксо-ABRh демонстрировал максимум при $\lambda_{\text{max}} 527$ нм, что на 43 нм короче, чем у исходного BRh (570 нм). Формы 4-оксо-ABRh, адаптированные к свету или к темноте поглощали при 506 нм (LA) и 502 (DA). 4-оксо-ABRh обладал фотоциклом с резко замедленными промежуточными этапами и высоким значением $\text{trac}1$, цикл *all-E*-4-оксо-ABRh имел полный оборот в несколько минут. Скорость образования «М-подобного» интермедиата близка к BRh, но его распад происходит в двухфазном режиме. Один «быстрый» компонент близок по кинетике с фотоциклом контрольного препарата природного BRh, а другие компоненты сильно замедлены.

Таблица 1. Спектральные характеристики и свойства аналогов ретиналя (Ret2 – Ret4) и микробных родопсинов (ABRh и ATRh) на их основе

Аналоги ретиналя RetCHO и микробных родопсинов	$\lambda_{\max}$ RetCHO/ [ε] в CH ₃ OH	$\lambda_{\max}$ ABRh/ (фотоцикл + наличие)	$\lambda_{\max}$ ATRh / (фотоцикл, + наличие)	Реакция с NH ₂ OH ABRh / ATRh	Реакция с <i>all-E</i> - RetCHO ABRh / ATRh
 природный <i>all-E</i>-RetCHO, Ret1 BRh, шт. 353П, pH 6.5, 20°C. pK_a 13.3-+0.3. и TRh В мицеллах: 0.2% DDM, 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, буфер, pH 8.0, 20°C.	380 [43800]	560 (DA) 570 (LA) / фотоцикл B-state ($\lambda_{\max}$ 570 нм, ε 63000 M ⁻¹ см ⁻¹) и M-state ($\lambda_{\max}$ 412 нм, ε 34000 M ⁻¹ см ⁻¹ , φ 0.64). (M ₄₁₂) τ _{Mform} 50 μs; τ _{Mdecay} 5 ms	350пл., 531 / + (Dl _{BRh-TRh} = 39 нм)	стабилен в темноте / относитель- но стабилен t _{1/2} ~ 3ч	- / -
 <i>all-E</i>-4-oxo-RetCHO, Ret2 4-оксо-ABRh, шт. 353П, pH 6.5, 20°C. и 4-оксо-ATRh В мицеллах: 0.2% DDM, 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, буфер, pH 8.0, 20°C.	294 [11400], 374 [50500]	527 506 (LA) 502 (DA) / + цикл бифазный с радикально замедленным интермедиатом M ₄₁₀ . (Dl 43 нм)	475пл., 499 ; 494, 475пл, 436, 410 - (LA) / + цикл с радикально замедленным интермедиатом (Dl 32 нм)	- / нестабилен t _{1/2} ~ 1 ч /	- / стабилен τ _{1/2} ~ 1 д
 <i>all-E</i>-4-Fluorophenyl-RetCHO, Ret3 4-F-Phe-ABRh, шт. 353П, pH 6.5, 20°C. и 4-F-Phe-ATRh В мицеллах: 0.2% DDM, 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, буфер, pH 8.0, 20° Образование продукта светоиндуцированного гидролиза альдиминой связи (377 нм)C.	387.5 [47700]	524 + цикл с радикально замедленным интермедиатом M ₃₉₅ . свето- и темновая адаптация сильно заторможена (Dl 46 нм)	496 / + цикл бифазный с радикально замедленным интермедиатом M ₃₉₀ . (Dl 35 нм)	- / относитель но стабилен t _{1/2} ~ 3 ч	- / стабилен t _{1/2} > 18 ч
 <i>all-E</i>-(Julolidine-9-yl)-RetCHO, Ret4 Julio-ABRh шт. <i>H. salinarum</i> ВКПМ В-9451, pH 6.5, 20°C t_{1/2 form} 60 мин и Julio-ATRh В мицеллах: 0.2% DDM, 50 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, буфер, pH 8.0, 20°C.	338, 460 ε [48000]	595 / ? (Dl -25 нм)	NO образование продукта не зафиксировано в течение 2 мес	нестабилен t _{1/2} ~ 30 мин / -	стабилен / -

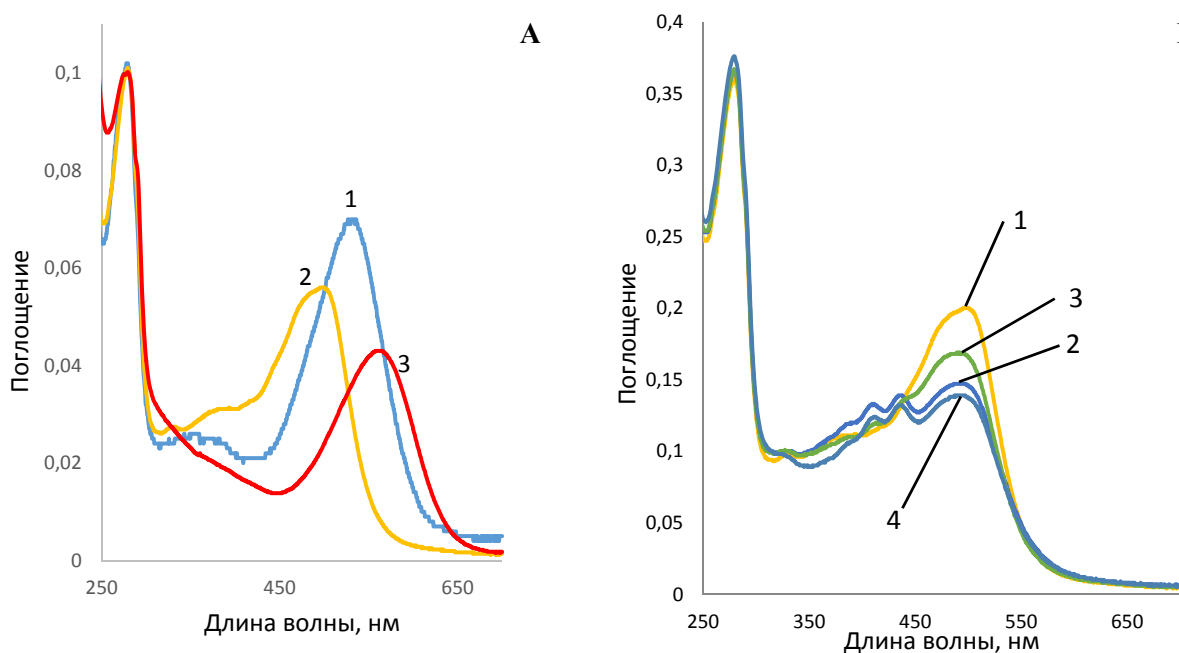
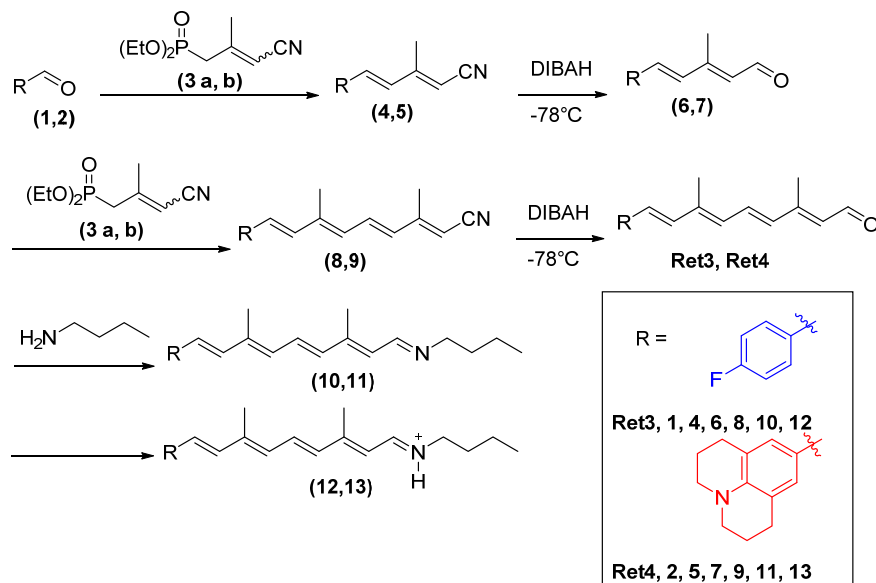


Рисунок 3. А - Спектры поглощения образцов: 1 – препарата рекомбинантного TRh; 2 – препарата 4-оксо-ATRh; 3 – препарата BRh; В - спектры поглощения: 1 – исходного препарата 4-оксо-ATRh; 2 – препарата 4-оксо-ATRh после 2 мин освещения видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12); 3 – он же после 10 мин выдержки в темноте; 4 – он же после дополнительного освещения 10 мин видимым светом с длиной волны >450 нм (фильтр ЖС-12)

Образцы рекомбинантного TRh и его аналогов 4-оксо-ATRh, F-Phe-ATRh были синтезированы добавлением 1,5 молярного избытка *all-E*-ретинала (Ret1) или его аналогов (Ret2, Ret3) в растворе этанола (не более 0,01% по объему для минимизации побочных процессов, т.е. денатурации и агрегации) к апопротеину TRh, солюбилизованному в буфере А (0,2% DDM, 50 мм NaH_2PO_4 и 200 мм NaCl , pH 8,0) при 20°C (рис. 3, 4; табл. 1).

Засветка образцов препарата 4-оксо-ATRh видимым светом галогеновой лампы ThorLabs OSL1-EC / светофильтр ЖС-12 ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 2-10 мин генерировало гипсохромный сдвиг основной полосы поглощения с (499, 475 нм) до (490, 475 нм) - (LA); с просадкой основного максимума на 25-30% и с появлением серии новых фотопродуктов, поглощающих при 436, 410, 385 нм, причем, темновая адаптация образца в течение 10-30 мин вызывала неполное до 85% восстановление амплитуды исходного максимума с исчезновением коротковолновых полос (рис. 3В, кривая 3).

Второй вариант модификации молекул исходных BRh и TRh заключался в использовании 4-фторфенильного аналога ретинала (Ret3), у которого триметилциклогексеновое кольцо природного хромофора замещено на 4-фторфенильный фрагмент, кроме того, присутствие атома фтора в 4-фторфенильном фрагменте открывает возможность использования метода ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{19}F для изучения структуры этих белков.



Ключевые стадии синтеза 4-фторфенильного (Ret3) и юлолидинового аналогов ретиналя (Ret4) представлены на схеме 1. Нами был использован классический вариант наращивания полиеновой цепи ретиноида (Ret3, Ret4) олефинированием исходных альдегидов (**1** или **2**) анионом C_5 -фосфоната (**3 a,b**) в условиях реакции Хорнера–Эммонса (схема).

На первой стадии нами было осуществлено олефинирование по Хорнеру–Эммонсу исходного 4-фторбензальдегида (**1**) или 9-формил-юлолидина (**2**) анионом C_5 -фосфонатного синтона с нитрильной терминальной полярной группой (**3 a,b**). В качестве основания при генерировании аниона C_5 -фосфоната в синтезе 4-фторфенильного (Ret3) использовали: NaH в THF, а в качестве основания при генерировании аниона C_5 -фосфоната (**3 a,b**) в синтезе юлолидинового (Ret4) был использован: LiOH в THF, при этом в обоих случаях было показано, что в результате реакции Хорнера–Эммонса вновь образующаяся связь $C=C$ в продуктах (**4,5**) имела *E*-конфигурацию, что подтверждалось значениями констант спин-спинового взаимодействия (16,2 Гц).

Затем следовала стадия восстановления нитрильной функции DIBАН при температуре от -70° до $-80^\circ C$. Повторение указанной последовательности операций – олефинирования альдегидов (**6,7**) по Хорнеру–Эммонсу и последующего восстановления нитрильной функции у соединения (**8,9**) – приводила к получению целевого ретиноида (Ret3).

Индивидуальные *all-E*-изомеры ретиноидов (Ret3 и Ret4), были получены с общими выходами 47% и 19% на исходные альдегиды (**1,2**) (схема 1) [18-20]. Структура *all-E*-изомера альдегида (Ret3) была подтверждена набором современных физико-химических методов анализа (УФ-, ^1H -ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией). В ^1H -ЯМР-спектре при наличии сигналов протонов, отвечающих: *n*-замещенному ароматическому фрагменту (δ 7,03 и 7,42 м.д.) у Ret3 или замещенному по $C9$ -юлолидиновому фрагменту у Ret4: синглет при δ 6,93 м.д. ($8',10'$ -H) и 3 мультиплета метиленовых групп при 3,19, 2,74 и 1,95 м.д. ($3',5'$ -CH₂, $1',7'$ -CH₂, $2',6'$ -CH₂), также были зарегистрированы полный набор дублетов протонов полиеновой цепи (δ 6,05–7,15 м.д.), сигнал протона альдегидной группы (дублет при δ 10,1 м.д. (J 8,2 Гц)) и два сигнала протонов двух метильных групп (при δ 2,10 и 2,35 м.д.), что строго подтверждало структуру целевых альдегидов (Ret3 и Ret4).

4-фторфенильный аналог ретиналя (Ret3) ранее был успешно использован для получения F-Phe-ABRh из *H. salinarum* [10,11,15-17]. Проведенное нами исследование цикла фотореакций F-Phe-ABRh показало, что хотя этот искусственный пигмент и сохранил эффективность фотоцикла на уровне $\sim 50\%$ от эффективности цикла природного BRh, но у него была на несколько порядков замедлена обратная реакция свето-темновой адаптации пигмента (табл. 1) [15-17]. Данный образец препарата F-Phe-ABRh послужил эталоном сравнения для нового искусственного пигмента F-Phe-ATRh.

Анализ кинетики процесса образования искусственных пигментов на основе TRh и F-Phe-TRh показал, что различия в кинетике встраивания *all-E*-изомера ретиналя (Ret1) и его 4-фторфенильного аналога (Ret3) в TRh-опсин, солюбилизированный в мицеллах DDM, практически отсутствуют ($\tau \leq 2$ мин). В то же время при встраивании *all-E*-изомера ретиналя (Ret1) и его 4-фторфенильного аналога (Ret3) в препарат апомембран, содержащих ВО из *H. salinarum*, кинетика этих процессов существенно различается ($\tau \sim 30$ мин и ~ 6 ч соответственно).

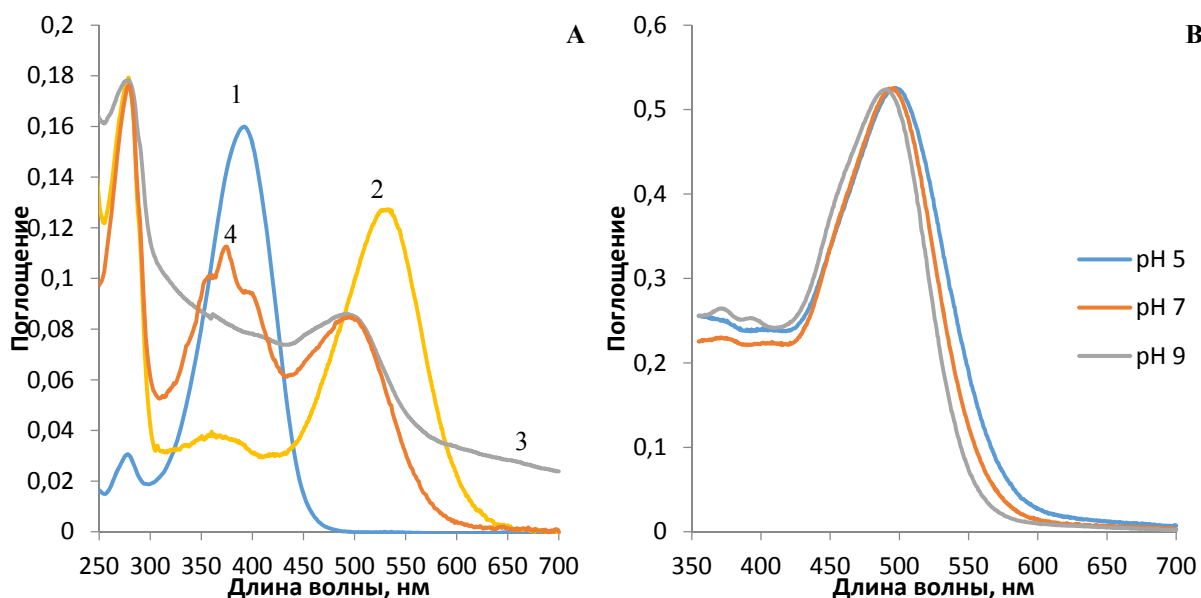


Рисунок 4. А. Электронные спектры поглощения образцов: 1 – 4-фторфенильного аналога ретиналя (Ret3) в этаноле; 2 – препарата рекомбинантного TRh; 3 – препарата F-Phe-ATRh, полученного в условиях добавления 0,8 экв. 4-фторфенильного аналога ретиналя (Ret3); 4 – препарата F-Phe-ATRh, полученного в условиях 1,5 экв. избытка 4-фторфенильного аналога ретиналя (Ret3); В. электронные спектры поглощения образца препарата F-Phe-ATRh, полученного в условиях 0,8 экв 4-фторфенильного аналога ретиналя (Ret3) при различных значениях pH 5,0 – 9,0

Установлено, что, как и в случае ВО из *H. salinarum*, замена триметилциклогексенового кольца в природном хромофоре на 4-фторфенильный фрагмент не блокирует возможность образования из TRh-опсина искусственного пигмента F-Phe-ATRh, сохраняющего цикл фотохимических реакций. Образцы микробных родопсинов: BRh и его аналога F-Phe-ABRh и TRh и его аналога F-Phe-ATRh были получены, как описано в работах [15-17,18,20].

Спектры поглощения полученных препаратов TRh и его аналога F-Phe-ATRh были исследованы при помощи стационарной и импульсной спектроскопии в диапазоне 250–700 нм, результаты проведенных экспериментов представлены на рисунке 4 и в таблице 1.

При pH 7,0 спектр поглощения полученного препарата F-Phe-ATRh демонстрирует максимум при 496 нм, что на 35 нм короче, чем у рекомбинантного TRh (531 нм). При изменении pH до 9,0 он сдвигается в коротковолновую область до 490 нм (рис. 4В). Сравнение спектров поглощения F-Phe-ATRh ($\lambda_{\max} = 496$ нм) со спектрами F-Phe-BRh ($\lambda_{\max}^{\text{DA}} 524$ нм и $\lambda_{\max}^{\text{LA}} 510$ нм) показало, что для белковой матрицы TRh максимум спектра поглощения сдвинут в коротковолновую область на 28 нм. У препаратов TRh и F-Phe-ATRh также наблюдается отсутствие различий в спектрах образцов, адаптированных к свету и темноте – явление свето-темновой адаптации, которое характерно для природного BRh из *H. salinarum* и большинства его аналогов.

Фотоцикл аналога F-Phe-ATRh исследовали методом импульсной лазерной спектроскопии. Обнаружены определенные различия в свойствах нативного рекомбинантного TRh и его аналога F-Phe-ATRh, включающие сдвиг максимума поглощения в коротковолновую область, наличие “долгоживущего М” и общее замедление его фотоцикла. В ответ на вспышку света, при pH 7,0 детектируется быстрое ($\tau = 50\text{--}70$ мкс) образование “короткоживущей” формы М-подобного интермедиата, соответствующей депротонированному основанию Шиффа, с максимумом поглощения 390 нм. Это отличает фотоцикл образца F-Phe-ATRh от фотоцикла дикого типа TRh, содержащего *all-E*-ретиаль (Ret1), в котором при pH 7,0 в мицеллах DDM образование М-интермедиата практически не детектируется.

Для оценки доступности протонированной альдиминной связи к действию различных стимулов и систем реагентов был проведен следующий ряд экспериментов: 1) засветка образцов F-Phe-ATRh видимым светом галогеновой лампы ThorLabs OSL1-EC, светофильтр ЖС-12 ($\lambda \geq 400$ нм) в течение 2–10 мин; 2) воздействие на образец F-Phe-ATRh раствора 50 мкМ NaBH₄, pH 9,0, в темноте и на свету; 3) реакция замещения образца F-Phe-ATRh раствором *all-E*-ретиала (Ret1) в этаноле (5 мМ) в темноте и на свету; 4) воздействие на образец F-Phe-ATRh раствора NH₂OH (50 мМ) в темноте и на свету. Полученные результаты представлены в таблице 1.

В результате проведенных исследований было также обнаружено, что при продолжительном освещении образца F-Phe-ATRh видимым светом галогеновой лампы его протонированная альдиминная связь подвергается частичному гидролизу с появлением продукта распада, спектрально идентичного образцу 4-фторфенилретиала (Ret3) в водном буфере А. Спектр поглощения продукта распада демонстрировал тонкую структуру: основная полоса 374 нм, и два плеча 355 нм (пл.) и 398 нм (пл.). При выдерживании “засвеченного видимым светом образца F-Phe-ATRh” в темноте более 2–3 ч наблюдается частичная реконструкция пигмента с увеличением оптической

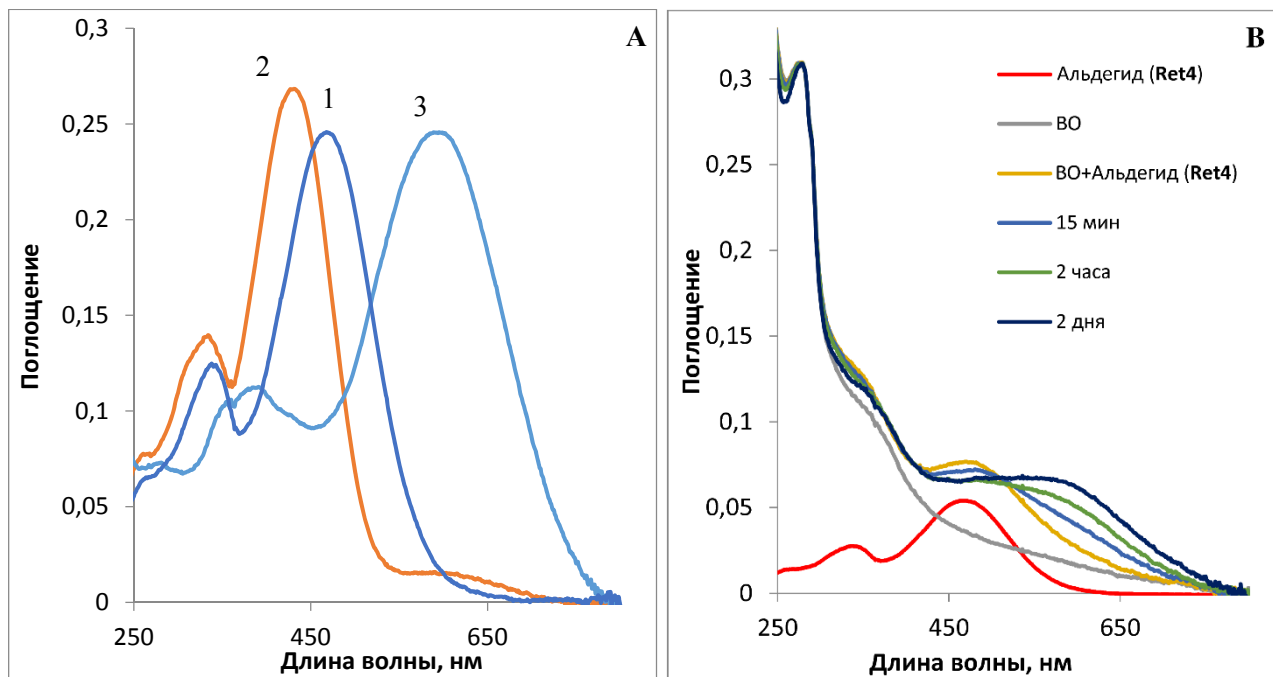


Рисунок 5. Электронные спектры поглощения: А. 1 – альдегида (Ret4); 2 – альдимины альдегида (Ret4) с *n*-бутиламином; 3 – протонированной формы альдимины альдегида (Ret4) в метаноле; В. спектрофотометрический контроль процесса образования комплекса Julo-ABRh из альдегида (Ret4) и апомембран из *H. salinarum*

плотности полосы поглощения F-Phe-ATRh (496 нм). Дополнительным доказательством строения продукта распада была его трансформация в соответствующий спирт действием раствора 50 мкМ NaBH₄, pH 9,0, в темноте. Спектр поглощения восстановленного продукта распада в буфере А был весьма близок к спектру реперного образца 4-фторфенилретинола (основная полоса 343 нм, два плеча 328 и 361 нм), который был получен обработкой NaBH₄ 4-фторфенилретинола (Ret3) в водном этаноле. Было проведено контрольное восстановление образца F-Phe-ATRh NaBH₄ в темноте, которое показало, что протонированная альдиминная связь в образце F-Phe-TRh достаточно стабильна к действию раствора NaBH₄ в темноте ($\tau_{1/2} \approx 10$ мин). “Опсиновый сдвиг” для образцов F-Phe-ATRh и F-Phe-ABRh составил 1963 см⁻¹ и 3040 см⁻¹ соответственно.

В результате была продемонстрирована пониженная стабильность полученного аналога протеородопсина F-Phe-ATRh к продолжительному воздействию видимого света. Данный феномен нами был зафиксирован впервые для микробных родопсинов TRh, BRh и их аналогов.

Индивидуальный *all-E*-изомер ретиноида (Ret4), был получен с общим выходом 19% на исходные альдегиды (**2**) (схема 1) [20].

При взаимодействии юлолидинового аналога (Ret4), с апомембранами ВО был получен пигмент Jul-ABRh с максимумом поглощения в районе 595 нм. Скорость образования пигментов оказалась несколько меньшей скорости формирования пурпурного комплекса BRh из *all-E*-ретинола (Ret1) и ВО. Полоса пигмента регистрировалась через 60-120 мин после добавления альдегида к апомембранам. В течение 2 суток образование пигмента заканчивалось (рис. 5А).

В ходе проведения исследования также было обнаружено, что в отличие от 4-оксо-ретинола (Ret2) и 4-фторфенильного аналога ретинола (Ret3), юлолидиновый аналог (Ret4) не образует искусственного пигмента с опсином из TRh. Причины этого явления пока не ясны, по всей видимости, понадобится привлечение методов компьютерного моделирования для их прояснения.

Хорошо известно, что хромофорной группой микробных родопсинов является протонированный альдимин ретинола с ε -аминогруппой определенного остатка Lys полипептидной цепи белка, то при определении степени влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретинола часто проводят сравнение оптических параметров исходного белка мишени с параметрами его моделей - протонированных альдиминных ретинола или его аналогов с простейшими аминами (чаще с *n*-бутиламином в органических растворителях). Нами было получено модельное основание Шиффа (альдимин) целевого соединения (Ret4) с *n*-бутиламином (**11**). При образовании альдимины из полиеналя ((Ret4) и *n*-бутиламина в электронных спектрах поглощения наблюдается гипсохромный сдвиг на 30 нм. Спектры поглощения полученных препаратов альдегида (Ret4) и альдимины (**11**) были получены при помощи стационарной электронной спектроскопии в диапазоне 250–700 нм в абсолютизированном метаноле (рис. 5В). Последующее протонирование альдимины (**11**) растворами HCl в диоксане или TFA в метаноле сопровождается батохромным сдвигом от 430 нм до 592(597) нм, величина которого зависит как от особенностей структуры аналога ретинола, так и от природы протонирующего агента и растворителя. Обнаружены выраженные различия в спектральном поведении препаратов альдегида (Ret4) и его альдиминных (**11,13**) с соответствующими производными природного ретинола (Ret1) (табл. 1, λ 360 нм /450 нм).

Таким образом, в результате нами была создана модель влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретинола в микробных родопсинах с использованием юлолидинового аналога ретинола (Ret4) и его альдиминных (**11,13**).

Результаты введения мощного электроно-донорного юлолидинового заместителя вместо триметилциклогексенового кольца природного хромофора демонстрируют такое же увеличение величины максимума основной полосы поглощения протонированного альдимины юлолидинового аналога ретинола (**13**) и его (батохромного сдвига) до λ 592-597 нм ($\Delta\lambda$ 162–167 нм), превышающее значение $\Delta\lambda$ в различных представителях микробных родопсинов ($\Delta\lambda$ 110-130 нм), при образовании протонированной альдиминной связи из природного ретинола и апобелка. Интересно также отметить, что протонирование атома азота в самом юлолидиновом аналоге (Ret4) растворами HCl / в диоксане или TFA / в метаноле наоборот сопровождается гипсохромным сдвигом ($\Delta\lambda = -115$ нм).

В таблице 1 представлены сравнительные спектральные характеристики полученных аналогов ретинола (Ret2 – Ret4) и их комплексов ABRh и ATRh с апомембранами из *H. salinarum* и *E. sibiricum*.

Полученные результаты подтверждают ранее описанные требования к структуре хромофора микробных родопсинов, включая наличие терминальной формильной группы, определенную длину полиеновой цепи и ее конфигурацию, а также отсутствие жестких пространственных ограничений района триметилциклогексенового кольца и наличие определенных препятствий в районе C₁₃=C₁₄-двойной связи.

Работа была частично поддержана РФФИ (проект № 20-03-00139) и была выполнена в рамках Государственного задания ИБХФ РАН 2024 года (тема №122041300210-2).

Список литературы / References:

1. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, no. 1, pp. 126-163, doi: 10.1021/cr4003769.

2. Kandori H. Biophysics of rhodopsins and optogenetics. *Biophys. Rev.*, 2020, vol. 12, no. 2, pp. 355-361, doi: 10.1007/s12551-020-00645-0.
3. *Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids*. Eds. Dawson M.I., Okamura W.H., Boca Raton: CRC Press Inc., 1990, 627 p., doi: 10.1201/9781351070638.
4. Ходонов А.А. Синтетический подход к исследованию взаимосвязи структура-активность в ретиноид-белковых комплексах: бактериородопсине и ядерных рецепторах ретиноевой кислоты. *Диссертация на степень д.х.н.*, Москва, 1997 [Khodonov A.A. Synthetic Approach to Investigation of Structure-Activity Relationships in Retinoid-Protein Complexes: Bacteriorhodopsin and Retinoic Acid Nuclear Receptors. *Doctor of Sciences Degree Thesis* (in Bioorganic Chemistry), Moscow, 1997 (In Russ.)].
5. Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Karnauchova E.N. Retinal analogs and N-retinylidenepeptides as tools for investigation of bacteriorhodopsin and rhodopsin chromophoric binding sites. In: *Retinal Proteins*. Ed. Ovchinnikov Yu.A. Utrecht: VNU Press, The Netherlands, 1989, pp. 561-569.
6. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. Аналоги ретиналя: синтез и взаимодействие с бактериородопсином. *Биоорган. химия*, 1986, т. 12, № 1, с. 5-53 [Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Evstigneeva R.P. Analogues of retinal: synthesis and interaction with bacterioopsin. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, 1986, vol. 12, no. 1, pp. 5-53 (In Russ.)].
7. Ходонов А.А., Еремин С.В., Локшин Дж.Л., Шве́ц В.И., Демина О.В., Хитрина Л.В., Каулен А.Д. Аналоги ретиналя и их роль в исследовании бактериородопсина. *Биоорган. химия*, 1996, т. 22, № 10-11, с. 745-776 [Khodonov A.A., Eremin S.V., Lockshin J. L., Shvets V.I., Demina O.V., Khitrina L.V., Kaulen A.D. Retinal analogs and their application for bacteriorhodopsin investigation. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, 1996, vol. 22, no. 10-11, pp. 745-776 (In Russ.)].
8. Демина О.В., Беликов Н.Е., Мельникова И.А., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Новые метки и зонды для решения задач бионанопотоники. *Химическая физика*, 2019, т. 38, № 12, с. 44-47, doi: 10.1134/S0207401X19120057 [Demina O.V., Belikov N.E., Melnikova I.A., Lukin A.Yu., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. New labels and probes for solving bionanophotonics problems. *Russ. J. Phys. Chem.*, 2019, vol. 38, no. 12, pp. 44-47 (In Russ.)].
9. Ходонов А.А., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Демина О.В., Складнев Д.А., Тюрин С.А., Шве́ц В.И. Гибридные аналоги ретиноидов: как инструменты для исследований в области нанобиопотоники. *Вестник МИТХТ*, 2011, т. 6, № 2, с. 15-36 [Khodonov A.A., Laptev A.V., Lukin A.Y., Belikov N.E., Fomin M.A., Demina O.V., Skladnev D.A., Tyurin S.A., Shvets V.I. Retinoid hybrids as instruments for nanobiophotonics researches. *Vestnik MITHT*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 15-36 (In Russ.)].
10. Khodonov A.A., Belikov N.E., Demina O.V. *Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs*. From 1975 to 2019, Eds: Chupin V.V., Varfolomeev S.D. Version 2, 2020; IBSP/MIPT, Moscow, Russia, 186 p.
11. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Чупин В.В., Демина О.В. Исследование селективности окружения хромофор связующего сайта молекулы бактериородопсина с помощью аналогов ретиноидов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 1, с. 91-100 [Khodonov A.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Petrovskaya L.E., Chupin V.V., Demina O.V. Study of the selectivity of the environment of the chromophore binding site of the bacteriorhodopsin molecule using retinoid analogues. *Russ. J. Biol. Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 91-100 (In Russ.)].
12. Миронова Е.В., Леонтьева С.В., Шевяков С.В., Алексеева С.Г., Шве́ц В.И., Демина О.В., Краснокутская И.С., Финкельштейн Е.И., Ходонов А.А. Удобный способ получения производных ретиналя, модифицированных по триметилциклогексеновому кольцу. *Биоорган. химия*, 2002, т. 28, № 6, с. 535-542 [Mironova E.V., Leont'eva S.V., Shevyakov S.V., Alexeeva S.G., Shvets V.I., Demina O.V., Krasnokutskaya I.S., Filkenstein E.I., Khodonov A.A. A convenient method for preparing retinal derivatives modified at the trimethylcyclohexene ring. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, 2002, vol. 28, no. 6, pp. 535-542 (In Russ.)].
13. Соколова Н.А., Мицнер Б.И., Закис В.И. Синтез 4-кето- и 4-оксипроизводных *all-E*- и *13Z*-ретиналя и их взаимодействие с бактериородопсином. *Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 7, с. 1053-1058 [Sokolova N.A., Mitsner B.I., Zakis V.I. Synthesis of 4-oxo and 4-hydroxy derivatives of *all-E*- and *13Z*-retinal and its interaction with bacterioopsin. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, 1979, vol. 5, no. 7, pp. 1053-1058 (In Russ.)].
14. Jaaskelainen T., Leppanen V.P., Parkkinen S., Parkkinen J.P.S., Khodonov A.A. The photochromic properties of 4-keto bacteriorhodopsin. *Optical Materials*, 1996, vol. 6, no. 4, pp. 339-345, doi: 10.1016/S0925-3467(96)00050-X.
15. Мицнер Б.И., Ходонов А.А., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. Ароматические аналоги *13-цис*- и *полностью-транс*-ретиналя. *Биоорган. химия*, 1987, т. 13, № 2, с. 238-251 [Mitsner B.I., Khodonov A.A., Zvonkova E.N., Evstigneeva R.P. Aromatic analogues of 13-*cis*- and *all-trans*-retinal. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, 1987, vol. 13, no. 1, pp. 238-251 (In Russ.)].
16. Драчев Л.А., Зорина В.В., Мицнер Б.И., Хитрина Л.В., Ходонов А.А., Чекулаева Л.Н. Исследование фотоцикла и электрогенеза *13-цис*- и *полностью-транс*-ароматических аналогов бактериородопсина. *Биохимия*, 1987, т. 52, № 9, с. 1559-1569 [Drachev L.A., Zorina V.V., Mitsner B.I., Khitrina L.V., Khodonov A.A., Chekulaeva L.N. Study of the photocycle and electrogenesis of 13-*cis*- and *all-trans*-aromatic analogues of bacteriorhodopsin. *Biochemistry (Russ.)*, 1987, vol. 52, no. 9, pp. 1559-1569 (In Russ.)].
17. Драчев Л.А., Каулен А.Д., Еремин С.В., Хитрина Л.В., Ходонов А.А., Шве́ц В.И., Чекулаева Л.Н. Образование М-типа интермедиатов в фотоцикле *13-цис*-аналогов бактериородопсина. *Биохимия*, 1993, т. 58, № 6, с. 819-826 [Drachev L.A., Kaulen A.D., Eremin S.V., Khitrina L.V., Khodonov A.A., Chekulaeva L.N. Formation

of M-type intermediates in the photocycle of 13-*cis*-analogs of bacteriorhodopsin. *Biochemistry (Russ.)*, 1993, vol. 58, no. 6, pp. 819-826 [In Russ.].

18. Беликов Н.Е., Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Долгих Д.А., Лукашев Е.П., Лукин А.Ю., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Чупин В.В., Ходонов А.А. Исследование взаимодействия фторфенильного аналога ретиналя с протеородопсином из *Exiguobacterium sibiricum*. *Биоорг. химия*, 2022, т. 48, № 6, с. 694-706, doi: 10.31857/S0132342322060070 [Belikov N.E., Petrovskaya L.E., Krukova E.A., Dolgikh D.A., Lukashov E.P., Lukin A.Yu., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Chupin V.V., Khodonov A.A. Study of the interaction of a fluorophenyl analogue of retinal with proteorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum*. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, 2022, vol. 48, no. 6, pp. 694-706 (In Russ.)].

19. Petrovskaya L.E., Lukashov E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, pp. 4193-4196.

20. Belikov N.E., Melnikova I.A., Demina O.V., Petrovskaya L.E., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kuzmichev P.K., Chupin V.V., Lukin A.Yu., Shumsky A.N., Chizhov I., Levin P.P., Kirpichnikov M.P., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. The effect of the chromophoric group modification on the optical properties of retinal proteins. *Mendeleev Communications*, 2018, vol. 28, no. 4, pp. 406-408, doi: 10.1016/j.mencom.2018.07.022.

21. Сафинова А.Я., Беликов Н.Е., Петровская Л.Е., Лукин А.Ю., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. Синтез и оптические свойства юлолидинового аналога ретиналя. *Биохимическая физика: труды XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ*. Москва: РУДН, 2023, с. 142-144 [Safinova A.Ya., Belikov N.E., Petrovskaya L.E., Lukin A.Yu., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Synthesis and optical properties of the yulolidine analogue of retinal. *Biochemical physics: proceedings of the XXII Annual Youth Conference with international participation of the Institute of Biochemical Physics RAS-Universities*. Moscow: RUDN, 2023, pp. 142-144 (In Russ.)].

THE STUDY OF THE FEATURES OF RETINOID ANALOGS INTERACTION SELECTIVITY WITH VARIOUS MICROBIAL RHODOPSINS

Belikov N.E.¹, Safinova A.Ya.^{1,2}, Lukin A.Yu.², Petrovskaya L.E.³, Demina O.V.¹, Khodonov A.A.¹,

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS

Kosygina St., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: khodonov@gmail.com;

² MIREA – Russian Technological University

Vernadsky Ave., 78, Moscow, 119571, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS

Miklukho-Maklay St., 16/10, Moscow, 117997, Russia

Received 17.07.2024

Abstract. Based on the results of our own researches, we have analyzed the influence of individual types of chromophore group modifications on the structure and function of the 2 representatives of microbial rhodopsins: bacteriorhodopsin (BRh) and proteorhodopsin (TRh). The ability of a selected group of retinoids to form covalent and non-covalent complexes with the indicated representatives of microbial rhodopsins was tested, and the features of their interaction with apoproteins and the parameters of their photochemical and functional properties were determined. It was found that, in the case of bacteriorhodopsin from *H. salinarum*, replacing the trimethylcyclohexene ring in the natural chromophore with 4-oxo- Ret2, 4-fluorophenyl Ret3 or yulolidine Ret4 analogs does not block the possibility of forming artificial bacteriorhodopsin analogs (ABRh), however, for the apoprotein from proteorhodopsin TRh the formation of artificial pigments only from Ret2, Ret3 retinal analogs (4-oxo-TRh, F-Phe-TRh) was observed. Photoinduced reversible hydrolysis of the protonated aldimine bond for F-Phe-TRh was discovered for the first time. A model was created that simulates the spectral properties of microbial rhodopsins based on the yulolidine analog Ret4.

Key words: microbial rhodopsins, bacteriorhodopsin, tundra-rhodopsin, retinal analogs, chromophore modifications, properties of microbial rhodopsin analogs.

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА И ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНА

Нерсисян Э.С.¹, Клименко И.В.¹, Лобанов А.В.^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

² ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»

ул. Малая Пироговская, 1, стр. 1, г. Москва, 119991, РФ

Поступила в редакцию 22.07.2024

Аннотация. Порфирины, макроциклические соединения, состоящие из четырех пиррольных колец, играют важную роль в различных биологических процессах. В данном исследовании была поставлена цель получить и изучить фотохимические свойства комплексов включения на основе 5, 10, 15, 20 – тетрафенилпорфирина (ТФП) и β -циклодекстрина (β -ЦД). Эксперименты проводились с использованием растворов β -ЦД в воде и ТФП в N, N – диметилформамиде (ДМФА) и этаноле. Первая серия экспериментов включала спектральный анализ растворов систем, позволивший определить изменения в интенсивностях поглощения и флуоресценции при различных концентрациях компонентов. Спектры поглощения показали перераспределение электронной плотности макромолекулы и сдвиг максимумов поглощения. Во второй серии экспериментов был получен комплекс β -ЦД – ТФП со стехиометрией 2:1, который был проанализирован методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Результаты показали образование устойчивых супрамолекулярных комплексов, что было подтверждено спектрами поглощения и флуоресценции, рассчитанной константой связывания $K_B=10^{5,38}$ и результатами ЯМР спектроскопии. Данные комплексы, благодаря своим уникальным фотохимическим и фотосенсорным характеристикам, могут быть использованы в фотодинамической терапии и диагностике, а также в качестве платформы при таргетной доставке. Данные исследования могут найти применение при разработке новых супрамолекулярных систем для биомедицины.

Ключевые слова: 5, 10, 15, 20 – тетрафенилпорфирин (ТФП), β -циклодекстрин (β -ЦД), комплекс включения, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, константа связывания.

Порфирины, широко распространенные макроциклические соединения, состоят из четырех пиррольных колец, связанных друг с другом в α -положении посредством метиленового звена. Они, а также их многочисленные производные, принимают участие в различных биологических процессах [1]: например, гемоглобин и миоглобин выступают в качестве основных белков транспортной системы молекул кислорода; хлорофилл и его производные являются фотосенсорами и непосредственными участниками фотосинтеза некоторых цианобактерий, водорослей и высших растений; протопорфирин IX и биливердин – основные пигменты, отвечающие за цвет яичной скорлупы [2-5].

Одними из доступных и распространенных представителей порфиринов являются 5, 10, 15, 20 – тетрафенилпорфирин (ТФП) и его металлокомплексы (рис. 1), обладающие фотохимическими свойствами, а также плоской и симметричной структурой, позволяющей им участвовать в супрамолекулярных функциональных ансамблях, в том числе с циклодекстринами (ЦД) [5]. Будучи молекулами, способными к поглощению света в областях длин волн от 200 нм до 600–700 нм и к эмиссии с возбуждением в областях от 350 нм до 650 нм, они играют важную роль в биохимии, органической химии, медицине, физической химии, химии материалов и прочих сферах [2,6].

Высокой степени модификации и, в некоторых случаях, функционализации ТФП способствуют α -, β - и γ -циклодекстрины (α -, β - и γ -ЦД, соответственно) благодаря своему необычному строению, включающему гидрофобную полость и гидрофильную внешнюю поверхность жесткой D-глюкопиранозой кольцевой структуры (рис. 2) [7-10]. Между ними за счет нековалентных взаимодействий, в том числе Ван-дер-Ваальсовых сил и

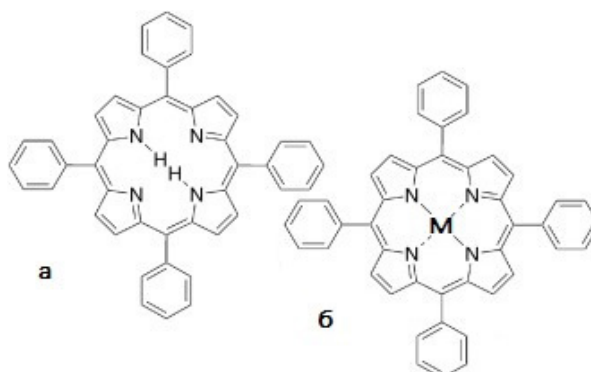


Рисунок 1. Структурные формулы ТФП (а) и его металлокомплекса (М = металл) (б)

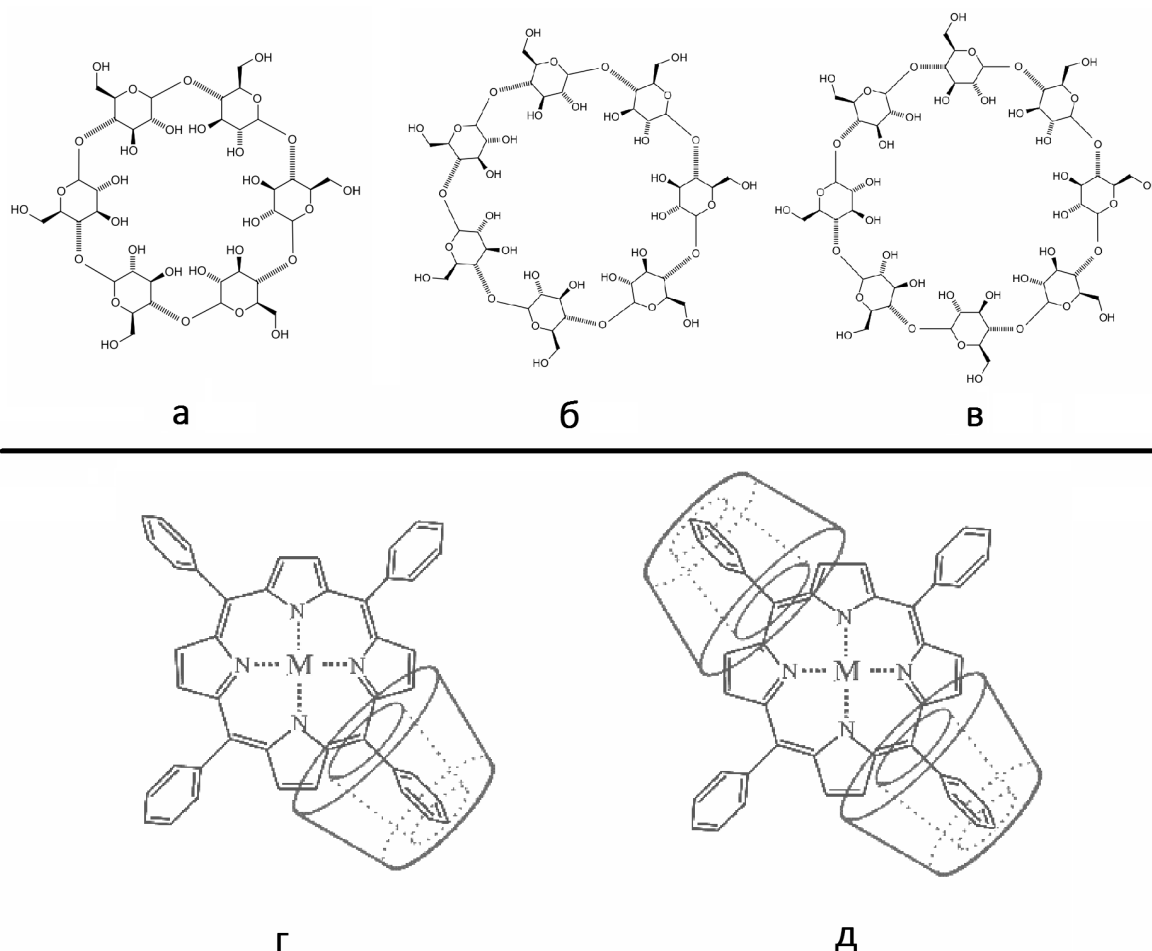


Рисунок 2. Структурные формулы α- (а), β- (б) и γ-циклодекстринов (в) и их супрамолекулярных комплексов с ТФП и его производными (M = 2H, металлы) (г, д)

гидрофобного эффекта, образуется типичный для супрамолекулярной химии комплекс включения (в соотношении 1:1 или 1:2), позволяющий защитить ТФП от влияния внешней среды, а также повысить его биодоступность за счет растворимой в воде оболочки лиганда и повысить степень его защиты от разложения (рис. 2).

На образование ансамблей влияет множество факторов, в том числе природа растворителя, условия среды, стехиометрическое соотношение реагентов, свойства используемых модификаций ТФП и ЦД. С целью определения оптимальных условий комплексообразования используют методы спектрометрического и спектрофлуориметрического анализа, применение которых актуально благодаря флуоресцентным свойствам порфирина.

В проведенном исследовании перед нами стояла задача получить комплексы включения ТФП с β-ЦД и изучить проявляемые супрамолекулой фотохимические свойства. Были использованы β-ЦД, предоставленный сотрудниками кафедры органической химии Института биологии и химии МПГУ, и ТФП (Sigma-Aldrich). В качестве растворителей использовались дистиллированная вода, этанол и N, N – диметилформамид (ДМФА, Реахим, Россия, дважды перегнанный).

Первая серия экспериментов. Комплексы получены из растворов β-ЦД в воде с концентрациями от $C_{\beta\text{-ЦД}} = 1,21 \cdot 10^{-7}$ моль/л до $C_{\beta\text{-ЦД}} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и ТФП в ДМФА, $C_{\text{ТФП}} = 1,08 \cdot 10^{-6}$ моль/л. К 2 мл растворов β-ЦД разной концентрации титрованием добавляли от 0,1 мл до 1 мл раствора ТФП. В качестве контрольного раствора использовалось аналогичное соотношение раствора одного из реагентов с растворителем другого (без второго компонента).

Вторая серия экспериментов. Комплексы получены из растворов β-ЦД в воде, $C_{\beta\text{-ЦД}} = 8,81 \cdot 10^{-2}$ моль/л, и ТФП в этаноле с концентрацией $C_{\text{ТФП}} = 2,64 \cdot 10^{-1}$ моль/л. К 3 мл раствора β-ЦД при 70°C и при перемешивании прибавляли 1 мл раствора ТФП (в итоге получено соотношение вода:этанол = 3:1 ($R_f=0,85$)). Выпавший осадок отфильтровывали, два раза промывали 5 мл ацетона, вновь отфильтровывали и высушивали в вакууме (1 мм. рт. ст.) над P_2O_5 . Выход составил 0,1181 г. (16%), т. пл. 290–292°C (разл.).

В процессе анализа продуктов реакции в первой серии экспериментов были получены спектры поглощения четырех систем β-ЦД–ТФП–ДМФА–вода, с разными исходными концентрациями β-ЦД. На рисунке 3 представлены спектры поглощения данных систем, а также спектры поглощения чистого ТФП в ДМФА и β-ЦД в воде.

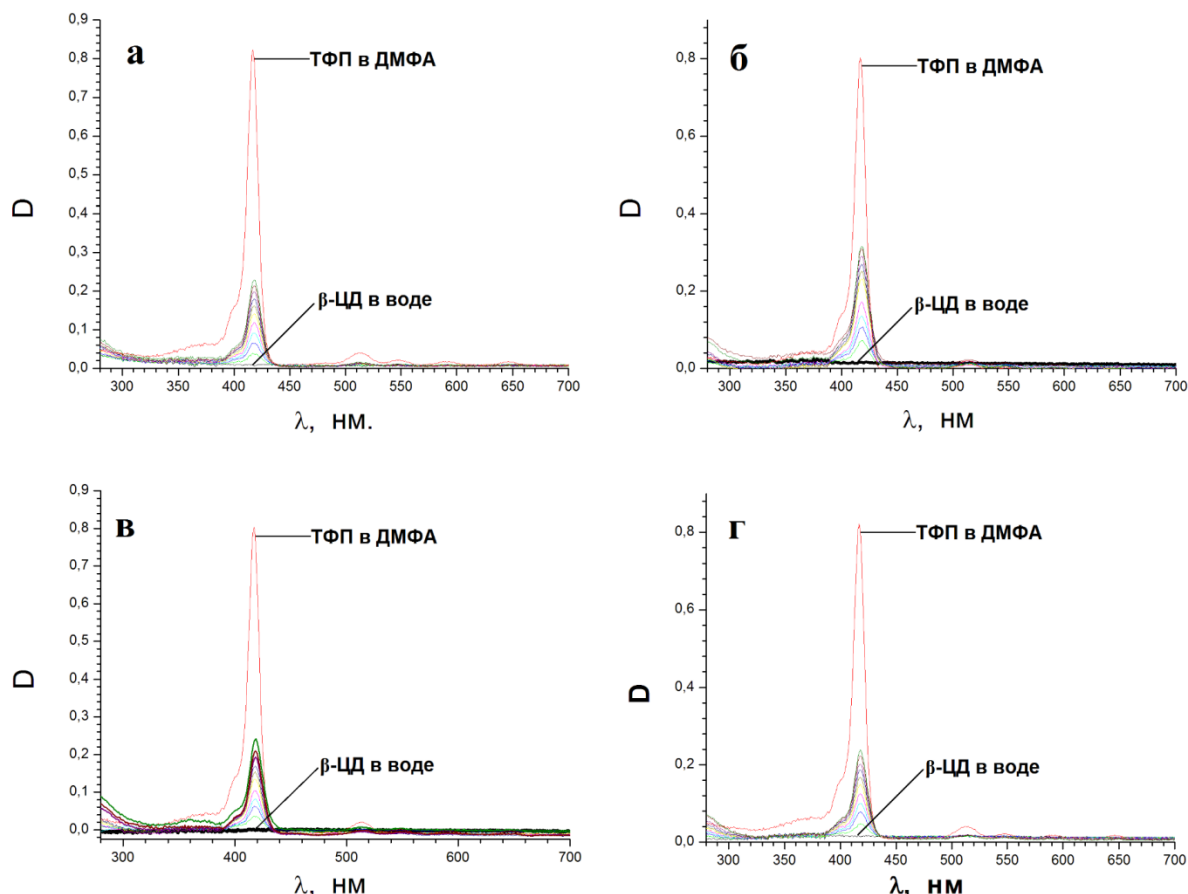


Рисунок 3. Спектры поглощения ТПП – ДМФА ($C_{\text{ТПП}} = 1,08 \cdot 10^{-6}$ моль), β -ЦД – вода и систем β -ЦД – ТПП – ДМФА -вода ($C_{\beta\text{-ЦД}} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (а), $1,21 \cdot 10^{-5}$ моль/л (б), $1,21 \cdot 10^{-6}$ моль/л (в), $1,21 \cdot 10^{-7}$ моль/л (г))

Согласно рисунку 3, происходит изменение интенсивностей спектров поглощения систем в зависимости от равновесных концентраций исходного раствора ТПП. В спектрах присутствуют отличительная для всех тетрапиррольных соединений интенсивная узкая В-полоса (полоса Соре) с максимумом при ~ 417 нм, что свидетельствует о перераспределении электронной плотности макромолекулы, а также расположенные в видимой области спектра (475–575 нм) два Q-перехода. Об образовании комплексов может говорить наблюдаемый сдвиг на 1 нм максимумов поглощений всех представленных смесей.

Эмиссионные спектры данных систем также демонстрируют флуоресценцию при отдельно взятых концентрациях ТПП и β -ЦД в системе (рис. 4).

При последующей обработке полученных данных построены общие градуировочные графики $f(C_{\text{ТПП}}) = D_{\text{maxTPP}}$ для спектров поглощения (рис. 5) и $f(C_{\text{ТПП}}) = S_{\text{ТПП}} = Q_{\text{н}}$ (где $S_{\text{ТПП}}$ – это площадь под кривой эмиссионного спектра, прямо пропорциональная полной скорости испускания флуоресценции $Q_{\text{н}}$) для спектров флуоресценции (рис. 6) всех полученных систем. При этом тангенсы углов наклона относительно оси абсцисс для полученных функций были прямо пропорциональны коэффициенту экстинкции (молярному коэффициенту абсорбции) ϵ и длине кюветы l , через которую проходило исходное излучение. Опуская последнее в силу использования одной и той же размерности кювет для каждого проведенного анализа, можно увидеть на общих градуировочных графиках, как спектров поглощения, так и спектров флуоресценции, значительное увеличение угла наклона линейной функции и, соответственно, увеличение коэффициента экстинкции ϵ смеси ТПП – β -ЦД – ДМФА – вода при концентрации $C_{\beta\text{-ЦД}} = 1,21 \cdot 10^{-5}$ моль/л, что также свидетельствует об образовании комплексного соединения.

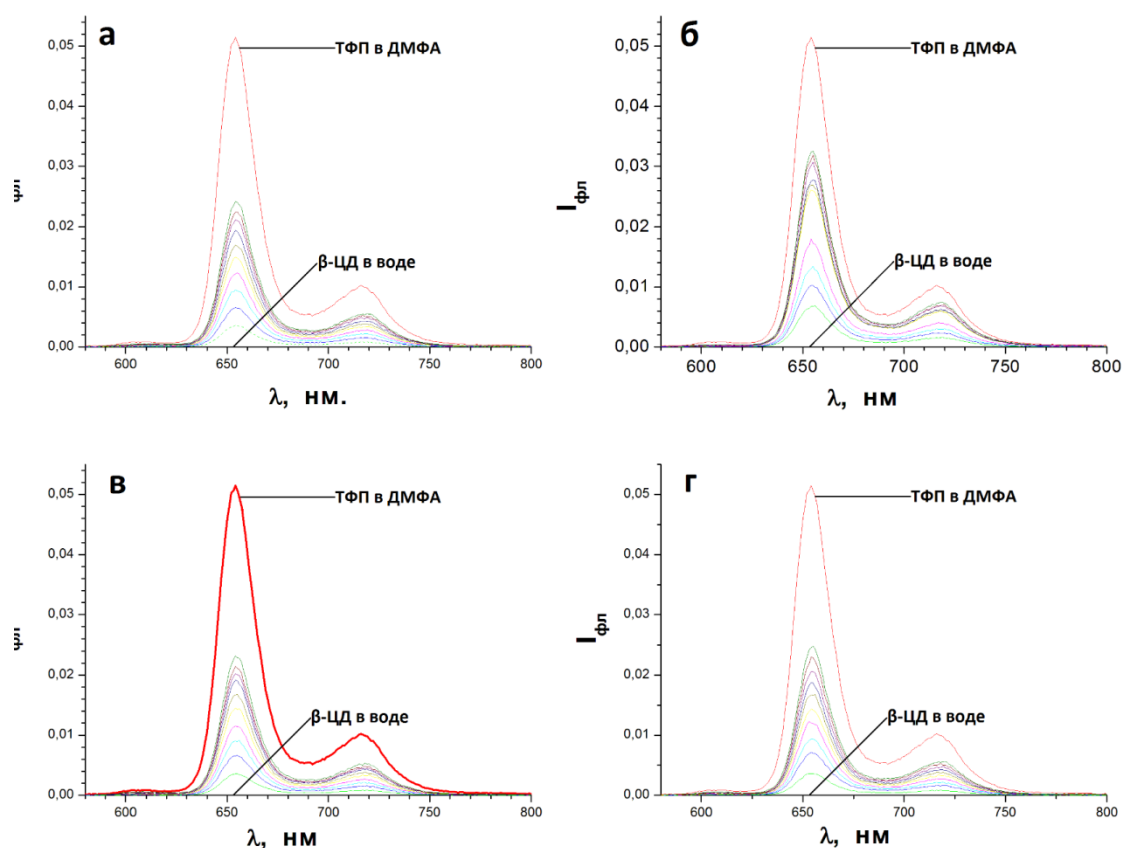


Рисунок 4. Спектры флуоресценции ТФП – ДМФА ($C_{\text{ТФП}} = 1,08 \cdot 10^{-6}$ моль), β -ЦД – вода и систем β -ЦД — ТФП – ДМФА – вода ($C_{\beta\text{-ЦД}} = 1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (а), $1,21 \cdot 10^{-5}$ моль/л (б), $1,21 \cdot 10^{-6}$ моль/л (в), $1,21 \cdot 10^{-7}$ моль/л (г)); $\lambda_{\text{возб}} = 430$ нм

Общий градуировочный график спектров поглощения

$$f(C_{\text{ТФП}}) = D_{\text{max}} \text{ТФП}$$

- $\beta\text{-ЦД}(C=10^{-5}) + \text{ТФП}(C=10^{-6})$
- $\beta\text{-ЦД}(C=10^{-6}) + \text{ТФП}(C=10^{-6})$
- $\beta\text{-ЦД}(C=10^{-7}) + \text{ТФП}(C=10^{-6})$
- $\beta\text{-ЦД}(C=10^{-4}) + \text{ТФП}(C=10^{-6})$

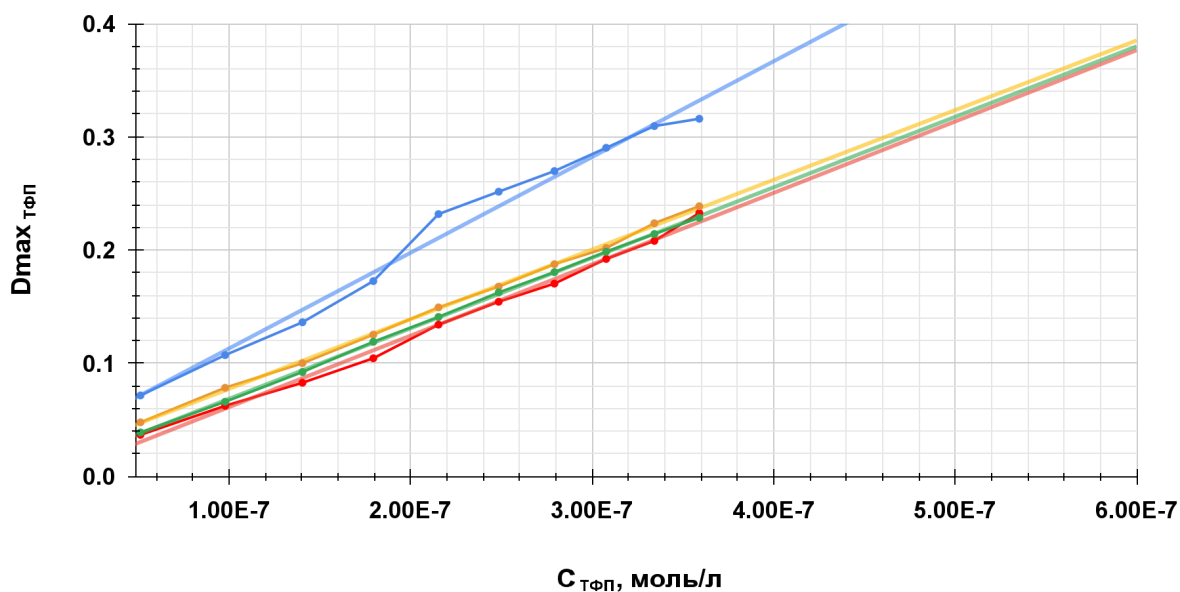


Рисунок 5. Общий градуировочный график спектров поглощения

Общий градуировочный график спектров флуоресценции

$$f(C_{\text{ТФП}}) = S_{\text{ТФП}}$$

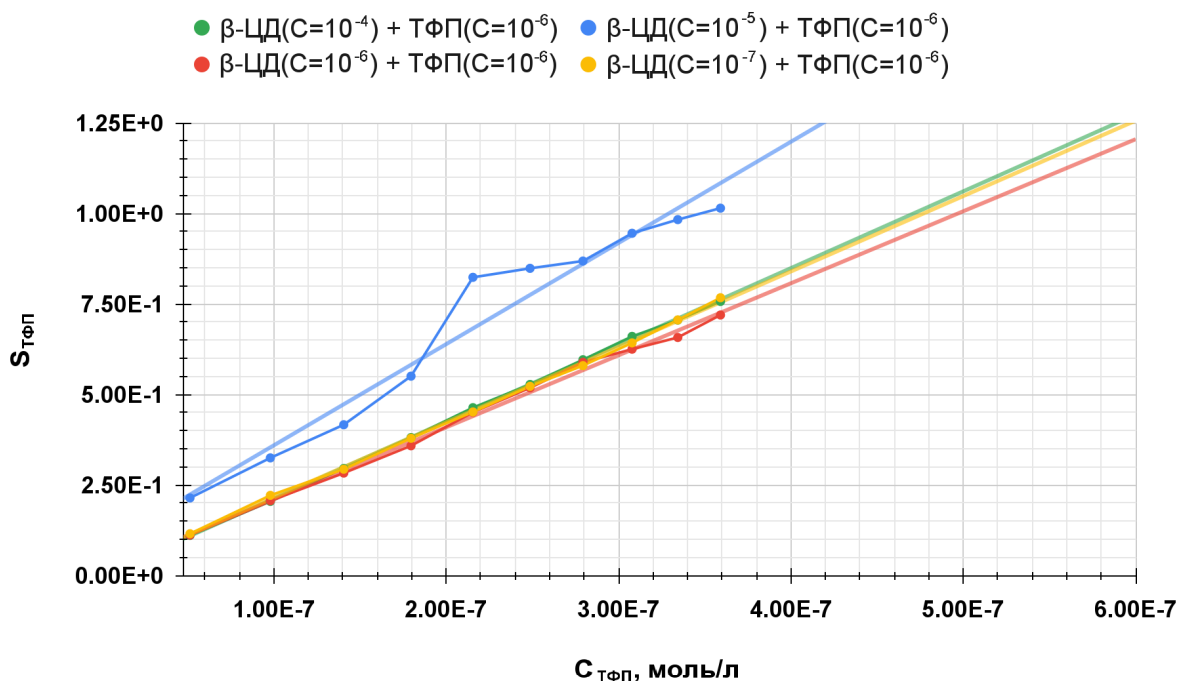


Рисунок 6. Общий градуировочный график спектров флуоресценции

На основе экспериментальных данных путем аппроксимации уравнения Бенези-Хильдебранда [11-14]

$$\lg \frac{A_i - A_0}{A_f - A_0} = \lg[G] + \lg K_B \quad (1)$$

где: A_i – поглощение для промежуточной точки;

A_0 – поглощение для начальной точки;

A_f – поглощение для конечной точки;

$[G]$ – концентрация добавленного компонента;

K_B – константа связывания;

нами была рассчитана константа связывания $K_B = 10^{5,38}$, подтверждающая устойчивость полученного комплекса.

Во второй серии экспериментов получено соединение включения β -ЦД с ТФП со стехиометрией 2:1. Для подтверждения образования устойчивого комплекса был проведен его анализ с помощью метода ядерно-магнитного резонанса ^1H (ДМСО- d_6). Согласно полученным данным определен состав соединения, состоящий из 58,44% атомов С, 5,70% атомов Н и 3,16% атомов N, что соответствует рассчитанным значениям 59,03%-С, 5,76%-Н; 3,20%-N и формуле $\text{C}_{86}\text{H}_{100}\text{N}_4\text{O}_{35}$ (табл. 1).

Таким образом, в результате работы были получены устойчивые супрамолекулярные комплексы включения на базе β -ЦД и свободного основания ТФП в широком диапазоне концентраций. Это подтверждается изменениями спектров поглощения и флуоресценции полученных систем относительно данных для исходных

Таблица 1. Результаты анализа ЯМР ^1H

ЯМР ^1H , δ_{H} , м. д.			
14H, C^6H_2	28H, $\text{C}^2\text{H}-\text{C}^5\text{H}$	7H, C^6OH	7H, C^1H
3.24–3.34 м	3.51–3.64 м	4.44 уш. с	4.79 м
14H, C^2OH , C^3OH	3H, м-CH, н-CH, J 7.3 Гц	2H, о-CH	1H, NH
5.68 уш. с	7.81 д	8.19 м	8.80 с

растворов β -ЦД и ТФП, результатами ЯМР ^1H спектроскопии, а также рассчитанной на основе экспериментальных данных константой связывания.

ТФП вступает в нековалентные взаимодействия с β -ЦД, в том числе за счет Ван-дер-Ваальсовых сил и гидрофобного эффекта. Олигосахарид становится для ТФП как солубилизатором, способствующим интегрированию его в водную среду, так и «молекулярным контейнером», позволяющим защитить молекулу ТФП от воздействия окружающей среды и разложения, а также влияющим на размерные и электронные свойства фотоактивной молекулы.

Применение β -ЦД в качестве лиганда, который защищает включенный в него субстрат и повышает его водорастворимость, может быть эффективно при разработке платформ для таргетной доставки лекарственных препаратов. ТФП, как субстрат, обладающий фотоактивными и фотосенсорными свойствами, является эффективным функциональным материалом при разработке новых супрамолекулярных систем, которые могут найти применение в фотодинамической терапии и других областях, требующих использование высокоэффективных фотоактивных компонентов.

Список литературы / References:

1. Kudin L.S., Dunaev A.M., Motalov V.B., Cavallo L., Minenkov Y. Thermochemistry of 5, 10, 15, 20-tetraphenylporphyrin. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2020, vol. 151, doi: 10.1016/j.jct.2020.106244.
2. Taniguchi M., Lindsey J.S., Bocian D.F., Holtz D. Comprehensive review of photophysical parameters (ϵ , Φ_f , τ_s) of tetraphenylporphyrin (H₂TPP) and zinc tetraphenylporphyrin (ZnTPP) – Critical benchmark molecules in photochemistry and photosynthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews*, 2021, vol. 46, no. 1-2, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2020.100401.
3. Zhang R., Zhang A., Stillman M.J., Ding Z. Enhancement of tetraphenylporphyrin electrochemiluminescence by means of symmetry breaking. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2020, vol. 124, no. 30, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c04531.
4. Tahoun M., Gee C.T., McCoy V.E., Sander P.M., Muller C.E. Chemistry of porphyrins in fossil plants and animals. *RSC advances*, 2021, vol. 11, no. 13, doi: 10.1039/d0ra10688g.
5. Park J.M., Hong K.I., Lee H., Jang W.D. Bioinspired applications of porphyrin derivatives. *Accounts of chemical research*, 2021, vol. 54, no. 9, doi: 10.1021/acs.accounts.1c00114.
6. Sekaran B., Misra R. β -Pyrrole functionalized porphyrins: Synthesis, electronic properties, and applications in sensing and DSSC. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, vol. 453, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214312.
7. Loftsson V., Hreinsdottir D., Masson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International journal of pharmaceuticals*, 2005, vol. 302, no. 1-2, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.042.
8. Kutyasheva N.V., Kurochkina G.I., Ilinich K.K., Grachev M.K. Behaviour Peculiarities of Some Dimeric β -Cyclodextrin Derivatives under Reaction with Organic Acids of Various Nature. *Macrocyclics*, 2022, vol. 15, no. 2, doi: 10.6060/mhc224126g.
9. Bezerra F.M., Lis M.J., Firmino H.B., Dias da Silva J.G., Curto Valle R.D., Borges Valle J.A., Scacchetti F.A., Tessaro A.L. The Role of β -Cyclodextrin in the textile industry. *Molecules*, 2020, vol. 15, no. 2, doi: 10.3390/molecules25163624.
10. Mulupe N., Babu B., Prinsloo E., Kaassis A.Y., Eddins K., Mack J., Nyokong T. Photodynamic activity of Sn (IV) meso-tetraacetylenophthalocyanine and its methyl- β -cyclodextrin inclusion complexes on MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2019, vol. 23, no. 11n12, doi: 10.1142/S1088424619501633.
11. Benesi H.A., Hildebrand J.H. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 1949, vol. 71, no. 8, doi: 10.1021/ja01176a030.
12. Wang Rui, Zhiwu Yu. Validity and reliability of Benesi-Hildebrand method. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2007, vol. 23, no. 9, doi: 10.1016/S1872-1508(07)60071-0.
13. Berezin D.B., Kustov A.V., Krest'yaninov M.A., Shukhto O.V., Batov D.V., Natal'ya V.K. The behavior of monocationic chlorin in water and aqueous solutions of non-ionic surfactant Tween 80 and potassium iodide. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, vol. 283, doi: 10.1016/j.molliq.2019.03.091.
14. Roy D., Chakraborty A., Rina G. Perimidine based selective colorimetric and fluorescent turn-off chemosensor of aqueous Cu²⁺: studies on its antioxidant property along with its interaction with calf thymus-DNA. *RSC advances*, 2017, vol. 7, no. 64, doi: 10.1039/C7RA06687B.

PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF SUPRAMOLECULAR SYSTEMS BASED ON β -CYCLODEXTRIN AND TETRAPHENYLPORPHYRINNersesyan E.S.¹, Klimenko I.V.¹, Lobanov A.V.^{1,2}¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Kosygina St., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru² Moscow Pedagogical State University
Malaya Pirogovskaya St., 1/1, Moscow, 119991, Russia
Received 22.07.2024

Abstract. Porphyrins, macrocyclic compounds consisting of four pyrrole rings, play a crucial role in various biological processes. This study aimed to obtain and investigate the photochemical properties of inclusion complexes of 5, 10, 15, 20 – tetraphenylporphyrin (TPP) with β -cyclodextrin (β -CD). Experiments were conducted using β -CD solutions in water and TPP in N,N-dimethylformamide (DMF) and ethanol. The first series of experiments involved spectral analysis of the solutions, which allowed for the observation of changes in absorption and fluorescence intensities at different component concentrations. Absorption spectra showed a redistribution of electron density within the macromolecule and a shift in absorption maxima. In the second series of experiments, a 2:1 β -CD—TPP complex was obtained and analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The results demonstrated the formation of stable supramolecular complexes, confirmed by absorption and fluorescence spectra, a calculated binding constant of $K_B=10^{5.38}$, and NMR spectroscopy results. These complexes, owing to their unique photochemical and photosensory characteristics, can be utilized in photodynamic therapy and diagnostics, as well as a platform for targeted delivery. The findings of this research may be applied in the development of new supramolecular systems for biomedicine.

Key words: 5, 10, 15, 20 – tetraphenylporphyrin (TPP), β -cyclodextrin (β -CD), inclusion complex, spectrophotometry, spectrofluorimetry, binding constant.

ВЛИЯНИЕ ДВУХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКОГО ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА (ФЛЭЧ), КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Малиновская Е.М.¹, Савинова Е.А.¹, Ершова Е.С.¹, Сергеева В.А.¹, Каменева Л.В.¹, Краевая О.А.², Трошин П.А.², Вейко Н.Н.¹

¹ФГБНУ «МГНЦ»

ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

²ИПФХ РАН

просп. ак. Семенова, 1, г. Черноголовка, 142432, РФ

Поступила в редакцию 22.07.2024

Аннотация. В настоящее время фуллерены имеют огромный потенциал применения в медицине и фармакологии в качестве векторов для доставки лекарств, противораковых, противовирусных препаратов, а также в качестве антиоксидантов. Однако их использование зачастую невозможно из-за практически полной несовместимости с водой и водными растворами. Активно разрабатываются новые методы получения водорастворимых производных фуллеренов. Модификации поверхности производных фуллерена изменяют их химические и физические свойства, повышают растворимость, однако любые изменения в функционализированных фуллеренах могут так же оказывать влияние на их цитотоксичность и антиоксидантные свойства. Предметом данной работы является изучение влияния двух водорастворимых производных фуллерена C₆₀, различающихся заменой Cl на Me, на окислительный метаболизм эмбриональных фибробластов легких человека (ФЛЭЧ). Исследовали влияние различных концентраций данных соединений на их проникновение в клетки, внутриклеточную локализацию, цитотоксичность и активацию генов сигнальных путей. Показали, что антиоксидантная активность одного из изучаемых производных C₆₀ связана с активацией гена транскрипционного фактора *NRF2* в период «раннего» ответа клеток на добавление фуллерена, тогда как при действии второго производного в течение 24 часов не происходит повышения уровня экспрессии *NRF2* ни на уровне гена, ни на уровне белка. Обнаруженный факт доказывает не только дозозависимый эффект воздействия фуллерена на его антиоксидантные свойства, но и роль заместителей фуллерена на ответ клетки.

Ключевые слова: водорастворимые производные фуллерена C₆₀, окислительный метаболизм, фибробласты легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ).

ВВЕДЕНИЕ

Активное развитие нанотехнологий привело к разработке препаратов на основании наночастиц и формированию такой отрасли, как наномедицина. Наночастицы на основе фуллеренов потенциально можно применять как векторы для доставки лекарств, в качестве противораковых, противовирусных препаратов, а также в качестве антиоксидантов. Исследуется биобезопасность новых синтезированных производных фуллерена, их токсичность в отношении клеток человека. Способность производных фуллерена связывать свободные радикалы связана с химической структурой каркаса фуллерена, способной поглощать электроны за счет большого количества сопряженных двойных связей. В растворах фуллерены проявляют мощные антиоксидантные свойства, в результате чего получили название «радикальных губок» из-за их способности связывать активные формы кислорода (АФК) [1-3]. Однако, показано, что большинство производных фуллерена индуцирует развитие вторичного оксидативного стресса в клетках человека [4,5]. Понимание механизма развития антиоксидантной активности фуллеренов на уровне регуляции транскрипционных факторов будет способствовать эффективному поиску соединений, обладающих антиоксидантными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе используются молекулярно-биологические методы исследования и методы культивирования клеток.

Исследовали два водорастворимые производные фуллерена C₆₀, предоставленные для исследования химиками-синтетиками из Института проблем химической физики Российской академии наук (ИПХФ РАН, г. Черноголовка), различающихся заменой Cl (рис. 1А) на Me (рис. 1Б). Синтез фуллеренов описан ранее [6]. Каждому фуллерену был присвоен идентификационный номер: Ф-225 и Ф-231. Структурные формулы исследуемых производных C₆₀ приведены на рисунке 1.

В экспериментах *in vitro* использованы культуры ФЛЭЧ (фибробластов легкого эмбриона человека) из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ» 2-6-го пассажей. Культуры клеток для проведения научной работы в рамках НИР получены с соблюдением этических норм в рамках проведения научных исследований.

Различные концентрации производных фуллерена добавляли к среде культивирования, клетки культивировались в присутствии соединений от 1 до 24 часов.

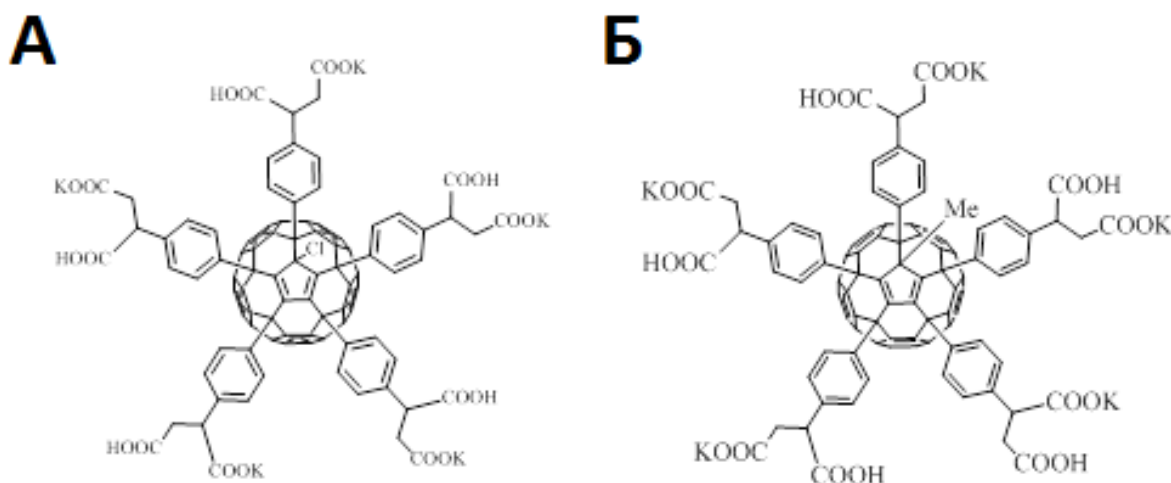


Рисунок 1. Молекулярная формула соединений Ф-225 (А) и Ф-231 (Б)

Для определения токсичности соединений в отношении культур клеток проводили стандартный МТТ-тест с детекцией на планшетном ридере («EnSpire», Финляндия).

Уровень активных форм кислорода (АФК) определяли с помощью красителя: 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) («Molecular Probes/Invitrogen», «СА», США), который под действием АФК окисляется с образованием флуоресцирующего 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF). Детектировали методом флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «Carl Zeiss MicАФКорпу», Германия) и проточной цитометрии (Partec CyFlow® ML, Германия).

Уровень экспрессии белков определяли путём проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных антител на приборе CyFlow Space (Partec, Германия).

Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. После воздействия фуллеренов из клеток выделяли РНК с использованием наборов YellowSolve («Клоноген», Россия) согласно стандартной методике с последующей фенол-хлороформной экстракцией и осаждением хлороформом и изоамиловым спиртом (49:1). Концентрацию РНК определяли с помощью красителя Quant-iT RiboGreen RNA reagent («MoViТес», Германия) на планшетном ридере («EnSpire equipment», Финляндия) λвоб – 487 нм, λфлу – 524 нм. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия) согласно стандартной методике. ПЦР проводили с использованием соответствующих праймеров («Синтол») и интеркалирующего красителя SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel MicАФКoft Office, Statistica 6.0, StatGraph. При анализе предполагаемых различий между выборками исходили из гипотезы об отсутствии различий, которую проверяли с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни. Различия достоверны при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки цитотоксичности исследуемых соединений был проведен стандартный МТТ-тест. Исследовали влияние водорастворимых производных фуллерена Ф-225 и Ф-231 на ФЛЭЧ в концентрации 20 нг/мл – 2 мг/мл. Фуллерены добавляли в среду в начале культивирования ФЛЭЧ. Длительность культивирования составляла 1-24 часа. Не цитотоксичной для ФЛЭЧ является концентрация соединения ниже 30 мкг/мл, в концентрации 30 мкг/мл – 0,55 мг/мл оба соединения (Ф-225 и Ф-231) оказывают повреждающее воздействие на клетки, вызывая гибель менее 50% клеток; Ф-225 и Ф-231 в концентрации выше 550 мкг/мл токсичны для клеток (рис. 2).

В результате сканирования спектра возбуждения водных растворов соединений фуллерена C_{60} Ф-225 и Ф-231 (длина волны возбуждения в диапазоне 230-600 нм при испускании 620 нм) для двух соединений обнаружены 2 максимума возбуждения, при длинах волн 280 нм и 370 нм. При длине волны возбуждения 370 нм спектр соединения Ф-225 имеет три максимума испускания, при 436, 470 и 628 нм. Спектр флуоресценции соединения Ф-231 при длине волны возбуждения 370 нм имеет максимум при длине волны 628 нм.

Флуоресценцию соединений Ф-225 и Ф-231 мы использовали для анализа их проникновения и локализации в культивируемых эмбриональных фибробластах легкого человека (ФЛЭЧ). Показали, что в течение 1-24 часов в условиях культивирования ФЛЭЧ соединение Ф-225 проникает через клеточную мембрану, накапливаясь в цитоплазме (рис. 3Б (1)). Соединение Ф-231 проникает через цитоплазматическую мембрану быстро – уже через 30 минут (рис. 3А (2)), через 2 часа в клетках наблюдается сильная флуоресценция (рис. 3Б (2)), а уже через 24 часа флуоресценция фуллерена Ф-231 в клетках снижается, что может свидетельствовать о быстром выходе соединения Ф-231 из клеток.

Результаты, полученные при исследовании проникновения соединений Ф-225 и Ф-231 в клетки методом флуоресцентной микроскопии, подтверждаются данными проточной цитофлуориметрии (рис. 3В). При

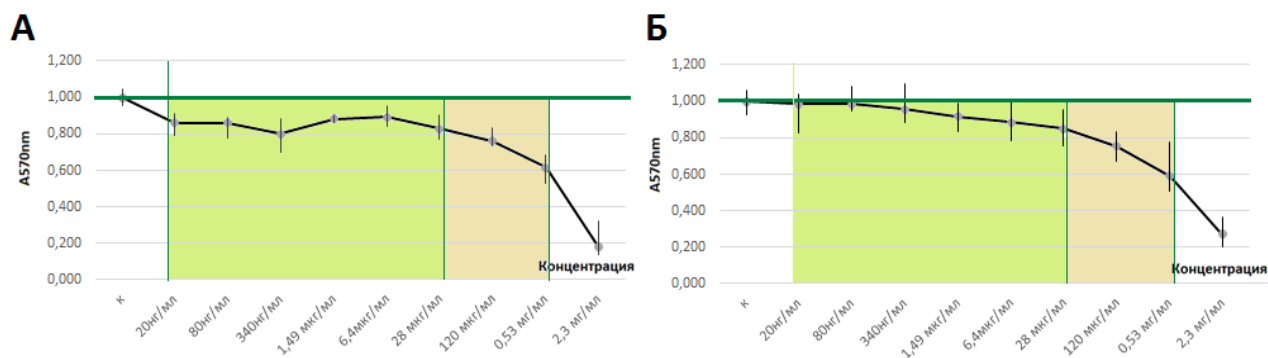


Рисунок 2. МТТ-тест: по оси X – концентрации фуллерена Ф-225 (А) и Ф-231 (Б), по оси Y – оптическая плотность при 570 нм

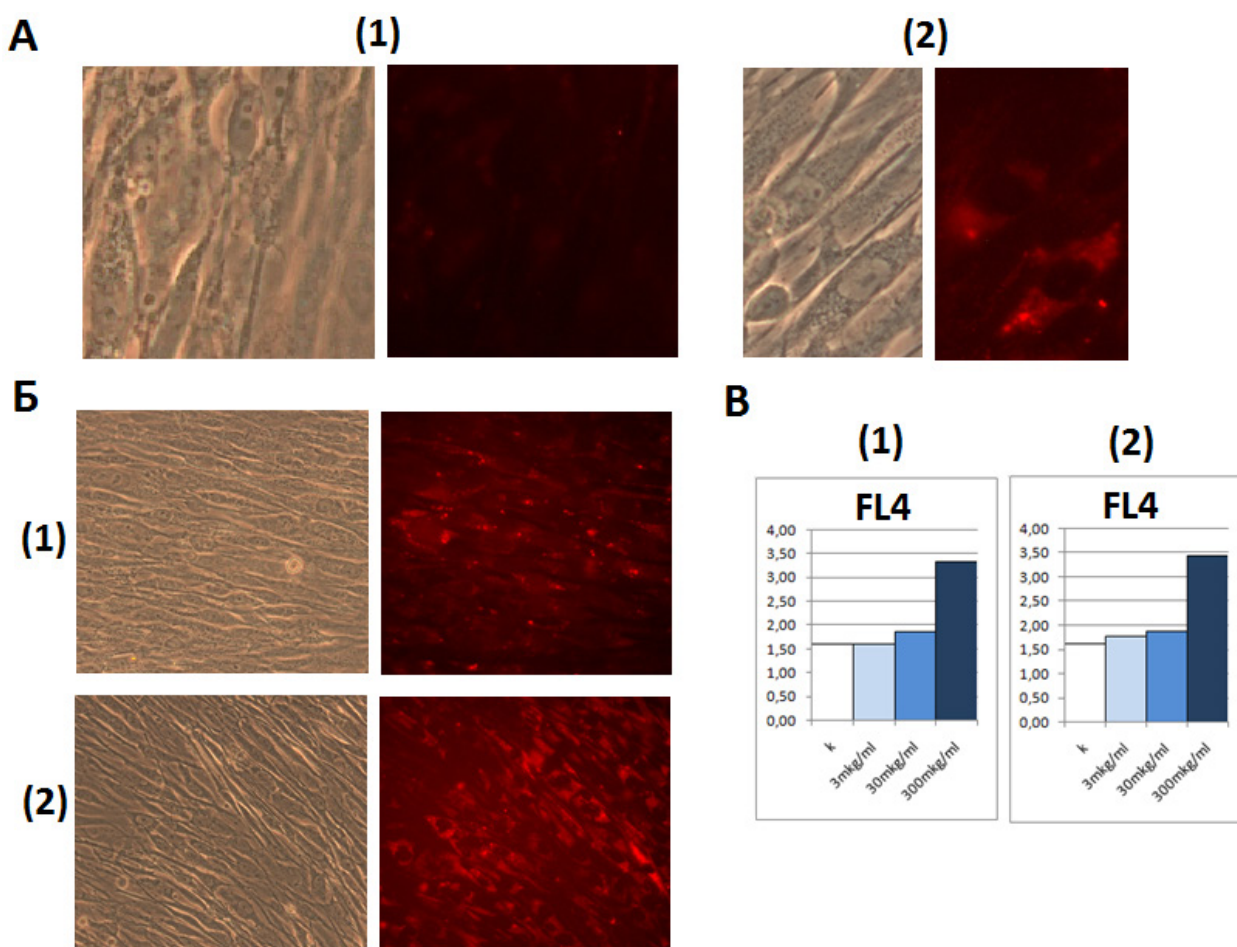


Рисунок 3. Проникновение соединений Ф-225 и Ф-231 в ФЛЭЧ по данным флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. (А, Б) микроскоп AxioVert, Carl Zeiss, Германия), (В) проточный цитофлуориметр CyFlow, PARTEC, Германия). А – флуоресценция Ф-231 (в концентрации 0,3 мг/мл) в клетках через 1 час, (1) – контроль, (2) – флуоресценция Ф-231 (слева – видимый свет, справа – флуоресценция с использованием фильтра 600-650 нм). Увеличение $\times 63$. Б – флуоресценция Ф-225 (1) Ф-231 (2) в концентрации 0,3 мг/мл в клетках через 2 часа (слева – видимый свет, справа – флуоресценция Ф-225 и Ф-231 с использованием фильтра 600-650 нм). Увеличение $\times 40$. В – зависимость медиан значений FL4 – сигнала в нефиксированных клетках (ФЛЭЧ) в зависимости от концентрации Ф-225 (1) и Ф-231 (2) после инкубации 12 часов. По критерию Манна-Уитни данные при концентрации Ф-225 и Ф-231 3 мг/мл отличаются от контроля ($p < 0,05$)

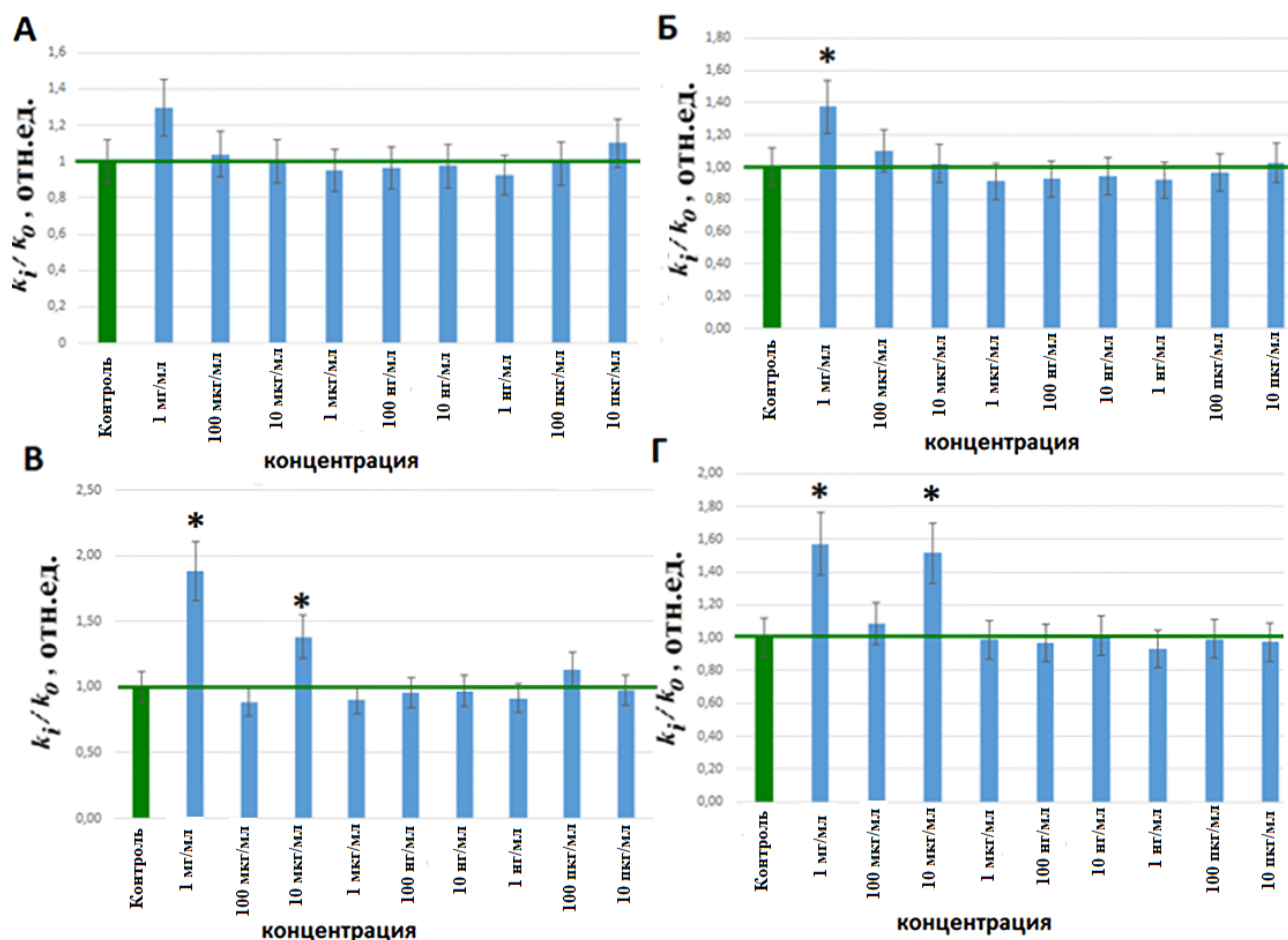


Рисунок 4. Гистограммы, отражающие зависимость уровня АФК в клетках (отношения констант скорости синтеза DCF после воздействия фуллерена – k_i и в контроле – k_0) от концентрации соединений Ф-225 (А, В) и Ф-231 (Б, Г) в среде культивирования и от времени инкубирования – 1 час (А, Б) и 24 часа (В, Г). * – по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля – зеленая линия ($p < 0,05$)

исследовании флуоресценции в нефиксированных ФЛЭЧ на проточном цитофлуориметре при облучении лазером с длиной волны 488 нм обнаружены сигналы темно-красной флуоресценции в клетках, инкубированных 12 часов с добавлением соединений Ф-225 и Ф-231 (рис. 3В, канал детекции FL4). Сигнал флуоресценции фуллерена в клетках возрастает с увеличением концентрации соединения. После фиксации ФЛЭЧ возрастания флуоресценции в зависимости от концентрации фуллерена не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии связывания обоих исследуемых соединений со структурами клетки.

Таким образом, мы показали, что соединения Ф-225 и Ф-231 обладают выраженной флуоресценцией, которая позволяет исследовать их проникновение в клетки, накопление и локализацию в цитоплазме.

В живой клетке АФК образуются в цитоплазме, на поверхности клеточной мембраны и в ядре. Кроме того, клетки продуцируют молекулы пероксида водорода в межклеточную среду. АФК принимают участие в реализации многих клеточных процессов, таких, как пролиферация, апоптоз и межклеточная сигнализация. С другой стороны, избыточный синтез клеткой АФК в результате нарушения внутриклеточных процессов и/или при внешнем воздействии, может вызывать клеточную гибель или повреждение клеток. Для оценки уровня синтеза АФК в клетках использовали соединение H2DCFH-DA (dichlorodihydrofluoresceindiacetate) - краситель, который быстро проникает через клеточные мембраны. В цитозоле этот краситель быстро гидролизует до DCFH гидролазами клетки. Не флуоресцирующий DCFH является чувствительным внутриклеточным маркером окислительного стресса, окисляясь радикалами АФК до интенсивно флуоресцирующего DCF.

На рисунке 4 приводятся зависимости для констант скорости синтеза DCF в клетках при концентрациях фуллеренов Ф-225 и Ф-231 от 10 пг/мл до 1 мг/мл через 1 и 24 часа инкубации клеток с соединениями.

При добавлении к клеткам производных фуллерена Ф-225 и Ф-231 в концентрации 1 нг/мл – 1 мкг/мл наблюдается статистически недостоверная тенденция к снижению уровня активных форм кислорода (АФК) и через 1, и через 24 часа (рис. 4), при высоких концентрациях – 10 мкг/мл – 1 мг/мл оба исследуемых соединения вызывают повышение уровня АФК через 1 и 24 часа, наиболее сильный подъем уровня АФК наблюдается в клетках при действии соединений Ф-225 и Ф-231 в концентрациях 10 мкг/мл – 1 мг/мл через 24 часа после добавления в среду культивирования (рис. 4). Большинство водорастворимых соединений фуллерена способны связывать АФК, но одновременно могут запускать процесс синтеза АФК в клетке, что может нивелировать снижение уровня АФК производными фуллерена. Мы исследовали процессы, происходящие в клетках после взаимодействия с соединениями Ф-225 и Ф-231.

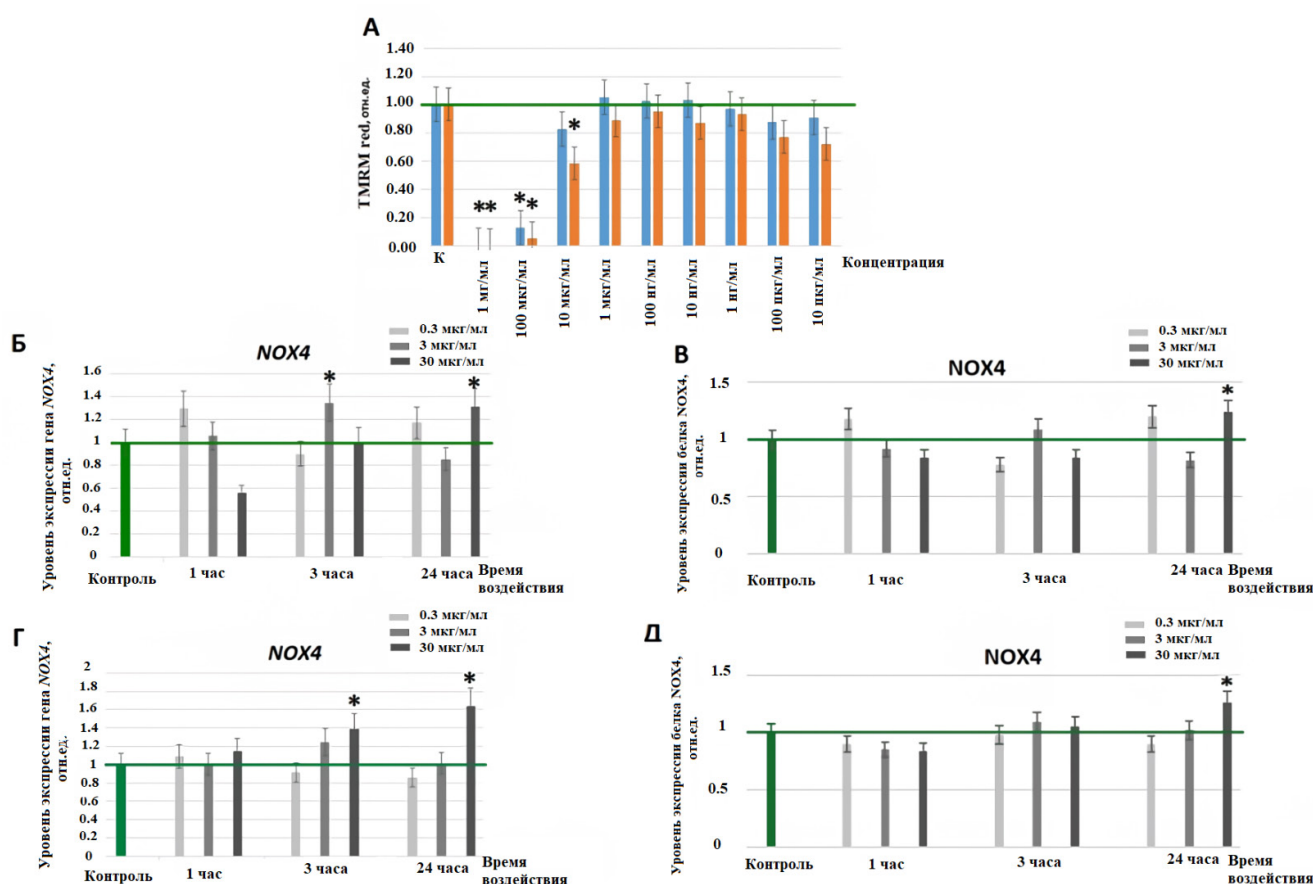


Рисунок 5. А – уровень интенсивности красителя митохондрий Mito-tracker Red 580 (TMRM red) после культивирования клеток в течение 24 часов в присутствии соединений Ф-225 и Ф-231 в концентрации 10 пкг/мл – 100 мкг/мл;

Б, Г – уровень экспрессии гена *NOX4* в клетках (ФЛЭЧ) при действии Ф-225 (Б) и Ф-231 (Г) в концентрации 0,3-30 мкг/мл. Количество РНК *NOX4* – среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена *NOX4* в присутствии производных фуллеренов по отношению к экспрессии гена *NOX4* в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген *TBP*;

Б, Д – уровень белка *NOX4* в ФЛЭЧ, обработанных Ф-225 (В) и Ф-231 (Д) в концентрации 0,3-30 мкг/мл, относительно контрольных значений (зеленая горизонтальная линия). (*) – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,01$, непараметрический U-тест

Изменение уровня АФК в клетках является результирующей составляющей активации синтеза свободных радикалов в клетках после действия фуллеренов и связывания свободных радикалов исследуемыми соединениями. Генерация активных форм кислорода митохондриями происходит при синтезе аденозинтрифосфата (АТФ) в результате окислительного фосфорилирования. Усиление окислительных процессов при действии фуллеренов в митохондриях может способствовать увеличению уровня АФК. Это предположение проверили, окрасив ФЛЭЧ красителем митохондрий - Mito-tracker Red 580 (TMRM red) после культивирования клеток в течение 24 часов в присутствии соединений Ф-225 и Ф-231 в концентрациях 10 пкг/мл – 1 мг/мл. Краситель TMRM red окрашивает только активные митохондрии, уровень активных митохондрий при инкубировании клеток с соединениями Ф-225 и Ф-231 не повышался, а в случае добавления к клеткам соединений Ф-225 и Ф-231 в концентрации 10 мкг/мл снижался, при концентрации исследуемых соединений 100 мкг/мл – 1 мг/мл оба соединения ингибировали активность митохондрий (рис. 5А), что согласуется с данными МТТ-теста.

NADPH-оксидазы также являются продуцентом физиологических количеств АФК в клетках. Одной из экспрессирующихся в фибробластах NADPH-оксидаз является *NOX4*, экспрессия которого регулируется на уровне гена. Уровень экспрессии *NOX4* на уровне гена и белка в клетках (ФЛЭЧ) при действии соединения Ф-225 в концентрации 0,3 мкг/мл возрастает в течение часа после начала инкубации; к 3 ч инкубации уровень экспрессии *NOX4* снижается, а затем через 24 часа вновь повышается (рис. 5Б, В). Уровень экспрессии *NOX4* на уровне гена и белка в клетках при действии соединения Ф-225 в концентрации 3 мкг/мл повышается через 3 часа культивирования в присутствии соединения, а через 24 часа - снижается ниже контрольных значений (рис. 5Б, В). Через час после добавления к ФЛЭЧ соединения Ф-225 в концентрации 30 мкг/мл уровень экспрессии гена *NOX4* падает почти в 2 раза, через 3 часа – восстанавливается до контрольных значений, через 24 часа возрастает на 30% выше контрольных значений (рис. 5Б, В). При действии соединения Ф-231 в концентрации 3 и 30 мкг/мл через 3-24 часа уровень экспрессии *NOX4* на уровне гена и белка в клетках возрастает, что особенно

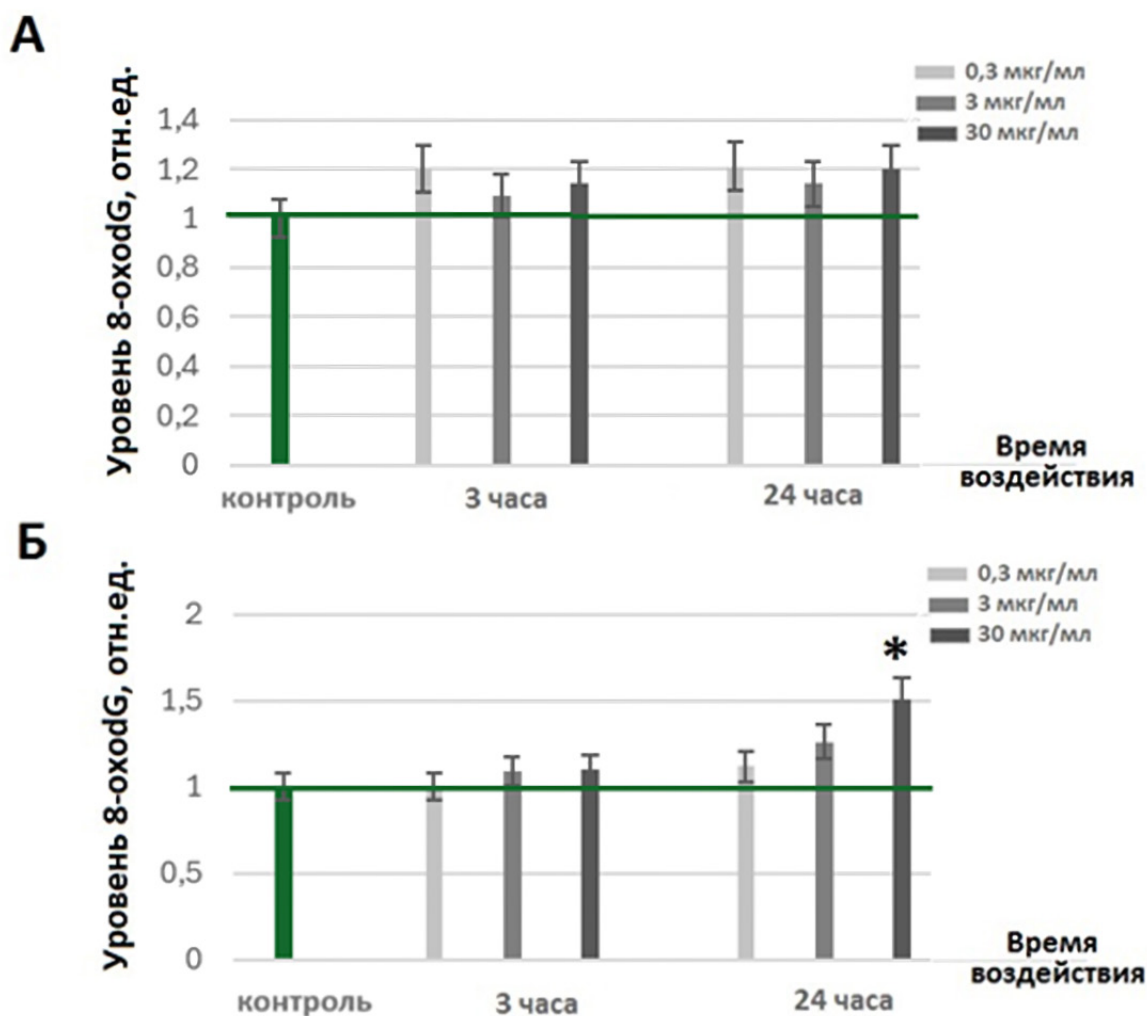


Рисунок 6. Гистограммы распределения медиан значений сигналов маркера окисления ДНК (8-оксигуанозина) в ФЛЭЧ при инкубировании клеток с производным фуллерена Ф-225 (А) и Ф-231 (Б) в концентрации 0,3-30 мкг/мл, время указано на рисунке. * - по критерию Манна-Уитни данные отличаются от контроля, зеленая линия ($p < 0,01$)

заметно при действии Ф-231 30 мкг/мл в течение 24 часов (рис. 5Г, Д). Повышение уровня экспрессии белка NOX4 через 24 часа инкубации клеток с соединениями Ф-225 и Ф-231 в концентрации 30 мкг/мл может объяснить, почему возрастает уровень АФК в клетках во времени.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нелинейной регуляции экспрессии гена *NOX4* при действии соединения Ф-225 в разных концентрациях во времени. Ф-225 может рассматриваться в качестве потенциального антиоксиданта при подборе оптимальной концентрации этого соединения. Антиоксидантные свойства соединения Ф-225 проявляются при его действии на клетки в концентрации 0,3 мкг/мл, в концентрации 30 мкг/мл оба исследуемых соединения – Ф-225 и Ф-231 – вызывают повышение уровня экспрессии белка NOX4 через 24 часа инкубации, что приводит к активному синтезу АФК в клетках и развитию «позднего» повреждающего эффекта соединений на клетки. Вероятно, добавление фуллеренов Ф-225 и Ф-231 вместе с ингибиторами NOX4 может привести к пролонгированному антиоксидантному действию соединений.

Возможное повреждающее действие соединений Ф-225 и Ф-231 на клетку может реализовываться в виде окислительных модификаций ДНК клеток. Исследовали уровень окислительных повреждений ДНК фибробластов при действии на них соединений Ф-225 и Ф-231 в концентрации 0,3-30 мкг/мл. Уровень 8-оксигуанозина (маркера окисления) при действии Ф-231 в концентрации 30 мкг/мл повышается через 24 часа, что свидетельствует о повышении количества окисленных оснований ДНК к 24 часам инкубации в присутствии фуллерена (рис. 6).

В регуляции антиокислительного ответа клеток принимает участие транскрипционный фактор NRF2. При действии соединения Ф-225 в концентрации 0,3-30 мкг/мл обнаружили повышение уровня экспрессии гена *NRF2* почти в 2 раза в течение первых 3 часов после добавления фуллерена Ф-225 в концентрации 0,3-3 мкг/мл и в течение 1 часа после добавления фуллерена Ф-225 в концентрации 30 мкг/мл (рис. 7Б). Через 24 часа после добавления фуллерена Ф-225 в концентрации 0,3-30 мкг/мл уровень экспрессии гена *NRF2* возвращается к контрольным значениям (рис. 7Б). Уровень экспрессии белка NRF2 в присутствии соединения Ф-225, как показано методом флуоресцентной микроскопии, также возрастает на 20-50 % (рис. 7А (1)). Методом

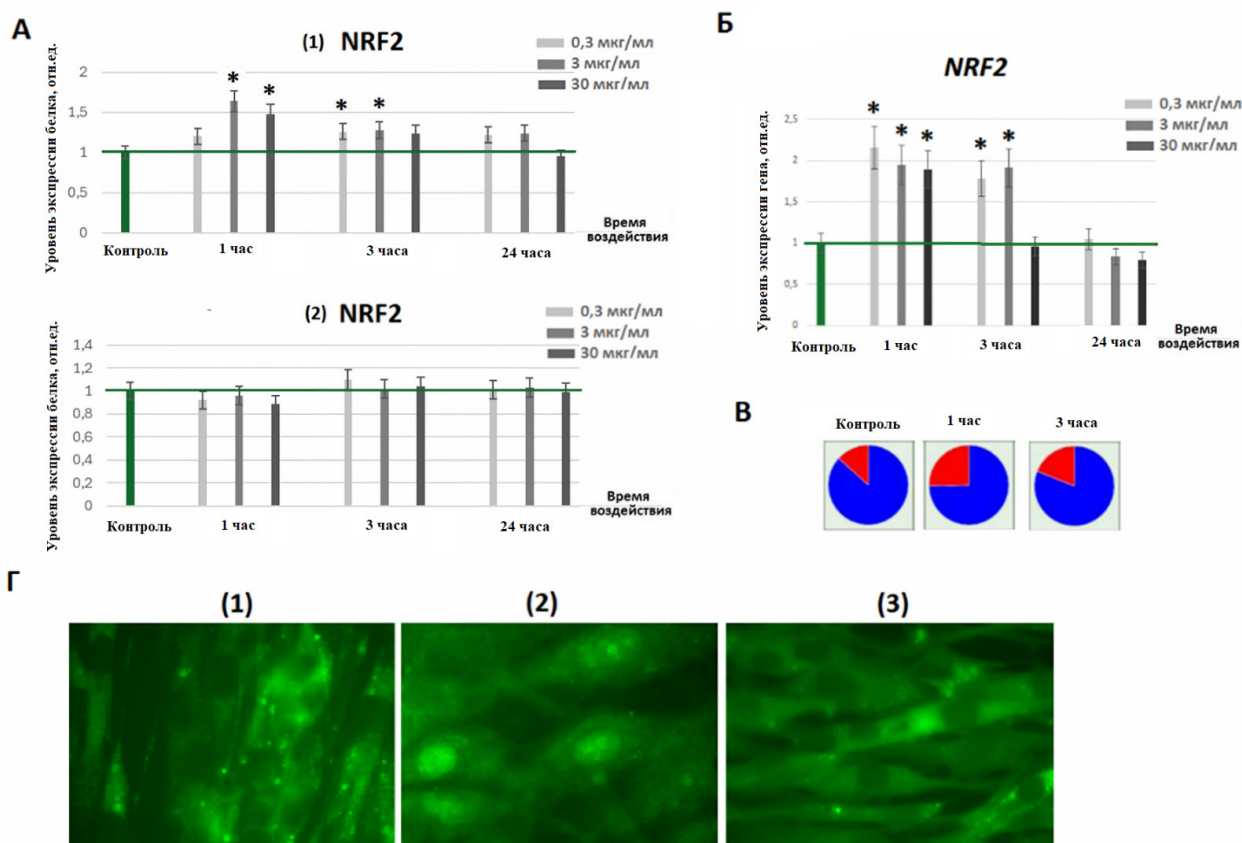


Рисунок 7. А – уровень белка NRF2 в ФЛЭЧ, обработанных Ф-225 (1) и Ф-231 (2) в концентрации 0,3-30 мкг/мл, относительно контрольных значений (зеленая горизонтальная линия). (*) – достоверные отличия с контрольными клетками, $p < 0,001$, непараметрический U-тест;

Б – уровень экспрессии гена *NRF2* в клетках (ФЛЭЧ) при действии Ф-225 в концентрации 0,3-30 мкг/мл. Количество РНК *NRF2* – среднее значение (три эксперимента) экспрессии гена *NRF2* в присутствии производных фуллеренов по отношению к экспрессии гена *NRF2* в контроле (зеленая горизонтальная линия). В качестве гена внутреннего стандарта использован ген *TBP*;

В – уровень фосфорилированной формы белка NRF2 в ФЛЭЧ, обработанных Ф-225 в концентрации 3 мкг/мл, относительно контрольных значений через 1 и 3 часа;

Г – флуоресцентная микроскопия, флуоресценция антител к NRF2 в ФЛЭЧ в концентрации 3 мкг/мл: (1) – контроль, (2) – клетки после инкубирования с Ф-225, 2 часа. (3) – клетки после инкубирования с Ф-231, 2 часа. Увеличение $\times 40$

флуоресцентной микроскопии показано, что NRF2 локализуется, преимущественно, в ядре клеток, что свидетельствует об активности NRF2 (рис. 7Г (2)). Исследовали уровень фосфорилированной формы NRF2 (phNRF2) в клетках. Через 1 час культивирования клеток в присутствии фуллерена Ф-225 уровень фосфорилированного NRF2 повышен, что также подтверждает активность фактора NRF2 в клетках. Полученные данные подтвердили с использованием системы для проведения клеточного имиджинга и последующей обработки полученных данных CyTell (GE Healthcare). Через 1-3 часа после добавления соединения Ф-225 процент окрашенных ядер возрастает (рис. 7В). При действии соединения Ф-231 в концентрации 0,3-30 мкг/мл мы не обнаружили в течение 24 часов повышения уровня экспрессии NRF2 ни на уровне гена, ни на уровне белка (рис. 7А (2), 7Г (3)).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании антиоксидантной активности водорастворимых производных фуллерена C_{60} *in vitro* на уровне генов ФЛЭЧ показано, что непродолжительная антиоксидантная активность с Ф-225 в клетках человека может быть обусловлена активацией гена транскрипционного фактора *NRF2*. *NRF2* (erythroid-derived factor 2) – один из главных транскрипционных факторов, который обуславливает антиокислительный ответ клеток на действие внутренних и внешних АФК. Фактор NRF2 контролирует конститутивную индуцибельную экспрессию ряда генов, которые в промоторе содержат ARE-элемент. Регуляция происходит как на уровне увеличения количества фактора, так и на уровне его локализации в клеточных структурах. Чтобы фактор регулировал экспрессию генов антиокислительного ответа, он должен быть локализован в ядре клеток. Известно, что NRF2 регулирует продукцию АФК митохондриями и NADPH-оксидазами, в том числе, NOX4. Увеличение экспрессии белка NOX4 и уровня АФК позволяет предположить, что активность фактора NRF2 в присутствии фуллерена

также может быть изменена. В ответе клеток на присутствие большинства производных фуллерена не наблюдается повышения экспрессии транскрипционного фактора NRF2 ни на уровне гена, ни на уровне белка, не происходит его транслокации в ядро клеток, при этом наблюдается развитие вторичного окислительного стресса в клетках. В данном исследовании мы выявили одно производное фуллерена, показывающее значительную активность транскрипционного фактора NRF2 в период «раннего» ответа клеток на добавление фуллерена

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ: проект 19-13-00411-П (синтез Ф-225 и Ф-231) и в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования.

Список литературы / References:

1. Xiao L., Takada H., Gan Xh., Miwa N. The water-soluble fullerene derivative "Radical Sponge" exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, vol. 16, no. 6, pp. 1590-1595, doi: 10.1016/j.bmcl.2005.12.011.
2. Yang X., Ebrahimi A., Li J., Cui Q. Fullerene-biomolecule conjugates and their biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine*, 2014, vol. 9, pp. 77-92, doi: 10.2147/IJN.S52829.
3. Liu Q., Cui Q., Li X.J., Jin L. The applications of buckminsterfullerene C60 and derivatives in orthopaedic research. *Connect Tissue Res.*, 2014, vol. 55, no. 2, pp. 71-79, doi: 10.3109/03008207.2013.877894.
4. Ershova E.S., Sergeeva V.A. et al. Functionalized fullerene increases NF-κB activity and blocks genotoxic effect of oxidative stress in serum-starving human embryo lung diploid fibroblasts. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, vol. 2016, p. 9895245, doi: 10.1155/2016/9895245.
5. Ershova E.S., Sergeeva V.A. et al. Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, 2016, vol. 805, pp. 46-57, doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.05.004.
6. Kraevaya O.A., Peregudov A.S. et al. Diversion of the Arbuzov reaction: alkylation of C-Cl instead of phosphonic ester formation on the fullerene cage. *Org. Biomol. Chem.*, 2019, vol. 17, no. 30, pp. 7155-7160, doi: 10.1039/c9ob00593e.

THE EFFECT OF TWO WATER-SOLUBLE DERIVATIVES OF FULLERENE C₆₀ ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OXIDATIVE METABOLISM OF HUMAN EMBRYONIC LUNG FIBROBLASTS (HEL F) CULTURED IN VITRO

Malinovskaya E.M.¹, Savinova E.A.¹, Ershova E.S.¹, Sergeeva V.A.¹, Kameneva L.V.¹, Kraevaya O.A.², Troshin P.A.², Veiko N.N.¹

¹ Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: m.elena.0402@gmail.com

² IPCP RAS

Semenov Ave. 1, Chernogolovka, 142432, Russia

Received 22.07.2024

Abstract. Currently, fullerenes have a huge potential for use in medicine and pharmacology as vectors for the delivery of drugs, anticancer, antiviral drugs, as well as antioxidants. However, their use is often impossible due to their almost complete incompatibility with water and aqueous solutions. New methods for the production of water-soluble derivatives of the fullerene are being actively developed. Surface modifications of fullerene derivatives change their chemical and physical properties, increasing solubility; however, any changes to functionalized fullerenes may also affect their cytotoxicity and antioxidant properties. The aim of this study is to investigate the effect of two water-soluble derivatives of the fullerene C₆₀, differing in Cl substitution for Me, on oxidative metabolism in human embryonic lung fibroblasts (HEL F). The effect of different concentrations of these compounds on their penetration into cells, intracellular localization, cytotoxicity, and activation of signaling pathway genes was studied. It was shown that the antioxidant activity of one of the studied derivatives is associated with activation of the NRF2 transcription factor gene during "early" cell response to fullerene addition. In contrast, with the action of a second derivative, no increase in NRF2 expression is observed at either the gene or protein levels within 24 hours. This discovery not only confirms the dose-dependent effect of fullerenes on their antioxidant properties but also demonstrates the role of substituents in fullerenes in their interaction with cells.

Key words: water-soluble derivatives of fullerene C₆₀, oxidative metabolism, human embryo lung fibroblasts (HEL F).

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ИОНООБМЕННЫХ БЕЛКОВ ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Яглов В.В.

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцина ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»

Абрикосовский пер., 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: yaglova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.07.2024

Аннотация. Йод относится к жизненно важным микроэлементам. В его внутриклеточном транспорте принимают участие два ионообменных канала, формируемых белками натрий-йодным симпортером (НИС) и пендрином. Цель исследования – выявление изменений в содержании НИС и пендрина в системном кровотоке и связи этих изменений с параметрами продукции тиреоидных гормонов при длительном увеличении содержания дейтерия в организме. Эксперимент выполнен на 60 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 340-370 г. Для повышения содержания дейтерия крысам опытной группы (n=30) водопроводная вода была заменена на воду с увеличенным до 500000 ppm содержанием дейтерия. Результаты исследования показали, что увеличение содержания дейтерия в организме влияет на продукцию как натрий-йодного симпортера, так и пендрина. Накопление дейтерия в организме стимулировало продукцию обоих ионообменных белков, но наибольший по продолжительности стимулирующий эффект оказывает на НИС. При этом в продукции НИС сохранялось влияние его естественного регулятора – тиреотропного гормона гипофиза, однако оно было более слабым по регулируемому эффекту, нежели увеличение концентрации дейтерия в клетках. Увеличение продукции пендрина происходило только на ранних этапах дейтерирования параллельно с увеличением секреции тироксина щитовидной железой. При этом, уровень НИС не демонстрировал связи с продукцией тиреоидных гормонов.

Ключевые слова: ионообменные каналы, йод, дейтерий, щитовидная железа, тиреоидные гормоны.

ВВЕДЕНИЕ

Йод относится к жизненно важным микроэлементам, содержание которого в организме является мощным регуляторным фактором в первую очередь морфогенетических процессов [1,2]. Йод поступает в организм в молекулярном виде, в виде неорганических солей и в составе органических соединений. Основным депо йода в организме является щитовидная железа, функционирование которой имеет непосредственную связь с обменом йода в организме. Также в метаболизме йода важную роль играют слизистая оболочка желудка, слюнные железы, лактирующая молочная железа [3]. Поступление йода в клетки опосредуется мембранным белком натрий-йодным симпортером (НИС), который осуществляет совместный транспорт в клетку натрия и йода против электрохимического градиента [4,5]. Для включения в молекулу тироглобулина в полости фолликулов йодиды должны проникнуть через апикальную мембрану фолликулярных тироцитов. Этот процесс осуществляет натрий-независимый йодид/хлоридный транспортер пендрин [6]. Экспрессия этих двух ионообменных белков чрезвычайно важна для гормоногенеза в щитовидной железе, однако механизмы ее регуляции остаются малопонятными. Основным стимулятором синтеза функциональных белков в тироцитах является тиреотропный гормон (ТТГ). Однако, секреторные процессы в тироцитах чувствительны не только к гормональной, но и другим видам регуляции. По нашим данным, щитовидная железа проявляет высокую чувствительность к изменению в балансе стабильных изотопов водорода протия и дейтерия в организме [7,8]. Содержание последнего в организме достаточно велико и влияет не только на скорость метаболических процессов, но и регулирует деление клеток [9,10]. Целью настоящего исследования было выявление изменений в содержании НИС и пендрина в системном кровотоке и связи этих изменений с параметрами продукции тиреоидных гормонов при длительном увеличении содержания дейтерия в организме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 60 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 340-370 г. Крысы содержались в стандартных условиях вивария и получали сухой корм для лабораторных грызунов. Животные контрольной группы (n=30) потребляли водопроводную питьевую воду с содержанием дейтерия 146 ppm. Для повышения содержания дейтерия крысам опытной группы (n=30) водопроводная вода была заменена на воду с увеличенным до 500000 ppm содержанием дейтерия (ФГБУ «ПНПФ им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»). Содержание дейтерия в воде верифицировали с помощью изотопного анализатора T-LWIA-45-EP («Los Gatos Research», США) с точностью 1ppm. Было подсчитано количество потребленной крысами жидкости, рассчитан объем потребленной жидкости на 100 г массы тела, показавший одинаковый уровень потребления жидкости животными контрольной и опытной групп. Производили забор крови из хвостовой вены в пробирки, получали сыворотку. В крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию НИС, пендрина, связанного

с белками тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), а также тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью коммерческих наборов («BioVendor», Чехия; «Fine test», Китай).

Эксперимент проведен в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 №267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г. с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 г. Исследование одобрено локальной этической комиссией (протокол № 28(4) от 27 октября 2021г.)

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 7.0 («StatSoft, Inc.», США). Количественные данные, имеющие приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и ошибкой среднего ($M \pm SEM$). Сравнение количественных данных производили с использованием t-критерия Стьюдента. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Затем вычисляли относительные изменения в экспериментальной группе по сравнению с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через сутки после начала эксперимента в группе крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия выявлено статистически значимое повышение концентрации НИС в среднем на 30%, а пендрина – более, чем на 200%. В продукции тиреоидных гормонов также были выявлены изменения в виде повышения концентрации Т4 и снижения уровня ТТГ по принципу обратной связи.

Через трое суток в группе крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия, отмечали прогрессивное увеличение содержания ионообменных белков. Концентрация НИС в сыворотке крови превышала значения контрольной группы в 1,5 раза, пендрина – в 4 раза. Наряду с этими изменениями были выявлены повышенный уровень как Т4, так и Т3 в сыворотке крови и пониженное содержание ТТГ.

Через неделю после начала эксперимента у крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия, регистрировали повышенную в среднем на 40% концентрацию НИС и не отличающуюся от значений контроля

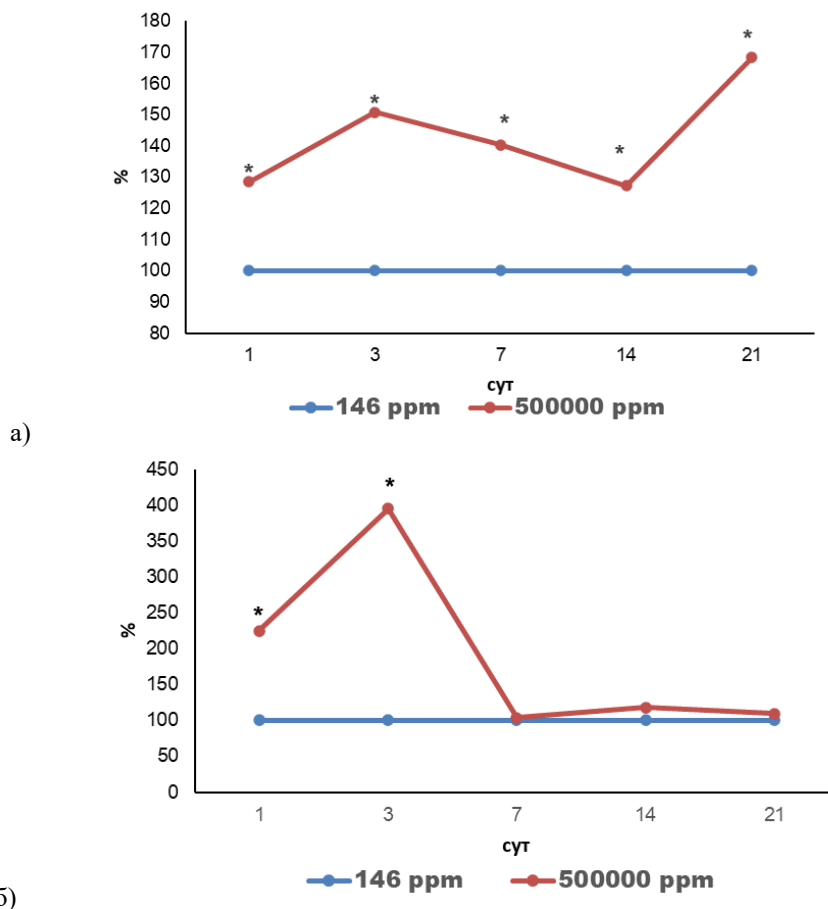


Рисунок 1. Изменения концентраций натрий-йодного симпортера (а) и пендрина (б) в сыворотке крови крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия; примечания: значения контрольной группы приняты за 100%, * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

концентрацию пендрина в сыворотке крови. В тиреоидном статусе отмечены изменения, связанные со снижением уровня Т3 при нормальном содержании Т4 в системном кровотоке и значительно пониженный ТТГ.

Через 14 суток в экспериментальной группе концентрации НИС превышали значения контрольной группы на четверть, а пендрина – статистически значимо не отличались от значений контрольной группы. В тиреоидном статусе отмечено пониженное содержание Т4, Т3 и ТТГ.

Через 21 сутки выявлено значительное увеличение концентрации НИС, в среднем на 70% по сравнению с контролем, и отсутствие каких-либо значимых отличий в уровне пендрина. Концентрации Т4 и Т3 повысились до уровня контрольной группы, а ТТГ значительно снизился.

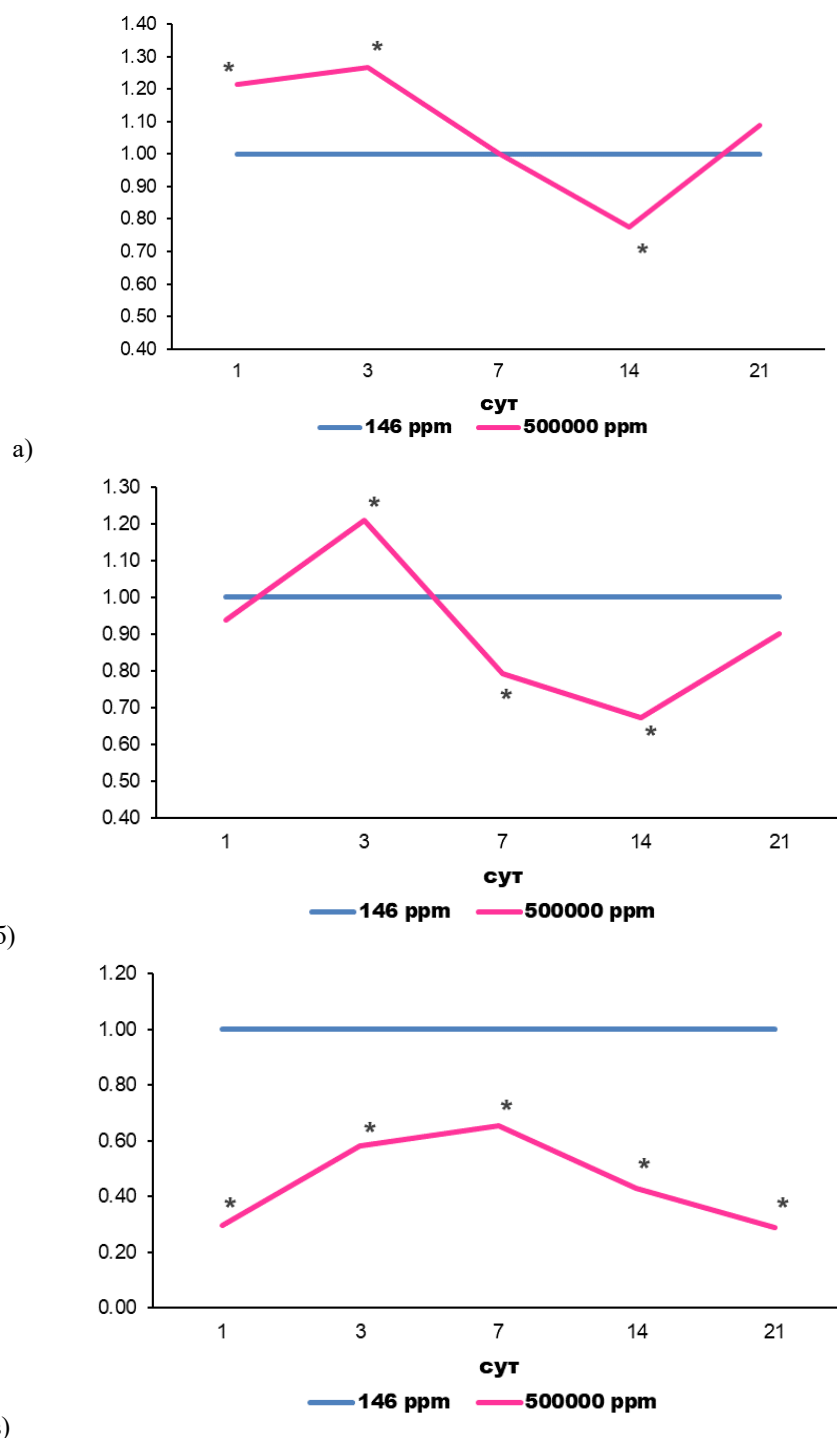


Рисунок 2. Изменения концентраций общего тироксина (а), общего трийодтиронина (б) и тиреотропного гормона (в) в сыворотке крови крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия; Примечания: значения контрольной группы приняты за единицу, * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

Проведенное исследование показывает, что содержание дейтерия в организме влияет на синтез ионообменных белков. Наиболее выраженные по длительности изменения наблюдались в продукции НИС, а по амплитуде – пендрин. Оценивая динамику концентраций НИС и пендрин необходимо отметить, что она происходила на фоне различных изменений в балансе протия и дейтерия в организме. Увеличение поступления дейтерия с водой в начале вызывает создание градиента концентраций дейтерия между кровью и клетками. Затем постепенно дейтерий поступает в клетки и включается в состав биополимеров [11]. Следовательно, наблюдаемые повышение концентрации обоих белков происходили на фоне градиента дейтерия между кровью и тканями, стимулировавшем формирование ионных каналов в клетках. По мере насыщения клеток дейтерием продукция НИС продолжала оставаться повышенной, а пендрин – начинала снижаться. Следовательно, накопление дейтерия в клетках требовало усиления формирования каналов для транспорта йодидов из системного кровотока, но не из клеток в полость фолликулов.

Оценивая связь продукции белков, транспортирующих в клетки йод, и тиреоидных гормонов, можно также выделить несколько этапов в сочетанных изменениях. Появление градиента дейтерия между кровью и тканями стимулировало и продукцию ионных каналов и тиреоидных гормонов. При этом важно отметить, что на 1-е и 3-и сутки наблюдалось физиологическое снижение уровня гипотиреоидного ТТГ по принципу обратной связи. Затем происходило ингибирование секреции ТТГ и на 14-е сутки у крыс развился вторичный гипотиреоз. Возможно, это была защитная реакция, направленная на нормализацию продукции гормонов щитовидной железы на фоне появившегося стимула в виде изменения баланса дейтерия и протия. Затем на 21-е сутки обратная связь между уровнем тиреоидных гормонов и ТТГ восстанавливалась. Динамика концентрации НИС показала, что на фоне его повышенной продукции отмечался спад с 7-х по 14-е сутки. Известно, что синтез НИС имеет гипотиреоидный контроль и стимулируется ТТГ, также коррелирует с уровнем секреции тиреоидных гормонов [12,13]. На второй-третьей неделе эксперимента выраженная супрессия секреции ТТГ сопровождалась относительным снижением уровня НИС, что свидетельствует с одной стороны о его регуляторной роли в данном случае, а с другой стороны указывает на наличие фактора, более сильного по стимулирующему и регулиющему воздействию, нежели ТТГ. Несомненно, что этот фактор непосредственно связан с дейтерированием клеток. Анализируя связь между изменениями тиреоидного статуса и концентрацией пендрин, мы обнаружили, что повышенная продукция основного гормона щитовидной железы Т4 наблюдалась в те же временные отрезки, что и пендрин, но связи с изменениями концентрации пендрин и ТТГ мы не наблюдали. Регуляторные механизмы синтеза пендрин мало изучены, вероятно, что они определяются локальными факторами и связаны с изменением электролитного баланса в клетках, поскольку пендрин помимо йода является транспортером и других анионов – хлоридов и бикарбонатов [14]. ТТГ не является стимулятором синтеза пендрин в фолликулярных тироцитах [15,16]. Следовательно, изменения продукции пендрин могли быть обусловлены сдвигами в рН в следствие изменения параметров окислительно-восстановительных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение содержания дейтерия в организме влияет на продукцию как натрий-йодного симпортера, так и пендрин. Накопление дейтерия в организме стимулирует продукцию обоих ионообменных белков, но наибольший по продолжительности стимулирующий эффект оказывает на натрий-йодный симпортер. При этом в продукции последнего сохраняется влияние его естественного регулятора – тиреотропного гормона гипофиза, однако оно является более слабым, нежели стимулирующее действие растущей концентрации дейтерия в клетках. Увеличение продукции пендрин происходит только на ранних этапах дейтерирования параллельно с увеличением секреции тироксина щитовидной железой. При этом, уровень натрий-йодного симпортера не демонстрирует связи с продукцией тиреоидных гормонов.

Исследование выполнено по госзаданию FGFZ-2022-0035.

Список литературы / References:

1. De la Vieja A., Santisteban P. Role of iodide metabolism in physiology and cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2018, vol. 25, R225-R245, doi: 10.1530/erc-17-0515.
2. Aceves C., Mendieta I., Anguiano B., Delgado-González E. Molecular iodine has Extrathyroidal effects as an antioxidant, differentiator, and Immunomodulator. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, p. 1228, doi: 10.3390/ijms22031228.
3. Zhang L., Shang F., Liu C., Zhai X. The correlation between iodine and metabolism: a review. *Front. Nutr.*, 2024, vol. 11, p. 1346452, doi: 10.3389/fnut.2024.1346452.
4. Dohan O., De la Vieja A., Paroder V., Riedel C., Artani M., Reed M., Ginter C.S., Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.*, 2003, vol. 24, pp. 48-77, doi: 10.1210/er.2001-0029.
5. Portulano C., Paroder-Belenitsky M., Carrasco N. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact. *Endocr Rev.*, 2014, vol. 35, pp. 106-149, doi: 10.1210/er.2012-1036.
6. Twyffels L., Massart C., Golstein P.E., Raspe E., Van Sande J., Dumont J.E., Beauwens R., Kruys V. Pendrin: the thyrocyte apical membrane iodide transporter? *Cell Physiol Biochem.*, 2011, vol. 28, no. 3, pp. 491-496, doi: 10.1159/000335110.

7. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Митрофанова В.А., Яглов В.В. Структурные изменения в щитовидной железе при употреблении воды с пониженным содержанием дейтерия. *Актуальная биотехнология*, 2020, № 3 (34), с. 355-357 [Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Mirtofanova V.A., Yaglov V.V. Structural changes in the thyroid gland after consumption of deuterium-depleted water. *Actual Biotechnology*, 2020, no. 3 (34), pp. 355-357 (In Russ.)].
8. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Response of Pituitary-Thyroid Axis to a Short-Term Shift in Deuterium Content in the Body. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2021, vol. 171, pp. 262-264, doi: 10.1007/s10517-021-05208-1.
9. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 3107, doi: 10.3390/ijms24043107.
10. Dzhimak S.S., Basov A.A., Baryshev M.G. Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2015, vol. 465, pp. 370-373, doi: 10.1134/S1607672915060071.
11. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis. *RusOMJ*, 2020, vol. 9, e0210, doi: 10.15275/rusomj.2020.0210.
12. Kosenkov A.V., Lobyshev V.I., Gulyaev M.V., Yusubalieva G.M., Baklaushev V.P. The reversible effect of deuteration on tissue fluid and biopolymers in normal and tumor tissues of mice. *Biophysics*, 2018, vol. 63, pp. 820-824, doi: 10.1134/S0006350918050111.
13. Pesce L., Kopp P. Iodide transport: implications for health and disease. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, 2014, no. 2014(1), p. 8, doi: 10.1186/1687-9856-2014-8.
14. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Mechanisms of Disruptive Action of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the Function of Thyroid Follicular Epitheliocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, vol. 160, pp. 231-233, doi: 10.1007/s10517-015-3136-x.
15. Rozenfeld J., Efrati E., Adler L., Tal O., Carrithers S.L., Alper S.L., Zelikovic I. Transcriptional regulation of the pendrin gene. *Cell Physiol Biochem.*, 2011, vol. 28, no. 3, pp. 385-396, doi: 10.1159/000335100.
16. Royaux I.E., Suzuki K., Mori A., Katoh R., Everett L.A., Kohn L.D., Green E.D. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 2000, vol. 141, no. 2, pp. 839-845, doi: 10.1210/endo.141.2.7303.
17. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R.A. Anticancer Effect of Deuterium Depleted Water - Redox Disbalance Leads to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Proteomics*, 2019, vol. 18, pp. 2373-2387, doi: 10.1074/mcp.RA119.001455.

CHANGES IN PRODUCTION OF ION-EXCHNGING PROTEINS WITH INCREASED DEUTERIUM BODY CONTENT

Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Nazimova S.V., Yaglov V.V.

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution

“Petrovsky National Research Centre of Surgery”

Abrikosovskiy side-St., 2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: yaglova@mail.ru

Received 24.07.2024

Abstract. Iodine is one of the vital microelements. Its intracellular transport is mediated by two ion exchange channels formed by sodium-iodine symporter (NIS) and pendrin. The purpose of the study is to identify changes in the content of NIS and pendrin in the systemic bloodstream and the relationship of these changes with the parameters of thyroid hormone production with a long-term increase in deuterium body content. The experiment was carried out on 60 mature male Wistar rats weighing 340-370 g. Deuteration of the organism was achieved by replacement of tap water with water enriched with deuterium up to 500,000 ppm, which was consumed by the rats of the experimental group (n=30). The results of the study showed that an increase in deuterium body content affects the production of both sodium-iodine symporter and pendrin. The accumulation of deuterium in the body stimulated the production of both ion-exchange proteins, but the stimulating effect had the greatest duration on NIS. At the same time, the influence of its natural regulator, the thyroid-stimulating hormone of the pituitary gland, remained in NIS production, but it had a weaker regulatory effect than an increase in the concentration of deuterium in the cells. An increase in pendrin production occurred only in the early stages of deuteration, in parallel with an increase in the secretion of thyroxine by the thyroid gland. At the same time, the level of NIS did not show any connection with the production of thyroid hormones.

Key words: ion exchange channels, iodine, deuterium, thyroid gland, thyroid hormones.

ВЛИЯНИЕ НАНОПЛАСТИКА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА

Проскурнина Е.В.¹, Костюк С.В.¹, Савинова Е.А.¹, Ершова Е.С.¹, Каменева Л.В.¹,
Вейко Н.Н.¹, Проскурнин М.А.², Шевченко Н.Н.³, Сапрыкин В.П.⁴, Иванов В.К.⁵

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: proskurnina@gmail.com

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 3, г. Москва, 119991, РФ

³ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений РАН»

Большой пр., 31, г. Санкт-Петербург, 199004, РФ; e-mail: natali.shevchenko29@gmail.com

⁴ФГАОУ ВО «Государственный университет просвещения»

ул. Веры Волошиной, 24, Московская обл., г. Мытищи, 141014, РФ

⁵ФГБУН «Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН»

Ленинский просп., 31, г. Москва, 119991, РФ

Поступила в редакцию 05.07.2024

Аннотация. Огромные масштабы производства пластмасс как источника микро-и нанопластика обуславливают актуальность исследование его эффектов на человека и животных. Цель работы – изучение выживаемости клеток человека при помощи стандартного 24-часового теста с метилтетразолием (МТТ-тест) на модели эмбриональных фибробластов легких для нанопластика различного химического состава (полистирол и полиметилметакрилат), размера (от 65 до 100 нм), наличия адсорбированного вещества (фуксина). Показано, что токсичность изученных частиц определяется прежде всего размером наночастиц, при этом максимальная токсичность характерна для наночастиц размером 70 нм («зона Златовласки»). Функционализация нанопластика фуксином не усиливает токсичность, что дает возможным использовать этот краситель в экспериментах по визуализации клеток при помощи микроскопии. Полученные результаты являются основой дальнейших экспериментов по изучению эффектов нанопластика на гены человека.

Ключевые слова: нанопластик, выживаемость клеток, эмбриональные фибробласты легкого человека.

ВВЕДЕНИЕ

Пластмассы применяются в огромных масштабах. Ограниченная биоразлагаемость этих материалов представляет собой насущную экологическую проблему, касающуюся прежде всего мирового океана [1]. С течением времени под воздействием микроорганизмов, ультрафиолетового излучения и механического истирания пластиковые отходы фрагментируются на микропластик (диаметр частиц от 100 нм до 5 мм) и нанопластик (частицы диаметром менее 100 нм) [2]. Помимо мирового океана, источниками микро- и нанопластика являются разнообразные чистящие средства, косметика, фармацевтические препараты, краски, зубные пасты, а также одежда, сигаретные фильтры, автомобильные шины и рыболовные снасти [3]. Микро- и нанопластик поглощается растениями и животными и по пищевой цепочке достигает человека [4]. Помимо пищевого пути, нанопластик попадает в организм человека при вдыхании загрязненного воздуха [5]. Находящийся во вдыхаемом воздухе нанопластик вступает в контакт с поверхностью дыхательных путей, проникает в легкие и вызывает воспаление легких и генотоксичность [6]. Микропластик, содержащийся в атмосферных осадках, может проникнуть в эпителиальные клетки легких, вызывая раздражение дыхательных путей, интерстициальный фиброз и гранулематозные поражения [7].

Нанопластик в организме человека вызывает повреждение мембран, окислительный стресс, воспаление, иммунную дисфункцию, нейротоксичность, генотоксичность, неопластические процессы, нарушения метаболизма и энергетического обмена [8-10]. Особое значение имеет окислительный стресс, однако механизмы токсического воздействия микро- и нанопластика на клетки сложны, взаимосвязаны друг с другом и индукция одного процесса может инициировать каскад других токсикологических реакций.

Токсичность нанопластика зависит не только от химического состава, но и размера, причем частицы меньшего размера представляют собой большую опасность, поскольку поглощаются эндоцитозом или пассивным переносом, в то время как более крупные частицы требуют фагоцитоза специализированными клетками [11]. Обычно существует обратная зависимость между размером частиц и их токсичностью, однако по отношению к поглощению и транспорту частиц существует т.н. «зона Златовласки» (*Goldilocks zone*), которая при прочих равных условиях зависит от типа клеток. Следует отметить, что на токсичность влияет множество факторов, таких как тип клетки, заряд, время воздействия и концентрация наночастиц. Высокие концентрации и хроническое воздействие могут привести к более активному поглощению клетками и, следовательно, к усилению токсичности. Поверхностный заряд имеет большое значение, при этом катионные частицы демонстрируют более высокую цитотоксичность по отношению к нефагоцитарным клеткам, чем анионные аналоги [12]. На токсичность нанопластика влияют растворимые добавки, составляющие примерно в среднем 4% масс, и включающие стабилизаторы, пластификаторы, смазочные материалы, красители и антипирены [13], а также

адсорбированные вещества (полихлорированные бифенилы, полициклические ароматические углеводороды, пестициды, тяжелые металлы и патогенные микроорганизмы) [14,15].

Целью работы являлось изучение выживаемости клеток человека при помощи стандартного 24-часового теста с метилтетразолием (МТТ-тест) на модели эмбриональных фибробластов легких при инкубации с образцами нанопластика различного химического состава (полистирол и полиметилметакрилат), размера (от 65 до 100 нм), наличия адсорбированного вещества (фуксина).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В качестве клеток для исследования токсичности соединений использовали эмбриональные фибробласты легкого человека (ФЛЭЧ) 4-го пассажа из коллекции культур клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова. Клетки рассеивали в количестве $1,7 \times 10^4$ клеток на мл в среде DMEM («Панэко», Москва, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (РАА Laboratories, Вена, Австрия), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл гентамицина («Sigma-Aldrich», США). Клетки с нанопластиком инкубировали 24 часа при 37°C в атмосфере 7,5% CO₂.

Нанопластик. В качестве объектов исследования использовали частицы на основе сополимера стирола со стиролсульфонатом натрия и частицы на основе полиметилметакрилата. С целью синтеза наночастиц диаметром от 60 до 90 нм была применена методика эмульсионной со-полимеризации [16,17]. Было получено две серии наночастиц: в первой основным сомономером выступал – стирол (Ст), во второй – метилметакрилат (ММА). При синтезе наночастиц на основе ММА в реакционную систему также вводили сшивающий агент — диметакрилат этиленгликоля (ДМЭГ). Состав полимерных наночастиц и их характеристики представлены в таблице 1.

После синтеза наночастицы очищали от непрореагировавших мономеров на ротаторном испарителе (Heidolph Laborota 4011, Германия), от водорастворимых примесей диализом с использованием диализных мешков Spectra/Por, диаметр пор 12–14 кДа (Spectrum laboratories INC). Наночастицы диализовали в течение 2 дней. После очистки были измерены гидродинамические диаметры наночастиц (D) и их индексы полидисперсности методом динамического светорассеяния (PDI) на приборе Malvern Zetasizer NanoZS (Великобритания). Электрокинетический потенциал наночастиц (ζ-потенциал) определяли методом микроэлектрофореза на приборе Malvern Zetasizer NanoZS (Великобритания) (таблица 1). Измерения проводили в среде фоновой электролита NaCl (10^{-3} М) при pH 7,5.

Модификацию полученных полимерных наночастиц фуксином проводили по следующей схеме. Навеску фуксина массой 2 мг (фуксин марки х.ч., ЗАО «Вектон», Россия) растворяли в 1,000 мл этанола (96%, ЗАО «Вектон», Россия). Раствор фуксина объемом 20 мкл добавили к дисперсии латексных частиц, после установления равновесия (через 4 часа) дисперсию частиц диализовали в течение 2 дней с использованием диализных мешков Spectra/Por, диаметр пор 12–14 кДа (Spectrum laboratories INC). После очистки наночастиц от этанола измеряли диаметры наночастиц и их индексы полидисперсности, а также ζ-потенциал методом динамического светорассеяния (табл. 1).

МТТ-тест. Для определения токсичности соединений в отношении культур клеток проводили МТТ-тест (метилтетразолиевый тест) с детекцией на планшетном ридере («EnSpire», Финляндия). МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток, основанный на способности NADPH-оксидазы митохондрий восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) до пурпурных гранул формазана. Реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами. Гранулы формазана растворяются в диметилсульфоксиде (ДМСО), количество восстановленного продукта определяют по оптической плотности при длине волны 540 нм. Значение концентрации, вызывающее 20% ингибирование роста популяции клеток (IC₂₀), определяли на основе дозозависимых кривых. Выживаемость клеток ФЛЭЧ в присутствии исследуемого вещества рассчитывали по формуле: $(A_{\text{опытных лунок}} - A_{\text{среды}}) / (A_{\text{контр. лунок}} - A_{\text{среды}}) \times 100\%$, где A – оптическая плотность. Все эксперименты проведены в восьми повторах. Исходная концентрация наночастиц составила 1%.

Таблица 1. Состав полимерных наночастиц и их характеристики

Образец	Состав наночастиц*	Функциональные группы	D, нм	PDI	ζ-потенциал, мВ
МД10	П(Ст-ССН-МАК)	-SO ₃ , -COOH	80	0,02	-72
МД11	П(Ст-ССН-МАК)	-SO ₃ , -COOH	65	0,03	-75
27П	П(ММА-ДМЭГ)	-COOH	90	0,11	-40
27П + фуксин	П(ММА-ДМЭГ)	-COOH	100	0,18	-21
30П	П(ММА-ДМЭГ)	-COOH	70	0,09	-46
30П + фуксин	П(ММА-ДМЭГ)	-COOH	90	0,13	-25

*ССН- стиролсульфонат натрия, МАК- метакриловая кислота

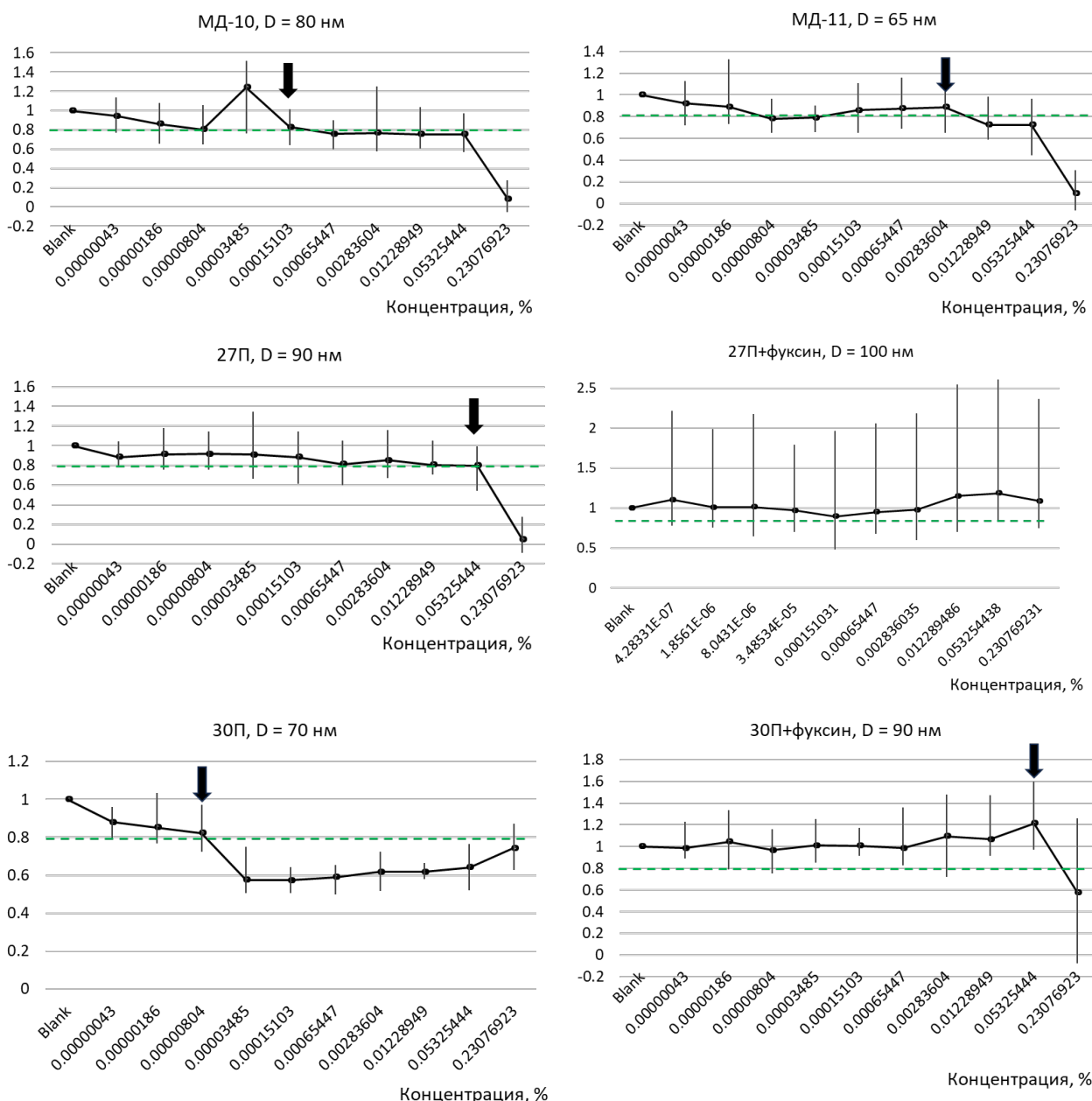


Рисунок 1. Результаты МТТ-теста, названия образцов нанопластика и диаметр частиц указаны на рисунке; зеленый пунктир – линия контроля, по оси ординат отложены значения МТТ-теста относительно контрольного образца (клетки, культивируемые без нанопластика). Стрелкой отмечена точка максимальной концентрации, обеспечивающая выживаемость 80% клеток (IC₂₀)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Графические результаты МТТ-теста представлены на рисунке 1.

Для наносфер полистирола размерами 65 и 80 нм IC₂₀ составила 28 и 1,5 ppm, соответственно, для наносфер полиметилметакрилата размерами 70 и 90 нм IC₂₀ составила 0,08 и 532 ppm, соответственно. Функционализация наночастиц фуксином привела к увеличению выживаемости, судя по всему, за счет увеличения диаметра (IC₂₀= 532 ppm для наночастиц размером 90 нм, IC₂₀> 2300 ppm для наночастиц размером 100 нм). Отметим, что частицы полистирола и полиметилметакрилата одинакового размера 90 нм характеризовались равной токсичностью (IC₂₀= 532 ppm), что дает основание сравнить токсичность всех образцов (рис. 2). По совокупности данных, максимальной токсичностью характеризуются частицы размером 70 нм (IC₂₀= 1,5 ppm) (табл. 2).

Наночастицы всех образцов характеризовались отрицательным зарядом. Попарное сравнение результатов (МД10 и МД11, 27П и 30П, 27П + фуксин и 30П + фуксин) свидетельствует о том, что абсолютная величина заряда оказывает существенно меньшее влияние на токсичность.

Таблица 2. Результаты МТТ-теста для образцов нанопластика, образцы перечислены в порядке увеличения диаметра частиц, жирным шрифтом отмечена наиболее токсичная концентрация

Образец	Состав наночастиц*	D, нм	ζ-потенциал, мВ	IC ₂₀ , ppm
МД11	П(Ст-СН-МАК)	65	-75	28
30П	П(ММА-ДМЭГ)	70	-46	0,08
МД10	П(Ст-СН-МАК)	80	-72	1,5
27П	П(ММА-ДМЭГ)	90	-40	532
30П + фуксин	П(ММА-ДМЭГ)	90	-25	532
27П + фуксин	П(ММА-ДМЭГ)	100	-21	>2300

ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевой вывод из экспериментальных данных заключается в том, что токсичность изученных образцов определяется прежде всего размером наночастиц, что соответствует литературным данным [11]. В клетках карциномы легких человека A549 наблюдали более выраженную экспрессию IL-8 через 2 часа воздействия частиц размером 64 нм по сравнению с частицами размером 202 и 535 нм [18]. По отношению к проникновению в клетку частиц может существовать «зона Златовласки» по размерам (*Goldilocks zone*). Например, более активное проникновение частиц полистирола размером 40 нм наблюдали для клеток карциномы легких A549 по сравнению с наночастицами размером 20 и 100 нм [19]. В модели гематоэнцефалического барьера на клетках hCMEC/D3, проникновение частиц полистирола размером 200 нм в клетки было активнее, чем частиц размером 100 и 500 нм [20]. Однако частицы меньшего размера не всегда оказываются более токсичными, поскольку на токсичность влияет еще множество факторов, таких как тип клетки, заряд, время воздействия, концентрация и химический состав. Более высокая токсичность частиц полистирола размером 500 нм по сравнению с частицами размером 50 нм была показана для культур клеток мышей NIH/3T3 и ES-D3 [21]. Для культуры эпителия бронхов BEAS-2B, инкубация с частицами полистирола (60 нм) в течение 24 часов приводила к проникновению частиц в клетки и значительному уменьшению выживаемости [22]. В клетках альвеолярного эпителия человека A549 частицы полистирола размером 25 и 70 нм накапливались в цитоплазме клеток начиная с 60 минут инкубации, при этом токсичность зависела от размера, концентрации и времени воздействия [23]. На основании наших данных, максимальная токсичность по отношению к ФЛЭЧ обусловлена частицами диаметром 70–80 нм.

Поверхностный заряд также влияет на проникновение и токсичность наночастиц. Так, транспорт частиц полистирола размером 20 и 100–120 нм через монослой альвеолярных эпителиальных клеток крысы был в 20–40 раз активнее для положительно заряженных частиц по сравнению с отрицательно заряженными [24]. Катионные частицы в целом демонстрируют более высокую цитотоксичность, чем анионные аналоги, за счет повреждения плазматической мембраны [12]. Амнированные частицы полистирола (~ 110 нм) ингибировали пролиферацию клеток ТНР-1, в то время как карбоксилированные частицы полистирола аналогичного размера не влияли на деление клеток [25,26]. В нашем исследовании изучали частицы с отрицательным поверхностным зарядом. Попарное сравнение результатов, во-первых, свидетельствует о том, что абсолютная величина заряда не оказывает существенного влияния на токсичность, и во-вторых, отрицательный заряд поверхности действительно является относительно безопасным по отношению к клеткам.

Адсорбированные вещества на поверхности нанопластика могут оказывать токсическое воздействие [14,15]. Фуксин является хорошо известным красителем (*маджента*), применяемым как противогрибковое и бактерицидное по отношению к стафилококкам средство в составе антисептиков и сред для культивирования

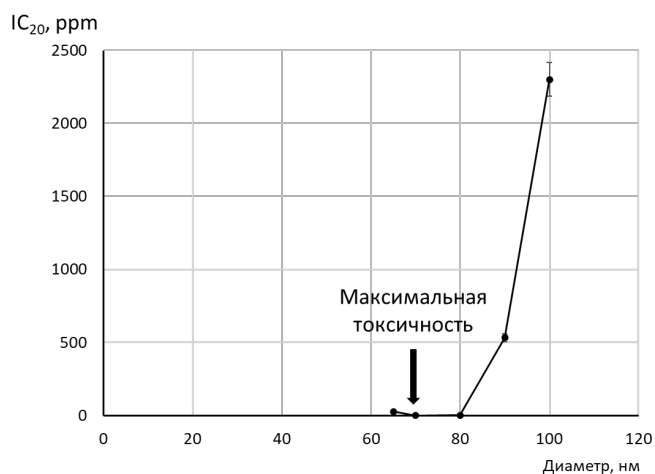


Рисунок 2. Результаты МТТ-теста (IC₂₀) в зависимости от размера наночастиц. Стрелкой указан размер, обуславливающий максимальную токсичность (70 нм) – «зона Златовласки»

[27]. Окрашивание наночастиц фуксином дает возможность визуализации их при помощи микроскопа при условии низкой токсичности. Действительно, результаты МТТ-теста свидетельствуют о том, что функционализация поверхности наночастиц не только не снижает, но и существенно улучшает выживаемость клеток, что связано, судя по всему, с увеличением размера наночастиц. Таким образом, этот метод окрашивания может быть использован в дальнейших экспериментах по изучению проникновения наночастиц в клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Токсичность изученных частиц определяется прежде всего размером, но не природой полимера (полистирол или полиметилметакрилат) и наличием фуксина на поверхности. Максимальная токсичность характерна для наночастиц размером 70 нм. Функционализация нанопластика фуксином не усиливает его токсичность, что дает возможным использовать этот краситель в экспериментах по визуализации клеток при помощи микроскопии. Полученные результаты являются основой дальнейших экспериментов по изучению эффектов нанопластика на гены человека.

Список литературы / References:

1. National Oceanic and Atmospheric Administration. A Guide to Plastic in the Ocean.
2. NJDEP-Science Advisory Board 2015. Human health impacts of microplastics and nanoplastics. 2015.
3. Toussaint B., Raffael B., Angers-Loustau A., Gilliland D., Kestens V., Petrillo M., Rio-Echevarria I.M., Van den Eede G. Review of micro- and nanoplastic contamination in the food chain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2019, vol. 36, pp. 639-673, doi: 10.1080/19440049.2019.1583381.
4. Carbery M., O'Connor W., Palanisami T. Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environ Int*, 2018, vol. 115, pp. 400-409, doi: 10.1016/j.envint.2018.03.007.
5. Prata J.C., da Costa J.P., Lopes I., Duarte A.C., Rocha-Santos T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Sci Total Environ*, 2020, vol. 702, p. 134455, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.
6. Gasperi J., Wright S., Dris R., Collard F., Mandin C., Guerrouache M., Langlois V., Kelly F., Tassin B. Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2018, vol. 1, pp. 1-5, doi: 10.1016/j.coesh.2017.10.002.
7. Wright S.L., Kelly F.J. Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environ Sci Technol*, 2017, vol. 51, pp. 6634-6647, doi: 10.1021/acs.est.7b00423.
8. Chang X., Xue Y., Li J., Zou L., Tang M. Potential health impact of environmental micro- and nanoplastics pollution. *J Appl Toxicol*, 2020, vol. 40, pp. 4-15, doi: 10.1002/jat.3915.
9. Hu M., Palic D. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox Biol*, 2020, vol. 37, p. 101620, doi: 10.1016/j.redox.2020.101620.
10. Bhattacharjee S., Ershov D., Islam A., Kampfer A., Maslowska K., Gucht J., Alink G.M., Marcelis A.T.M., Zuilhof H., Rietjens I. Role of membrane disturbance and oxidative stress in the mode of action underlying the toxicity of differently charged polystyrene nanoparticles. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, p. 19321, doi: 10.1039/c3ra46869k.
11. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. *Transport into the Cell from the Plasma Membrane: Endocytosis*. In *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, 2002.
12. Frohlich E., Roblegg E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*, 2012, vol. 291, pp. 10-17, doi: 10.1016/j.tox.2011.11.004.
13. Bouwmeester H., Hollman P.C., Peters R.J. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ Sci Technol*, 2015, vol. 49, pp. 8932-8947, doi: 10.1021/acs.est.5b01090.
14. Brennecke D., Duarte B., Paiva F., Cacador I., Canning-Clode J. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2016, vol. 178, doi: 10.1016/j.ecss.2015.12.003.
15. Campanale C., Massarelli C., Savino I., Locaputo V., Uricchio V.F. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, vol. 17, doi: 10.3390/ijerph17041212.
16. Shakirova J., Shevchenko N., Baigildin V., Chelushkin P., Khlebnikov A., Tomashenko O., Solomatina A., Starova G., Tunik S. Eu-Based Phosphorescence Lifetime Polymer Nanothermometer: A Nanoemulsion Polymerization Approach to Eliminate Quenching of Eu Emission in Aqueous Media. *ACS Applied Polymer Materials*, 2019, doi: 10.1021/acsapm.9b00952.
17. Shevchenko N., Tomsik E., Laishevskina S., Iakobson O., Pankova G. Cross-linked polyelectrolyte microspheres: preparation and new insights into electro-surface properties. *Soft Matter*, 2021, vol. 17, pp. 2290-2301, doi: 10.1039/d0sm02147d.
18. Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, vol. 175, pp. 191-199, doi: 10.1006/taap.2001.9240.

19. Varela J.A., Bexiga M.G., Aberg C., Simpson J.C., Dawson K.A. Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *J Nanobiotechnology*, 2012, vol. 10, p. 39, doi: 10.1186/1477-3155-10-39.
20. Nowak M., Brown T.D., Graham A., Helgeson M.E., Mitragotri S. Size, shape, and flexibility influence nanoparticle transport across brain endothelium under flow. *Bioeng Transl Med*, 2020, vol. 5, e10153, doi: 10.1002/btm2.10153.
21. Hesler M., Aengenheister L., Ellinger B., Drexel R., Straskraba S., Jost C., Wagner S., Meier F., von Briesen H., Buchel C. et al. Multi-endpoint toxicological assessment of polystyrene nano- and microparticles in different biological models in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2019, vol. 61, p. 104610, doi: 10.1016/j.tiv.2019.104610.
22. Lim S.L., Ng C.T., Zou L., Lu Y., Chen J., Bay B.H., Shen H.M., Ong C.N. Targeted metabolomics reveals differential biological effects of nanoplastics and nanoZnO in human lung cells. *Nanotoxicology*, 2019, vol. 13, pp. 1117-1132, doi: 10.1080/17435390.2019.1640913.
23. Xu M., Halimu G., Zhang Q., Song Y., Fu X., Li Y., Li Y., Zhang H. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Sci Total Environ*, 2019, vol. 694, p. 133794, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133794.
24. Yacobi N.R., Malmstadt N., Fazlollahi F., DeMaio L., Marchelletta R., Hamm-Alvarez S.F., Borok Z., Kim K.J., Crandall E.D. Mechanisms of alveolar epithelial translocation of a defined population of nanoparticles. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2010, vol. 42, pp. 604-614, doi: 10.1165/rcmb.2009-0138OC.
25. Loos C., Syrovets T., Musyanovych A., Mailander V., Landfester K., Nienhaus G.U., Simmet T. Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio-nano interactions. *Beilstein J Nanotechnol*, 2014, vol. 5, pp. 2403-2412, doi: 10.3762/bjnano.5.250.
26. Loos C., Syrovets T., Musyanovych A., Mailander V., Landfester K., Simmet T. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials*, 2014, vol. 35, pp. 1944-1953, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.056.
27. Cooksey C., Dronsfield A. Fuchsine or magenta: the second most famous aniline dye. A short memoir on the 150th anniversary of the first commercial production of this well known dye. *Biotech Histochem*, 2009, vol. 84, pp. 179-183, doi: 10.1080/10520290903081401.

EFFECT OF NANOPLASTIC ON VIABILITY OF HUMAN EMBRYONIC LUNG FIBROBLASTS

Proskurnina E.V.¹, Kostyuk S.V.¹, Savinova E.A.¹, Ershova E.S.¹, Kameneva L.V.¹, Veiko N.N.¹,

Proskurnin M.A.², Shevchenko N.N.³, Saprykin V.P.⁴, Ivanov V.K.⁵

¹Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechye St., 1, Moscow, 115522, Russia; email: proskurnina@gmail.com

²Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry

GSP-1, Leninskie Gory, 1-3, Moscow, 111991, Russia

³Institute of Macromolecular Compounds of RAS

Bolshoy Prospekt, Str., 31, St. Petersburg, 199004, Russia

⁴State University of Education, Faculty of Natural Sciences

Very Voloshinoy St., 24, Moscow region, Mytishchi, 141014, Russia

⁵Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of RAS

Leninsky Ave., 31, Moscow, 119991, Russia

Received 05.07.2024

Abstract. The huge scale of plastic production as a source of micro- and nanoplastics brings to the fore the study of its effects on humans and animals. Here, we aimed to study the viability of human cells using a standard 24-hour methyl tetrazolium test (MTT test) on embryonic lung fibroblasts for nanoplastics of chemical structure (polystyrene and polymethyl methacrylate), size (from 65 to 100 nm), the presence of an adsorbed substance (fuchsin). The toxicity of the studied particles is determined primarily by the size of the nanoparticles. Maximum toxicity is typical for nanoparticles with a size of 70 nm ("Goldilocks zone"). Functionalization of nanoplastics with fuchsin does not increase its toxicity, which makes it possible to use this dye in experiments on cell visualization using microscopy. The results obtained are the basis for further experiments to study the effects of nanoplastics on human genes.

Key words: nanoplastics, cell viability, human embryonic lung fibroblasts.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОКИСЛЕНИЯ НИТРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ ХИМИЧЕСКИМ СПОСОБОМ И С ПОМОЩЬЮ МИКРООРГАНИЗМОВ

Куликова А.А.¹, Габрин В.А.², Саратовских Е.А.¹, Лебедев А.Т.³, Голосов Е.В.¹, Яруллин Р.Н.⁴¹ ФИЦ Проблем химической физики и медицинской химии РАН

просп. ак. Семёнова, 3, г. Черноголовка, 142432, РФ; e-mail: a.kulikova@icp.ac.ru

² ФГБОУ ВО «Ивановский Государственный химико-технологический университет»

просп. Шереметевский, 7, г. Иваново, 7153000, РФ

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

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

⁴ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, РФ

Поступила в редакцию 29.07.2024

Аннотация. Проведено сравнение результатов разложения НЦ (13,38%) химическим и биологическим способами. При гидролизе НЦ с помощью КОН образуется смесь химических органических веществ, из которых - 9 в высоких концентрациях. Установлено наличие диэтилфталата ($m/z = 92$) и дибутилфталата ($m/z = 143$), в концентрации 2,4 и 1,9 мкг/мл, соответственно. Они способны накапливаться в организме человека, нанося вред гормональной, эндокринной, половой системам, печени, легким, провоцировать развитие рака. При разведении 1:50 ХПК = $2696,4 \pm 404,5$ г/дм³; БПК₅/БПК₂₀ = 32,26/33,82 мгО₂/л, т.е. гидролизат НЦ весьма устойчив к последующему биологическому окислению. Биоразложение НЦ бактериями *Nitratidesulfovibrio vulgaris* наиболее эффективно при инкубации в течение 16-38 суток. Степень окисления НЦ составляет 3-5%. Предварительная обработка НЦ с помощью жёсткого УФ приводит к отрыву NO₂ групп, расположенных на внешней поверхности НЦ глобулы. Предикубационная обработка УФ значительно способствует дальнейшему окислению НЦ бактериями. Происходит снижение Mw до 43700, вероятно, в результате разрывая связи С-С. Однако, ни УФ обработка, ни бактерии не затрагивают большую часть углеводородного скелета и расположенных в глубине полимерной глобулы NO₂ групп. С точки зрения технологического применения возможно сочетание гидролиза НЦ щёлочью с последующей обработкой стока биологическим методом, в том числе с помощью бактерий *Nitratidesulfovibrio vulgaris*.

Ключевые слова: нитрованная целлюлоза, химическое окисление нитрованной целлюлозы, бактерии *Nitratidesulfovibrio vulgaris*.

ВВЕДЕНИЕ

Объёмы производства нитрованных полимеров (НП) в мире весьма значительны. Производство фильтрующих материалов, лаков, красок, искусственных кож, целлулоида, порохов тесно связано с НП. Считается, что отходы производства НП являются нетоксичными [1]. Однако, в больших объёмах приравняются к веществам с выраженным мутагенным действием [2]. Существует несколько способов обработки отходов производства НП, их варианты и сочетания, но каждый из них имеет свои недостатки. Физико-химические методы: мембранная фильтрация с применением коагулирующих агентов, химический гидролиз, сжигание [3] – дороги и экологически небезопасны. Компостирование и захоронение отходов [4], в силу непредсказуемости биохимических процессов, вызываемых случайной микрофлорой, не дают точного прогноза результатов её ферментативной активности в отношении как самой НП, так и продуктов её разложения. В последние годы весьма популярными стали биологические методы обработки отходов различных промышленных производств. Следует помнить, что работа с биологическими объектами – микробами, бактериями и пр. требует соблюдения техники безопасности. Важно, предотвратить попадание патогенных микроорганизмов в окружающую среду, и не вызвать бактериального поражения населения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в ФИЦ Проблем химической физики и медицинской химии, Российской академии наук. Объектом исследования являлась нитрованная целлюлоза (НЦ), предоставленная Казанским пороховым заводом (Российская Федерация), марка «М/л 26 432-01» с содержанием азота 13,38% (масса элементарного звена макромолекулы 284,4; степень полимеризации 1140; молекулярная масса 324216), ГОСТ Р 50461-92.

В качестве биологического деструктора исследовали сульфатовосстанавливающую бактерию *Nitratidesulfovibrio vulgaris* Hildenborough штамм ВКМ В-1388, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов, Института биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН. Для приготовления культуральных питательных сред, буферных систем и выполнения физико-химических исследований использовали реагенты и растворители производства фирм Sigma (США), BioRad (США) и Реахим

(Россия): KCl, NH₄Cl, CaCl₂, K₂HPO₄, MgCl₂·6H₂O, NaNO₃, Салактат, Na салицилат; NaOH, глюкозу, тетрагидрофуран (ТГФ), ацетон.

Биомассу штамм *Nitratidesulfovibrio vulgaris* ВКМ В-1388 культивировали на среде обогащенной лактатом Са (50 мМ) и сульфатом Na (10 мМ) с образованием сульфида до 9,8 мМ. Посев производили в пробирки Хангейта и инкубировали при температуре 30°C. Биомассу бактерий получали в медицинских флаконах объемом 250 мл с рабочим объемом среды DSV, равном 100 мл. Оптическая плотность культуральной жидкости (при длине волны $\lambda = 600$ нм) к 7 суткам инкубации составляла 0,34-0,35, что соответствовало 6,5-8,510⁸ клеток в 1 мл среды культивирования. Для приготовления культуральной питательной среды с целью изучения биодegradации НЦ в двух литрах дистиллированной воды растворяли следующие соли (в г): KCl – 5,0; NH₄Cl – 10,0; CaCl₂ – 1,0; K₂HPO₄ – 10,0; MgCl₂·6H₂O – 20,0. Далее дробно добавляли: дрожжевой экстракт – 10 г; лактатСа – 60 мл. Полученный концентрат культуральной питательной среды разбавляли в соотношении 1 : 4 дистиллированной водой.

Эксперименты по изучению биологического окисления НЦ проводили в лабораторных герметично закрытых стеклянных реакторах объемом 3 л при естественном солнечном освещении без продува воздухом. Такие условия проведения эксперимента применили, чтобы выяснить максимально возможную степень биотрансформации в предельно благоприятных для бактерий условиях. В эксперименте использовали два образца, содержащих бактерии *N. vulgaris*. Каждый из них содержал по 50 мл посевноматериала, затем эти образцы разбавляли в лабораторных закрытых реакторах культуральной питательной средой до 500 мл.

В оба образца вводили НЦ в концентрации 5 г/л.

Образец № 1 - НЦ исходная, содержание азота – 13,38%.

Образец № 2 – НЦ, обработанная в течение 27 часов УФ-излучением и озоном.

Пробы для анализа отбирали на 5, 15, 38 и 65 сутки от начала эксперимента, в объеме 50 мл после механического перемешивания раствора.

Реакцию фотохимического разложения НЦ проводили в кругло-донном кварцевом реакторе с внутренним диаметром 10,0 см и объемом 500 мл. Реактор устанавливали на расстоянии 4 см от источника излучения. Для облучения использовали дуговую ртутную газоразрядную лампу с люминофором высокого давления 400W ДРЛ-400 марки «Е 40» производства фирмы ОАО «Лисма» (Россия). Лампа имеет длины волн излучения в диапазоне 250-600 нм, световой поток в УФ диапазоне составляет 24000 Лм. В качестве источника озона использовали озонатор производства ФГБУН ИПХФ РАН, имеющий объемную скорость продувки кислорода QO₂ ≈ 350 см³/мин = 21 л/час. При 2,5% содержания озона в кислороде, его производительность составляла ≈ 0,5 л O₃/час = 1,125 грамм O₃/час. Барботирование озоном исходного раствора НЦ осуществляли через капилляр. Исходная концентрация НЦ составляла 10г/л. Пробы по 10 мл смеси для определения pH реакционного раствора и азота в НЦ отбирали через 1 час, 3, 7, 12, и 27 часов от начала эксперимента.

Химическое окисление НЦ производили действием эквимольного количества водного раствора NaOH на исходную НЦ той же партии. Полученный гидролизат НЦ имеет следующий состав: нитрат натрия NaNO₃ примерно 20% массовых; низкомолекулярные органические кислоты, сахароподобные вещества примерно 20% массовых. Гидролизат имеет щелочную реакцию. Определение ХПК и БПК растворов ГНЦ проводили согласно [5-7]. Для определения БПК₅ и БПК₂₀ был приготовлен раствор исходного ГНЦ с разбавлением в 100000 раз (разбавление проведено с учетом содержания растворенного кислорода в 1й день определения).

Количество НЦ определяли весовым методом. Из каждого лабораторного реактора регулярно отбирали пробы по 50 мл. Осадок из культуральной жидкости, содержащий бактериальные клетки, нерастворимые соли, частицы НЦ, отделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 20 мин на ультрацентрифуге Optima L-90K производства фирмы «Beckman» (США). Затем дважды отмывали дистиллированной водой, высушивали до постоянного веса при 105°C. Сухой осадок обрабатывали ацетоном в количестве 50 мл и оставляли на 2 часа при 40°C для достижения предельной полноты растворения НЦ в ацетоне. НЦ из раствора в ацетоне отделяли центрифугированием при 7000 об/мин в течение 15 мин, сливали в круглодонные фарфоровые чашки и упаривали на 50% объема при 40°C. Затем по каплям добавляли водно-спиртовую смесь (1:2) для осаждения НЦ. Высушивали до постоянного веса в термощкафу при 40°C и определяли вес НЦ.

Содержание С, Н, N, S выполняли в полностью высушенных образцах НЦ на CHNS/O элементном анализаторе VarioMICROcube, производства фирмы «ElementarGmbH» (Германия). Использовали навеску 0,01 г. Во всех проанализированных образцах наличие серы не было зафиксировано.

Анализ содержания нитрат-ионов в растворе культуральной жидкости выполняли фотометрическим методом. Фотометрические измерения проводили на фотоколориметре КФК-2МП производства ЗАО НПО «Техноком» (Россия). Нитрат-ионы определяли измерением светопоглощения комплексного соединения желтого цвета, образующегося при взаимодействии нитрат-ионов с салициловой кислотой при длине волны $\lambda = 400$ нм в кювете толщиной 2 см относительно воды (модифицированный метод Лурье [8-10]. Содержание нитрата устанавливали по градуировочному графику, для построения которого использовали рабочий раствор NaNO₃, содержащий 13.8 мкг/см³ нитрата. Уравнение градуировочного графика имеет вид:

$$A = 0,033 + 0,0198m \quad (1)$$

где:

m – масса внесенного нитрат-иона, мкг;

A – оптическая плотность.

Таблица 1. Значения БПК₅ и БПК₂₀ для ГНЦ

Разведение	pH	ХПК, г/дм ³	БПК ₅ /БПК ₂₀ , мгО ₂ /л
1:80			61,86
1:50		2696,4±404,5	32,26/33,82
1:40			17,86/18,41
1:20			6,66/7,32
нет	8,5		-

Рабочий раствор нитрата и раствор салицилата натрия (0,5 масс.%) готовили непосредственно перед употреблением. Поскольку часть растворов представленных образцов проб была мутной, перед проведением измерений их фильтровали через сухой фильтр «синяя лента» в сухую посуду.

Измерение количества нитрит-ионов в растворе культуральной жидкости выполняли фотометрическим методом на фотоколориметре КФК-2МП производства ЗАО НПО «Техноком» (Россия). Нитрит-ион определяли измерением светопоглощения красно-фиолетового азокрасителя (диазосоединения) при длине волны $\lambda = 540$ нм в кювете толщиной 5 см относительно воды. Азокраситель образуется в присутствии α -нафтиламина и сульфаниловой кислоты (модифицированный метод Лурье [8-10]). Содержание нитрита устанавливали по градуировочному графику, который строили по свежеприготовленному раствору NaNO₂, содержащему 10,4 мкг/см³ нитрита. Уравнение градуировочного графика имеет вид:

$$A = 0,127m \quad (2)$$

где:

m – масса внесенного нитрит-иона, мкг;

A – оптическая плотность.

Аликвотную часть пробы воды вносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли воду до объема 7 мл и добавляли 0,2 мл 10 масс. %-ного раствора реактива Грисса, нагревали колбу на кипящей водяной бане 2 мин. Вынимали, быстро охлаждали под струей холодной воды и фотометрировали при $\lambda = 540$ нм в кювете толщиной 5 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Считается, что НЦ трудно разлагается с помощью микроорганизмов. В технологической практике очистки стоков производства НЦ используют методы предварительного химического воздействия на НЦ. В частности, предлагается в технологических целях проведение модификации НЦ гидролизом гидроксидом калия или натрия, до более легко усвояемых для микроорганизмов веществ, с последующим биологическим окислением активным илом в не токсичные соединения. Гидролизат НЦ (ГНЦ), полученный под действием NaOH, представлял собой жидкость темного цвета. Результаты измерений представлены в таблице 1.

Значение ХПК выше 65 мг/дм³ указывает на сильное загрязнение воды органическими соединениями. Необходима очистка такого стока, т.к. согласно существующим нормативам при сбросе сточных вод в водоемы питьевого и хозяйственно-бытового назначения и водоемы, используемые для рекреационного назначения, величина ХПК не должна превышать 15 мг/дм³ и 30 мг/дм³ соответственно [11].

Для того, чтобы определить состав продуктов, полученных при химическом окислении НЦ, мы выполнили хромато-масс анализ раствора ГНЦ. На рисунке 1 представлена хроматограмма ГНЦ по полному ионному току

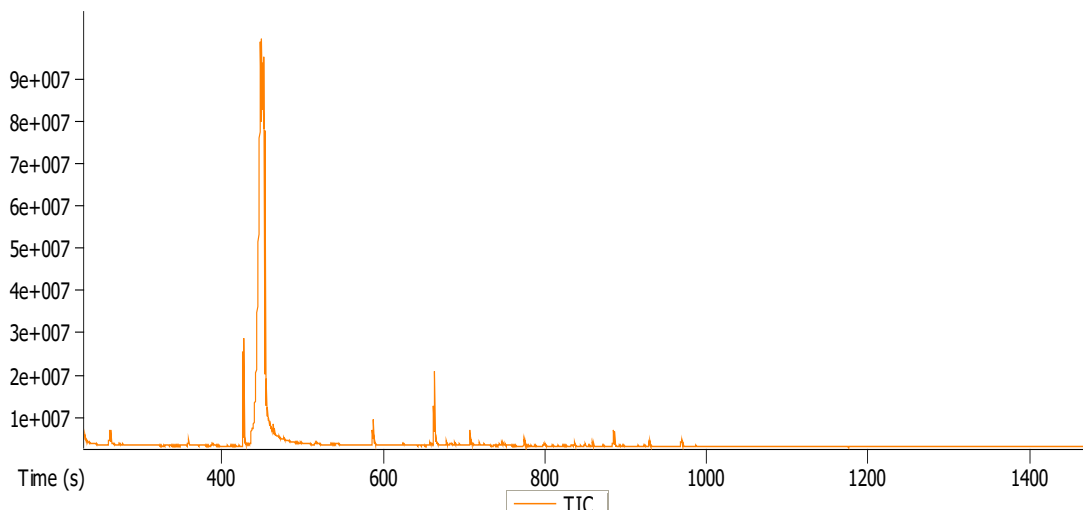


Рисунок 1. Хроматограмма по полному ионному току гидролизата

Таблица 2. Компоненты образца гидролизата

Peakm/z	Определённые вещества	Интенсивность, R.T. (s)	Концентрация, ug/ml
Основные продукты			
8	Oxime-, methoxy-phenyl-	262,3	2,2
50	1,4:3,6-Dianhydro- α -d-glucopyranose	448,8	136
52	2,3-Anhydro-d-galactosan	451,7	77
54	3,4-Anhydro-d-galactosan	453,2	40
92	DiethylPhthalate	587,6	2,4
124	IsopropylMyristate	664,1	1,5
143	Dibutylphthalate	707,4	1,9
186	Hexatriacontane	885,2	2,5
198	OleicAcid	969,3	1,2

зарегистрированного хромато-масс спектра, а в таблице 2 приведены основные компоненты гидролизата. Из представленных результатов видно, что после щелочной обработки исходная полимерная молекула НЦ полностью разложилась на короткоцепочечные органические вещества.

Согласно нормам ПДК для водоемов культурно-бытового водопользования БПК₂₀ составляет 6 мг/л [11]. Значения БПК₅ для стандартной сточной воды (после очистки) – порядка 10-30 мг/л.

Таким образом, при обработке НЦ с помощью КОН образуется смесь химических органических веществ, из них – 9 веществ, в высоких концентрациях. Некоторые, как например, диэтилфталат и дибутилфталат способны накапливаться в нашем организме. Попадая в организм, фталаты распространяются по всем органам, нанося вред гормональной системе, печени, легким. Они способны вызвать серьезные нарушения в эндокринной, половой системах. У женщин они провоцируют развитие рака груди, заболевания яичников. Однако, как видно из показателя БПК₅/БПК₂₀, в дальнейшем – на активном иле, смесь этих органических соединений окисляется не в полной мере.

Возможность окисления НЦ исследовали с помощью бактерий *N. vulgaris*.

В первой серии экспериментов было изучена возможность фотохимического окисления водного раствора НЦ под действием жёсткого УФ облучения и озона. Была проведена 27-часовая обработка НЦ одновременно УФ и озоном.

В растворах исходных образцов НЦ содержание нитрат- ионов колебалось от 5,94 до 6,24 мкг/мл. Нитрит-ионов обнаружено не было. Однако, после 27 часов обработки УФ+озон, в растворе не обнаружены нитрат- ионы, а количество нитрит-ионов составило 1,46 мкг/мл. Из таблицы 3 видно, что с увеличением времени обработки сильно изменяется pH среды в кислую сторону. В выделенных и высушенных образцах НЦ изменения содержания азота происходит незначительно. Наиболее сильно в первый час обработки: 13,38%-9,77% = 3,61%; тогда как минимальное изменение содержания азота относится к 27 часам обработки и составляет только 3,15%.

Таблица 3. Содержание элементов, нитрат- и нитрит- ионов и ММР в образцах НЦ в процессе обработки бактериями *Nitratidesulfovibrio vulgaris* (н/о - не обнаружено)

№ образца	Время инкубирования, сутки	pH	Содержание					Mn	Mw
			C, %	H, %	N, %	NO ₃ ²⁻ мкг/мл	NO ₂ ²⁻ мкг/мл		
Ацетон									
Исх.НЦ		6,0			13,38	5,94-6,24	н/о		324216
Образец №1 без обработки									
№1	0	7,0							
№ 1	5		31,72	3,972	11,57	5,80	н/о	21100	114900
№ 1	16	8,65	25,97	2,892	11,72	3,23	н/о	15000	96800
№ 1	38	6,75	25,99	3,109	10,58	5,55	0,52	14760	96000
№ 1	65	5,97	25,80	2,81	11,40	7,58	1,6	9340	58000
Образец №2-НЦобр									
№2	0	4,5	25,15	3,378	10,65		1,46		144700
№ 2	5		32,05	4,830	11,17	3,00	н/о	21100	114900
№ 2	16	8,29	30,61	3,831	11,02	9,01	н/о	13600	53100
№ 2	38	3,42	29,40	3,787	10,92	6,06	0,20	15000	43700
№ 2	65	5,96	27,38	3,657	10,63	5,00	1,10	21200	58000

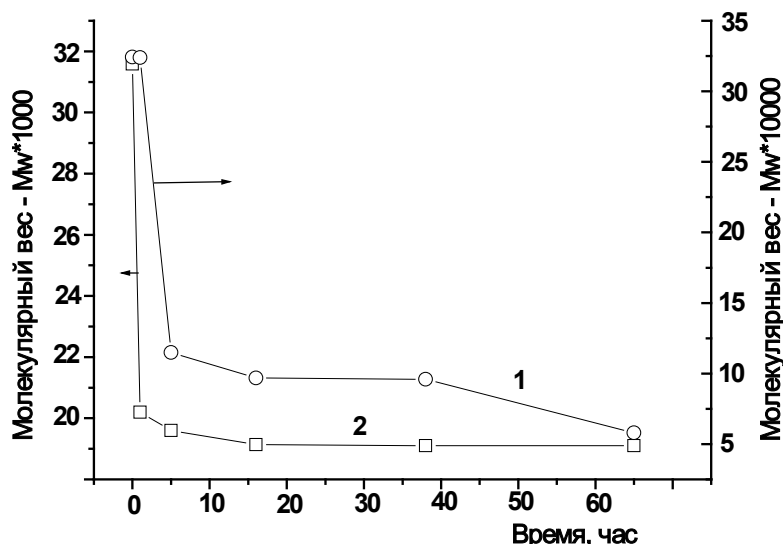


Рисунок 2. Изменение молекулярного веса НЦ от времени в процессе УФ обработки и выдержки на бактериях *Nitratidesulfovibrio vulgaris*. N=10,7% - левая ось; N=13,38% - правая ось. Точки «0 и 1» час – результаты УФ обработки; далее – время выдержки на бактериях

Предварительная обработка УФ+озон приводит к уменьшению молекулярного веса полимера и увеличению доли низкомолекулярных продуктов. Доля низкомолекулярной моды в контрольном образце после УФ-обработки находится в пределах 3%.

Полученные результаты показывают, что в результате применения УФ-обработки происходит изменение надмолекулярной структуры НЦ, появляются низкомолекулярные продукты и снижается молекулярный вес образцов, что указывает на отрыв низкомолекулярных фрагментов или отрыв групп NO_2 . Переходя в водную среду, диоксид азота в равновесной реакции с водой образует азотную и азотистую кислоты. Об этом свидетельствует сильное уменьшение pH в процессе УФ-обработки.

Максимальным временем УФ-обработки являются 2-4 часа, и более длительная обработка не приводит к существенным изменениям.

Опыты по воздействию бактерий *N. vulgaris* на НЦ проводили в герметично закрытых реакторах без продува воздухом, чтобы выяснить максимально возможную степень биотрансформации в предельно благоприятных для бактерий условиях. Воздействию бактерий подвергали как не обработанную, так и НЦ предварительно обработанную УФ+озон.

В процессе инкубации бактерий *N. vulgaris* на НЦ происходят колебания значений pH раствора. Однако, в конце наблюдения (65 суток) значения pH в обоих вариантах опытов становятся практически одинаковыми. Содержание азота в выделенной и высушенной НЦ уменьшается незначительно, нет существенной разницы между образцами № 1 (НЦ) и №2 (НЦобр). По сравнению с исходной НЦ (13,38%) снижение содержания азота не превышает 3%.

У образца №1 под действием бактерий *N. vulgaris* MMP изменяется существенно и закономерно по мере увеличения времени выдержки (рис. 2): Mw – молекулярный вес полимера в максимуме уменьшается, а Mn, отражающая долю низкомолекулярных продуктов, – нарастает.

Доля низкомолекулярной фракции находится в пределах 4-14%. Увеличение доли низкомолекулярной моды происходит почти линейно. Уменьшение Mw в два раза к 65-м суткам инкубации с бактериями, указывает на разрушение углеводородного скелета под действием *N. vulgaris*. Однако, уменьшение не линейное, в первые 0 - 5 - 16 суток скорость разложения НЦ высока, если бы такая скорость сохранялась и в дальнейшем, то – гипотетически, к 65 суткам вся НЦ была бы полностью деструктирована. Но этого не происходит. Как следует из таблицы 3, скорость биодеструкции бактериями в зависимости от времени выдержки падает.

Для образца №2 во времени сохраняется та же закономерность, -доля низкомолекулярной моды растёт. Но, в отличие от образца №1 скорость роста ниже и доля низкомолекулярных фракций – меньше, в пределах 4-8%.

Сравнение серий с разными временами биодеградаций: 5 и 65 суток наглядно иллюстрирует, что молекулярно-массовые характеристики образцов после биологической обработки сульфатредуцирующими бактериями от увеличения времени инкубации с бактериями меняются не значительно рисунок 2.

Колебания pH и увеличение доли низкомолекулярных продуктов от времени выдержки на бактериях в исследуемых образцах показывают, что предварительная УФ-обработка НЦ меняет конформацию НЦ, что приводит к доступности для бактерий и последующей биодеградаций глубинных слоёв глобулы НЦ. Однако, снижение скорости накопления низкомолекулярных продуктов, т.е. снижение скорости биодеструкции образцов от времени инкубации на *N. vulgaris* показывает, что бактерии теряют активность. Причинами могут быть закисление реакционного раствора, или полное потребление питательной среды необходимой для жизнедеятельности бактерий, или отмирание части бактерий.

Можно предположить, что при предварительной УФ обработке происходит отрыв NO_2 групп, расположенных на внешней поверхности всей НЦ глобулы; она не затрагивает более глубоких слоёв клубка. Инкубация на бактериях более 16 суток не влияет ни на процесс отщепления NO_2 групп, ни на деструкцию углеводородного скелета. У образца №1 – процесс отщепления тех же внешних групп NO_2 и в том же количестве происходит в процессе инкубации с бактериями.

Ни УФ обработка, ни бактерии не затрагивают большую часть углеводородного скелета и расположенных в глубине полимерной глобулы NO_2 групп. Поскольку падает ММР, то вероятно, разрываются связи С-С, а С-О- NO_2 остаются.

Инкубация НЦ на бактериях – процесс длительный, степень окисления НЦ не превышает 3-5%. Однако, идентифицируемые низкомолекулярные части полимерной молекулы не являются токсичными по отношению к живым организмам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнение результатов разложения НЦ химическим и биологическим способами.

При гидролизе НЦ с помощью КОН образуется смесь химических органических веществ. Определено как минимум 9 веществ, в высоких концентрациях. Некоторые из них способны накапливаться в организме человека и наносить вред гормональной системе, печени, легким. Как видно из показателя БПК₅/БПК₂₀, в дальнейшем при обработке микроорганизмами, смесь этих органических соединений окисляется не в полной мере.

Исследование окисления НЦ сульфатредуцирующими бактериями *Nitratidesulfovibrio vulgaris* продолжалось 65 суток. Предварительно половина образцов была подвергнута действию жёсткого УФ облучения и озона продолжительностью 27 часов.

Эффекты биоразложения НЦ с помощью бактерий *N. vulgaris* проявляются в течение первых 16-38 суток. Более длительное время инкубации НЦ на бактериях не приводит увеличению степени окисления. Предварительная обработка НЦ с помощью жёсткого УФ значительно способствует дальнейшему окислению НЦ бактериями.

Несмотря на незначительную степень разложения НЦ под действием бактерий *N. vulgaris*, биологические методы окисления НЦ следует считать наиболее перспективными, т.к. продукты биоокисления НЦ не содержат токсичных соединений.

Полученные результаты показывают, что с точки зрения технологического применения весьма эффективным может оказаться сочетание предварительной обработки стока с помощью гидроксида калия с последующим с применением биологической обработки с помощью, в частности, бактерий *N. vulgaris*.

Работа выполнена в соответствии с темой № FFSG-2024-0012 Государственного задания (№ государственной регистрации 124020500019-2).

Список литературы / References:

1. Wang L.K., Pressman M., Shuster W.W., Shade R.W., Bilgen F., Lynch T. Separation of nitrocellulose fine particles from industrial effluent with organic polymers. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 1982, vol. 60, no. 1, doi: 10.1002/cjce.5450600120.
2. Петрова О.Е., Тарасова Н.Б., Давыдова М.Н. Трансформация нитроэфира целлюлозы сульфатредуцирующей бактерией *D. desulfuricans*. *Микробиология*, 2002, т. 71, № 3 [Petrova O.E., Tarasova N.B., Davydova M.N. Transformation of cellulose nitroester by sulfate-reducing bacterium *D. desulfuricans*. *Microbiology*, 2002, vol. 71, no. 3 (In Russ.)].
3. Wendt T.M., Kaplan A.M. A Chemical biological treatment process for cellulose nitrate disposal. *Journal Water Pollution Control Federation*, 1976, vol. 48, no. 4.
4. White G.F., Snape J.R. Microbial cleavage of nitrate esters; defusing the environment. *The Journal of General Microbiology*, 1993, vol. 139, doi: 10.1099/00221287-139-9-1947.
5. ПНДФ 14.1:2.100-97 Количественный химический анализ вод. *Методика выполнения измерений химического потребления кислорода в пробах природных и очищенных сточных вод титриметрическим методом*. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200044250> [PNDF 14.1:2.100-97 Quantitative chemical analysis of water. *Methodology for measuring chemical oxygen demand in samples of natural and treated wastewater using the titrimetric method* (In Russ.)].
6. ПНД Ф 14.1:2.101-97 Количественный химический анализ вод. *Методика выполнения измерений массовой концентрации растворенного кислорода в пробах природных и очищенных сточных вод йодометрическим методом*. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200044249> [PNDF 14.1:2.101-97 Quantitative chemical analysis of water. *Methodology for measuring the mass concentration of dissolved oxygen in samples of natural and treated wastewater using the iodometric method* (In Russ.)].
7. ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 Количественный химический анализ вод. *Методика выполнения измерений биохимического потребления кислорода после n - дней инкубации (БПК_{полн}) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах*. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1305172882> [PNDF 14.1:2:3:4.123-97 Quantitative chemical analysis of water. *Methodology for measuring biochemical oxygen*

demand after n -days of incubation (BOD_{total}) in surface fresh, underground (ground), drinking, waste and treated waste water (In Russ.).

8. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984, 448 с. [Lurye Yu.Yu. *Analytical chemistry of industrial wastewater*. M.: Chemistry, 1984, 448 p. (In Russ.)].

9. ПНДФ 14.1;2.3-95 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрит-ионов в природных и сточных водах. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200056724> [PNDF 14.1;2.3-95 Quantitative chemical analysis of water. Methodology for measuring the mass concentration of nitrite ions in natural and waste water (In Russ.)].

10. ПНДФ 14.1;2.4-95 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрат-ионов в природных и сточных водах. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200056725> [PNDF 14.1;2.4-95 Quantitative chemical analysis of water. Methodology for measuring the mass concentration of nitrate ions in natural and waste water (In Russ.)].

11. СанПиН 2.1.5.980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод». Минздрав России, Москва, 2000 [SanPiN 2.1.5.980-00 "Hygienic requirements for the protection of surface waters". Ministry of Health of Russia, Moscow, 2000 (In Russ.)].

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF OXIDATION OF NITRATED POLYMERS BY CHEMICAL METHOD AND WITH THE MICROORGANISMS

Kulikova A.A.¹, Gabrin V.A.², Saratovskikh E.A.¹, Lebedev A.T.³, Golosov E.V.¹,
Yarullin R.N.⁴

¹ FRC Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of RAS
ac. Semenov Ave., 3, Chernogolovka, 142432, Russia; e-mail: a.kulikova@icp.ac.ru

² Ivanovo State University of Chemistry and Technology
Sheremetevsky Ave., 7, Ivanovo, 153000, Russia

³ Moscow State University named after M.V. Lomonosov
Leninskie Gory, 1, Moscow, 119991, Russia

⁴ Kazan (Volga Region) Federal University
Kremlevskaya St., 18, Kazan, 420008, Russia

Received 29.07.2024

Abstract. The results of NC decomposition (13.38%) were compared using chemical and biological methods. During NC hydrolysis with KOH, a mixture of chemical organic substances is formed, of which 9 are in high concentrations. The presence of diethyl phthalate ($m/z = 92$) and dibutyl phthalate ($m/z = 143$) was established in concentrations of 2.4 and 1.9 $\mu\text{g/ml}$, respectively. They can accumulate in the human body, harming the hormonal, endocrine, reproductive systems, liver, lungs, and provoke cancer development. When diluted 1:50, $\text{COD} = 2696.4 \pm 404.5 \text{ g/dm}^3$; $\text{BOD}_5/\text{BOD}_{20} = 32.26/33.82 \text{ mgO}_2/\text{l}$, i.e. NC hydrolyzate is very stable to subsequent biological oxidation. Biodegradation of NC by *Nitratidesulfovibrio vulgaris* bacteria is most effective with incubation for 16-38 days. The degree of NC oxidation is 3-5%. Pre-treatment of NC with hard UV leads to the detachment of NO_2 groups located on the outer surface of the NC globule. Pre-incubation treatment with UV significantly promotes further oxidation of NC by bacteria. There is a decrease in M_w to 43700, probably due to the rupture of C-C bonds. However, neither UV treatment nor bacteria affect the majority of the hydrocarbon skeleton and NO_2 groups located deep in the polymer globule. From the point of view of technological application, it is possible to combine NC hydrolysis with alkali and subsequent treatment of the wastewater by a biological method, including using *Nitratidesulfo vibriovulgaris* bacteria.

Key words: nitrated cellulose, chemical oxidation of nitrated cellulose, bacteria *Nitratidesulfovibrio vulgaris*.