

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 9, № 2
2024**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 9, № 2
2024**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 9, No. 2, 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, № 2, 2024

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая, В.И. Бадюлина

Активатор гетеротримерных G-белков, комплекс AlF_4^- , подавляет Ca^{2+} -ответы в макрофагах 121

Д.Н. Чернышев, В.С. Ключкова

Разделение спектра поглощения водного экстракта микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl.....131

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

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

Моделирование сетевой активности нейронов при окислительной модификации глутаматных рецепторов 136

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

Структурно-динамические модели и ИК спектры метилзамещенных пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем 143

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Л.Н. Шишкина, П.Д. Белецкая, А.В. Машукова, А.А. Фенин

Последствия воздействия фракционированного рентгеновского излучения на липосомы в зависимости от физико-химических свойств и состава липидов лецитина 148

Е.В. Проскурнина, М.М. Созарукова, Е.С. Ершова, Е.А. Савинова,

Л.В. Каменева, Н.Н. Вейко, В.К. Иванов, С.В. Костюк

Цитотоксичность и генотоксичность стабилизированного кардиолипидом наноразмерного диоксида церия 155

А.В. Ерофеев, О.В. Острейко, А.С. Шаракшанэ, Н.В. Грановский,

Д.В. Спирин, А.Д. Мансфельд, А.А. Аносов

Совместное применение методов пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии при моделировании локальной гипертермии опухоли головного мозга человека 160

В.В. Рощина, Л.А. Сергиевич

Исследование влияния азуленов как защитных факторов на жизнеспособность мышей 168

О.П. Чжу, И.И. Маринич, Д.Э. Аравиашвили, Н.Э. Агаджанова

Физико-химические методы определения показателей оксидативного стресса при возникновении и развитии патологического процесса на модели лабораторных приматов 174

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

Влияние изменения концентрации дейтерия в организме на активность лимфоцитопоза в тимусе.....179

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ**Э.С. Челебиева, И.Н. Чубчикова, Н.В. Данцюк, И.В. Дробецкая, Г.С. Минюк**

Морфофизиологические характеристики зеленой каротиногенной микроводоросли *Coelastrella* sp. в условиях лабораторной накопительной культуры..... 184

Н.В. Бурдиян

Влияние атмосферных осадков, волнового перемешивания, окислительно-восстановительных условий на численность анаэробных бактерий в прибрежных наносах (на примере прибрежной акватории Севастополя, Чёрное море).....191

С.В. Алёмов

Многолетние изменения экологического статуса акваторий региона Севастополя по биотическим индексам и структурным показателям основных видов макрозообентоса..... 196

Д.А. Тужилкин, А.С. Бородин, К.И. Бер

Воздействие факторов внешней среды на эктопическую активность сердца человека 202

CONTENTS

Volume 9, No. 2, 2024

GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS

- L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya, V.I. Badulina**
Heterotrimeric g-proteins activator, complex AlF_4^- , attenuates Ca^{2+} responses in macrophages 121
- D.N. Chernyshev, V.S. Klochkova**
Decomposition of the absorption spectrum of aqueous extract of microalgae *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl.....131

MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

- S.V. Aksenova, A.S. Batova, A.N. Bugai, E.B. Dushanov**
Modeling of network activity of neurons at oxidative modification of glutamate receptors..... 136
- I.V. Ivlieva (Peretokina), A.A. Meshcheryakova, L.M. Babkov, V.V. Sorokin**
Structural-dynamic models and IR spectrum of methyl substituted pyrido[1,2-a]pyrimidine systems..... 143

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- L.N. Shishkina, P.D. Beletskaya, A.V. Mashukova, A.A. Fenin**
Consequences under action of the fractional X-ray irradiation on liposomes depending on the physicochemical properties and composition lipids of lecithin 148
- E.V. Proskurnina, M.M. Sozarukova, E.S. Ershova, E.A. Savinova, L.V. Kameneva, N.N. Veiko, V.K. Ivanov, S.V. Kostyuk**
Cytotoxicity and genotoxicity of cardiolipin-stabilized nanoceria 155
- A.V. Erofeev, O.V. Ostreyko, A.S. Sharakshane, N.V. Granovsky, D.V. Spirin, A.D. Mansfeld, A.A. Anosov**
Joint application of passive acoustic thermometry and infrared thermography methods in modeling local hyperthermia of the human brain..... 160
- V.V. Roshchina, L.A. Sergievich**
The study of the azulenes' effects as protective factors on the mouse vitality..... 168
- O.P. Chzhu, I.I. Marinich, D.E. Aravishvili, N.E. Agadzhanova**
Physicochemical methods of determination of oxidative stress indicators at the occurrence and development of pathological process on the model of laboratory primates.....174

E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova The effect of changed deuterium body concentration on the activity of lymphocytopoiesis in the thymus	179
---	-----

BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES

E.S. Chelebieva, I.N. Chubchikova, N.V. Dantsyuk, I.V. Drobetskaya, G.S. Minyuk Morphophysiological characteristics of the green carotenogenic microalga <i>Coelastrella</i> sp. in batch culture under laboratory conditions	184
---	-----

N.V. Burdiyan The influence of atmospheric precipitation, wave mixing, redox conditions on the number of anaerobic bacteria in coastal sediments (on the example of the coastal waters of Sevastopol, the Black Sea)	191
--	-----

S.V. Alyomov Long-term changes in the ecological status of the Sevastopol region's water areas by biotic indices and structural indicators of the main species of macrozoobenthos	196
---	-----

D.A. Tuzhilkin, A.S. Borodin, K.I. Ber Influence of environmental factors on ectopic activity of the human heart	202
--	-----

АКТИВАТОР ГЕТЕРОТРИМЕРНЫХ G-БЕЛКОВ, КОМПЛЕКС AlF_4^- , ПОДАВЛЯЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: l.milenina@spbu.ru

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

ул. Литовская, 2, г. Санкт-Петербург, 194100, РФ

Поступила в редакцию 24.07.2024

Аннотация. Важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации играют гетеротримерные G-белки (состоящие из α , β и γ субъединиц), работающие как молекулярные переключатели, трансдукторы сигналов в цепях передачи сигналов в клетках, и передающие сигнал от мембранных рецепторов, связанных с G-белками, на определенные эффекторные молекулы в клетке. G-белки участвуют во многих внутриклеточных процессах, в первую очередь в процессах Ca^{2+} -сигнализации. Удобным инструментом для изучения роли G-белков в активации клеток является специфический активатор гетеротримерных G-белков, комплекс AlF_4^- . Для выявления участия гетеротримерных G-белков в регуляции Ca^{2+} -сигналов в макрофагах, исследовали влияние комплекса AlF_4^- на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что комплекс AlF_4^- значительно подавляет мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в клетки, индуцируемые тапсигаргином или циклопязоникой кислотой, в перитонеальных макрофагах. Обнаружено также, что комплекс AlF_4^- практически полностью подавляет уже развившийся депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Полученные данные свидетельствуют об участии гетеротримерных G-белков в регуляции Ca^{2+} -сигналов и, в первую очередь, в активации и регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: комплекс AlF_4^- , гетеротримерные G-белки, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации играют гетеротримерные G-белки (состоящие из α , β и γ субъединиц), работающие как молекулярные переключатели (molecular switches), трансдукторы сигналов (signal transducers) в цепях передачи сигналов в клетках, и передающие сигнал от мембранных рецепторов, связанных с G-белками (G protein-coupled receptors, GPCRs), на определенные эффекторные молекулы в клетке [1-4]. Эффекторными системами, связанными с G-белками, являются: ключевой фермент аденилатциклазной системы – аденилатциклаза, цГМФ-специфичная фосфодиэстераза фоторецепторов, ключевой фермент фосфоинозитидной системы – фосфолипаза $C\beta$, фосфолипаза A_2 , некоторые типы ионных каналов и др. В последнее время было обнаружено, что G-белки могут участвовать в процессах внутриклеточной сигнализации и без участия (активации) рецепторов, связанных с G-белками [5]. Показано, что возможна двойная регуляция функций эффектора со стороны G-белков: более быстрая прямая регуляция G-белком (membrane-delimited way of modulation) и более медленное не прямое влияние через вторичные посредники, образующиеся с участием G-белков [2,6].

G-белки участвуют во многих внутриклеточных процессах, в первую очередь в процессах Ca^{2+} -сигнализации [7]. Установлено, что G-белки модулируют активность различных типов ионных каналов. Так, $G\beta\gamma$ субъединицы G-белков прямо (membrane-delimited way) ингибируют потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы семейств Cav2 и Cav3 [8,9] и прямо активируют калиевые каналы входящего выпрямления (G protein-coupled inwardly rectifying K^+ (GIRK; Kir3) channels) [10,11]. α_s субъединицы Gs белков прямо ингибируют потенциалзависимые Nav1.5 каналы [12] и активируют потенциалзависимые Ca^{2+} каналы Cav1.2 [6,13] и Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы [14] в клетках сердца и потенциалзависимые Ca^{2+} каналы Cav1.1 в скелетных мышцах [15]. Обнаружено также, что канонические Ca^{2+} -проницаемые каналы TRPC4 и TRPC5 прямо активируются α -субъединицами Gi/o и Gq белков [16,17]. На некоторых типах клеток обнаружено участие одного или более G-белков в регуляции депозависимого или “емкостного” входа Ca^{2+} , активируемого при опустошении внутриклеточных Ca^{2+} -депо [18-20].

Важным свойством G-белков, позволяющим эффективно изучать их участие в тех или иных внутриклеточных процессах, является возможность их необратимой активации (или инактивации), минуя стадию стимуляции рецептора агонистом.

Удобным инструментом для изучения роли G-белков в активации клеток является комплекс AlF_4^- . Показано, что AlF_4^- эффективно и обратимо активирует гетеротримерные G-белки типов G_s , G_i , G_q и G_{12} [1,21-23]. Считается, что комплекс AlF_4^- имеет структуру, сходную с фосфатной группой, и может взаимодействовать с ГДФ, связанным с α -субъединицей G-белков. Таким образом, AlF_4^- активирует α -субъединицу G-белка, связываясь с

ГДФ и имитируя присоединение третьего (γ) фосфата [21,22]. Способность комплекса AlF_4^- проникать через мембрану делает его удобным для исследования функциональной роли G-белков в интактных клетках.

В перитонеальных макрофагах крысы выявлены гетеротримерные G-белки типов G_{i-1} , G_{i-2} , G_{i-3} , G_s и G_q [4,24,25]. Особенно многочисленны в клетках иммунной системы G_{i-2} и G_{i-3} белки [25].

Для выявления возможной роли G-белков в активации и регуляции Ca^{2+} -сигналов в макрофагах, мы исследовали влияние комплекса AlF_4^- на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20 - 22°C через 1 – 2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны нами ранее [26]. Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [27]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $P \leq 0,05$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [28,29].

В исследованиях использовали два экспериментальных подхода. В первом исследовали действие фармакологических агентов на Ca^{2+} -ответ, индуцированный тапсигаргином или ЦПК в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе. Агенты вводили либо до действия тапсигаргина или ЦПК, либо после, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала, отражающей депозависимый вход Ca^{2+} из наружной среды. Во втором варианте опытов для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки использовали следующую схему эксперимента (Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -reintroduction protocol). Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде (0 мМ Ca^{2+} , 1 мМ ЭГТА), затем на них действовали тапсигаргином или ЦПК, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} и восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+} , наблюдается быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в клетку. Далее исследовали влияние фармакологических агентов, добавленных до введения тапсигаргина или ЦПК, или во время развивающегося входа Ca^{2+} из наружной среды.

AlF_4^- применяли как смесь NaF и $AlCl_3$ в области концентраций от 10 мМ NaF + 50 мкМ $AlCl_3$ до 20 мМ NaF + 100 мкМ $AlCl_3$. Постановка опытов заключалась в следующем. К окрашенным Fura-2AM макрофагам вначале добавляли $AlCl_3$, через 2-3 мин вводили в среду NaF и затем через 7-10 мин добавляли ингибиторы эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз.

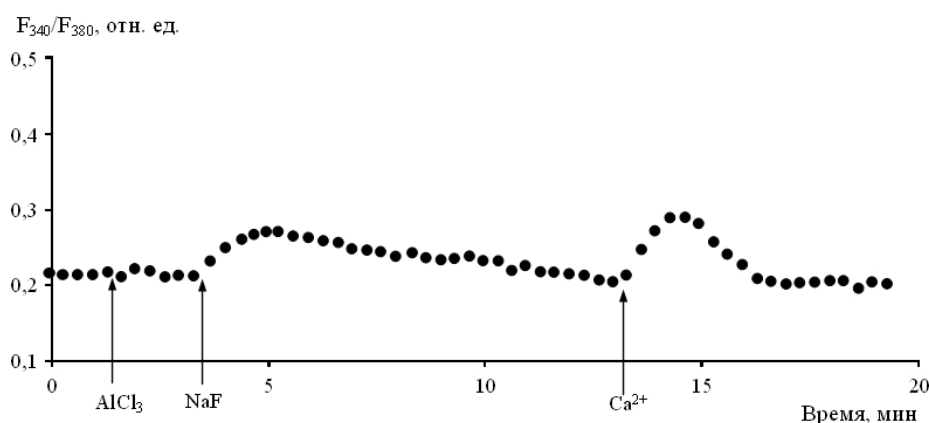


Рисунок 1. Влияние комплекса AlF_4^- на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, в перитонеальных макрофагах крысы. Здесь и на рисунках 2-5 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время (мин). К макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 50 мкМ $AlCl_3$, через 2 мин в среду вводили 10 мМ NaF и затем через 10 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . Здесь и на рисунке 2-5 каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6-8 независимых экспериментов

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлены данные о влиянии комплекса AlF_4^- на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Видно, что добавление 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, вызывает относительно медленное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ от базального уровня, равного 92 ± 11 нМ, до 145 ± 20 нМ, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из депо.

После 10 мин инкубации клеток с AlF_4^- , в среду добавляли 2 мМ Ca^{2+} , что приводило к небольшому по сравнению с контролем и более быстро заканчивающемуся дальнейшему увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до уровня 163 ± 22 нМ, связанному с входом Ca^{2+} из наружной среды.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в перитонеальных макрофагах крысы AlF_4^- вызывает как мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо, так и вход Ca^{2+} из наружной среды. Активация входа Ca^{2+} при действии AlF_4^- может быть результатом опустошения депо, вызванным активацией связанных с фосфолипазой $\text{C}\beta$ гетеротримерных Gq-белков и продукцией инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3). Сходные данные о том, что AlF_4^- вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вследствие мобилизации Ca^{2+} из депо и входа Ca^{2+} из наружной среды были получены ранее на тромбоцитах человека [30,31] и клетках линии A431 эпидермоидной карциномы человека [31].

Таким образом, AlF_4^- имитирует действие агонистов, повышающих концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Однако, Ca^{2+} -сигнал, индуцируемый AlF_4^- в различных клетках, существенно меньше, чем сигнал, индуцированный связыванием агониста с рецептором. Так, на клетках асцитной карциномы Эрлиха было показано, что AlF_4^- вызывает мобилизацию Ca^{2+} из того же внутриклеточного депо, что и АТФ. Однако, увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызываемое AlF_4^- , развивается существенно медленнее, чем изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, индуцируемые АТФ. Эти различия

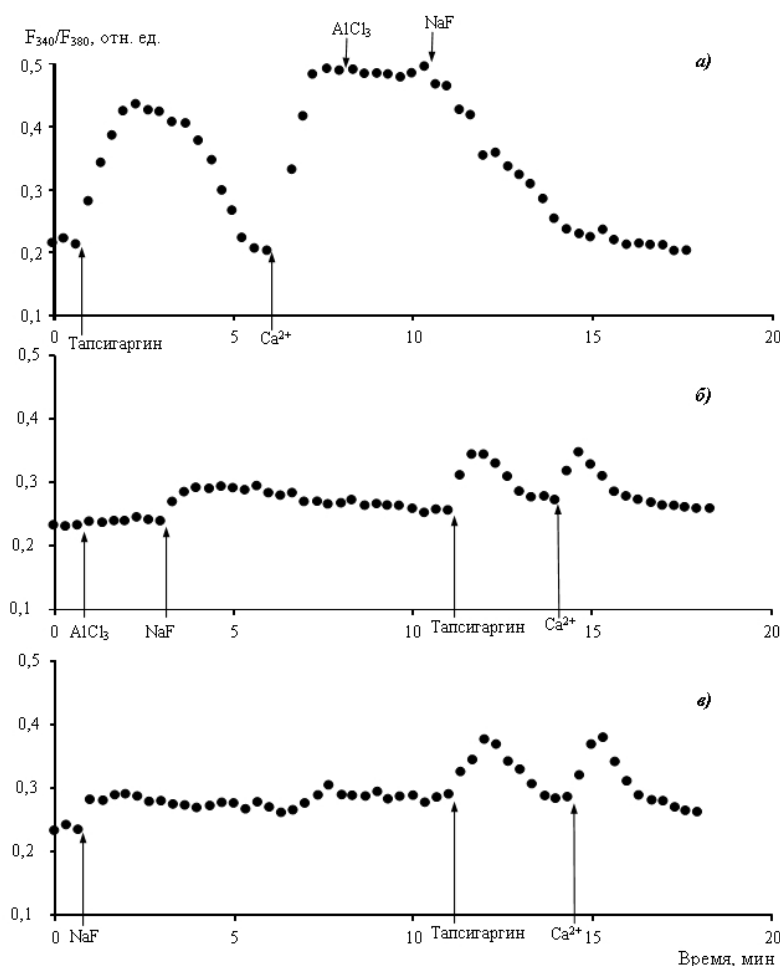


Рисунок 2. Влияние комплекса AlF_4^- (а, б) и NaF (в) на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы, находящимся в бескальциевой среде. а – макрофаги стимулировали 0,5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF ; б – к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 100 мкМ AlCl_3 , через 2 мин в среду вводили 20 мМ NaF , через 8 мин добавляли 0,5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; в – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 20 мМ NaF , затем добавляли 0,5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

обусловлены более медленной мобилизацией Ca^{2+} из депо под действием AlF_4^- , чем АТФ. Обнаружено также, что скорость выхода Ca^{2+} из клетки под действием AlF_4^- значительно ниже, чем при воздействии АТФ. Следовательно, Ca^{2+} , медленно высвобождаемый из депо, выходит из клетки без значительного увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [32].

Далее было исследовано влияние комплекса AlF_4^- на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином и ЦПК в макрофагах. В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0,5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 2а).

В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 170 ± 23 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 2а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 220 ± 27 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$).

Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 3а): в среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 161 ± 21 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$), а во время депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги – 201 ± 25 нМ ($n = 7$; $P < 0,05$) (рис. 3а).

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что добавление к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, 100 мкМ AlCl_3 и 20 мМ NaF за 10 мин до воздействия тапсигаргина (рис. 2б) или ЦПК (рис. 3б) приводит к значительному подавлению обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцированных ингибиторами

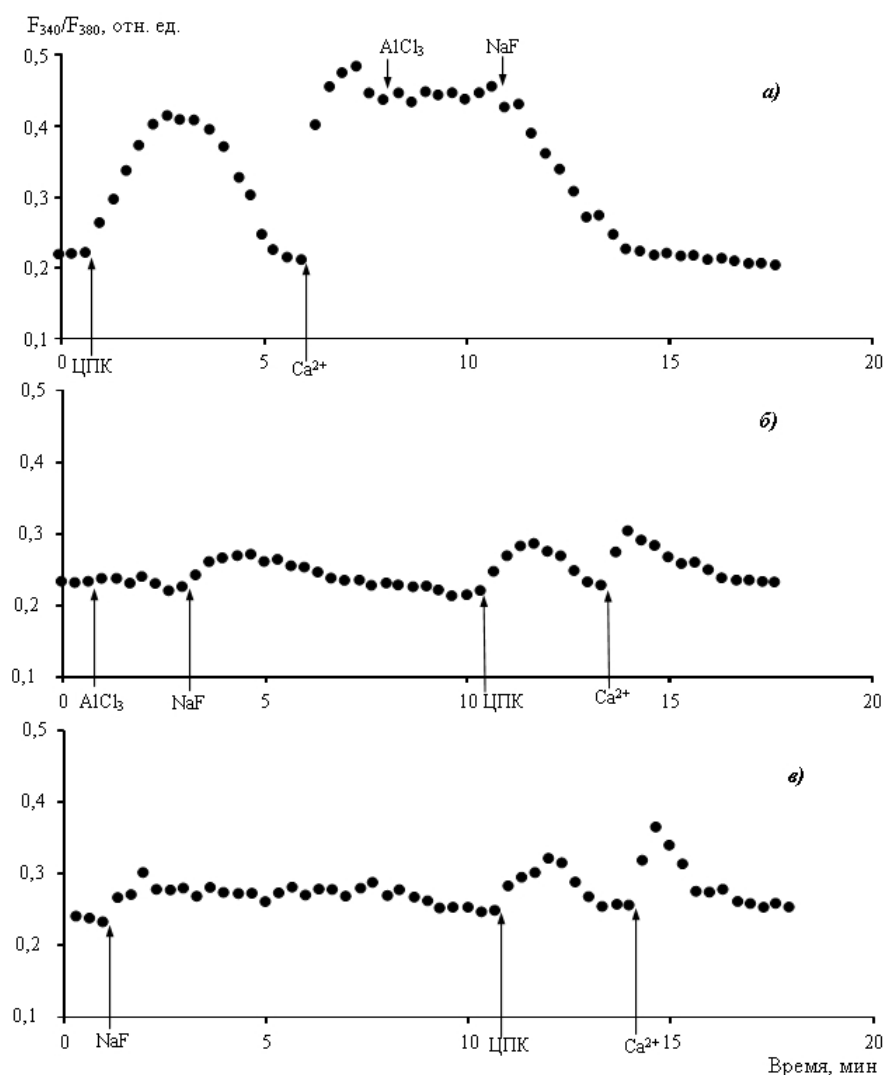


Рисунок 3. Влияние комплекса AlF_4^- (а, б) и NaF (в) на Ca^{2+} -ответы, вызываемые циклопозониковой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы, находящимся в бескальциевой среде. а - макрофаги стимулировали 10 мкМ ЦПК в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF ; б - к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 100 мкМ AlCl_3 , через 2 мин в среду вводили 20 мМ NaF , через 8 мин добавляли 10 мкМ ЦПК, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; в - клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 20 мМ NaF , затем добавляли 10 мкМ ЦПК, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+}

эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. Так, подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило $58,2 \pm 11,4\%$ ($n = 7$; $P < 0,05$), а депозависимого входа Ca^{2+} – $63,7 \pm 12,6\%$ ($n = 7$; $P < 0,05$) для опытов с применением тапсигаргина. Сходные результаты были получены в экспериментах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 3б). Подавление комплексом AlF_4^- мобилизации Ca^{2+} из депо составило $65,8 \pm 12,5\%$ ($n = 7$; $P < 0,05$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} – $67,1 \pm 13,3\%$ ($n = 7$; $P < 0,05$).

Обнаружено также, что комплекс AlF_4^- может ингибировать уже развившийся депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги, индуцированный ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. Показано, что введение 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF во время индуцированного тапсигаргином (рис. 2а) или ЦПК (рис. 3а) развившегося входа Ca^{2+} приводит к полному подавлению входа Ca^{2+} и возвращению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к базальному уровню. Это согласуется с данными, полученными ранее с помощью метода пэтч-клэмп, в соответствии с которыми комплекс AlF_4^- ингибирует уже активированный I_{crac} (calcium-release activated current) в лейкоцитарных базофилах линии RBL-2H3 крысы [18]. Это свидетельствует об участии G-белков не только в активации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги.

В экспериментах, выполненных с использованием нормального физиологического раствора, содержащего Ca^{2+} , были получены сходные результаты. На рисунках 4 и 5 представлены типичные Ca^{2+} -ответы, индуцированные тапсигаргином (рис. 4) и ЦПК (рис. 5) в нормальном физиологическом растворе. Видно, что добавление к макрофагам 0,5 мкМ тапсигаргина (рис. 4) или ЦПК (рис. 5) приводит к значительному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$, связанному с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо и последующим депозависимым входом Ca^{2+} из наружной среды. На фазе плато Ca^{2+} -ответа, отражающего депозависимый вход Ca^{2+} , повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ составило 184 ± 24 нМ для тапсигаргина и 173 ± 25 нМ для ЦПК.

Показано, что преинкубация макрофагов в течение 10 мин с 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF приводит к значительному подавлению фазы мобилизации Ca^{2+} из депо и практически полному ингибированию фазы плато Ca^{2+} -сигналов, вызванных 0,5 мкМ тапсигаргина или 10 мкМ ЦПК (не показано). Из рисунка 4 и рисунка 5 также видно, что введение 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала, индуцированного 0,5 мкМ тапсигаргина (рис. 4а) или 10 мкМ ЦПК (рис. 5а), приводит к ингибированию фазы плато, отражающей депозависимый вход Ca^{2+} , и возвращению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к базальному уровню.

Таким образом, Ca^{2+} -ответы в макрофагах, индуцируемые тапсигаргином или ЦПК, эффективно подавляются активатором гетеротримерных G-белков, комплексом AlF_4^- . AlF_4^- применяли как смесь AlCl_3 и NaF . Известно, однако, что во многих случаях добавления экзогенного AlCl_3 не требуется. Возможно, он имеется в

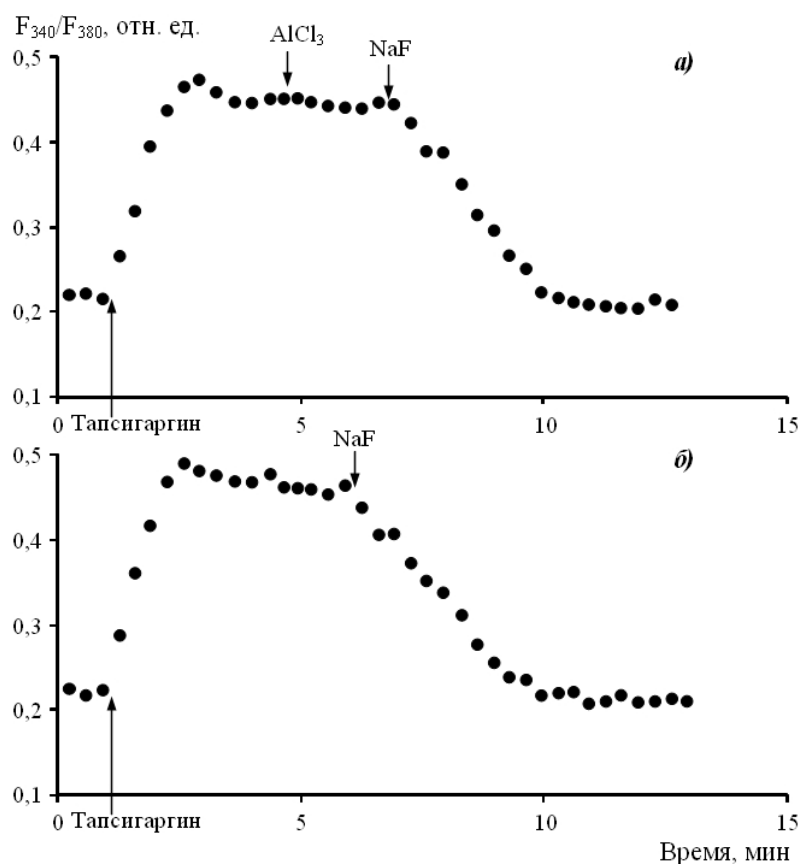


Рисунок 4. Влияние комплекса AlF_4^- (а) и NaF (б) на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы, находящихся в среде, содержащей Ca^{2+} . а, б - во время фазы плато Ca^{2+} -ответа, индуцированного 0,5 мкМ тапсигаргина, добавлено 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF (а) или 20 мМ NaF (б)

среде в следовых количествах, и этого достаточно для проявления эффектов фторида. В связи с этим, мы сочли целесообразным исследовать влияние на Ca^{2+} -сигналы в макрофагах одного фторида (NaF).

Показано, что преинкубация макрофагов, находящихся в нормальном физиологическом растворе, с 20 мМ NaF в течение 10 мин до воздействия 0,5 мкМ тапсигаргина или 10 мкМ ЦПК приводит к значительному подавлению Ca^{2+} -ответов, вызываемых этими агентами. Наблюдается полное подавление фазы плато Ca^{2+} -ответов, обусловленной депозависимым входом Ca^{2+} из наружной среды, и существенное уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (не показано). Обнаружено также, что добавление 20 мМ NaF во время фазы плато Ca^{2+} -сигналов, индуцированных тапсигаргином (рис. 4б) или ЦПК (рис. 5б), приводит к полному подавлению фазы плато, отражающей депозависимый вход Ca^{2+} , и возвращению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к базальному уровню.

На рисунках 2в и 3в приведены данные о влиянии 20 мМ NaF на вызванные тапсигаргином и ЦПК Ca^{2+} -ответы в макрофагах, инкубируемых в бескальциевой среде. Показано, что добавление к клеткам 20 мМ NaF за 10 мин до воздействия 0,5 мкМ тапсигаргина (рис. 2в) или 10 мкМ ЦПК (рис. 3в) приводит к подавлению как фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, так и фазы депозависимого входа Ca^{2+} . Подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило $55,1 \pm 10,7\%$ для опытов с применением тапсигаргина и $63,7 \pm 11,2\%$ для опытов с использованием ЦПК. Подавление депозависимого входа Ca^{2+} составило $55,6 \pm 10,5\%$ для опытов с тапсигаргином и $56,4 \pm 9,8\%$ для опытов с ЦПК. Это согласуется с данными, полученными на гранулоцитах линии HL-60 человека, в соответствии с которыми преинкубация клеток с NaF (5, 10 и 20 мМ) вызывает дозозависимое ингибирование депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином [20]. Кроме того, показано, что 1 мМ NaF значительно подавляет мобилизацию Ca^{2+} из депо и практически полностью подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином в амелобластах мыши (линия LS8) [33].

Таким образом, NaF имитирует действие комплекса AlF_4^- и существенно подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых тапсигаргином или ЦПК. Добавление к клеткам 20 мМ NaCl вместо NaF не вызывало ингибирования Ca^{2+} -ответов в макрофагах, что свидетельствует о том, что ингибирующее действие NaF не связано с гиперосмолярностью наружного раствора.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что специфический активатор гетеротримерных G-белков, комплекс AlF_4^- , ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги в двух вариантах опытов: при добавлении его до ингибиторов эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз и при воздействии AlF_4^- на фоне развивающегося депозависимого входа Ca^{2+} . Установлено, что AlF_4^- является специфическим активатором гетеротримерных G-белков и не стимулирует ГТФ-связывающие белки малой молекулярной массы (20-25 кДа) [34]. Это позволяет предположить, что в активации и регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы принимают участие гетеротримерные G-белки.

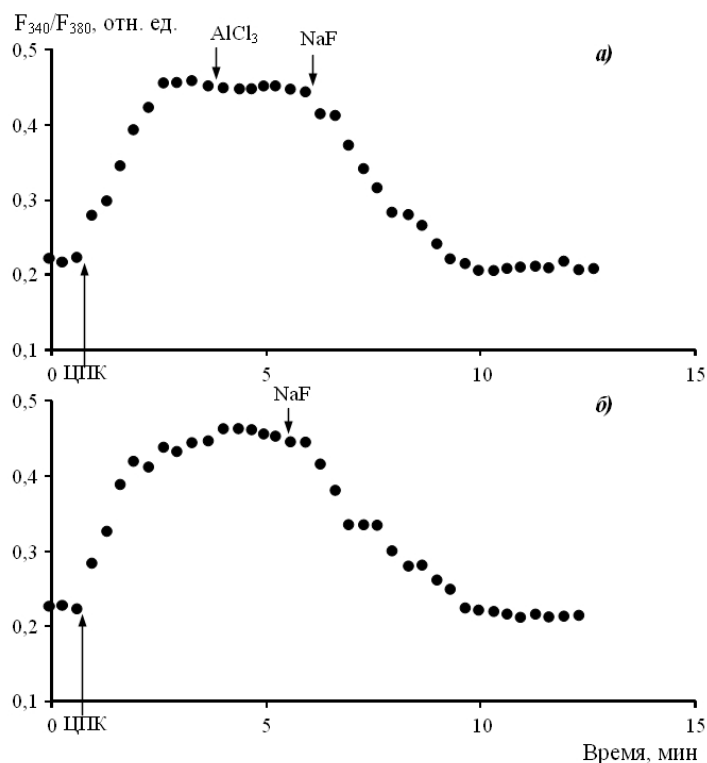


Рисунок 5. Влияние комплекса AlF_4^- (а) и NaF (б) на Ca^{2+} -ответы, вызываемые циклопязоникой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы, находящихся в среде, содержащей Ca^{2+} . а, б - во время фазы плато Ca^{2+} -ответа, индуцированного 10 мкМ ЦПК, добавлено 50 мкМ AlCl_3 и 10 мМ NaF (а) или 20 мМ NaF (б)

Во всех вариантах проведенных нами экспериментов показано, что активация G-белков при действии комплекса AlF_4^- (или NaF) приводит к ингибированию депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги, вызываемого тапсигаргином или ЦПК. Сходные данные по ингибированию депозависимого входа Ca^{2+} при активации G-белков негидролиземым аналогом ГТФ, ГТФ γ S, или AlF_4^- были получены на лейкоцитах базофилов линии RBL-2H3 крысы [18], ацинарных клетках слезной железы мыши (19), гранулоцитах линии HL-60 [20] и ооцитах *Xenopus* [34].

Активация G-белков может иметь существенное влияние на депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый опустошением внутриклеточных депо. Возможны два механизма влияния G-белков на сигнальные пути, отвечающие за регуляцию Ca^{2+} -тока, $I_{\text{сrac}}$, через сrac -каналы (calcium release-activated channel). Во-первых, гетеротримерные G-белки могут активировать фосфолипазу $\text{C}\beta$, что приводит к генерации IP_3 , необходимого для мобилизации Ca^{2+} из депо. Во-вторых, гетеротримерные G-белки или G-белки малой молекулярной массы могут играть более непосредственную роль в регуляции передачи информации от опустошенных депо к плазматической мембране [18-20]. Доказательства прямого участия G-белков в регуляции “емкостного входа” Ca^{2+} основываются на введении в клетки ГТФ γ S (негидролиземого аналога ГТФ), ГДФ β S (негидролиземого аналога ГДФ) и комплекса AlF_4^- , что приводит к различным результатам в зависимости от типа клеток. Так, с использованием метода пэтч-клэмп Фасолато и др. [18] показали, что ГТФ γ S (100 мкМ) блокирует активацию $I_{\text{сrac}}$, вызванную опустошением депо при действии иономицина или IP_3 . Ингибирующее действие ГТФ γ S проявляется на стадии, предшествующей активации $I_{\text{сrac}}$, и предотвращается добавлением ГТФ. ГДФ β S не ингибирует $I_{\text{сrac}}$, а вызывает даже некоторое увеличение амплитуды $I_{\text{сrac}}$. AlF_4^- вначале вызывает быструю активацию $I_{\text{сrac}}$ (по-видимому, путем опустошения депо), а затем ингибирует $I_{\text{сrac}}$. Авторы предполагают, что механизм активации депозависимого входа Ca^{2+} включает ГТФ-зависимую стадию, в которой принимают участие G-белки малой молекулярной массы [18]. На мегакариоцитах крысы также обнаружено, что 1 мМ ГТФ γ S значительно (на 65 %) подавляет амплитуду $I_{\text{сrac}}$, активированного иономицином [35].

В гранулоцитах линии HL-60 ГТФ γ S или ГДФ β S не влияют на мобилизацию Ca^{2+} из депо при действии тапсигаргина или иономицина [20]. В то же время, ГТФ γ S, но не ГДФ β S, блокирует активацию депозависимого входа Ca^{2+} в ответ на тапсигаргин. Ингибирующее действие ГТФ γ S имитируется NaF , активирующим гетеротримерные G-белки. Сходное влияние ГТФ γ S и NaF позволяет предположить, что в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в гранулоциты принимают участие гетеротримерные G-белки. ГТФ γ S и F^- могут действовать либо путем активации α -субъединицы G-белков, либо путем увеличения числа $\beta\gamma$ -субъединиц [20].

На нейтрофилах человека обнаружено, что вызываемый тапсигаргином вход Ca^{2+} и Mn^{2+} частично (на 50%) ингибируется коклюшным токсином, который АДФ-рибозилирует G_i -белки [36]. Это позволяет предположить участие G_i -белков в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в нейтрофилы человека. На гепатоцитах крысы также показано, что коклюшный токсин существенно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} или Mn^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином или ВНҚ [37]. Предполагают, что гетеротримерный G-белок, чувствительный к коклюшному токсину, необходим для активации депозависимого входа Ca^{2+} в гепатоциты. В последующей работе авторы показали, что вызываемый тапсигаргином депозависимый вход Ca^{2+} в гепатоциты ингибируется ГТФ γ S и AlF_4^- . Ингибирующее действие ГТФ γ S имитируется цАМФ и форсколином [38].

На ооцитах *Xenopus* активаторы G-белков ГТФ γ S и AlF_4^- вызывают только кратковременную активацию емкостного входа Ca^{2+} [34]. Кроме того, ГТФ γ S (2 мМ) и AlF_4^- (50 мкМ), но не ГДФ β S (2 мМ), ингибируют депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, что свидетельствует об участии гетеротримерных G-белков в регуляции “емкостного” входа Ca^{2+} в ооциты. Обнаружено также, что активация протеинкиназы А или протеинкиназы С приводит к подавлению депозависимого входа Ca^{2+} в ооциты, индуцируемого тапсигаргином. На основании этого, Петерсен и Берридж [34] предположили, что ингибирование “емкостного” входа Ca^{2+} при действии ГТФ γ S или AlF_4^- может быть опосредовано вызываемой гетеротримерными G-белками стимуляцией протеинкиназы А и протеинкиназы С. Это подтверждается также тем, что влияние ГТФ γ S на вход Ca^{2+} предотвращается неспецифическим ингибитором протеинкиназ стауроспорином.

Таким образом, результаты вышеописанных работ свидетельствуют о роли в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетки как гетеротримерных G-белков, так и G-белков малой молекулярной массы, работающих на стадии после вызванного агонистами образования IP_3 .

Наши эксперименты на перитонеальных макрофагах с использованием специфического активатора гетеротримерных G-белков, комплекса AlF_4^- , свидетельствуют об участии гетеротримерных G-белков в активации и регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином или ЦПК. Какой тип G-белков может играть роль в регуляции “емкостного” входа Ca^{2+} в макрофаги? В связи с тем, что в фагоцитирующих клетках (макрофагах, нейтрофилах) наиболее многочисленными G-белками являются G_i -белки, можно предположить, что в макрофагах в передаче сигнала от внутриклеточных депо к Ca^{2+} -каналам принимают участие G_i -белки, чувствительные к коклюшному токсину. Возможно, что эти гетеротримерные G_i -белки могут прямо модулировать депозависимые Ca^{2+} -каналы. G-белки, как известно, непосредственно модулируют активность различных типов ионных каналов [6,8], поэтому вполне вероятно, что такая регуляция может иметь место и для депозависимых Ca^{2+} -каналов. С учетом того, что в наших экспериментах активация протеинкиназы А и протеинкиназы С оказывает существенное влияние на депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги, нельзя также исключить возможность непрямого влияния G-белков, действующих путем стимуляции этих протеинкиназ.

Участие гетеротримерных G-белков в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги подтверждается также тем, что AlF_4^- ингибирует уже развившийся вход Ca^{2+} . Ингибирующее действие AlF_4^- может быть связано с модуляцией самого депозависимого Ca^{2+} -канала, по-видимому, путем активации механизмов отрицательной обратной связи, вторичных по отношению к стимуляции гетеротримерных G-белков (например, фосфорилирования канала протеинкиназами). Кроме того, известно, что NaF может ингибировать фосфатазы, что также может способствовать процессам фосфорилирования.

Работа выполнена в рамках Договора СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20 от 12.03.2020.

Список литературы / References:

1. Gilman A.G. G-proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, pp. 615-649.
2. Neer E.J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 1995, vol. 80, pp. 249-257.
3. Sprang St.R. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, vol. 66, pp. 639-678.
4. Milligan G., Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: A short history. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, vol. 147, suppl. 1, pp. S46-S55.
5. Garcia-Marcos M. Heterotrimeric G protein signaling without GPCRs: the $\text{G}\alpha$ -binding-and-activating (GBA) motif. *J. Biol. Chem.*, 2024, vol. 300, no. 3, 105756, doi: 10.1016/j.jbc.2024.105756.
6. Brown A.M., Birnbaumer L. Direct G protein gating of ion channels. *Amer. J. Physiol.*, 1988, vol. 23, pp. H401-H410.
7. Dhyania V., Gareia S., Gupta R.K., Swaina S., Venkatesh K.V., Giri L. GPCR mediated control of calcium dynamics: a systems perspective. *Cellular Signalling*, 2020, vol. 74, 109717, doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109717.
8. Dolphin A.C. Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J. Physiol.*, 1998, vol. 506.1, pp. 3-11.
9. Zamponi G.W., Striessnig J., Koschak A., Dolphin A.C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol. Rev.*, 2015, vol. 67, pp. 821-870.
10. Kano H., Toyama Y., Imai S., Iwahashi Y., Mase Y., Yokogawa M., Osawa M., Shimada I. Structural mechanism underlying G protein family specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. *Nature Commun.*, 2019, vol. 10, 2008, doi: 10.1038/s41467-019-10038-x.
11. Nguyen H., Glaaser I.W., Slesinger P.A. Direct modulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Front. Physiol.*, 2024, vol. 15, doi: 10.3389/fphys.2024.1386645.
12. Schubert B., Van Dongen A.M., Kirsch G.E., Brown A.M. β -adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G-protein pathways. *Science*, 1989, vol. 245, no. 4917, pp. 516-519.
13. Pelzer S., Shuba Y.M., Asai T., Codina J., Birnbaumer L., McDonald T.F., Pelzer D. Membrane-delimited stimulation of heart cell calcium current by beta-adrenergic signal-transducing Gs protein. *Amer. J. Physiol.*, 1990, vol. 259, no. 1, pp. H264-H267.
14. Kume H., Graciano M.P., Kotlikoff M.I. Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, pp. 11051-11055.
15. Hamilton S.L., Codina J., Hawkes M.J., Yatani A., Sawada T., Strickland F.M., Froehner S.C., Spiegel A.M., Toro L., Stefani E., Birnbaumer L., Brown A.M. Evidence for direct interaction of $\text{G}\alpha$ with the Ca^{2+} channel of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, no. 29, pp. 19528-19535.
16. Won J., Kim J., Jeong H., Kim J., Feng S., Jeong B., Kwak M., Ko J., Im W., So I., Lee H.H. Molecular architecture of the $\text{G}\alpha$ -bound TRPC5 ion channel. *Nat. Commun.*, 2023, vol. 14, no. 1, 2550, doi: 10.1038/s41467-023-38281-3.
17. Kang H., Kim J., Park C.H., Jeong B., So I. Direct modulation of TRPC ion channels by $\text{G}\alpha$ proteins. *Front. Physiol.*, 2024, vol. 15, 1362987, doi: 10.3389/fphys.2024.1362987.
18. Fasolato C., Hoth M., Penner R. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 28, pp. 20737-20740.
19. Bird G.St.J., Putney J.W. Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 29, pp. 21486-21488.
20. Jaconi M.E.E., Lew D.P., Monod A., Krause K.-H. The regulation of store-dependent Ca^{2+} influx in HL-60 granulocytes involves GTP-sensitive elements. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 35, pp. 26075-26078.
21. Bigay J., Deterre P., Pfister D., Chabre M. Fluoroaluminates activate transducin-GDF by mimicking the γ -phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett.*, 1985, vol. 191, pp. 181-185.
22. Bigay J., Deterre P., Pfister D., Chabre M. Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the γ -phosphate of GTP. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, pp. 2907-2913.
23. Cockcroft S., Taylor J.A. Fluoroaluminates mimic guanosine 5'-[γ -thio]-triphosphate in activating the polyphosphoinositide phosphodiesterase of hepatocyte membranes. *Biochem. J.*, 1987, vol. 241, pp. 409-414.

24. Makhlof M., Ashton S.H., Hildebrandt J., Mehta N., Gettys T.W., Halushka P.V., Cook J.A. Alterations in macrophage G proteins are associated with endotoxin tolerance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, vol. 1312, no. 2, pp. 163-168.
25. Wiese K., Ali S.R., Gewecke B., Novakovic A., Konrad F.M., Pexa K., Beer-Hammer S., Reutershan J., Piekorz R.P., Schmidt R.E., Nurnberg B., Gessner J.E. Gai2 is the essential Gai protein in immune complex-induced lung disease. *J. Immunol.*, 2013, vol. 190, no. 1, pp. 324-333.
26. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые трифлуоперазином, в макрофагах. *Цитология*, 2018, т. 60, № 2, с. 116-121 [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Arachidonic acid metabolism inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, no. 4, pp. 315-322 (In Russ.)].
27. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
28. Bruce J.I.E., Elliott A.C. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Brit. J. Physiol.*, 2000, vol. 131, pp. 761-771.
29. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566, doi: 10.1074/jbc.M109518200.
30. Бочков В.Н., Феоктистов И.А., Авдонин П.В., Ткачук В.А. Форболовый эфир блокирует сопряжение GTP-связывающего белка с рецепторуправляемыми кальциевыми каналами. *Биохимия*, 1989, т. 54, с. 1533-1542 [Bochkov V.N., Feoktistov I.A., Avdonin P.V., Tkachuk V.A. Phorbol ester inhibits the coupling of GTP-binding protein to receptor-operated calcium channels. *Biochemistry*, 1989, vol. 54, pp. 1533-1542 (In Russ.)].
31. Авдонин П.В., Ткачук В.А. *Рецепторы и внутриклеточный кальций*. М.: Наука, 1994, 288 с. [Avdonin P.V., Tkachuk V.A. *Receptors and intracellular calcium*. М.: Nauka, 1994, 288 p. (In Russ.)].
32. Gukovskaya A.S., Zinchenko V.P. Mechanisms of receptor-mediated generation of ionic signals in rat thymocytes and Ehrlich ascites tumor cells. *Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol.*, 1990, vol. 10, pp. 1-98.
33. Aulestia F.J., Groeling J., Bomfim G.H.S., Costiniti V., Manikandan V., Chaloemtoem A., Concepcion A.R., Li Y., Wagner L.E., Idaghdour Y., Yule D.I., Lacruz R.S. Fluoride exposure alters Ca^{2+} signaling and mitochondrial function in enamel cells. *Sci. Signal.*, 2020, vol. 13, eaay0086, doi: 10.1126/scisignal.aay0086.
34. Petersen C.C.H., Berridge M.J. G-protein regulation of capacitative calcium entry may be mediated by protein kinases A and C in *Xenopus* oocytes. *Biochem. J.*, 1995, vol. 307, pp. 663-668.
35. Somasundaram B., Norman J.C., Mahaut-Smith M.P. Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochem. J.*, 1995, vol. 309, pp. 725-729.
36. Wenzel-Seifert R., Krautwurst D., Musgrave I., Seifert R. Thapsigargin activates univalent- and bivalent-cation entry in human neutrophils by a SKaF96365- and Gd^{3+} -sensitive pathway and is a partial secretagogue: involvement of pertussis-toxin-sensitive G-proteins and protein phosphatases 1/2A and 2B in the signal-transduction pathway. *Biochem. J.*, 1996, vol. 314, pp. 679-686.
37. Fernando K.C., Barritt G.J. Evidence from studies with hepatocyte suspensions that store-operated Ca^{2+} inflow requires a pertussis toxin-sensitive trimeric G-protein. *Biochem. J.*, 1994, vol. 303, pp. 351-356.
38. Fernando K.C., Gregory R.B., Barritt G.J. Protein kinase A regulates the disposition of Ca^{2+} which enters the cytoplasmic space through store-activated Ca^{2+} channels in rat hepatocytes by diverting inflowing Ca^{2+} to mitochondria. *Biochem. J.*, 1998, vol. 330, pp. 1179-1187.

HETEROTRIMERIC G-PROTEINS ACTIVATOR, COMPLEX AIF4⁻, ATTENUATES Ca²⁺ RESPONSES IN MACROPHAGES

Milenina L.S.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹

¹ Saint-Petersburg State University

Universitetskaya Emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia; e-mail: l.milenina@spbu.ru

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University

Litovskaya St., 2, Saint-Petersburg, 194100, Russia

Received 24.07.2024

Abstract. An important role in intracellular signaling processes is played by heterotrimeric G-proteins (consisting of α , β and γ subunits), working as molecular switches, signal transducers in cellular signaling chains, and transmitting signals from G protein-coupled receptors to certain effector molecules in the cells. G proteins are involved in many intracellular processes, primarily in Ca²⁺ signaling. A useful tool for studying the role of G proteins in cell activation is the specific activator of heterotrimeric G proteins, complex AIF4⁻. To elucidate the involvement of heterotrimeric G-proteins in the regulation of Ca²⁺ signals in macrophages, the effect of complex AIF4⁻ on Ca²⁺ responses, induced by inhibitors of endoplasmic Ca²⁺-ATPases thapsigargin and cyclopiazonic acid in rat peritoneal macrophages was investigated. Using Fura-2AM microfluorimetry, we have shown for the first time that complex AIF4⁻ significantly suppresses both Ca²⁺ mobilization from intracellular Ca²⁺ stores and the subsequent store-dependent Ca²⁺ entry into cells, induced by thapsigargin or cyclopiazonic acid in peritoneal macrophages. It was also found that complex AIF4⁻ almost completely inhibits the already developed store-dependent Ca²⁺ entry into macrophages. The data obtained indicate the involvement of heterotrimeric G-proteins in the regulation of Ca²⁺ signals and, first of all, in the activation and regulation of store-dependent Ca²⁺ entry in macrophages.

Key words: complex AIF4⁻, heterotrimeric G-proteins, intracellular Ca²⁺ concentration, macrophages.

РАЗДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА МИКРОВОДОРОСЛИ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS* NORTH. GEITL.

Чернышев Д.Н., Ключкова В.С.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 10.08.2024

Аннотация. В работе составлены математические модели пигментов с-фикоцианина и аллофикоцианина, на основании спектров поглощения чистых пигментов по литературных данных. Математические модели пигментов представляют сумму кривых Гаусса в области от 400 до 700 нм. Полученные модели применены для декомпозиции водного экстракта микроводоросли спиролины и вычисления концентрации пигментов. Водный экстракт получали по методике холодной экстракции. Параллельно рассчитаны концентрации пигментов по стандартной методике и использованием линейных уравнений. Показано что рассчитанные значения концентраций пигментов по предложенному методу и стандартной методике статистически не различаются. На практике модель спектра поглощения водного экстракта микроводоросли *Arthrospira platensis* может быть использована для определения концентрации с-фикоцианина и аллофикоцианина по данным спектров поглощения. Реализован метод математического разделения спектра поглощения водного экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие приближения концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью, выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента поиска решения, где неизвестными величинами являются концентрации пигментов, сдвиг максимума и коэффициент уширения полос. Реализация предлагаемого метода позволяет наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр поглощения.

Ключевые слова: кривые Гаусса, спиролина, С-ФЦ, АФЦ, аппроксимация, водный экстракт, спектры поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Решение задачи определения концентрации пигментов микроводорослей и разделение смеси пигментов представляет интерес как практическом так в и теоретическом плане. В преобладающем большинстве исследований оценка концентрации пигментов определяется с помощью спектрофотометрии. Стандартная биохимическая методика [1] предполагает экстракцию фикобилиновых пигментов микроводорослей фосфатным буфером, центрифугирование и спектрофотометрирование проб с расчётом концентрации пигментов по известным экстинкциям. Такой подход позволяет оценить только те пигменты, максимумы поглощения которых не накладываются. Для решения этой задачи используют методы тонкослойной, жидкостной хроматографии, которые требуют специализированного оборудования и длительной подготовки проб.

Одним из методов количественного определения содержания пигментов в микроводорослях является разделение спектра экстракта на математические модели отдельных пигментов. В ряде работ [2,3] предложено использовать сумму кривых нормального распределения для моделирования поглощения каждого пигмента. Каждый отдельный пик был описан выражением:

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

где:

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

$D_{\max}$ – высота пика, отн. ед;

λ_i – длина волны, нм;

$\lambda_{\max}$ – положение максимума пика, нм; σ – полуширина пика на полувысоте, нм.

Объектом исследования в работе являлась цианопрокариота *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Спектры поглощения культуры регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO₄). Спектры поглощения экстрактов регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм на спектрофотометре Unicо в кварцевых 1 см кюветах в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,5 нм.

В представленной работе было выполнено разложение и анализ перекрывающихся полос пигментов в спектре поглощения водного экстракта методом приближения с применением табличного процессора MS Excel.

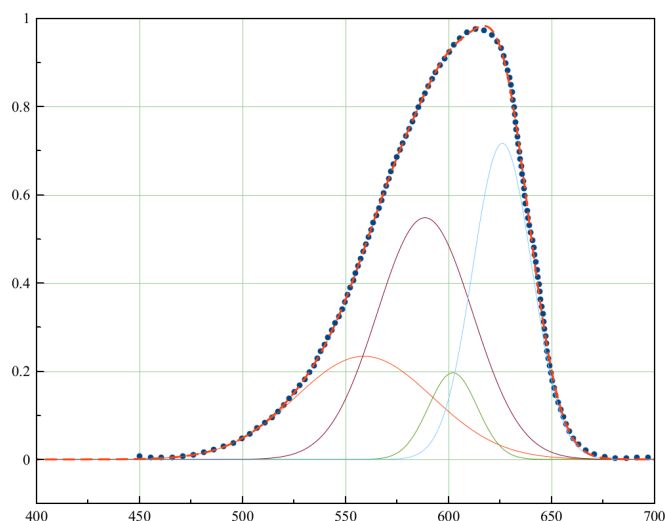


Рисунок 1. Разделение спектра поглощения С-фикоцианина [4] на отдельные кривые Гаусса ($R^2=0,99$)

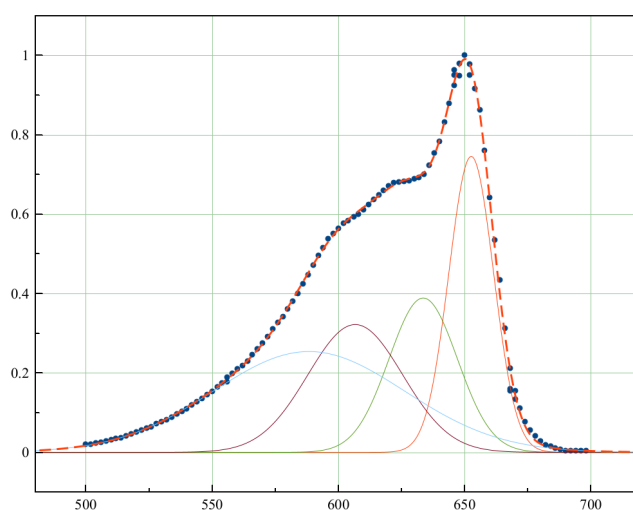


Рисунок 2. Разделение спектра поглощения аллофикоцианина на [4] на отдельные кривые Гаусса ($R^2=0,99$)

Была реализована надстройка «Поиск решения». Оптимизации подвергалась целевая функция, а именно сумма квадратов отклонений, (должна была стремиться к нулю), поиск решения проводился методом общего понижающего градиента (ОПГ)

Было проведено описание спектров поглощения С-ФЦ и АФЦ в фосфатном буфере по литературным данным [4] алгебраической суммой гауссиан в области от 400 до 750 нм. Спектры пигментов были отсканированы и приведены к 1 (значение оптической плотности) в точке максимума.

Полученные модели пигментов в чистом виде были использованы для разделения спектра водного экстракта, полученного по методике холодной экстракции [1] на спектры отдельных пигментов. Вычисленные значения концентрации пигментов хорошо согласуются с методом расчёта по линейным уравнениям, применяемым ранее [2].

Предложен метод математического разделения спектра поглощения водного экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие приближения концентраций пигментов путём минимизации суммы

Таблица 1. Параметры модели С-ФЦ

Номер пика	1	2	3	4
Амплитуда	0,2336	0,5478	0,1964	0,7164
Полуширина	33,2	23,1	11,8	14,4
Максимум	559	588,6	602,1	626,2

Таблица 2. Параметры модели АФЦ

Номер пика	1	2	3	4
Амплитуда	0,238	0,3672	0,2732	0,815
Полуширина	39,75	20,96	10,93	9,21
Максимум	592,7	614,2	635,3	656,2

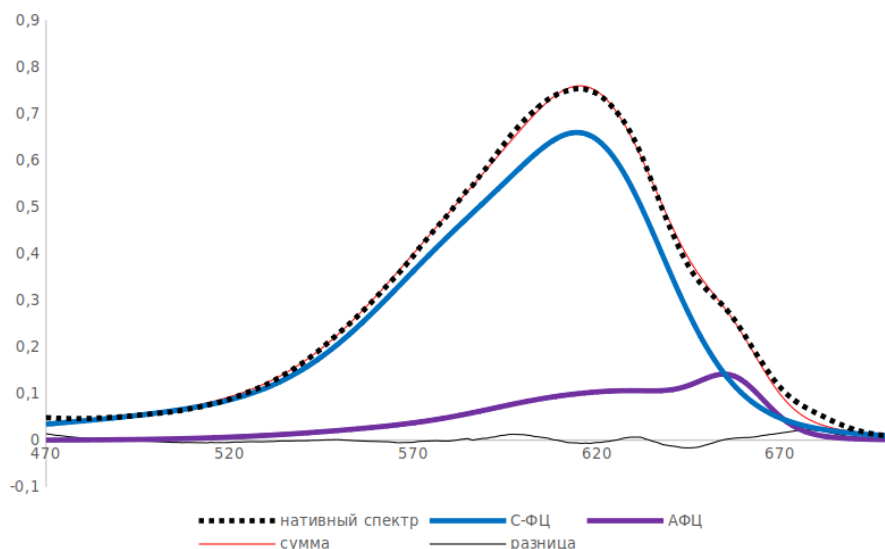


Рисунок 3. Пример декомпозиции спектра поглощения водного экстракта спирулины на спектры отдельных пигментов

квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью, выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента «Поиска решения». Спектр поглощения экстракта приближали с помощью математической модели, в которой неизвестными параметрами являются концентрации С-ФЦ и АФЦ.

На рисунке 3 представлен пример разделения спектра поглощения водного экстракта спирулины. Всего было обработано 10 спектров, коэффициент детерминации R^2 составлял от 0,995 до 0,999, что свидетельствует о высокой точности предложенной модели.

Получены парные значения ($n = 10$) концентраций С-ФЦ и АФЦ, рассчитанные разными методами (рис. 4). Коэффициент корреляции составил 0,9999 для С-ФЦ, 0,9993 для АФЦ, что свидетельствует о высокой связи между значениями концентраций, рассчитанных разными методами.

Предложенный способ математической обработки спектра статистически не отличается от стандартной методики и может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. Так же применение данного метода дает возможность наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр.

При сравнении значений концентрации, полученных различными методами, был применен метод Блэнда-Алтмана [5] (рис. 5). Было установлено, что все концентрации С-ФЦ и АФЦ находятся в пределах двух стандартных отклонений разности концентраций, что говорит о согласованности измерений, полученных разными способами. Средняя разность методов с 95 % доверительным интервалом для С-ФЦ составила -0,0042 [-0,0049; -0,0036], АФЦ 0,0012 [0,0009; 0,0014].

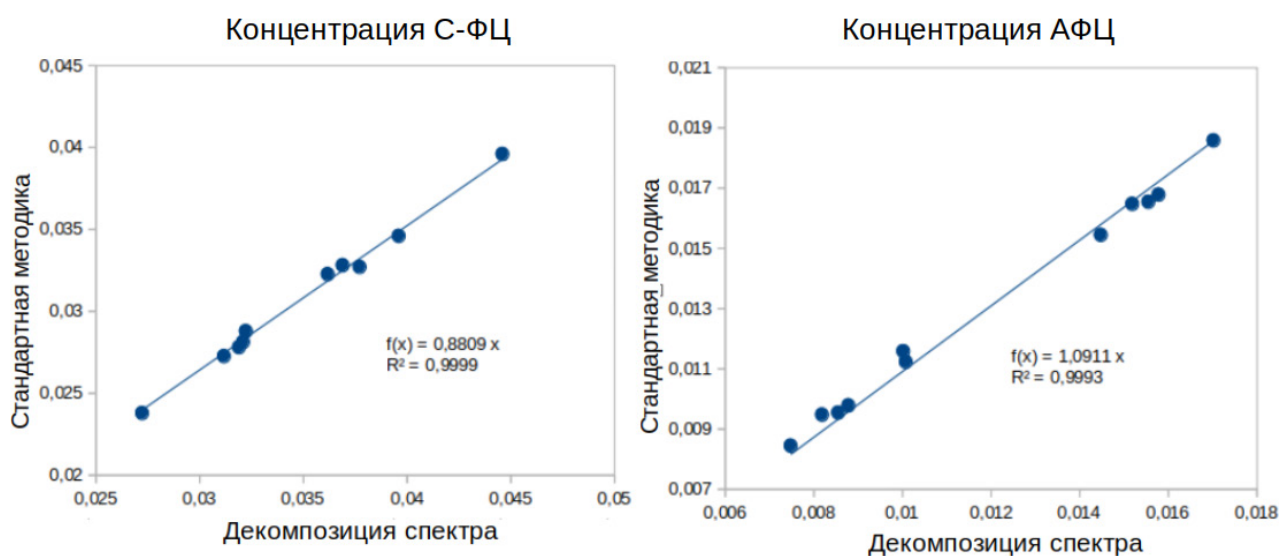


Рисунок 4. Зависимость между результатами (г/л), полученными стандартным методом и методом декомпозиции спектра

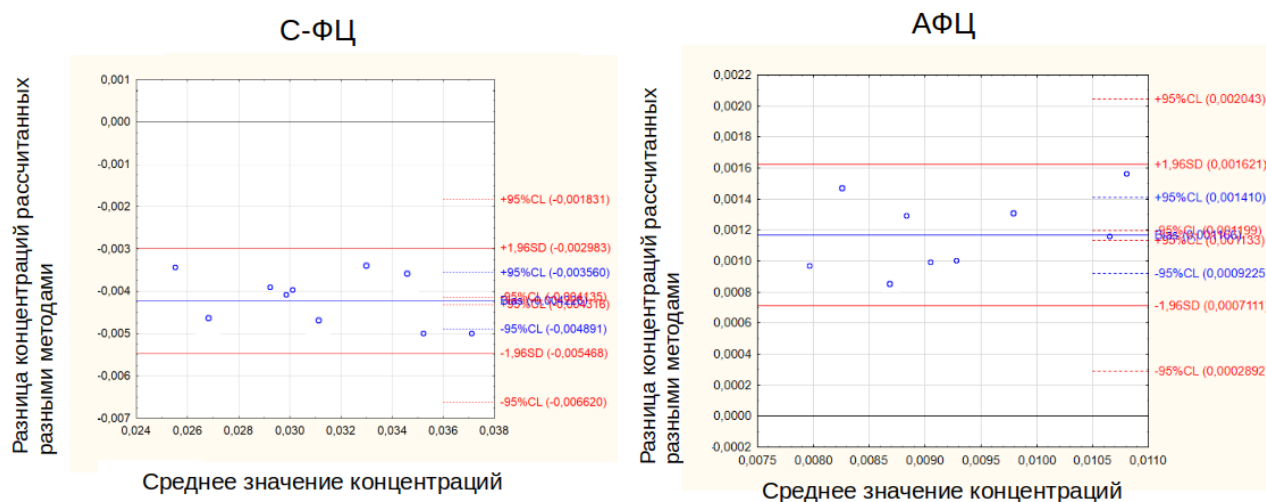


Рисунок 5. Диаграммы Блэнда-Алмана, сравнения значений концентраций (г/л), рассчитанных по стандартной методике и методом декомпозиции спектра

В предложенном способе расчета в табличном процессоре все параметры модели могут быть изменены (коэффициенты экстинкции, характеристики отдельных пиков).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный способ математической обработки спектра статистически не отличается от стандартной методики и может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. Так же реализация данного метода позволяет наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр.

Список литературы/ References:

1. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. *Количественное определение массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Холодная экстракция: учебно-методическое пособие.* РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, 2017, 21 с. (Препринт / РАН, ИМБИ). [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of C-phycocyanin and allophycocyanin in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Cold extraction: teaching manual.* RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. A.O.Kovalevsky. Sevastopol, 2017, 21 p. (In Russ.)].
2. Стадничук И.Н. *Фикобилипротеины.* Москва: ВИНТИ, 1990, т. 193 [Stadnichuk I.N. *Phycobiliproteins.* Moscow: VINITI, 1990, vol. 193 (In Russ.)].
3. Kupper H. et al. Reversible coupling of individual phycobiliprotein isoforms during state transitions in the cyanobacterium *Trichodesmium* analysed by single-cell fluorescence kinetic measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2009, vol. 1787, no. 3, pp. 155-167.
4. Boussiba S., Richmond A.E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 1979, vol. 120, pp. 155-159.
5. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *International journal of nursing studies*, 2010, vol. 47, no. 8, pp. 931-936.

**DECOMPOSITION OF THE ABSORPTION SPECTRUM OF AQUEOUS EXTRACT OF MICROALGAE
ARTHROSPIRA (SPIRULINA) *PLATENSIS* NORTH. GEITL.****Chernyshev D.N., Klochkova V.S.**

Sevastopol State University

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

Received 10.08.2024

Abstract. In this paper, mathematical models of the pigments c-phyococyanin and allophycocyanin are compiled based on the absorption spectra of pure pigments according to literature data. The mathematical models of the pigments represent the sum of the Gaussian curves in the range from 400 to 700 nm. The obtained models are used to decompose the aqueous extract of the microalgae spirulina and calculate the concentration of pigments. The aqueous extract was obtained using the cold extraction method. In parallel, the concentrations of the pigments were calculated using the standard method linear equations. It is shown that the calculated values of the pigment concentrations according to the proposed method and the standard method do not differ statistically. In practice, the absorption spectrum model of the aqueous extract of the microalga *Arthrospira platensis* can be used to determine the concentration of c-phyococyanin and allophycocyanin based on absorption spectra. The method of mathematical separation of the absorption spectrum of the aqueous extract in the Microsoft Excel program is implemented. Calculations that approximate pigment concentrations by minimizing the sum of squared deviations between the true absorption spectrum and its mathematical model are performed using a spreadsheet using a solution search tool, where the unknown values are pigment concentrations, maximum shift, and band broadening coefficient. The implementation of the proposed method allows for a visual assessment of the contribution of individual pigments to the overall absorption spectrum.

Key words: *Gauss curves, spirulina, C-FC, AFC, approximation, aqueous extract, absorption spectra.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

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

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

Поступила в редакцию 10.08.2024

Аннотация. Глутаматные рецепторы играют важную роль в регуляции синаптической пластичности, включая процессы обучения и формирования памяти. В настоящей работе рассматривается влияние окислительной модификации триптофана в структуре глутаматных рецепторов на свойства нейронных сетей гиппокампа. С помощью разработанного ранее модельного подхода были выявлены изменения проводимости рецепторов, имеющих замещение аминокислотного остатка триптофана на 5-гидрокси-L-триптофан. С помощью методов молекулярно-динамического моделирования показано, что окисление аминокислотных остатков рецепторных белков может приводить к изменению их свойств и поведения в нейронной сети. Проводимость модифицированных рецепторов AMPA возросла по сравнению с нативной формой, в то время как проводимость рецепторов NMDA уменьшалась. Исходя из анализа вольтамперных характеристик было выявлено, что модификация триптофана в структуре рецепторного канала вызывает снижение ионного тока через отдельный NMDA-рецептор. Изучение сетевой активности нейронов с измененной структурой рецепторов проводилось в модели нейронной сети CA3 области гиппокампа. В результате исследования получены электрофизиологические характеристики модели нейронной сети в зависимости от строения ионного канала рецептора. Определен характер зависимости пиковых значений спектра мощности основных ритмов гиппокампа в зависимости от проводимости рецепторов AMPA и NMDA.

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

Глутаматные рецепторы опосредуют быструю возбуждающую синаптическую передачу в центральной нервной системе и регулируют широкий спектр процессов [1]. Рецепторы NMDA принимают непосредственное участие в координировании активности сетей нейронов гиппокампа при кодировании, консолидации и извлечении воспоминаний [2,3]. Нарушение структуры глутаматных рецепторов, вызванное действием свободных радикалов, способно привести к изменению их свойств и поведения в нейронной сети.

Активные формы кислорода (АФК) постоянно производятся в процессе нормального метаболизма кислорода и включают свободные радикалы, такие как супероксид-анион (O_2^-), гидроксильный радикал ($OH^\cdot$) и перекись водорода (H_2O_2). АФК, вызывающие стресс, образуются в результате воздействия ионизирующей радиации, ультрафиолетового света и различных окисляющих химических веществ. Окислительный стресс – это состояние дисбаланса между образованием активных форм кислорода и антиоксидантной способностью клеток из-за усиленной генерации АФК и/или дисфункции антиоксидантной системы. Патологические процессы, вызванные действием свободных радикалов, связывают с развитием нейродегенеративных заболеваний [4].

В результате окислительного стресса в структуре глутаматных рецепторов а.о. триптофан с наибольшей вероятностью заменяется на молекулу 5-гидрокси-L-триптофан (HRP-лиганд в базе PDB) [5,6]. В данной работе проведено молекулярно-динамическое моделирование рецепторов AMPA и NMDA, содержащих модифицированные аминокислотные остатки триптофана (5-гидрокси-L-триптофан) (рис. 1, табл. 1). На основе сравнения радиуса поврежденного рецепторного канала с радиусом канала нативной формы рецептора было определено изменение проводимости ионного канала рецептора. Визуализация ионного канала была произведена при помощи пакета HOLE v2.2.005 (рис. 2). Построение геометрии канала проводилось после достижения молекулярной системой стабильного состояния в процессе моделирования, что соответствует примерно 25-50 нс после начала моделирования. Полученные данные о проводимости модифицированных каналов рецепторов позволили произвести оценку влияния повреждений на динамику модели нейронной сети [7].

МЕТОД

Исследование влияния окислительного стресса на глутаматные рецепторы проводилось в несколько этапов. Первоначальным этапом было восстановление недостающих аминокислотных остатков в трёхмерной структуре глутаматных рецепторов с помощью программного пакета MODELLER 10.3. Построение липидного бислоя и

Таблица 1. Модифицированные а.о. в рецепторах и их процентное соотношение

AMPA	6DM1	5L1B	NMDA	6WHT	6WHR
Trp606Hrp	3,85%	2,94%	Trp606Hrp (NR2); Trp752Hrp (NR1)	3,13%	3,13%
Организм: <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Homo sapiens</i> Система экспрессии: <i>Homo sapiens</i> PDBDOI: 10.1016/j.neuron.2018.07.027	Организм: <i>Rattus norvegicus</i> Система экспрессии: <i>Spodoptera frugiperda</i> PDBDOI: 10.1016/j.cell.2020.05.052				

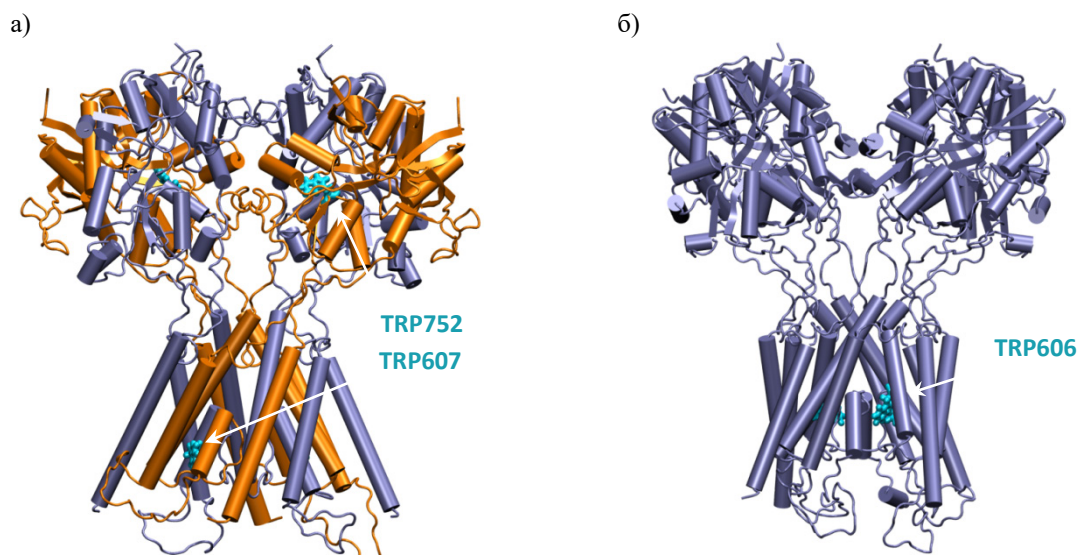


Рисунок 1. Модифицированные а.о. в рецепторах а) NMDA: 6WHT и б) AMPA: 6DM1

сольватирование выполнено в среде Charmm-GUI. Молекулярно-динамическое моделирование проводилось в среде GROMACS версии 5.13.

Исходя из анализа проводимости ионных каналов (табл. 2) и распределения ионов магния в каналах рецепторов NMDA, было изучено поведение нейронной сети с каждым типом рецептора NMDA и AMPA, произведён расчёт локального потенциала и определены значения коллективных колебаний (ритмов) нейронной сети гиппокампа. Изучение сетевой активности нейронов с различными типами рецепторов NMDA проводилось в моделях нейронных сетей CA3 [7] области гиппокампа. Для изучения поведения нейронной сети применялся пакет NEURON [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярно-динамическое моделирование. Молекулярно-динамические расчёты показали, что проводимость ионного канала модифицированных форм рецепторов NMDA уменьшалась, в то время как в случае AMPA-рецепторов имело место увеличение проводимости.

Для исследования влияния нарушений структуры рецептора на динамику открытия ионного канала было определено расстояние между противоположными парами аминокислотных остатков Ser667/645(NMDA) и Ser615 (AMPA) из высоконсервативного мотива SYTANLAAF в трансмембранном домене глутаматных рецепторов (рис. 3).

Для участия в синаптической передаче сигнала рецептор должен находиться в активном конформационном состоянии, для чего требуется связывание с агонистами. Среднее время открытия рецептора AMPA – 2 мс [9] Время открытия отдельных каналов активированных рецепторов NMDA составляет 5–15 мс [10]. Нарушение связи субъединиц NMDA-рецептора с глутаматом и глицином может привести к закрытию рецепторного канала и деактивации рецептора. В процессе молекулярно-динамического моделирования наблюдалось нарушение связи рецептора NMDA с глутаматом, при котором происходила потеря одного лиганда. В случае рецептора AMPA нарушения связи с глутаматом на протяжении всего времени моделирования практически не наблюдалось.

Время связывания глутаматных рецепторов с лигандами GLU/GLY оценивалось путем определения расстояния между лигандом и близлежащим аминокислотным остатком рецептора. Расчёты показали, что лиганды рецептора NMDA после 20 нс отделяются от рецептора, а в случае рецептора AMPA связь с лигандами GLU – устойчивая.

Расчет макроскопических ионных токов. Активация рецептора NMDA требует, как связывания с нейротрансмиттером-лигандом, глутаматом (высвобождаемым из пресинаптического нейрона), так и деполяризации мембраны постсинаптического нейрона. На молекулярном уровне ион магния является потенциал зависимым блокатором открытых каналов NMDA-рецептора, а деполяризация нейронов может снизить магниевый блок [11-13]. Наличие высоких концентраций Mg^{2+} в клетках млекопитающих необходимо для регуляции широкого спектра клеточных функций и активности многих ферментов [14]. Данные свидетельствуют о том, что магний оказывает нейропротекторное действие на центральную нервную систему; снижение количества свободного Mg^{2+} в мозге связано с когнитивными нарушениями при старении, травмах, ишемии/инсульте и нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [15].

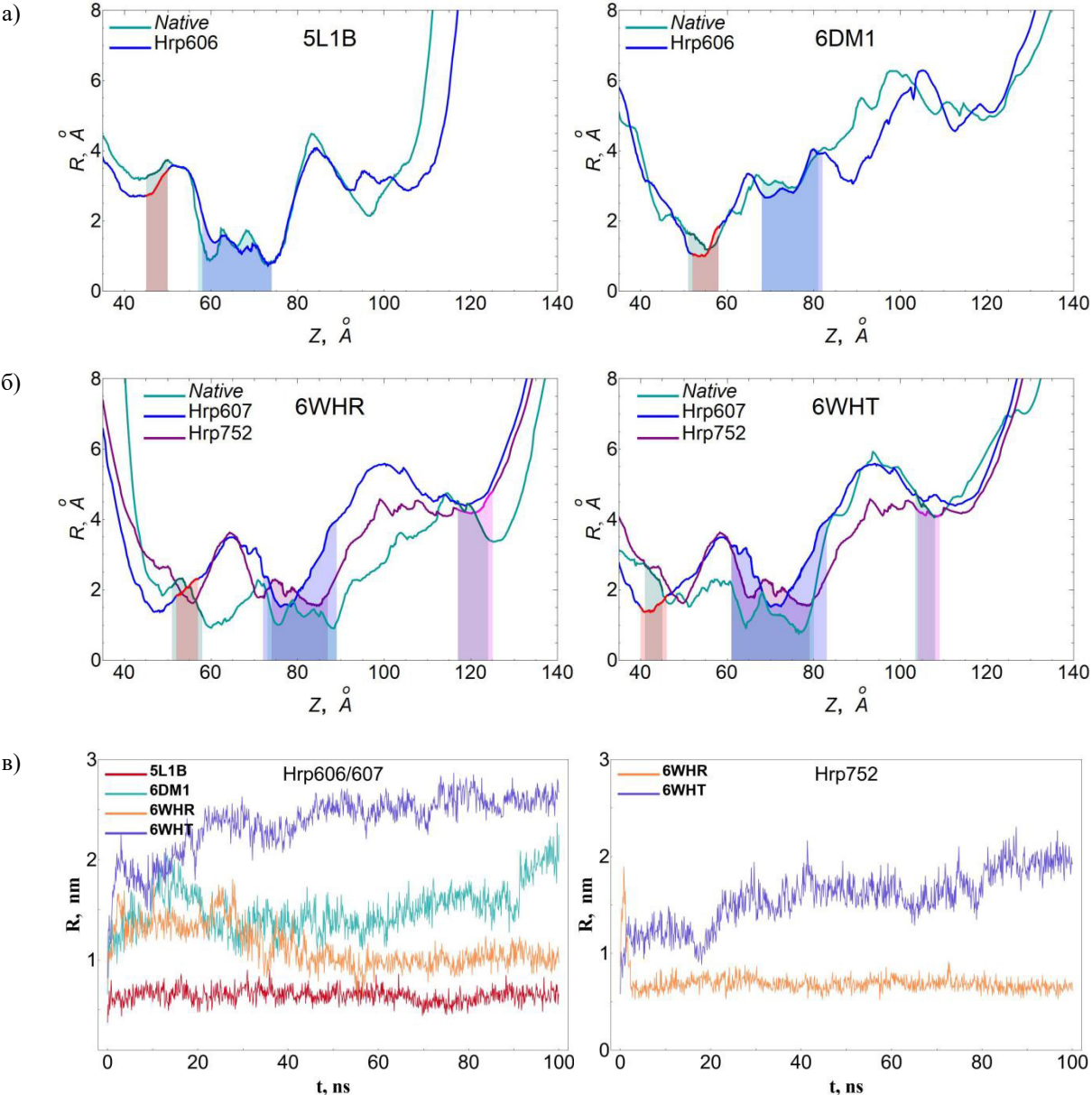


Рисунок 2. Изменения геометрии каналов глутаматных рецепторов NMDA иAMPA в зависимости от модификации а.о. оксидантами: а) неактивная (слева) и активная форма (справа) глутаматных рецепторовAMPA (PDB: 5L1B, 6DM1); б) неактивная (слева) и активная (справа) форма NMDA (PDB: 6WHR и 6WHT); в) среднеквадратичные отклонения остовых атомов мотива SYTANLAAF ионного канала глутаматных рецепторов, модифицированных оксидантами

Таблица 2. Соотношение проводимости G поврежденного рецептора NMDA и AMPA к проводимости G_{base} неповрежденного рецепторного канала NMDA и AMPA

	NMDA		AMPA
Тип повреждения	Trp607 → Hrp607	Trp752 → Hrp752	Trp606 → Hrp606
G/G_{base}	0,760±0,006	0,603±0,006	1,224±0,006

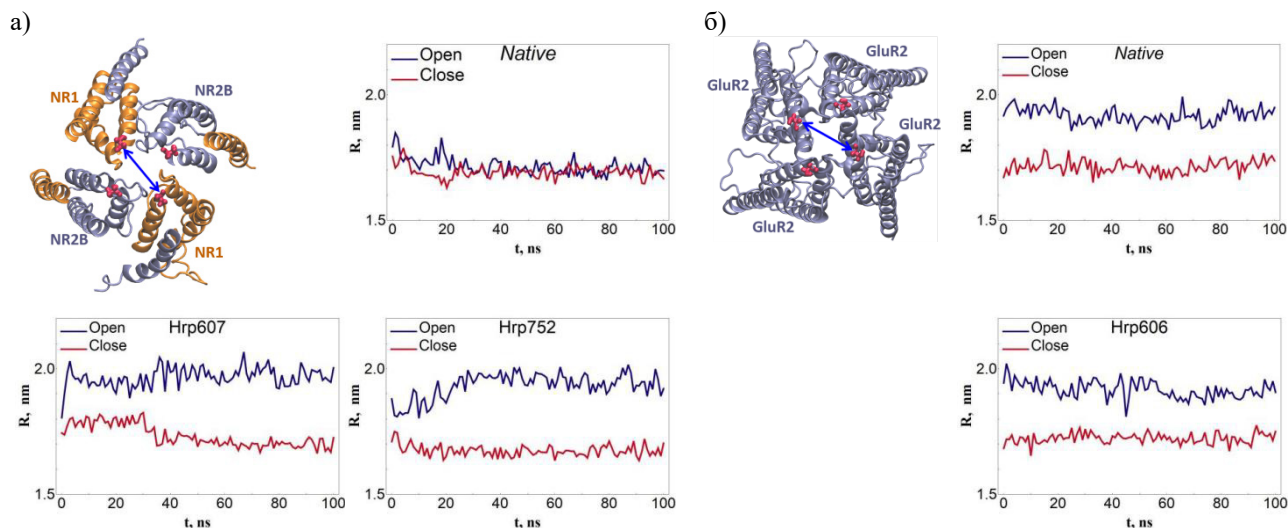


Рисунок 3. Среднее расстояние между парами а.о. Ser667-667 (NR1) и Ser645-645 (NR2) рецептора NMDA и Ser615-Ser615 рецептора AMPA: а)слева сверху – рецептор NMDA в активной конформации, после 20 нс динамики. б) слева сверху – рецептор AMPA в активной конформации, после 50 нс динамики

Известно, что физиологическая концентрация Mg^{2+} составляет около 1 мМ. Каналы рецепторов NMDA не проводят ток, если потенциал постсинаптической мембраны составляет менее -80 мВ [16].

Макроскопический ионный ток I_{m} через отдельный рецептор NMDA рассчитывается по формуле [17]:

$$I_{NMDA} = \frac{G_{NMDA} P(V_{pre})(V - V_e)}{1 + \frac{[Mg^{2+}]}{K_d} \exp[-qV/V_0]}, \quad (1)$$

Ионные токи глутаматных рецепторов в модели нейронной сети [7] представлены в виде:

$$I_{NMDA} = \frac{G_{NMDA}}{1 + 0.28 \exp[-0.062V]}, \quad (2)$$

$$I_{AMPA} = G_{AMPA}(V - V_e) \quad (3)$$

где:

G_{NMDA} – максимальная проводимость рецептора NMDA для определенного типа иона, в нашем случае токи иона Na^+ ,

G_{AMPA} – максимальная проводимость рецептора AMPA,

P – вероятность открытия канала в зависимости от пресинаптического потенциала V_{pre} и макроскопическая кинетика состояний рецептора,

V – постсинаптический мембранный потенциал с равновесным напряжением V_e , q – феноменологическая константа, отражающая электрохимические свойства [16].

Константа диссоциации K_d [17] определяется согласно следующему выражению:

$$K_d = C_R \left(\frac{N_m B_m}{N_b B_b} - 1 \right), \quad (4)$$

где:

C_R является коэффициентом пропорциональности,

N_m – количество ионов Mg^{2+} , которые достигают сайта связывания в TMD,

N_b – количество связанных ионов Mg^{2+} .

Один ион способен образовывать до $B_m = 4$ связи в сайте блокирования,

B_b – это фактическое количество связей с одним из четырех остатков Asn616 (N616).

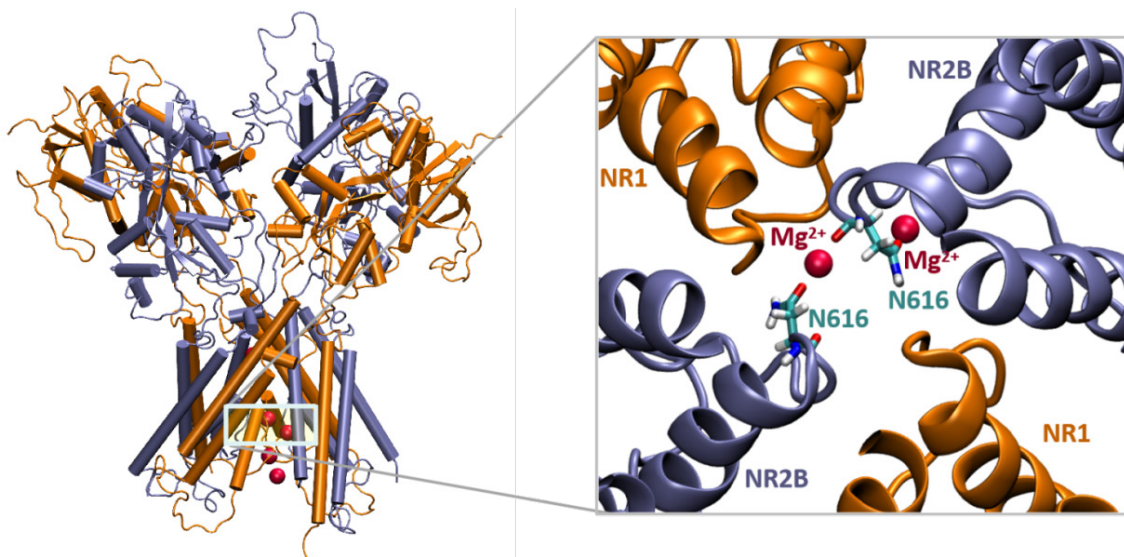


Рисунок 4. Связывание ионов Mg^{2+} с а.о. Asn616 посредством водородной связи в канале рецептора NMDA

Чтобы определить K_d , мы поместили 8 ионов Mg^{2+} в пору ионного канала открытого рецептора и выполнили молекулярно-динамическое моделирование длительностью 100 нс. После этого мы рассчитали количество ионов, достигающих сайта связывания, и количество сформированных связей (рис. 4). Значения параметров представлены в таблице 3. На рисунке 5 представлены вольтамперные характеристики глутаматных рецепторов. Равновесное напряжение V_e для рецепторов AMPA и NMDA было определено как 2,2 мВ. $V_0 = 1,1$. Параметр q вычислялся исходя из выражения [18]:

$$\frac{q}{q_{nat}} = \frac{u_{nat}}{u} \quad (5)$$

Динамика нейронной сети гиппокампа. Влияние различных повреждений глутаматных рецепторов на динамику нейросетей гиппокампа оценивается по спектрам мощности, отражающим выраженность того или иного частотного диапазона генерируемых осцилляций. Рассмотрены два частотных диапазона: тета (4-8 Гц) и гамма (30-60 Гц).

Модель [7] воспроизводит базовые тета-модулированные гамма-колебания локального потенциала (ЛП), наблюдаемые экспериментально. Мы проанализировали изменения локального потенциала, вызванные нарушением проводимости глутаматных рецепторов.

Спектральный анализ сигнала производится с помощью прямого Фурье-преобразования функции, описывающей локальный потенциал. Были получены спектры мощности сигнала ЭЭГ для модели сети нейронов, содержащей повреждённые рецепторы NMDA и AMPA.

На рисунке 6 отражена зависимость максимального значения спектра мощности ритмов тета и гамма от проводимости рецепторного канала.

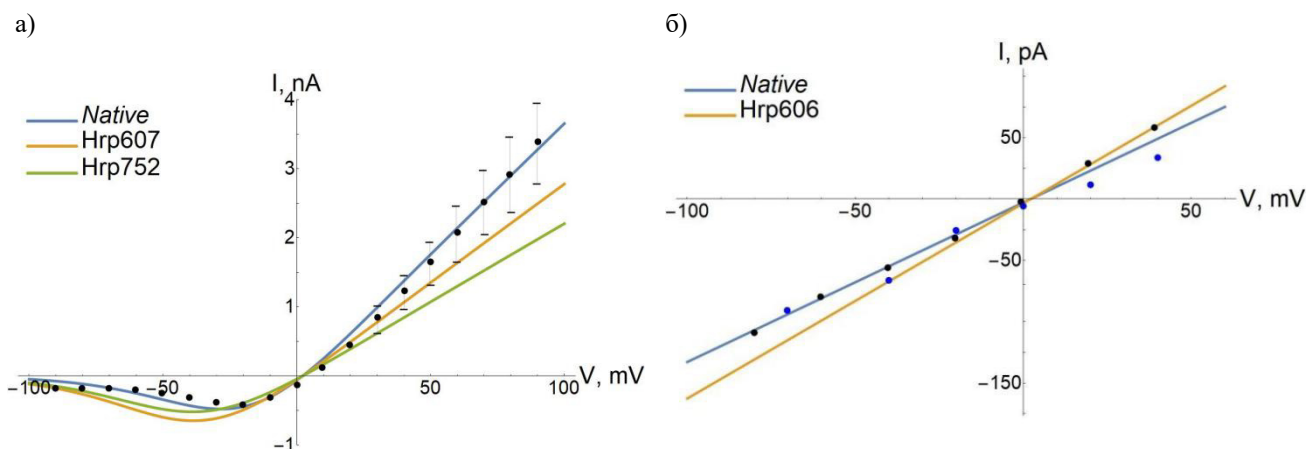
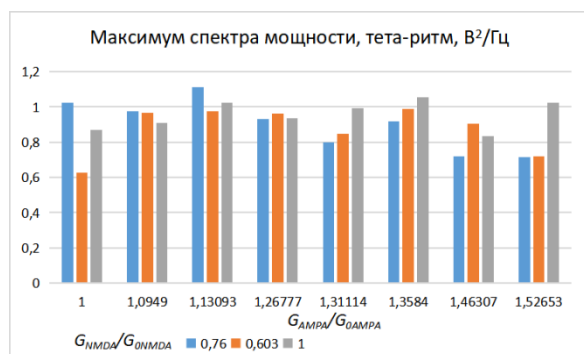


Рисунок 5. Вольтамперные характеристики ионного канала рецепторов: а) макроскопический ионный ток через отдельный рецептор NMDA при физиологической концентрации ионов Mg^{2+} , экспериментальные данные • [17]; б) макроскопический ионный ток через отдельный рецептора AMPA, экспериментальные данные из • [19,20]

Таблица 3. Параметры для определения ионного тока через рецептор NMDA. Значения параметров связывания ионов магния в каналах рецепторов NMDA: G – максимальная проводимость для определенного типа иона, N_m – количество ионов Mg^{2+} , которые достигают сайта связывания в TMD, N_b – количество связанных ионов Mg^{2+} , B_b – фактическое количество связей Mg^{2+} с одним из четырех аминокислотных остатков N616, u – длина связи

Тип повреждения	G/G_{base}	N_m/N_b	B_b	$u, \text{\AA}$	c, mM	q, mB^{-1}
Native	$1,000 \pm 0,03$	1	2	1,96	0,280	0,0620
Trp607Hrp	$0,760 \pm 0,03$	1	1	1,99	0,093	0,0609
Trp752Hrp	$0,603 \pm 0,03$	1	1	2,01	0,093	0,0603

а)



б)

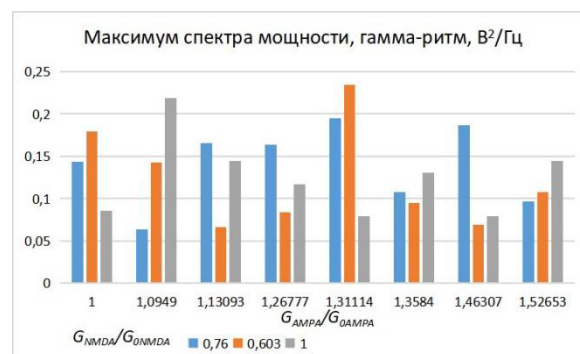


Рисунок 6. Максимум спектра мощности (PSD, $B^2/\text{Гц}$) ритмов: а) тета; б) гамма в зависимости от проводимости рецепторов AMPA и NMDA. По оси Ох приведены значения соотношения проводимостей нативной формы к поврежденной форме рецептора AMPA. Серый цвет соответствует нативной форме, синий – при повреждении Trp607Hrp, красный – при повреждении Trp752Hrp рецептора NMDA

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В серии работ по моделированию сетевой активности нейронов, имеющих поврежденные глутаматные рецепторы, с применением предложенного ранее модельного подхода [21] нами было показано влияние изменения геометрии канала на свойства нейронной сети гиппокампа. Локальный потенциал нейронной популяции модели сети изменяется в зависимости от локализации и типа повреждения. Учитывая разичную проводимость рецепторных каналов определены значения коллективных ритмов (тета и гамма) сети гиппокампа при окислительной модификации аминокислотных остатков рецепторных белков. В ходе настоящего исследования проведено молекулярно-динамическое моделирование полноатомной структуры рецепторов AMPA и NMDA с модифицированными а.о. триптофана. Анализ полученных конфигураций позволил определить изменение проводимости ионных каналов по сравнению с нативными формами. Изучение вольтамперных характеристик на основе данных об изменении проводимости и характера связывания ионов Mg^{2+} в каналах глутаматных рецепторов выявило снижение макроскопического ионного тока через отдельный NMDA-рецептор. Анализ характера связывания рецепторов с лигандами выявил, что наличие повреждения Hrp606 не влияет на динамику открытия канала AMPA-рецептора. В случае рецептора NMDA в процессе моделирования происходит потеря одного лиганда как в нативной форме, так и в рецепторах, имеющих в своей структуре повреждения Hrp607 и Hrp752.

Список литературы / References:

1. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J. et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev.*, 2010; vol. 62, no. 3, pp. 405-496, doi: 10.1124/pr.109.002451.
2. Sosa M., Gillespie A.K., Loren M., Frank L.M. Neural Activity Patterns Underlying Spatial Coding in the Hippocampus. *Curr Top Behav Neurosci.*, 2018, vol. 37, pp. 43-100, doi: 10.1007/7854_2016_462.
3. Cravens C.J., Vargas-Pinto N., Christian K.M., Nakazawa K. CA3 NMDA receptors are crucial for rapid and automatic representation of context memory. *EJN*, 2006, vol. 24, pp. 1771-1780, doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05044.x.
4. Chen X., Guo C., Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.*, 2012, vol. 7, no. 5, pp. 376-385, doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009.
5. Ehrenshaft M., Deterding L.J., Mason R.P. Tripping Up Trp: Modification of Protein Tryptophan Residues by Reactive Oxygen Species, Modes of Detection, and Biological Consequences. *Free Radic Biol Med.*, 2015, vol. 89, pp. 220-228, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.003.
6. Sahoo N., Hoshi T., Heinemann S.H. Oxidative Modulation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Antioxid Redox Signal.*, 2014, vol. 21, no. 6, pp. 933-952, doi: 10.1089/ars.2013.5614.

7. Neymotin S.A. et al. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus. *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, pp. 11733-11743, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0501-11.2011.
8. Hines M.L., Carnevale N.T. The NEURON simulation environment. *Neural Comput.*, 1997, vol. 9, pp. 1179-1209, doi: 10.1162/neco.1997.9.6.1179.
9. Clements J.D., Feltz A., Sahara Y., Westbrook G.L. Activation Kinetics of AMPA Receptor Channels Reveal the Number of Functional Agonist Binding Sites. *J. Neurosci.*, 1998, vol. 18, no. 1, p. 119127, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-01-00119.1998.
10. Hestrin S., Sah P., Nicoll R.A. Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron*, 1990, vol. 5, pp. 247-253, doi: 10.1016/0896-6273(90)90162-9.
11. Mayer M.L., Westbrook G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.*, 1987, vol. 394, pp. 501-527, doi: 10.1113/jphysiol.1987.sp016883.
12. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 1984, vol. 309, pp. 261-263.
13. Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 1984, vol. 307, pp. 462-465, doi: 10.1038/307462a0.
14. Romani A.M. Magnesium homeostasis in mammalian cells. *Front. Biosci.*, 2007, vol. 12, pp. 308-331, doi: 10.2741/2066.
15. Hou H., Wang L., Fu T., Papasergi M., Yule D.I., Xia H. Magnesium acts as a second messenger in the regulation of NMDA receptor mediated CREB signaling in neurons. *Mol. Neurobiol.*, 2020, vol. 57, no. 6, pp. 2539-2550, doi: 10.1007/s12035-020-01871-z.
16. Jahr C.E., Stevens C.F. A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior. *J. Neurosci.*, 1990, vol. 10, no. 6, pp. 1830-7, doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-06-01830.1990.
17. Fedele L., Newcombe J., Topf M., Gibb A., Harvey R.J., Smart T.G. Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, p. 957.
18. Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B. Effect of mutant NMDA receptors on oscillations in a model of Hippocampus. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2019, vol. 17, no. 01, doi: 10.1142/S0219720019400031.
19. Billa S.K., Liu J., Bjorklund N.L., Sinha N., Fu Y., Shinnick-Gallagher P., and Moron J.A. Increased Insertion of Glutamate Receptor 2-Lacking α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionic Acid (AMPA) Receptors at Hippocampal Synapses upon Repeated Morphine Administration. *Mol Pharmacol.*, 2010, vol. 77, no. 5, pp. 874-883, doi: 10.1124/mol.109.060301.
20. Getz A.M. et al. High-resolution imaging and manipulation of endogenous AMPA receptor surface mobility during synaptic plasticity and learning. *Sci Adv*, 2022, vol. 8, no. 30, doi: 10.1126/sciadv.abm5298.
21. Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б. Влияние оксидативного стресса на функционирование глутаматных рецепторов гиппокампа. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 2, с. 151-158 [Aksenova S.V., Batova A.S., Bugai A.N., Dushanov E.B. The effect of oxidative stress on the functioning of glutamate receptors in the hippocampus. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 2, pp. 151-158 (In Russ.)].

MODELING OF NETWORK ACTIVITY OF NEURONS AT OXIDATIVE MODIFICATION OF GLUTAMATE RECEPTORS

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

Joint Institute for Nuclear Research

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

Received 10.08.2024

Abstract. Glutamate receptors play an important role in the regulation of synaptic plasticity, including learning and memory formation. In this paper, we consider the effect of oxidative modification of tryptophan in the structure of glutamate receptors on the properties of hippocampal neural networks. Using a previously developed model approach, we identified changes in the conductivity of receptors with a substitution of the amino acid residue of tryptophan for 5-hydroxy-L-tryptophan. Using molecular dynamics modeling methods, we showed that oxidation of amino acid residues of receptor proteins can lead to changes in their properties and behavior in the neural network. The conductivity of modified AMPA receptors increased compared to the native form, while the conductivity of NMDA receptors decreased. Based on the analysis of the volt-ampere characteristics, it was found that modification of tryptophan in the structure of the receptor channel causes a decrease in the ionic current through a single NMDA receptor. The study of the network activity of neurons with altered receptor structure was conducted in the model of the neural network of the CA3 region of the hippocampus. As a result of the study, electrophysiological characteristics of the known neural network model were obtained depending on the structure of the receptor ion channel. The nature of the dependence of the peak values of the power spectrum of the main rhythms of the hippocampus depending on the conductivity of AMPA and NMDA receptors was determined.

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

СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И ИК СПЕКТРЫ МЕТИЛЗАМЕЩЕННЫХ ПИРИДО[1,2-а]ПИРИМИДИНОВЫХ СИСТЕМ Ивлиева (Перетокина) И.В., Мещерякова А.А., Бабков Л.М., Сорокин В.В.

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
ул. Астраханская, 83, г. Саратов, 410012, РФ; e-mail: Irine09@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.08.2024

Аннотация. Путём одностадийной трехкомпонентной реакции аминопиридина, малонитрила и ароматических альдегидов синтезированы бразцы пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем, реализующиеся в виде смеси 2-(2-метилфенил(пиридин-2-иламино)метил-малонитрилов и их незациклизованных форм 4-амино-2-(2-метилфенил)-6Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-карбинитрилов. Проведено исследование цитотоксической активности полученной смеси вновь синтезированных соединений в сравнении с исходным 2-аминопиридином *in vitro* на линии клеток Vero (культуре клеток почки африканской зеленой марышки). Установлено, что исходный 2-аминопиридин не оказывает существенного влияния на изменение метаболической активности клеток, в то время как полученные смеси обладают относительно высокой цитотоксической активностью уже спустя 24 часа инкубации. С целью идентификации компонент синтезированной смеси при комнатной температуре в диапазоне 400–3700 см⁻¹ измерены ее ИК спектры. Методом функционала плотности B3LYP/6-31G(d) построены структурно-динамические модели соединений компонент смеси 2-(2-метилфенил(пиридин-2-иламино)метил-малонитрилов и их незациклизованных форм 4-амино-2-(2-метилфенил)-6Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-карбинитрилов. Рассчитаны параметры адиабатических потенциалов соединений, составляющих смесь: минимизированы энергии, оптимизированы структуры, вычислены силовые постоянные и дипольные моменты. Решены механическая и электрооптическая задачи: рассчитаны частоты нормальных колебаний в гармоническом приближении и распределение интенсивностей в ИК спектрах молекул смесей. Установлены спектрально-структурные признаки соединений, образующих смесь. Дана интерпретация измеренных ИК спектров.

Ключевые слова: 4-амино-2-арил-6Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-карбонит-рилы, 2-(арил(пиридин-2-иламино)метил)малонитрилы, пиридо[1,2-а]пиримидиновые системы, геометрическая структура, ИК спектр.

Пиридо[1,2-а]пиримидиновые системы обладают широким спектром биологической и фармакологической активности – противогрибковой, противовоспалительной, антибактериальной, противоаллергенной, противоопухолевой, анти-ВИЧ [1-5], и широко изучаются в последнее время.

Нами впервые синтезированы образцы пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем, реализовываемые в виде смеси 2-(2-метилфенил(пиридин-2-иламино)метил-малонитрилов (I) и их незациклизованных форм 4-амино-2-(2-метилфенил)-6Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-3-карбинитрилов (II) [1-3]. Синтез образцов пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем осуществлялся путём одностадийной трехкомпонентной реакции аминопиридина, малонитрила и ароматических альдегидов [6]. Образование изомерных незациклизованных продуктов 2-(арил(пиридин-2-иламино)метил)малонитрилов предположительно вызвано слабой нуклеофильностью эндоциклического атома азота пиридина. Бициклическая форма молекулы (I) устойчива за счет более длинной цепи сопряжения.

Проведено исследование цитотоксической активности полученной смеси синтезированных соединений в сравнении с исходным 2-аминопиридином *in vitro* на линии клеток Vero (культуре клеток почки африканской зеленой марышки) с помощью МТТ-теста. В результате проведенных исследований было установлено, что исходный 2-аминопиридин не оказывает существенного влияния на изменение метаболической активности клеток, в то время как полученные нами образцы обладают относительно высокой цитотоксической активностью уже спустя 24 часа инкубации (IC₅₀ = 50 мкг/мл) [7].

В ходе проводимых исследований возникла проблема идентификации компонент смеси по ее ИК спектрам. Она была решена на основе использования методов квантовой химии и теоретической спектроскопии.

ИК спектр исследуемой смеси записан на ИК фурье-спектрометре IRAFFINITY-1 Производитель: Shimadzu (Япония) в таблетках KBr (Potassium bromide for IR spectroscopy CAS: 7758-02-3, Merck Germany) при комнатной температуре. Для более подробного исследования геометрического строения полученных соединений были использованы методы молекулярного моделирования, позволяющие установить параметры адиабатических потенциалов. В моделировании использован метод B3LYP/6-31g(d) [10,11], реализованный в программном пакете GAUSSIAN'03 [12]. Рассчитаны минимальные энергии, оптимальные структуры, силовые постоянные, вычислены дипольные моменты. Строение соединений I и II дано на рис.1 (атомы азота выделены синим цветом, углерода – серым). Рассчитанные геометрические параметры соединений I и II приведены в таблицах 1 и 2.

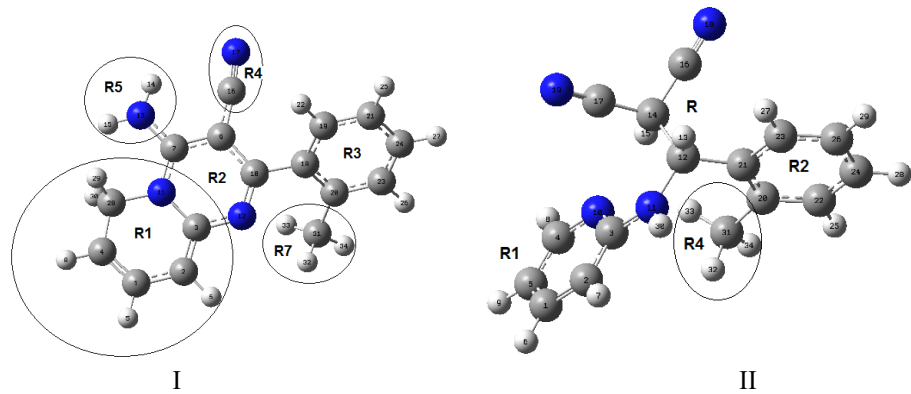


Рисунок 1. Геометрическое строение молекул I и II

Таблица 1. Геометрические параметры молекулы (I)

Связь	Длина, А	Связь	Длина, А
C20-C31	1,512	C7-N11	1,358
C28-C4	1,503	C4-C1	1,344
C10-C18	1,490	C10-N12	1,308
N11-C28	1,489	C16≡N17	1,169
C10-C9	1,442	C28-H30	1,107
C1-C2	1,439	C28-H29	1,101
C3-N11	1,438	C31-H33	1,095
C20-C18	1,416	C31-H32	1,095
C9-C16	1,415	C31-H32	1,094
C9-C7	1,409	C23-H26	1,088
C18-C19	1,404	C24-H27	1,087
C23-C20	1,400	C21-H25	1,087
C24-C23	1,395	C1-H5	1,086
C19-C21	1,393	C19-H22	1,086
C21-C24	1,393	C4-H8	1,086
C3-N12	1,369	C2-H6	1,082
C2-C3	1,363	N13-H14	1,013
C7-N13	1,360	N13-H15	1,008
Угол	Величина угла, °	Угол	Величина угла, °
C9-C16≡N17	174	N11-C3-C2	119
C10-C9-C16	125	C2-C1-H5	119
C2-C1-C4	122	C18-C19-H22	119
C1-C4-C28	122	C23-C20-C18	118
C28-N11-C3	122	C10-C18-C19	118
C1-C4-H8	122	C3-C2-H6	117
N12-C10-C9	122	C10-C9-C7	117
C3-N12-C10	121	C7-N13-H14	116
C3-C2-C1	121	H14-N13-H15	116
C9-C7-N13	121	C4-C28-N11	113
C7-N13-H15	121	C20-C31-H33	112
C18-C19-C21	121	C20-C21-H32	111
C9-C7-N11	120	C20-C31-H34	110
C9-C10-C18	120	C4-C28-H29	110
C21-C24-C23	120	C4-C28-H30	110
C24-C23-C20	120	H34-C31-H32	109
C20-C18-C19	120	H33-C31-H34	108
C19-C21-H25	120	H32-C31-H33	106
C21-C24-H27	120	N11-C3-C2	119
C24-C23-H26	119	C2-C1-H5	119
C23-C20-C31	119	C18-C19-H22	119
C19-C21-C24	119		

Таблица 2. Геометрические параметры молекулы (II)

Связь	Длина, Å	Связь	Длина, Å
C12-C14	1,576	C4-N10	1,343
C12-C21	1,535	N10-C3	1,341
C20-C31	1,512	C16=C18	1,160
C14-C17	1,474	C17=C19	1,160
C14-C16	1,473	C31-H32	1,097
N11-C12	1,461	C12-H13	1,096
C2-C3	1,416	C14-H15	1,094
C21-C20	1,413	C31-H34	1,094
C23-C21	1,404	C31-H33	1,092
C1-C5	1,402	C4-H8	1,088
C20-C22	1,402	C22-H25	1,088
C22-C24	1,393	C23-H27	1,088
C24-C26	1,393	C24-H28	1,087
C26-C23	1,392	C2-H7	1,087
C5-C4	1,387	C1-H6	1,087
C2-C1	1,383	C26-H29	1,086
C3-N11	1,382	C5-H9	1,085
Угол	Величина угла, °	Угол	Величина угла, °
C14-C16=N18	179	C4-N10-C3	118
C14-C17=N19	179	C2-C3-N11	118
C12-C21-C20	125	C21-C20-C22	118
C5-C4-N10	124	C1-C5-C4	117
C21-C20-C31	124	C3-N11-H30	114
N10-C3-C2	122	N11-C12-C14	113
C1-C5-H9	122	C14-C12-C21	113
C26-C23-C21	122	C20-C31-H33	113
C20-C22-C24	122	C20-C31-H32	111
C5-C4-H8	121	C12-C14-C16	111
C2-C1-C5	120	C12-C14-C17	111
C3-C2-H7	120	C20-C31-H34	110
C2-C1-H6	120	C16-C14-C17	109
N10-C3-N11	120	C12-C14-H15	109
C3-C2-C1	119	H34-C31-H33	107
C22-C24-C26	119	H32-C31-H33	106
C24-C26-C23	119	N11-C12-H13	105
C23-C21-C20	119		

По выявленным спектрально-структурным признакам соединений I и II установлена их идентификация в смеси. В частности, интенсивным полосам 2205 см^{-1} измеренного спектра (рис. 2) соответствуют валентные колебания связей $Q_{R4}(C\equiv N)$ и $Q_{R2R4}(CC)$ - с рассчитанной частотой 2205 см^{-1} соединения I, а полосе 1648 см^{-1} – плоские деформационные колебания группы R5 соединения I с рассчитанной частотой 1614 см^{-1} . Интенсивным полосам 2205 см^{-1} измеренного спектра соответствуют валентные колебания связей $Q_{R4}(C\equiv N)$ и $Q_{R2R4}(CC)$ – с рассчитанной частотой 2205 см^{-1} соединения I, а полосе 1648 см^{-1} – плоские деформационные колебания группы R5 с рассчитанной частотой 1614 см^{-1} . Интенсивной полосе 1313 см^{-1} измеренного спектра соответствуют неплоские колебания группы R с рассчитанной частотой 1344 см^{-1} соединения II, а полосам 795 см^{-1} - неплоские колебания кольца R1 с рассчитанной частотой 779 см^{-1} . Указанные полосы измеренных ИКС являются спектрально-структурными признаками соединений I и II смеси.

Таким образом, на основании молекулярного моделирования идентифицированы составляющие смеси соединений I и II в измеренном ИК спектре по их установленным спектрально-структурным признакам. Дана интерпретация измеренного ИК спектра.

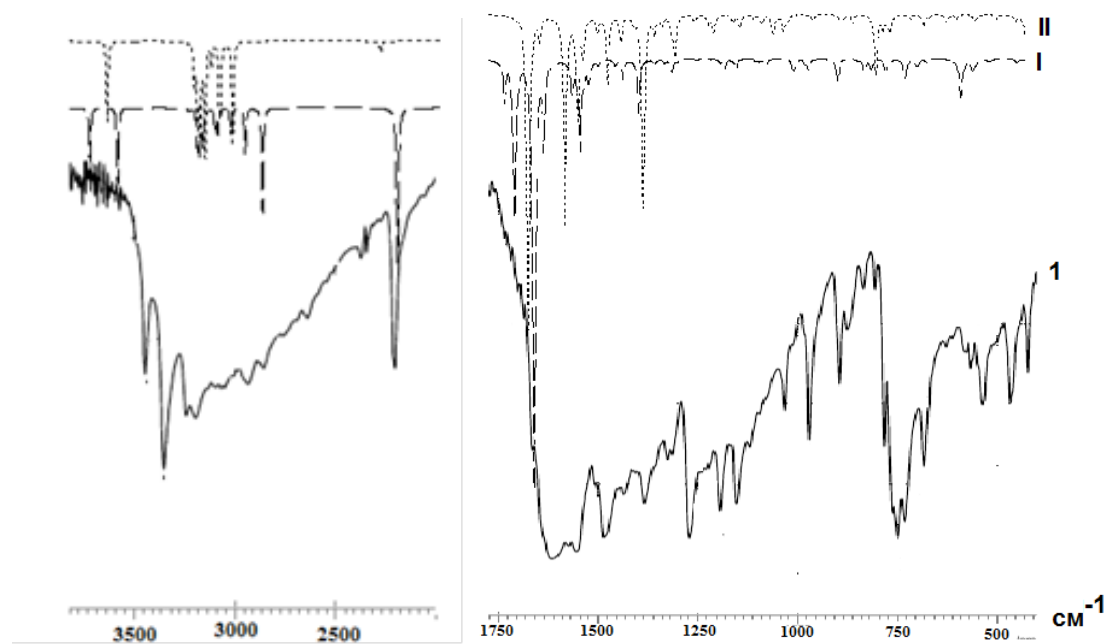


Рисунок 2. ИК спектры: экспериментальный (1) и теоретические (I, II)

Список литературы / References:

1. Hese S.V. et al. Synthesis of 2-phenyl-3H-dipyrimido [1, 2-a] pyrimidin-4 (5H)-one derivatives and their antifungal activity. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, vol. 7, no. 7, pp. 784-790.
2. Madar J.M. et al. Design, synthesis, characterization, and biological evaluation of pyrido [1, 2-a] pyrimidinone coumarins as promising anti-inflammatory agents. *Synthetic Communications*, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 375-386.
3. Luo Z. et al. Synthesis, anticancer activity and molecular docking studies of novel pyrido [1, 2-a] pyrimidin-4-one derivatives. *Synthetic Communications*, 2019, vol. 49, no. 17, pp. 2235-2243.
4. Rashad A.E., Mahmoud A.E., Ali M.M. Synthesis and anticancer effects of some novel pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine derivatives by generating reactive oxygen species in human breast adenocarcinoma cells. *European journal of medicinal chemistry*, 2011, vol. 46, no. 4, pp. 1019-1026.
5. Hajimahdi Z., Zarghi A., Zabihollahi R., Aghasadeghi M.R. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of new 1,3,4-oxadiazole- and 1,3,4-thiadiazole-substituted 4-oxo-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidines as anti-HIV-1 agents. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, vol. 22, no. 5, pp. 2467-2475, doi: 10.1007/s00044-012-0241-5.
6. Ивонин М.А., Бурыгин Г.Л., Мещерякова А.А., Тюлькина И.Р., Сорокин В.В. Цитотоксическая активность некоторых представителей ряда бензимидазоло[1,2-α]хиназолина, пиридо[1,2-α]пиримидина и пиразолокарбонитрилов. *Межвуз. сборник науч. трудов XIII Всероссийской конференции молодых ученых с межд. участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии»*. Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2018, с. 37-39 [Ivonin M.A., Burygin G.L., Meshcheryakova A.A., Tyulkina I.R., Sorokin V.V. Cytotoxic activity of some representatives of the benzimidazolo[1,2-α]quinazoline, pyrido[1,2-α]pyrimidine and pyrazolocarbonitriles series. *Interuniversity. collection of scientific Proceedings of the XIII All-Russian Conference of Young Scientists with International. participation "Modern problems of theoretical and experimental chemistry"*. Saratov: Publishing house "Saratov source", 2018, pp. 37-39 (In Russ.)].
7. Ивонин М.А., Тюлькина И.Р., Мещерякова А.А., Бурыгин Г.Л., Сорокин В.В. Трехкомпонентный синтез новых аминицианов ряда пиридопиримидина. *Химия биологически активных веществ*, 2019, с. 134-135 [Ivonin M.A., Tyulkina I.R., Meshcheryakova A.A., Burygin G.L., Sorokin V.V. Three-component synthesis of new aminocyanes of the pyridopyrimidine series. *Chemistry of biologically active substances*, 2019, pp. 134-135 (In Russ.)].
8. Кон В. Электронная структура вещества – волновые функции и функционалы плотности. *УФН*, 2002, т. 172, № 3, с. 336-348 [Kon V. Electronic structure of matter - wave functions and density functionals. *UFN*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 336-348 (In Russ.)].
9. Попл Дж.А. Квантово – химические модели. *УФН*, 2002, т. 172, № 3, с. 349-356 [Pople J.A. Quantum-chemical models. *UFN*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 349-356 (In Russ.)].
10. Frisch J., Trucks G.W., Schlegel H.B. *Gaussian03, Revision B.03*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003, 302 p.

STRUCTURAL-DYNAMIC MODELS AND IR SPECTRUM OF METHYL SUBSTITUTED PYRIDO[1,2-a]PYRIMIDINE SYSTEMS

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

Saratov State University named after N.G.Chernyshevsky

Acrakchanskaya St., 83, Saratov, 410012, Russia; e-mail: Irine09@yandex.ru

Received 10.08.2024

Abstract. Samples of pyrido[1,2-a]pyrimidine systems were synthesized by a one-step three-component reaction of aminopyridine, malononitrile and aromatic aldehydes. They were realized as a mixture of 2-(2-methylphenyl(pyridin-2-ylamino)methylmalonitriles and their non-cyclized forms 4-amino-2-(2-methylphenyl)-6H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-3-carbonitrile. The cytotoxic activity of the resulting mixture of newly synthesized compounds was studied in comparison with the initial 2-aminopyridine in vitro on the Vero cell line (African green monkey kidney cell culture). It was found that the initial 2-aminopyridine does not significantly affect the change in the metabolic activity of the cells, while the resulting mixtures have a relatively high cytotoxic activity after 24 hours of incubation. In order to identify the components of the synthesized mixture at room temperature in its IR spectra were measured in the range of 400–3700 cm⁻¹. The density functional method B3LYP/6-31G(d) was used to construct structural and dynamic models of the compounds of the components of a mixture of 2-(2-methylphenyl(pyridin-2-ylamino)methylmalonitriles and their non-cyclized forms 4-amino-2-(2-methylphenyl)-6H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-3-carbonitrile. The parameters of adiabatic potentials of the compounds constituting the mixture were calculated: energies were minimized, structures were optimized, force constants and dipole moments were calculated. Mechanical and electrooptical problems were solved: frequencies of normal vibrations in the harmonic approximation and intensity distribution in the IR spectra of mixture molecules were calculated. Spectral and structural features of the compounds forming the mixture were established. The measured IR spectra were interpreted.

Key words: 4-amino-2-aryl-6H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-3-carbonitriles, 2-(aryl(pyridine-2-ylamino)methyl)malonitriles, pyrido[1,2-a]pyrimidine systems, geometric structure, IR spectrum.

ПОСЛЕДСТВИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЛИПОСОМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СОСТАВА ЛИПИДОВ ЛЕЦИТИНА

Шишкина Л.Н.¹, Белецкая П.Д.¹, Машукова А.В.¹, Фенин А.А.²

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

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева
пл. Мусская, 9, г. Москва, 125047, РФ

Поступила в редакцию 24.07.2024

Аннотация. Изучено влияние исходных значений параметров системы регуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) липосом, сформированных из соевого лецитин-стандарта, на образование пероксидов, содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) в липидах липосом при фракционированном рентгеновском облучении в диапазоне доз 1-10 Гр с мощностью дозы от 0,001 Гр/с до 0,01 Гр/с и в диапазоне доз 30-90 Гр с мощностью дозы 0,3 Гр/с и 3 Гр/с. Выявлено, что доля фосфолипидов в составе общих липидов и соотношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций в составе фосфолипидов липосом влияют на скорость образования пероксидов липидов и содержание ДК и КД в липидах липосом после облучения. Показано, что масштаб и направленность радиационно-индуцированных эффектов обусловлен соотношением дозы фракционированного излучения и ее мощности.

Ключевые слова: лецитин, липосомы, перекисное окисление липидов, облучение, УФ-спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Ионизирующее излучение широко используется в медицинской практике для радиотерапии опухолей [1,2]. Однако, несмотря на достаточно обширную литературу в этой области, изучение механизма формирования последствий его воздействия на биологические объекты в зависимости от тяжести лучевого поражения требует проведения детальных исследований. Дискуссионным является и вопрос о влиянии мощности дозы излучения на формирование радиационно-индуцированных эффектов в биологических системах. Высокая чувствительность параметров физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов (ПОЛ) и обратная зависимость интенсивности ПОЛ от дозы облучения и ее мощности, установленная в лабораторных экспериментах и на природных популяциях грызунов [3-6], позволяет рассматривать параметры данной системы регуляции в качестве перспективных тестов для исследования механизма формирования последствий воздействия излучений. При этом, однотипность функционирования системы регуляции ПОЛ на разных уровнях организации биологических объектов [7] обуславливает возможность использования различных биологических модельных систем.

Цель работы – проанализировать влияние исходного состояния параметров системы регуляции перекисного окисления липидов липосом, сформированных из соевого лецитина, на формирование последствий воздействия фракционированного рентгеновского излучения в зависимости от дозы излучения и ее мощности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для формирования липосом был выбран соевый лецитин, представляющий собой смесь природных липидов, среди которых обычно не менее 50% составляют фосфолипиды (ФЛ). В работе использован 10%-ный раствор лецитин-стандарта (ЛС) в этаноле («БИОЛЕК», Харьков). После вскрытия ампулы и отгонки исходного растворителя готовили растворы лецитина либо в дистиллированной воде (УФ-спектроскопия, облучение), либо в хлороформе (состав липидов). Концентрация лецитина в дистиллированной воде по всех экспериментах $4,3 \times 10^{-5}$ М, что обуславливает спонтанную агрегацию лецитина. Поскольку для достижения динамического равновесия необходимое время экспозиции составляет не менее 1 часа [8], то дисперсию лецитина в дистиллированной воде, приготовленную непосредственно перед экспериментом, выдерживали в течение не менее 1-2 часов.

Качественный состав липидов лецитина анализировали методом ТСХ, используя стеклянные пластинки размером 9×12 см, силикагель типа Н (Sigma, США) и смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в соотношениях 12,5 : 7,5 : 2 : 1 в качестве мобильной фазы [9]. Хроматограммы проявляли в парах йода. Количественный анализ содержания отдельных фракций фосфолипидов (ФЛ) анализировали после удаления пятен ФЛ с пластинки и сжигания их до неорганического фосфора (Р) спектрофотометрически по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты при 815 нм (ПЭ5400ВИ, Россия). Методические подробности анализа состава липидов приведены в работе [10]. Определяли также обобщенные показатели состава липидов: долю ФЛ (%ФЛ) в составе общих липидов и соотношение сумм более легкоокисляемых и более трудноокисляемых фракций ФЛ ($\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$), характеризующее способность липидов к окислению [10]. Последнее соотношение

вычисляли по формуле: $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ} = (\text{ФИ} + \text{ФС} + \text{ФЭ} + \text{КЛ} + \text{ФК})/(\text{ЛФХ} + \text{СЛ} + \text{ФХ})$, где ФИ – фосфатидилинозит, ФС – фосфатидилсерин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, КЛ – кардиолипин, ФК – фосфатидная кислота, ЛФХ – лизоформы ФЛ, СЛ – сфинголипиды, ФХ – фосфатидилхолин. При определении состава ФЛ на пластинку наносили 5 параллельных дорожек.

Фракционированное рентгеновское облучение проводили с помощью рентгеновской трубки БХВ6 с вольфрамовым катодом (сила тока 5 мА, напряжение 40 кВ) в диапазоне доз 1–10 Гр при мощности дозы от 0,001 до 0,01 Гр/с и в дозе 30 Гр, используя мощности дозы 0,03 и 0,3 Гр/с. Кроме того дисперсии лецитина облучали в диапазоне доз от 30 до 90 Гр при мощности дозы 0,3 и 3 Гр/с. По достижении определенной общей дозы облучение прерывали на 3–5 мин для записи УФ-спектров и на 20–25 мин для определения содержания пероксидов в растворе, затем кювету вновь помещали в аппарат для продолжения облучения.

УФ-спектры водных дисперсий лецитина регистрировали на спектрофотометре (СФ-2000, Россия) в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм и подвергали математической обработке по методу Гаусса в программе Excel solver путем минимизации суммы квадратов разности между экспериментальным и расчетным спектрами после аппроксимации на уровне достоверности 10^{-3} – 10^{-5} . Количество функций Гаусса при аппроксимации зависело от вида спектра.

Содержание пероксидов в липидах определяли методом йодометрии, анализируя концентрацию выделившего йода спектрофотометрически при $\lambda=350$ нм. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) в липидах липосом рассчитывали из отношений оптической плотности (D) максимумов полос поглощения в областях 225–235 нм и 265–275 нм соответственно к величине D максимума основной полосы поглощения липидов в области 195–200 нм.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными статистическими методами, используя программный продукт MS Excel. Данные представлены в виде средних арифметических значений с указанием их среднеквадратичных ошибок ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и все природные объекты, соевый лецитин характеризуется чрезвычайно лабильным составом липидов [11]. Это вызывает необходимость определения исходных физико-химических характеристик и состава липидов конкретной партии лецитина, используемой в эксперименте. В данном исследовании работали с четырьмя партиями лецитина, соотношение фракций ФЛ, которых представлено в таблице 1, а ряд параметров физико-химической системы регуляции ПОЛ приведены в таблице 2.

Основным субстратом окисления в любых биологических системах являются ФЛ. Поэтому закономерно, что липиды липосом партии № 1, в составе которых содержится низкое содержание ФЛ, характеризуются и наиболее высокой долей более трудноокисляемых ФЛ (табл. 1), и самой низкой способностью липидов к окислению (табл. 2). Интересно отметить, в то время как степень ненасыщенности жирных кислот (ЖК) липидов липосом, о которой судят по содержанию ДК, в разных партиях достоверно различается, их степень окисленности, т.е. содержание КД, практически одинакова во всех использованных в работе партиях лецитина (табл. 2).

Таблица 1. Количественное соотношение фракций фосфолипидов в партиях соевого лецитин-стандарта

Фракция ФЛ, (%Р)	Партия №1	Партия №2	Партия №3	Партия №4
ЛФХ	5,05 ± 0,85	0,92 ± 0,23	3,36 ± 0,21	3,31 ± 0,06
СЛ	8,58 ± 0,29	7,65 ± 0,70	3,35 ± 0,45	3,88 ± 0,07
ФХ	85,3 ± 1,0	86,60 ± 0,37	87,6 ± 0,85	90,9 ± 0,5
ФИ+ФС	0,22 ± 0,01	1,15 ± 0,45	1,34 ± 0,18	1,05 ± 0,24
ФЭ	0,21 ± 0,02	2,59 ± 0,45	1,21 ± 0,16	0,28 ± 0,08
КЛ+ФК	0,63 ± 0,21	1,11 ± 0,15	3,15 ± 0,55	0,56 ± 0,22

Таблица 2. Параметры системы регуляции ПОЛ использованных в работе партий лецитин-стандарта

Показатель	Партия №1	Партия №2	Партия №3	Партия №4
Доля ФЛ в составе общих липидов (%)	40,3 ± 1,7 (7)	73,6 ± 2,1 (7)	78,7 ± 4,9 (7)	93,0 ± 1,35 (7)
$\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$	0,011 ± 0,001 (5)	0,051 ± 0,005 (5)	0,060 ± 0,004 (5)	0,019 ± 0,0025 (5)
Диеновые конъюгаты, отн. ед.	0,217 ± 0,010 (5)	0,327	0,091 ± 0,010 (8)	0,190 ± 0,016 (3)
Кетодиены, отн. ед.	0,094 ± 0,014 (5)	0,093	0,118 ± 0,005 (7)	0,101 ± 0,022 (3)

Примечание: в скобках указано число измерений

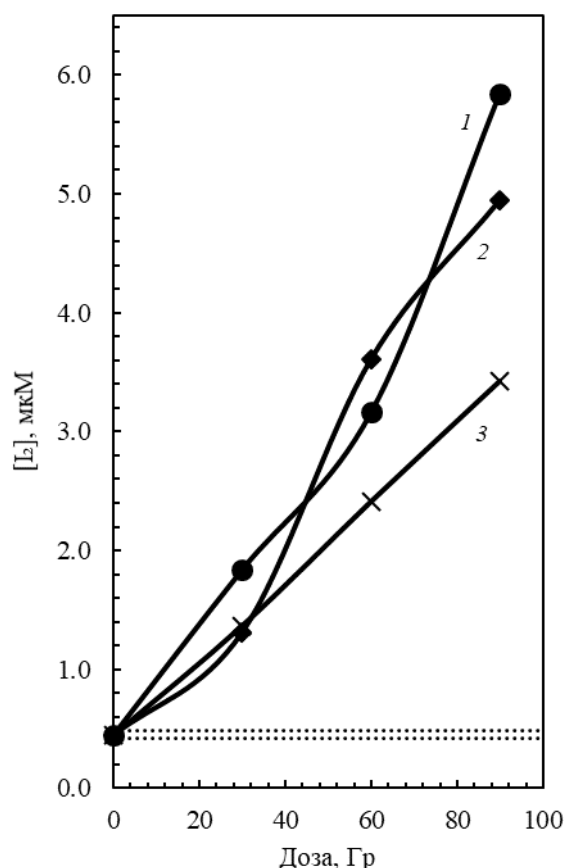


Рисунок 1. Зависимость концентрации выделившегося йода от дозы рентгеновского излучения и условий эксперимента: 1 – мощность дозы 0,3 Гр/с, %ФЛ = 40,3%; 2 – мощность дозы 3 Гр/с, %ФЛ = 40,3%; 3 – мощность дозы 0,3 Гр/с, %ФЛ = 73,6%, Пунктирными линиями обозначен интервал точности анализа концентрации йода в необлученных суспензиях лецитина

Влияние мощности дозы в зависимости от тяжести лучевого воздействия на образование первичных продуктов окисления – пероксидов липидов – исследовали на партиях лецитина №1 и №2. Эти результаты представлены на рисунке 1.

Как следует из этих данных, наиболее существенное влияние на накопление пероксидов при облучении липосом в диапазоне доз 30–90 Гр оказывает исходное содержание продуктов окисления (%ФЛ). Так, высокая доля ФЛ в составе общих липидов липосом, характеризующихся исходно большей способностью к окислению и степенью ненасыщенности ЖК липидов (таблица 2), обуславливает меньшую скорость образования пероксидов (рис. 1, прямая 3). Это соответствует результатам работы [12] о влиянии состава ЖК липосом на скорость окисления их полиненасыщенных ЖК. Что касается влияния мощности дозы на содержание пероксидов в липосомах, имеющих всего 40% ФЛ в составе общих липидов и характеризующихся низкой способностью к окислению, то соотношение концентраций пероксидов зависит от дозы облучения. Так, при облучении в дозе 60 Гр более высокое содержание пероксидов выявлено при мощности дозы 3 Гр/с, а уменьшение мощности дозы в 10 раз обуславливает более высокое содержание пероксидов при облучении липосом в дозах 30 Гр и 90 Гр (рис. 1). Это соответствует данным об изменении структурного состояния мембран головного мозга при облучении мышей в зависимости от соотношения дозы облучения и ее мощности [13], а способность ФЛ к спонтанной агрегации с образованием липосом разного размера оказывает влияние на скорость окисления ФЛ [14].

Количество максимумов в УФ-спектрах в водных дисперсиях липосом из лецитина определяется составом из липидов. Так, в УФ-спектрах липосом из лецитина партии №3 при более низкой доле N-содержащих фракций ФЛ выявлены три основных максимума полос поглощения (рис. 2).

Основной максимум с наиболее высокой оптической плотностью в области 200 ± 10 нм, характерен для сложноэфирных и одиночных двойных связей и обычно используется для определения содержания липидов в биологической системе: максимум полосы поглощения в области длины волны 225–235 нм, обусловленной наличием в липидах сопряженных двойных связей, по оптической плотности которого рассчитывают содержание ДК; полоса поглощения с максимумом в области 268–275 нм обусловлена наличием карбонильных групп и сопряженных двойных связей, используемая для оценки содержания КД. Однако при высоком содержании N-содержащих фракций ФЛ в составе липидов липосом при математической обработке их УФ-спектров выявляются дополнительные полосы поглощения (рис. 3).

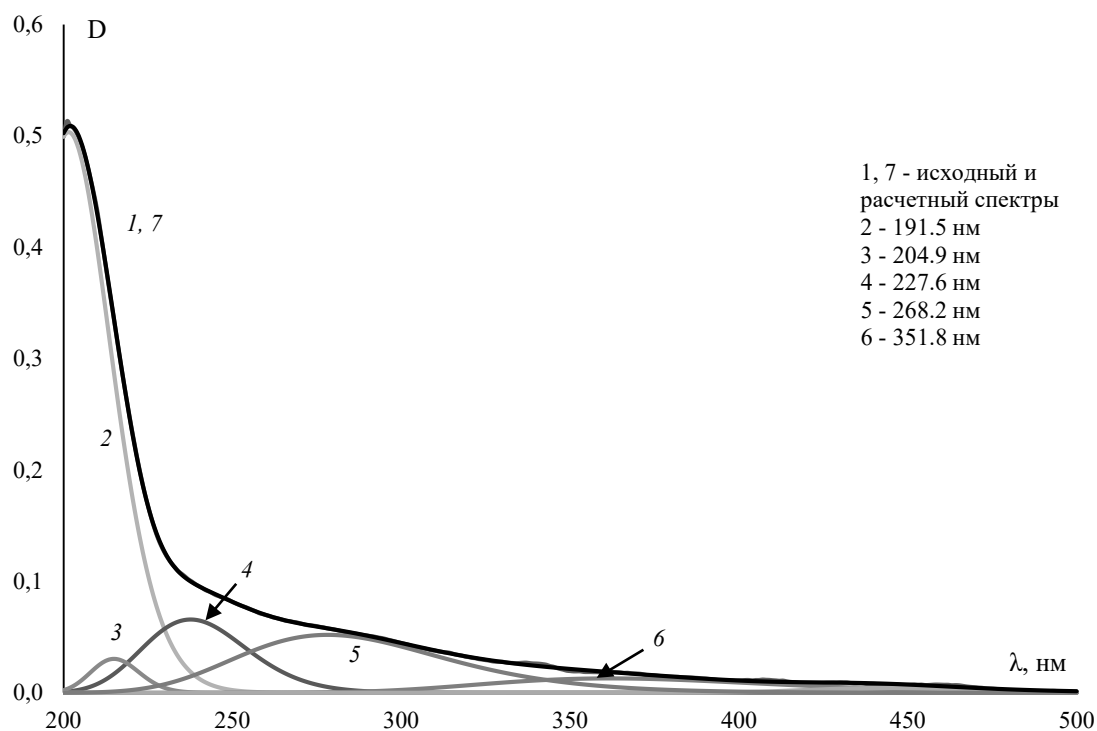


Рисунок 2. УФ-спектр лецитина партии №3 в дистиллированной воде и его гауссианы. $[ЛС] = 4,3 \times 10^{-5}$ М

Как видно из рисунка 3, в УФ-спектре липосом дополнительно выявлен максимум полосы поглощения в области 240 нм, имеющий достаточно высокую D и свидетельствующий о наличии N-содержащих группировок в составе ФЛ (суммарная доля N-содержащих фракций в составе ФЛ в этой партии лецитина достигает 98%), а также максимумы полос поглощения при $\lambda > 300$ нм, имеющие значительно меньшую D и характеризующие наличие в составе липидов PO_2^- -содержащих фрагментов.

На основании математической обработки УФ-спектров было рассчитано содержание ДК и КД в липидах липосом из разных партий лецитина (табл. 2) и после облучения. Типичный УФ-спектр облученной дисперсии лецитина и его гауссианы представлен на рисунке 4.

Анализ содержания ДК и КД в облученных дисперсиях липосом в разных экспериментах позволил выявить ряд закономерностей. Так, воздействие рентгеновского излучения на липосомы из лецитина партии №3 в дозе 30 Гр при мощностях дозы 0,03 Гр/с и 0,3 Гр/с обуславливает только увеличение вариабельности содержания ДК,

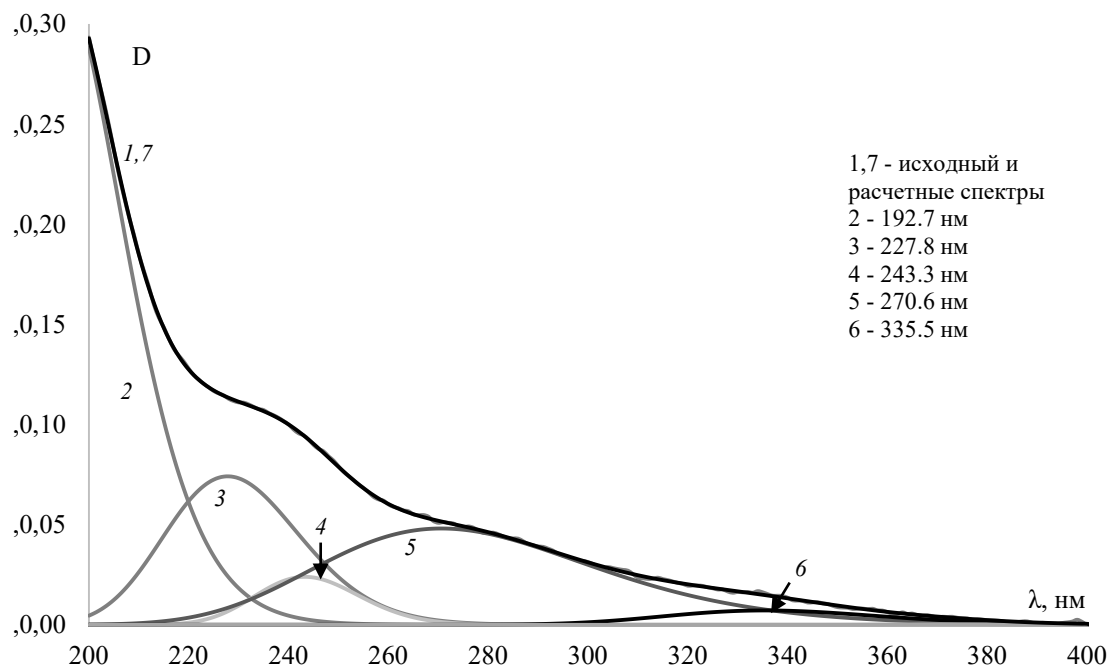


Рисунок 3. УФ-спектр лецитина партии №4 в дистиллированной воде и его гауссианы. $[ЛС] = 4,3 \times 10^{-5}$ М

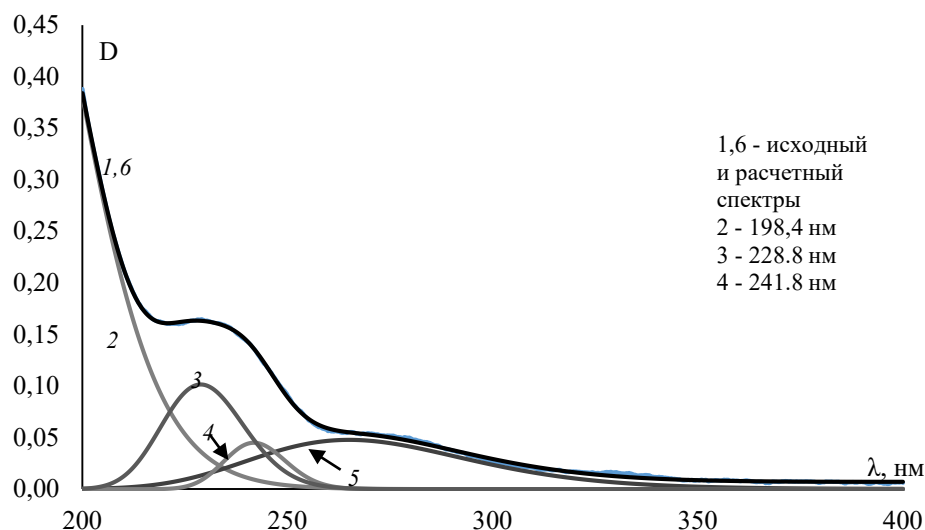


Рисунок 4. УФ-спектр лецитина партии №1 в дистиллированной воде и его гауссианы после фракционированное рентгеновского облучения в дозе 10 Гр, мощность дозы 0,005 Гр/с. [ЛС] = $4,3 \times 10^{-5}$ М

не изменяя его величины по сравнению с контролем (таблица 2), и равны $0,091 \pm 0,019$ ($n=3$) и $0,089 \pm 0,022$ ($n=3$) при мощностях дозы 0,03 Гр/с и 0,3 Гр/с соответственно. Однако содержание КД сохраняется на уровне контроля только при облучении с мощностью дозы 0,03 Гр/с ($0,120 \pm 0,019$, $n=3$), в то время как увеличение мощности дозы на порядок приводит к уменьшению содержания КД в 1,8 раза ($0,065 \pm 0,033$, $n=3$), резко увеличивая вариабельность ответа липидов липосом на воздействие.

Следующим этапом работы явилось исследование влияния исходного состояния параметров системы регуляции липидов липосом на содержание в них продуктов окисления при облучении в дозах 1-10 Гр в зависимости от мощности дозы. Содержание ДК в липидах липосом в этих экспериментах представлено на рисунке 5.

Необходимо отметить, что во всех трех экспериментах наблюдаются стадийные изменения содержания ДК с ростом дозы облучения, однако масштаб и направленность эффекта зависят от исходной степени ненасыщенности липидов, дозы и мощности дозы рентгеновского излучения. Так, максимальное содержание ДК выявлено при облучении липосом из лецитина, характеризующихся высоким %ФЛ, высокой способностью к окислению и степенью ненасыщенности липидов, в дозе 3 Гр с мощностью дозы 0,01 Гр/с, в то время как при других дозах облучения содержание ДК варьирует в пределах содержания ДК в контроле (рис. 5, кривая 1). При облучении липосом из лецитина с низкой долей ФЛ в составе общих липидов, низкой способностью к окислению, но относительно высокой степенью ненасыщенности липидов содержание ДК в зависимости от дозы облучения обусловлено мощностью дозы. Облучение с мощностью дозы 0,01 Гр/с вызывает стадийный рост содержания ДК с максимумом в дозе 6 Гр (рис. 5, кривая 2), а уменьшение мощности дозы в 2 раза обуславливает достоверное снижение содержания ДК при облучении в дозах 1-3 Гр и колебания содержания ДК в пределах, близких к контролю, в диапазоне доз облучения от 4 Гр до 10 Гр (рис. 5, кривая 3).

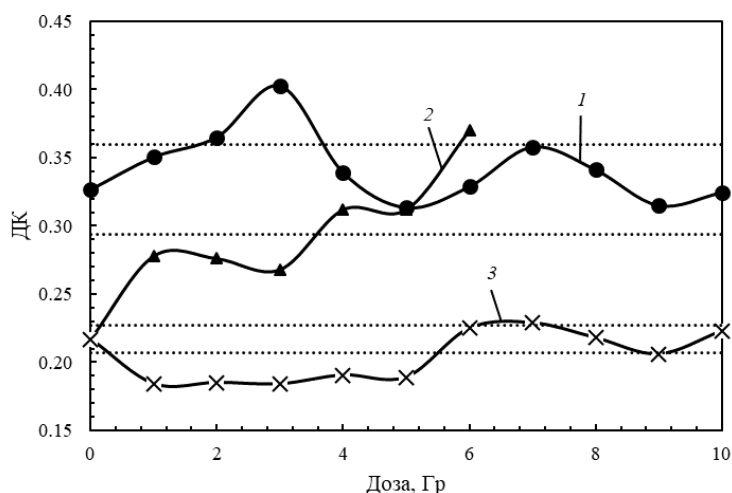


Рисунок 5. Влияние дозы фракционированного рентгеновского облучения с разной мощностью на содержание ДК в липидах липосом: 1 – мощность дозы 0,01 Гр/с, лецитин партии №2; 2 – мощность дозы 0,01 Гр/с, лецитин партии №1; мощность дозы 0,005 Гр/с, лецитин партии №1. Пунктирными линиями обозначен интервал точности анализа содержания ДК в необлученной суспензии лецитина

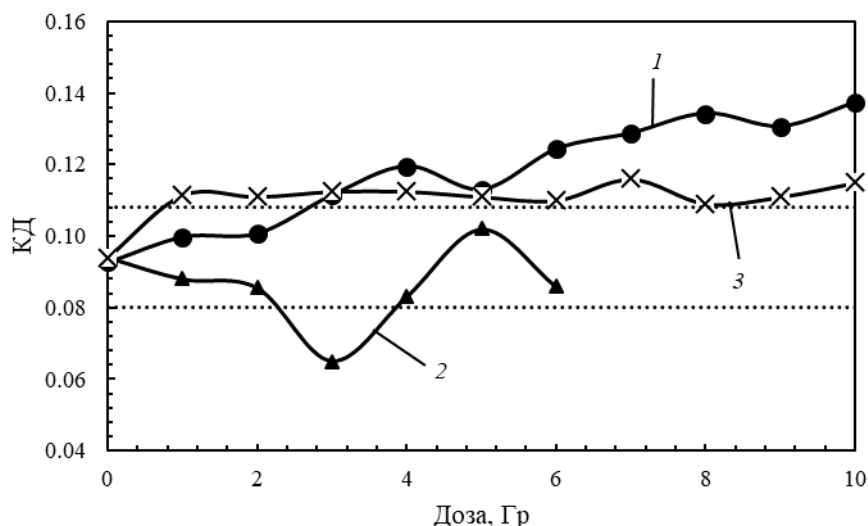


Рисунок 6. Влияние дозы фракционного рентгеновского облучения с разной мощностью на содержание КД в липидах липосом: 1 – мощность дозы 0,01 Гр/с, лецитин партии №2; 2 – мощность дозы 0,005 Гр/с, лецитин партии №1; мощность дозы 0,01 Гр/с, лецитин партии №1. Пунктирными линиями обозначен интервал точности анализа содержания ДК в необлученной суспензии лецитина

Как отмечалось выше, содержание КД в липидах использованных партий соевого лецитина является достаточно стабильным параметром (таблица 2). Возможно, это и обуславливает совершенно иной характер влияния дозы и ее мощности на содержание КД в липидах липосом (рис. 6).

Как видно из данных рисунка 6, изменение степени окисленности липосом при воздействии излучения преимущественно обусловлено мощностью дозы, содержанием %ФЛ и способностью липидов к окислению, в то время как доза облучения в диапазоне 1–10 Гр практически не оказывает влияние на содержание КД в липидах липосом. Только при облучении липосом, липиды которых содержат 73,6% ФЛ и характеризуются высокой способностью к окислению, наблюдается практически постепенное увеличение содержания КД на 42% по сравнению с контролем (рис. 6, кривая 1). При этом, облучение липосом с низким %ФЛ и низкой способностью их липидов к окислению во всем диапазоне доз увеличивает содержание КД до значения $0,112 \pm 0,001$, $n=10$ (рис. 6, кривая 2) и уменьшает из содержания до $0,085 \pm 0,005$, $n=6$ (рис. 6, кривая 3) при мощности дозы 0,005 Гр/с и 0,01 Гр/с соответственно.

Как экспериментально установлено, пероксиды липидов и ДК являются первичными продуктами окисления липидов в физико-химической системе регуляции ПОЛ в биологических объектах, обуславливая затем образование КД [7,10,15,16]. Анализ результатов экспериментов свидетельствует как о различной чувствительности данных параметров системы регуляции ПОЛ к действию фракционированного рентгеновского излучения, так и о влиянии свойств и состава липидов лецитина, использованного для формирования липосом, на формирование последствий воздействия в зависимости от дозы облучения и ее мощности. Так, содержание субстратов окисления (%ФЛ) и способность липидов липосом к окислению ($\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$) влияют на скорость образования пероксидов липидов и содержание ДК и КД в липидах липосом после облучения. Масштаб и направленность радиационно-индуцированных эффектов обусловлен соотношением дозы фракционированного излучения и ее мощности.

Список литературы / References:

1. Berdis A.J. Current and emerging strategies to increase the efficacy of ionizing radiation in the treatment of cancer. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2014, vol. 9, no. 2, pp. 167-181, doi: 10.1517/17460441.2014.876987.
2. Acherar S. Recent advances in medical radiation technology. *Frontiers in Chemistry*, 2024, vol. 12, p. 1360379, doi: 10.3389/fchem.2024.1360379.
3. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Жижина Г.П., Конрадов А.А. Новые аспекты закономерностей действия низкоинтенсивного облучения в малых дозах. *Радиац. биология. Радиоэкология*, 1999, т. 39, № 1, с. 25-34 [Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Zhizhina G.P., Konradov A.A. New aspects of the laws of action of low-intensity irradiation in small doses. *Radiation biology. Radioecology*, 1999, vol. 39, no. 1, pp. 25-34 (In Russ.)].
4. Kudyasheva A.G., Shishkina L.N., Shevchenko O.G., Bashlykova, L.A., Zagorskaya, N.G. Biological consequences of increased natural radiation background for *Microtus oeconomus* Pall. populations. *J. Environ. Radioactivity*, 2007, vol. 97, no. 1, pp. 30-41, doi: 10.1016/j.jenvrad.2007.03.004.
5. Климович М.А., Сергейчев К.Ф., Карфидов Д.М., Лукина Н.А., Шишкина Л.Н. Биологическая эффективность рентгеновского излучения в малых дозах переменной мощности. *Технологии живых систем*, 2010, т. 7, № 8, с. 17-28 [Klimovich M.A., Sergeychev K.F., Karfidov D.M., Lukina N.A., Shishkina L.N. Biological effectiveness of X-ray radiation in small doses of variable power. *Technologies of living systems*, 2010, vol. 7, no. 8, pp. 17-28 (In Russ.)].

6. Shishkina L.N., Kudyasheva A.G., Zagorskaya N.G., Shevchenko O.G., Taskaev A.I. Participation of the lipid peroxidation processes in the mechanism of wild rodent adaptation to radioactive contamination of the Chernobyl NPP zone. *The lessons of Chernobyl: 25 years later*, 2012, pp. 187-208.
7. Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V. Functioning similarity of the physicochemical regulatory system parameters of the lipid peroxidation on the membrane and organ levels. In: *Pharmaceutical and Medical Biotechnology: New Perspectives*. N.Y.: Nova Science Publishers Ltd., 2013, pp. 151-157.
8. Шишкина Л.Н., Дубовик А.С., Козлов М.В., Повх А.Ю., Швыдкий В.О. Модельные системы для оценки воздействия компонентов водной среды на биологические объекты. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 1, с. 160-165 [Shishkina L.N., Dubovik A.S., Kozlov M.V., Povkh A.Yu., Shvydkiy V.O. Model systems for assessing the impact of components of the aquatic environment on biological objects. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 160-165, doi: 10.29039/rusjbpc.2022.0499 (In Russ.)].
9. *Биологические мембраны: методы*. Под ред. Дж.Б.С. Финдлея, В.Х. Эванза. М.: Мир, 1990, 423 с. [*Biologicheskiye membrany: metody*, eds. J.B.C. Findley, W.H. Evan. Moscow, 1990, 423 p. (In Russ.)].
10. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах. *Радиация. биология. Радиоэкология*, 2004, т. 44, № 3, с. 289-295 [Shishkina L.N., Kushnirева Ye.V., Smotryaeva M.A. A new approach to assessment of biological consequences of exposure to low-dose radiation. *Radiat. Biologiya. Radioekologiya*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 289-295 (In Russ.)].
11. Маракулина К.М., Крамор Р.В., Луканина Ю.К., Плащина И.Г., Поляков А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю., Кучин А.В., Шишкина Л.Н. Влияние природы фосфолипидов на масштаб их взаимодействия с антиоксидантами нового класса – изоборнилфенолами. *Журнал физической химии*, 2016, т. 90, № 2, с. 182-189 [Marakulina K.M., Kramor R.V., Lukanina Y.K., Plashchina I.G., Polyakov A.V., Shishkina L.N., Fedorova I.V., Chukicheva I.Y., Kutchin A.V. Effect of the nature of phospholipids on the degree of their interaction with isobornylphenol antioxidants. *Russ. J. Phys. Chem. A.*, 2016, vol. 90, no. 2, pp. 286-292, doi: 10.1134/S0036024416020187 (In Russ.)].
12. Vossen R.C.R.M., van Dam-Mieras M.C.E., Hornstra G., Zwaal R.F.A. Continuous monitoring of lipid peroxidation by measuring conjugated diene formation in an aqueous liposome suspension. *Lipids*, 1993, vol. 28, no. 9, pp. 857-861.
13. Treshchenkova J.A., Goloshchapov A.N., Shishkina L.N., Burlakova E.B. Effect of the potassium phenosan salt and radiation at low doses on the functional activity and state of the brain membranes of mice. In *Antioxidants in Systems of Varying Complexity*, 2019, pp. 209-231.
14. Менгеле Е.А., Плащина И.Г., Касаикина О.Т. Кинетика окисления лецитина в липосомальных водных растворах. *Коллоидный журнал*, 2011, т. 73, № 6, с. 815-821 [Mengele E.A., Kasaikina O.T., Plashchina I.G. Kinetics of lecithin oxidation in liposomal aqueous solutions. *Colloid Journal*, 2011, vol. 73, no. 6, pp. 815-821, doi: 10.1134/S1061933X11050073 (In Russ.)].
15. Burlakova Ye.B., Pal'mina N.P., Mal'tseva Ye.L. A physicochemical system regulating lipid peroxidation in membrane during tumor growth. *Membrane Lipid Oxidation*, 1991, vol. III, pp. 209-237.
16. Valko M., Leibfriz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007, vol. 39, no.1, pp. 44-84, doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

CONSEQUENCES UNDER ACTION OF THE FRACTIONAL X-RAY IRRADIATION ON LIPOSOMES DEPENDING ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND COMPOSITION LIPIDS OF LECITHIN

Shishkina L.N.¹, Beletskaya P.D.¹, Mashukova A.V.¹, Fenin A.A.²

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

Kosygina St., 4, IBCP RAS, Moscow 119991, Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

² Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

Miusskaya Sq., 9, Moscow 125047, Russia

Received 24.07.2024

Abstract. Effect of the parameter initial values of the physicochemical regulatory system of the lipid peroxidation (LP) of liposomes formed from lecithin-standard on the peroxide formation, the diene conjugate (DC) and ketodiene (KD) content in the liposome lipids is studied under the fractional X-ray irradiation at the dose range of 1-10 Gy and the dose rate from 0.001 Gy/s to 0.01 Gy/s, and also at the dose range of 30-90 Gy and dose rate 0.3 Gy/s and 3 Gy/s. It is revealed that the phospholipid shares in the total lipid composition and the ratio of sums of the more easily oxidizable and the more poorly oxidizable fractions in the phospholipid composition of liposomes cause on the rate of the lipid peroxide formation and the DC and KD content in the liposome lipids after irradiation. The scale and direction of the radiation induced effects are obtained to depend on the ratio between the dose and its dose rate.

Key words: lecithin, liposomes, lipid peroxidation, irradiation, UV-spectrometry.

**ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО
КАРДИОЛИПИНОМ НАНОРАЗМЕРНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ**
**Проскурнина Е.В.¹, Созарукова М.М.², Ершова Е.С.¹, Савинова Е.А.¹, Каменева Л.В.¹,
Вейко Н.Н.¹, Иванов В.К.², Костюк С.В.¹**

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

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

² ФГБУН «Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН»

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

Поступила в редакцию 25.07.2024

Аннотация. Ключевой биохимической особенностью диоксида церия является способность нейтрализовать различные активные формы кислорода, проявляя ферментоподобные свойства за счет уникальных каталитических свойств поверхности. Модификаторы поверхности изменяют свойства наночастиц в зависимости от своей химической природы. Цель исследования – изучить цито- и генотоксичность стабилизированного кардиолипином наноразмерного диоксида церия. Наночастицы концентрацией 1,5 мкМ культивировали с эмбриональными фибробластами легких человека в течение 1, 3, 24 и 72 часов. Для оценки цитотоксичности использовали стандартный 72-часовой МТТ-тест. Генотоксичность оценивали по уровню 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина как маркера окисления ДНК и фосфорилированных гистонов γ H2AX как маркера двунитевых разрывов методом проточной цитометрии. Стабилизированный кардиолипином наноразмерный диоксид церия оказался безопасным для клеток в широком диапазоне концентраций вплоть до 7 мМ. Умеренная генотоксичность, вызванная окислительным повреждением, проявлялась спустя 3 часа инкубации, после чего уровни маркеров снижались до контрольных значений.

Ключевые слова: наноразмерный диоксид церия, кардиолипин, выживаемость клеток, генотоксичность, эмбриональные фибробласты легкого человека.

ВВЕДЕНИЕ

Ключевой особенностью диоксида церия, обусловившей перспективы его биомедицинского применения, является способность нейтрализовать различные активные формы кислорода (АФК) за счет уникальных каталитических свойств поверхности. Супероксиддисмутаза-подобная (СОД-подобная) активность была показана для диоксида церия одной из первых [1]. Авторы [2] сравнили активность диоксида церия с рядом СОД-миметиков и отметили, что эта активность у диоксида церия максимальна и сопоставима с активностью нативного фермента. Каталазные свойства изучены в работе [3], пероксидазные на примере окисления природных флавоноидов – в работе [4]. Наночастицы диоксида церия способны инактивировать активные формы азота [5,6], проявлять свойства оксидазы [7,8] и фосфатазы [9]. Эти свойства дополнены открытием принципиально новых типов биохимической активности, среди которых фотолиазо- [10], фосфолипазо- [11] и нуклеазоподобные [12] свойства. Все это позволяет говорить о мультифункциональной нанозимной активности наночастиц CeO_2 .

Несмотря на многообещающие биохимические перспективы, лишь небольшая часть исследований посвящена изучению на культурах клеток человека. Так, изучение токсичности диоксида церия было проведено в основном на культурах злокачественных клеток: рака легких человека [13], гепатомы [14], нейробластомы [15], аденокарциномы легкого [16], меланомы кожи [17], рака яичников [18], клеток лейкемии [19]. Целью исследований на культуре раковых клеток является изучение возможности использования токсичности наночастиц для лечения рака. Исследования на культуре неопухолевых клеток малочисленны: это исследования на кератиноцитах кожи для разработки солнцезащитных кремов [20], клетках пигментного эпителия сетчатки [21].

Модификаторы поверхности играют различную роль в зависимости от своей химической природы – они могут являться стабилизаторами коллоидной системы, облегчать проникновение наночастиц в клетки, изменять биологические свойства наночастиц, снижать токсичность. Кардиолипин входит в состав митохондриальных мембран. Его интересным свойством является способность образовывать с цитохромом С комплексы и наноструктуры, что приводит к появлению у цитохрома С фосфолипипероксидазной активности и запуску митохондриального пути апоптоза [22,23]. Кардиолипин использовали для создания системы доставки препарата через гематоэнцефалический барьер [24]. Введение кардиолипина в полиуретановую пленку привело к улучшению биосовместимости по отношению к сосудам [25]. Нанодиски кардиолипина в комплексе с доксорубицином не изменяли биологической эффективности препарата, но существенно снижали его токсичность [26]. Таким образом, как модификатор поверхности и система доставки препарата в клетки, кардиолипин является перспективным. Работ, посвященных изучению влияния модифицированного кардиолипином нанодиоксида церия на гены и клетки человека в литературе найти не удалось.

Цель работы – изучение цитотоксичности и генотоксичности стабилизированного кардиолипином наноразмерного диоксида церия на модели эмбриональных фибробластов легких человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В качестве клеток для исследования токсичности соединений использовали эмбриональные фибробласты легкого человека 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 1 мл в среде DMEM (Панэко, Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (PAA Laboratories, Австрия), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл гентамицина (Sigma-Aldrich, США). Клетки с наночастицами инкубировали 1, 3, 24 и 72 часа при 37°C в атмосфере 7,5% CO₂.

Стабилизированный кардиолипином наноразмерный диоксид церия. Синтез электростатически стабилизированного коллоидного раствора CeO₂ проводили по методике, основанной на термогидролизе гексанитратоцерата аммония(IV). Водный раствор (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ (#215473, Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 100 г/л выдерживали в течение 24 ч в сушильном шкафу при температуре 95 °C. Образовавшийся осадок отделяли от маточного раствора центрифугированием, трехкратно промывая изопропанолом. Отмытый осадок редиспергировали в деионизованной воде с последующим кипячением в течение 1 ч при постоянном перемешивании до полного удаления изопропанола. Раствор кардиолипина был приготовлен растворением навески в смеси метанол/вода (4:1). Золь CeO₂ модифицировали постепенным введением (по каплям) при непрерывном перемешивании исходного коллоидного раствора CeO₂ к раствору кардиолипина. После добавления наночастиц CeO₂ перемешивание продолжали в течение 30 мин.

Рентгенофазовый анализ (РФА) высушенных образцов проводили с помощью дифрактометра Bruker D8 Advance. Средний гидродинамический диаметр наночастиц CeO₂ оценивали методом динамического рассеяния света (ДРС) с применением анализатора Photocor Compact-Z. С помощью метода электрофоретического рассеяния света с применением анализатора Photocor Compact-Z (программа Photocor Zeta) определяли значение дзета-потенциала.

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, количество восстановленного продукта определяют по оптической плотности при длине волны 540 нм. Все эксперименты проведены в восьми повторях.

Проточная цитометрия. Проточную цитометрию использовали для количественной оценки уровня 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина как маркера окисления ДНК и фосфорилированных гистонов γH2AX как маркера двунитевых разрывов. Клетки промывали раствором Версена (Thermo Fisher Scientific, США), обрабатывали 0,25% трипсином (Панэко, Россия), промывали культуральной средой, суспендировали в фосфатном буферном растворе (ФБР, pH 7,4) (Панэко, Россия). Далее клетки фиксировали параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) при 37°C в течение 10 мин, трижды промывали 0,5% БСА-ФБР, обрабатывали 0,1% Triton X-100 в фосфатном буферном растворе течение 15 мин при 20°C и промывали 3 раза 0,5% БСА-ФБР. Затем клетки окрашивали конъюгированными антителами (1 мкг/мл) в течение 2 часов при комнатной температуре, промывали фосфатным буферным раствором и анализировали с использованием проточного цитометра CytoFlex S (Beckman Coulter, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате термогидролиза гексанитратоцерата (IV) аммония был получен электростатически стабилизированный золь CeO₂. Согласно данным гравиметрического анализа, концентрация водного золя CeO₂ без модификатора составила $0,130 \pm 0,004$ моль/л (22,3 г/л). Размер наночастиц, стабилизированных кардиолипином в соотношении 1 : 1, оцененный методом РФА, составил $5,9 \pm 0,4$ нм, методом ДРС — 38 ± 5 нм. Дзета-потенциал составил $-36,6 \pm 0,4$ мВ.

По данным МТТ-теста, стабилизированный кардиолипином наноразмерный диоксид церия не проявлял токсичности в широком диапазоне концентраций. Вплоть до максимальной изученной концентрации 7 мМ выживаемость клеток была более 80% (рис. 1).

Избыточное количество активных форм кислорода может привести к повреждению ДНК — окислению и двунитевым разрывам. Спустя 1 час инкубации с наночастицами диоксида церия содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG), являющегося маркером окислительного повреждения ДНК, уменьшилось на 22%, видимо, вследствие антиоксидантных свойств наночастиц, через 3 часа увеличилось почти в 1,5 раза, через 24 часа снизилось до контрольных значений (рис. 2). Увеличение 8-охо-dG может привести к двунитевым разрывам ДНК, которые оценивали с помощью определения содержания фосфорилированного гистона γH2AX. В результате инкубации в течение 3 часов содержание фосфорилированного γH2AX увеличилось почти в 1,5 раза, что коррелировало с нарастанием уровня 8-охо-dG. Спустя 24 часа инкубации уровни двухцепочечных разрывов и маркера окисления ДНК снизились до контрольных значений. Спустя 72 часа инкубации как уровень 8-охо-dG, так и уровень γH2AX оставались на уровне контрольных значений. Таким образом, генотоксичность стабилизированного кардиолипином наноразмерного диоксида церия проявляется через 3 часа инкубации клеток с наночастицами.

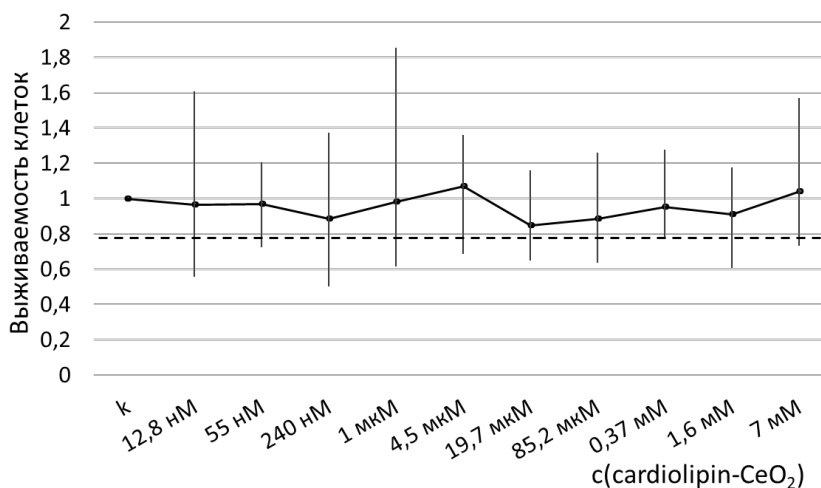


Рисунок 1. Результаты МТТ-теста, пунктир – граница, соответствующая выживаемости клеток 80% и более, по оси ординат отложены значения МТТ-теста относительно контрольного образца (клетки, культивируемые без наночастиц)

Относительно токсичности и безопасности наночерия в литературе имеются противоречивые данные. Исследования немодифицированных наночастиц диоксида церия в культурах альвеолярных эпителиальных клеток II типа крыс демонстрируют его провоспалительное и окислительное действие [27]. В отношении клеток рака легких наночастицы диоксида церия вызывали выраженный окислительный стресс, перекисное окисление липидов и повреждение мембран [13]. Cheng с соавт. показали, что наночастицы CeO₂ вызывают повреждение и апоптоз в клетках гепатомы человека посредством окислительного стресса и активации сигнальных путей MAPK [14]. Наноразмерный диоксид церия проявлял токсичность по отношению к клеткам гепатомы [15]. Токсический эффект CeO₂ на клетки аденокарциномы легких продемонстрирован Mittal с соавторами. Они доказали опосредованное АФК повреждение ДНК и апоптотическую гибель клеток под действием CeO₂ [16]. CeO₂ проявлял опосредованную АФК токсичность в отношении клеток меланомы [17]. Было показано, что наночастицы диоксида церия являлись радиосенсибилизаторами повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением в клетках HL-60 [19]. Напротив, в исследовании клеток рака яичников и толстой кишки человека CeO₂ обладал антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Авторы полагают, что наночастицы диоксида церия можно использовать для снижения паранеопластического воспаления [18]. Антиоксидантный эффект диоксида церия на клетки лейкозных моноцитов человека также был расценен как благоприятный [28]. В нашем исследовании стабилизированный кардиолипином диоксид церия не проявлял цитотоксичности вплоть до миллимолярных концентраций, что согласуется с данными исследования, в котором кардиолипина в комплексе с доксорубицином существенно снижал его цитотоксичность [26].

Окислительное повреждение ДНК и одновременное нарастание уровня двунитевых разрывов в первые три часа инкубации, скорее всего, вызвано активацией NOX4 [29,30]. В свою очередь, в ответ на повреждение ДНК активируются системы репарации [31], что объясняет снижение уровня окислительных повреждений и двунитевых разрывов до контрольных значений через 24–72 часа инкубации.

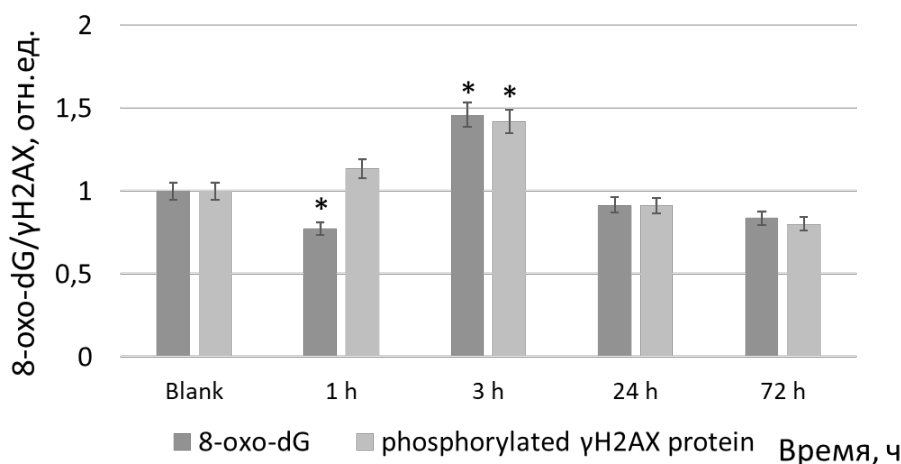


Рисунок 2. Уровни 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, маркера окислительного повреждения ДНК, и γH2AX, маркера двунитевых разрывов, относительно контрольного образца. Значимые различия по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$) отмечены знаком *

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, стабилизированный кардиолипином наноразмерный диоксид церия является безопасным для эмбриональных фибробластов легкого человека в широком диапазоне концентраций вплоть до 7 мМ. Умеренная генотоксичность, вызванная окислительным повреждением, проявляется спустя 3 ч инкубации, после чего уровни маркеров снижаются до контрольных значений в результате активации систем репарации. Полученные результаты являются основой дальнейших экспериментов по изучению эффектов стабилизированного кардиолипином наноразмерного диоксида церия на гены человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-25-00088.

Список литературы / References:

1. Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W.T. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2007, pp. 1056-1058, doi: 10.1039/b615134e.
2. Batinic-Haberle I., Reboucas J.S., Spasojevic I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Antioxid Redox Signal*, 2010, vol. 13, pp. 877-918, doi: 10.1089/ars.2009.2876.
3. Pirmohamed T., Dowding J.M., Singh S., Wasserman B., Heckert E., Karakoti A.S., King J.E., Seal S., Self W.T. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2010, vol. 46, pp. 2736-2738, doi: 10.1039/b922024k.
4. Ivanov V.K., Usatenko A.V., Scherbakov A.B. Study of the antioxidant activity of nanocrystalline cerium dioxide in relation to anthocyanins (in Russian). *Zh. Neorg. Khimii*, 2009, vol. 54, pp. 1596-1601.
5. Dowding J.M., Dosani T., Kumar A., Seal S., Self W.T. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical (NO). *Chem. Commun. (Camb.)*, 2012, vol. 48, pp. 4896-4898, doi: 10.1039/c2cc30485f.
6. Ivanov V.K., Scherbakov A.B., Ryabokon I.G., Usatenko A.V., Zholobak N.M., Tretyakov Yu.D. Inactivation of the nitroxyl radical by cerium dioxide nanoparticles (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk*, 2010, vol. 430, pp. 639-642.
7. Asati A., Santra S., Kaftanis C., Nath S., Perez J.M. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009, vol. 48, pp. 2308-2312, doi: 10.1002/anie.200805279.
8. Liu B., Huang Z., Liu J. Boosting the oxidase mimicking activity of nanoceria by fluoride capping: rivaling protein enzymes and ultrasensitive F(-) detection. *Nanoscale*, 2016, vol. 8, pp. 13562-13567, doi: 10.1039/c6nr02730j.
9. Yao T., Tian Z., Zhang Y., Qu Y. Phosphatase-like Activity of Porous Nanorods of CeO₂ for the Highly Stabilized Dephosphorylation under Interferences. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, vol. 11, pp. 195-201, doi: 10.1021/acsami.8b17086.
10. Tian Z., Yao T., Qu C., Zhang S., Li X., Qu Y. Photolyase-Like Catalytic Behavior of CeO₂. *Nano Lett.*, 2019, vol. 19, pp. 8270-8277, doi: 10.1021/acs.nanolett.9b03836.
11. Khulbe K., Karmakar K., Ghosh S., Chandra K., Chakravorty D., Mugesh G. Nanoceria-Based Phospholipase-Mimetic Cell Membrane Disruptive Anti-Biofilm Agents. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, pp. 1-36.
12. Xu F., Lu Q., Huang P.J., Liu J. Nanoceria as a DNase I mimicking nanozyme. *Chem. Commun. (Camb.)*, 2019, vol. 55, pp. 13215-13218, doi: 10.1039/c9cc06782e.
13. Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D., Ma Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells. *Int. J. Toxicol.*, 2006, vol. 25, pp. 451-457, doi: 10.1080/10915810600959543.
14. Cheng G., Guo W., Han L., Chen E., Kong L., Wang L., Ai W., Song N., Li H., Chen H. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways. *Toxicol. In Vitro*, 2013, vol. 27, pp. 1082-1088, doi: 10.1016/j.tiv.2013.02.005.
15. Kumari M., Singh S.P., Chinde S., Rahman M.F., Mahboob M., Grover P. Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *Int. J. Toxicol.*, 2014, vol. 33, pp. 86-97, doi: 10.1177/1091581814522305.
16. Mittal S., Pandey A.K. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *Biomed. Res. Int.*, 2014, vol. 2014, pp. 891934, doi: 10.1155/2014/891934.
17. Ali D., Alarifi S., Alkahtani S., Alkahtane A.A., Almalik A. Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells. *Cell. Biochem. Biophys.*, 2015, vol. 71, pp. 1643-1651, doi: 10.1007/s12013-014-0386-6.
18. Vassie J.A., Whitelock J.M., Lord M.S. Endocytosis of cerium oxide nanoparticles and modulation of reactive oxygen species in human ovarian and colon cancer cells. *Acta Biomater.*, 2017, vol. 50, pp. 127-141, doi: 10.1016/j.actbio.2016.12.010.
19. Montazeri A., Zal Z., Ghasemi A., Yazdannejat H., Asgarian-Omran H., Hosseini-mehr S.J. Radiosensitizing Effect of Cerium Oxide Nanoparticles on Human Leukemia Cells. *Pharm. Nanotechnol.*, 2018, vol. 6, pp. 111-115, doi: 10.2174/2211738506666180306161253.
20. Ngoc L.T.N., Bui V.K.H., Moon J.Y., Lee Y.C. In-Vitro Cytotoxicity and Oxidative Stress Induced by Cerium Aminoclay and Cerium Oxide Nanoparticles in Human Skin Keratinocyte Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2019, vol. 19, pp. 6369-6375, doi: 10.1166/jnn.2019.17035.
21. Ma Y., Li P., Zhao L., Liu J., Yu J., Huang Y., Zhu Y., Li Z., Zhao R., Hua S., et al. Size-Dependent Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Retinal Pigment Epithelia Cells. *Int. J. Nanomedicine*, 2021, vol. 16, pp. 5333-5341, doi: 10.2147/IJN.S305676.

22. Vladimirov Y.A., Sarisozen C., Vladimirov G.K., Filipczak N., Polimova A.M., Torchilin V.P. The Cytotoxic Action of Cytochrome C/Cardiolipin Nanocomplex (Cyt-CL) on Cancer Cells in Culture. *Pharm. Res.*, 2017, vol. 34, pp. 1264-1275, doi: 10.1007/s11095-017-2143-1.
23. Vladimirov G.K., Remenshchikov V.E., Nesterova A.M., Volkov V.V., Vladimirov Y.A. Comparison of the Size and Properties of the Cytochrome c/Cardiolipin Nanospheres in a Sediment and Non-polar Medium. *Biochemistry (Mosc)*, 2019, vol. 84, pp. 923-930, doi: 10.1134/S000629791908008X.
24. Kuo Y.C., Tsai H.C. Rosmarinic acid- and curcumin-loaded polyacrylamide-cardiolipin-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with conjugated 83-14 monoclonal antibody to protect beta-amyloid-insulted neurons. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2018, vol. 91, pp. 445-457, doi: 10.1016/j.msec.2018.05.062.
25. Zhu H., Fu L., He L., Zhang J., Zhang L., Yang L., Li Y., Zhao Y., Wang Y., Mo H. et al. Polyurethane-Cardiolipin Nanoparticle-Modified Decellularized Scaffold-Based Vascular Patches for Tissue Engineering Applications. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, vol. 2, pp. 1696-1702, doi: 10.1021/acsabm.9b00079.
26. Fox C.A., Romenskaia I., Dagda R.K., Ryan R.O. Cardiolipin nanodisks confer protection against doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2022, vol. 1864, p. 183984, doi: 10.1016/j.bbmem.2022.183984.
27. Schwotzer D., Niehof M., Schaudien D., Kock H., Hansen T., Dasenbrock C., Creutzenberg O. Cerium oxide and barium sulfate nanoparticle inhalation affects gene expression in alveolar epithelial cells type II. *J. Nanobiotechnology*, 2018, vol. 16, p. 16, doi: 10.1186/s12951-018-0343-4.
28. Patel P., Kansara K., Singh R., Shukla R.K., Singh S., Dhawan A., Kumar A. Cellular internalization and antioxidant activity of cerium oxide nanoparticles in human monocytic leukemia cells. *Int. J. Nanomedicine*, 2018, vol. 13, pp. 39-41, doi: 10.2147/IJN.S124996.
29. Ekin S., Yildiz H., Alp H.H. NOX4, MDA, IMA and oxidative DNA damage: can these parameters be used to estimate the presence and severity of OSA? *Sleep Breath*, 2021, vol. 25, pp. 529-536, doi: 10.1007/s11325-020-02093-2.
30. Avci V., Ayengin K., Alp H.H. Oxidative DNA Damage and NOX4 Levels in Children with Undescended Testes. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, 2019, vol. 29, pp. 545-550, doi: 10.1055/s-0039-1692167.
31. D'Errico M., Parlanti E., Dogliotti E. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat. Res.*, 2008, vol. 659, pp. 4-14, doi: 10.1016/j.mrrev.2007.10.003.

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF CARDIOLIPIN-STABILIZED NANOCERIA

Proskurnina E.V.¹, Sozarukova M.M.², Ershova E.S.¹, Savinova E.A.¹, Kameneva L.V.¹, Veiko N.N.¹,
Ivanov V.K.², Kostyuk S.V.¹

¹ Research Centre for Medical Genetics

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

² Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of RAS

Leninsky Ave., 31, Moscow, 119991, Russia

Received 25.07.2024

Abstract. A key biochemical feature of ceria is the ability to neutralize various reactive oxygen species, exhibiting enzyme-like properties due to the unique catalytic properties of the surface. Surface modifiers play different roles depending on their chemical nature. The aim of the study is to examine the cyto- and genotoxicity of cardiolipin-stabilized nanoceria. Nanoparticles (1.5 μ M) were cultured with human embryonic lung fibroblasts for 1, 3, 24, and 72 hours. To assess cytotoxicity, a standard 72-hour MTT test was used. Genotoxicity was assessed by the content of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of DNA oxidation and phosphorylated histones γ H2AX as a marker of double-strand breaks using flow cytometry. As a result, cardiolipin-stabilized nanoceria was safe for cells in a wide range of concentrations up to 7 mM. Moderate genotoxicity caused by oxidative damage appears after 3 hours of incubation, after which the marker levels decrease to control values as a result of activation of repair systems.

Key words: nanoceria, cardiolipin, cell survival, genotoxicity, human embryonic lung fibroblasts.

СОВМЕСТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ПАССИВНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ ТЕРМОМЕТРИИ И ИНФРАКРАСНОЙ ТЕРМОГРАФИИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЛОКАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ ОПУХОЛИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Ерофеев А.В.^{1,2}, Острейко О.В.⁴, Шаракшанэ А.С.^{1,2}, Грановский Н.В.¹, Спирин Д.В.², Мансфельд А.Д.³, Аносов А.А.^{1,2}

¹ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
ул. Трубецкая, 8 стр. 2, г. Москва 119991, РФ; e-mail: averof2364@gmail.com

² Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН
ул. Моховая, 11, стр. 7, г. Москва 125009, РФ

³ Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова РАН
ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

⁴ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова
ул. Льва Толстого, 6-8, г. Санкт-Петербург 197022, РФ

Поступила в редакцию 29.07.2024

Аннотация. При циторедукции опухолевой ткани головного мозга человека методом локальной гипертермии важно локализовать область нагрева, контролировать ее размеры и температуру. Проведено исследование возможностей определения параметров распределения температуры при локальной гипертермии на фантоме ткани мозга совместным применением методов пассивной акустической термометрии (ПАТ) и инфракрасной термографии (ИКТ). Локальный нагрев модельного объекта проводился хирургическим лазером мощностью 2 Вт на длине волны 0,97 мкм. Получены данные о распределении температуры в фантоме при определенной глубине расположения источника тепловой мощности и выбранной продолжительности процедуры методом пассивной акустической термометрии (ПАТ). Также методом инфракрасной термографии (ИКТ) определено изменение во времени размера нагреваемой областей, в которых температура превышает 45 и 60°C. Полученные данные показывают, что при глубине расположения источника нагрева 2 см ПАТ регистрирует увеличение глубинной температуры немедленно, в то время как ИКТ, видимо, после расширения области нагрева до поверхности фантома, показывает начало нагрева только через 1,5 минуты. При этом данные ПАТ и ИК-термометрии хорошо согласуются и при совместном использовании позволяют точнее оценить тепловое состояние тканей.

Ключевые слова: пассивная акустическая термометрия, инфракрасная термография, гипертермия, циторедукция опухолевой ткани, фантом ткани головного мозга человека.

ВВЕДЕНИЕ

Локальная гипертермия позволяет достигать циторедукции опухолевой ткани. Типовая процедура гипертермии опухолевых тканей головного мозга описана в О. В. Острейко с соавторами [1], – в мозг вводится оптоволокну, через оптоволокну подается инфракрасное излучение необходимой мощности, и в области конца оптоволокну образуется область повышенной температуры (рис. 1). Эффект преимущественной гибели раковых клеток достигается достаточной по длительности выдержкой ткани при температуре 45 °С.

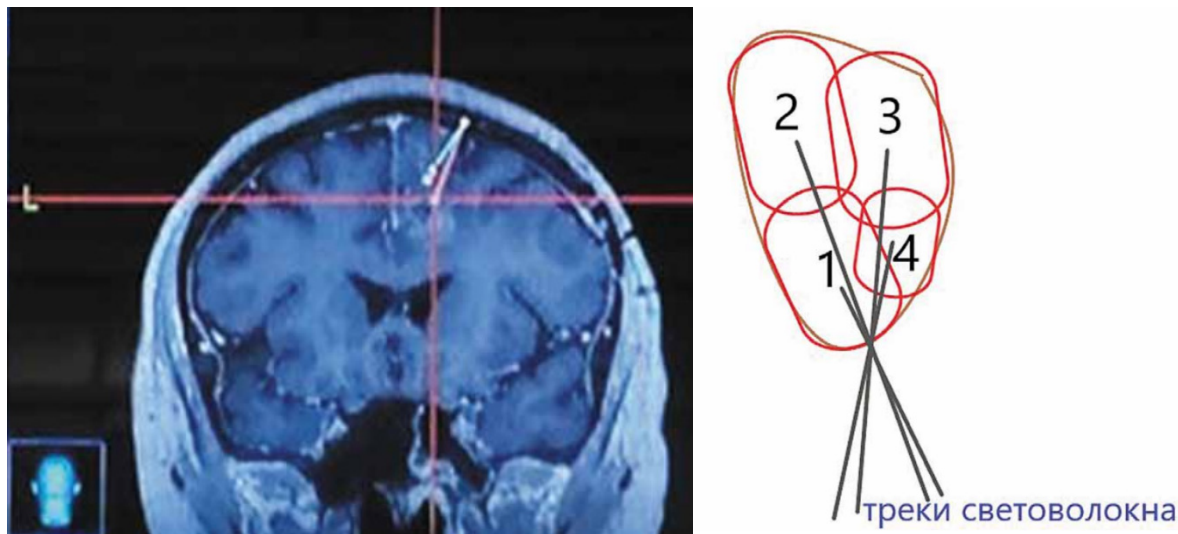


Рисунок 1. Локальная гипертермия по методу Острейко: слева план операции и справа схема участков гипертермии

Чтобы не перегреть ткань, и не вызвать гибель здоровых клеток, время воздействия, место и размер нагреваемой области необходимо контролировать. Но риски инвазивных методов контроля при таких операциях превышают достигаемую пользу, а контроль температуры поверхности тела не дает достаточной информации о глубинном распределении температур.

Неинвазивно информацию о глубинной температуре в тканях можно получить методом пассивной акустической термометрии (ПАТ) [2,3] по измеряемой акусто-яркостной температуре объекта — интегральной характеристике, равной температуре акустического черного тела, создающего такую же плотность потока теплового акустического излучения, как и исследуемый объект [4].

Поверхностную температуру фантома неинвазивно можно измерять методом инфракрасной термографии [5].

Ранее мы проводили работы по исследованию возможностей контроля локальной гипертермии у людей, методом ПАТ с применением поверхностного нагрева методом нанесения на кожу предплечья разогревающей мази [6,7]; с применением УВЧ-нагрева [8,9]; и при воспалении внутренних органов тела человека [10,11].

В данной работе поставлена задача измерения глубиной температуры с помощью ПАТ и поверхностной температуры с помощью ИКТ на фантоме опухоли головного мозга человека.

МЕТОДЫ

В данной работе проведено исследование возможности определения параметров распределения температуры при локальной гипертермии на фантоме опухоли головного мозга человека совместным применением методов пассивной акустической термометрии (ПАТ) и инфракрасной термографии (ИКТ).

Локальный нагрев фантома проводился хирургическим лазером (IPG Photonics, Фрязино) на длинах волн 0,97 и мощностью 2 Вт. Инфракрасное излучение лазера поступало по световоду в фантом на глубину 2 см в течении 7 минут. Для измерений теплового акустического излучения использован многоканальный акустотермограф (полоса пропускания 1,6–2,5 МГц, пороговая чувствительность при времени интегрирования 10 с–0,2 К) с двумя датчиками, расположенными на разных расстояниях от области нагрева (рис. 3).

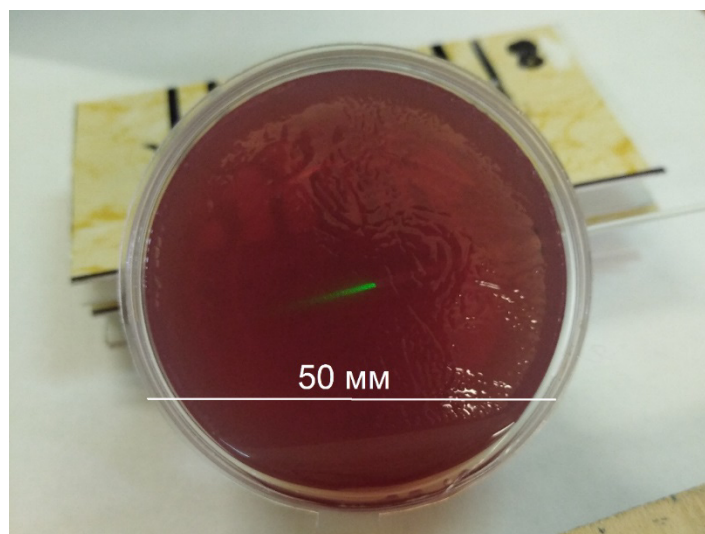


Рисунок 2. Фантом опухоли головного мозга человека: по центру лазерный луч, справа оптоволоконно, подводящее лазерный луч

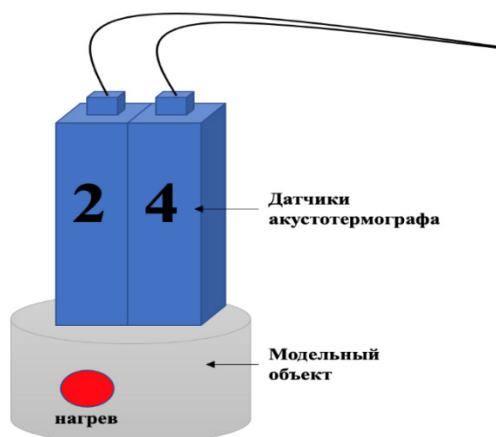


Рисунок 3. Схема расположения датчиков на фантоме

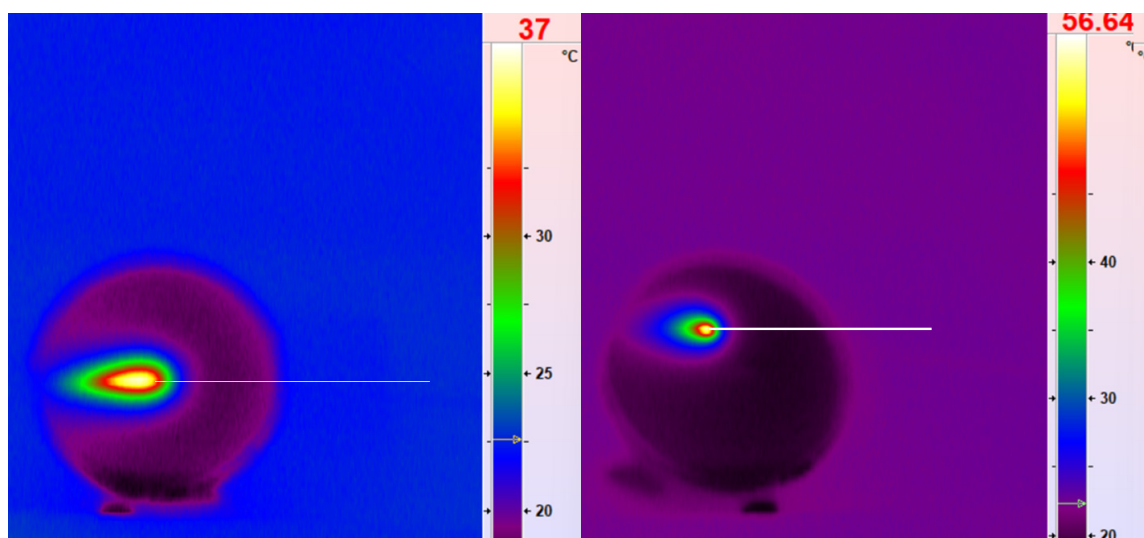


Рисунок 4. ИК-термограмма разных этапов нагрева фантома

В акустотермографе акустические сигналы преобразовываются в электрические, усиливаются и проходят через квадратичный детектор. С выходов многоканального акустотермографа сигналы подаются на 14-ти разрядный многоканальный АЦП с частотой дискретизации 1 КГц на канал и усредняются скользящим сглаживанием с окном 30 мс. Итоговая величина после калибровки является интегральной акустояркой температурой (АЯТ) области чувствительности датчика.

Для измерения поверхностной температуры до, во время и после процедуры нагрева использовался портативный компьютерный термограф ИРТИС-2000с разрешением 0,05 К при температуре 30 °С, регистрирующий ИК-излучение в диапазоне длин волн 3-5 мкм (рис. 4).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для создания в зоне нагрева фантома критических температур циторедукции опухоли были проведены различные режимы нагрева фантома: 3, 5 и 7 минут (рис. 5). Для основного эксперимента был выбран режим 7 минут, как оптимальный в данных условиях для создания в ткани фантома критических температур.

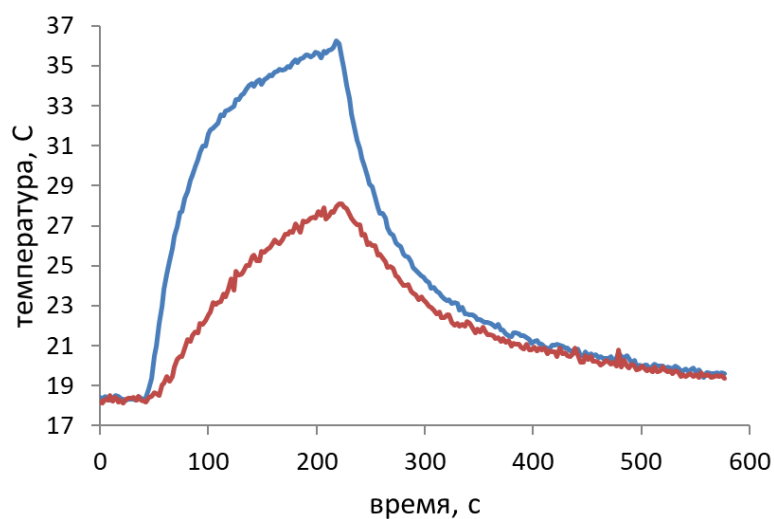
Измерение поверхностной температуры методом ИКТ показало возможность контроля зон критических температур нагрева фантома опухоли головного мозга человека 45°C и 60°C (рис. 6).

Глубинная температура, измеряемая датчиком 2, поднялась на $12,1 \pm 0,3$ °С, а датчик 4 показал изменение температуры на $2,3 \pm 0,3$ °С (рис. 7).

Рост АЯТ наблюдается сразу же после включения нагрева, спад происходит медленнее и наблюдается после отключения нагрева. Пики на графике зависимости АЯТ от времени соответствуют образованию пузырьков в нагреваемом фантоме.

ИКТ показала увеличение температуры поверхности фантома с задержкой 1,5 мин после включения источника нагрева на глубине 2 см.

На рисунке 8 представлены результаты сравнения поверхностной и глубиной температур фантома.



— центр нагрева — 5 мм

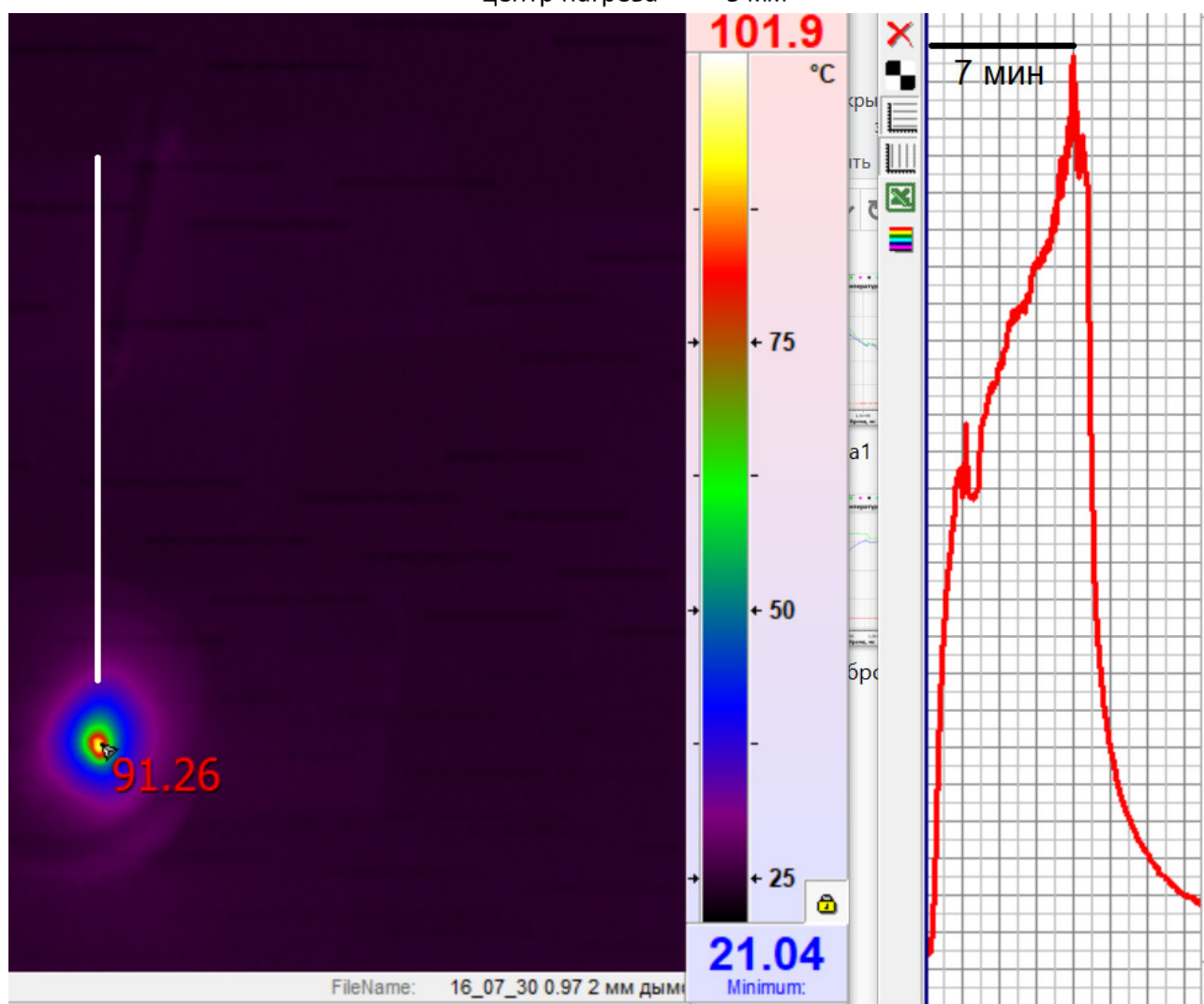


Рисунок 5. Определение максимальных температур при временах нагрева фантома 3 и 7 минут

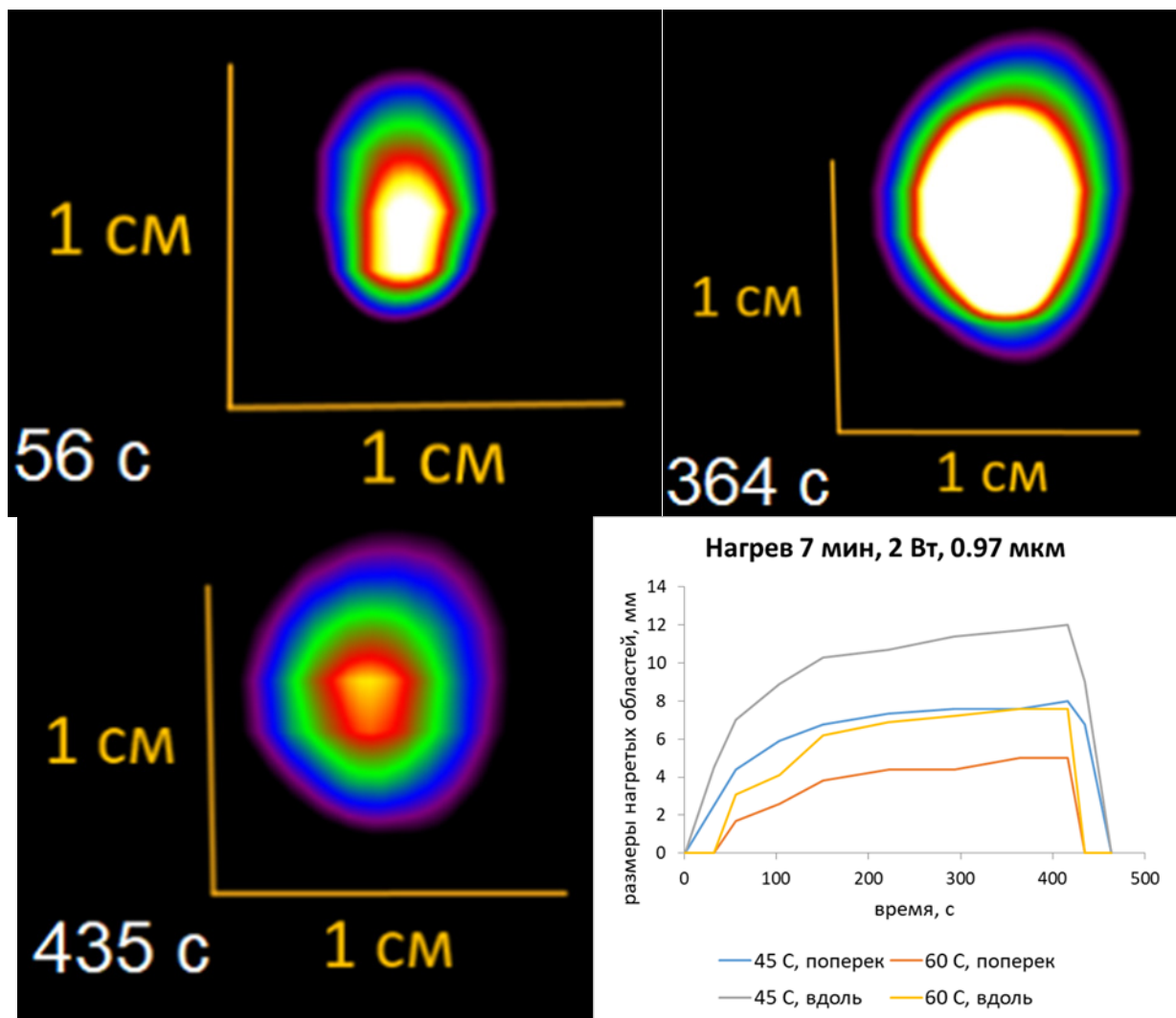


Рисунок 6. Определение размеров нагретой области при выбранном времени нагрева 7 минут

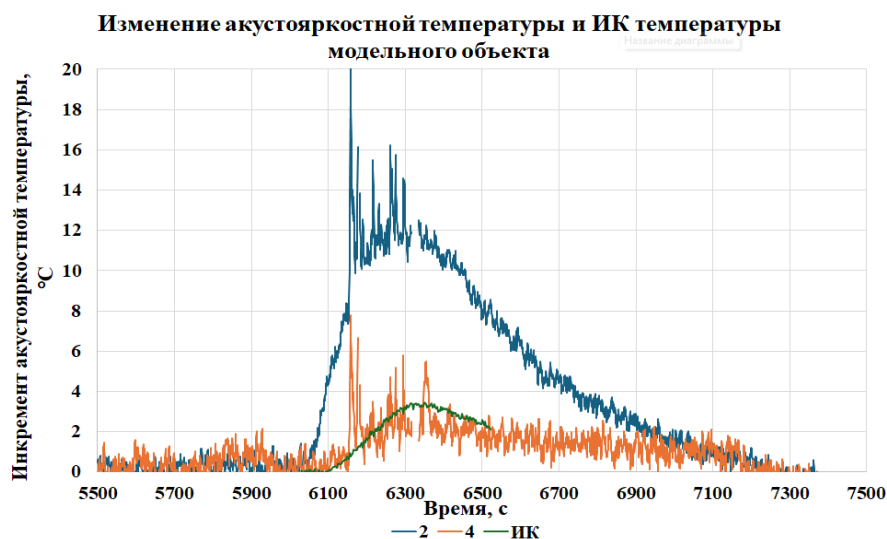


Рисунок 7. График зависимости акустяркостной температуры от времени при нагреве фантома

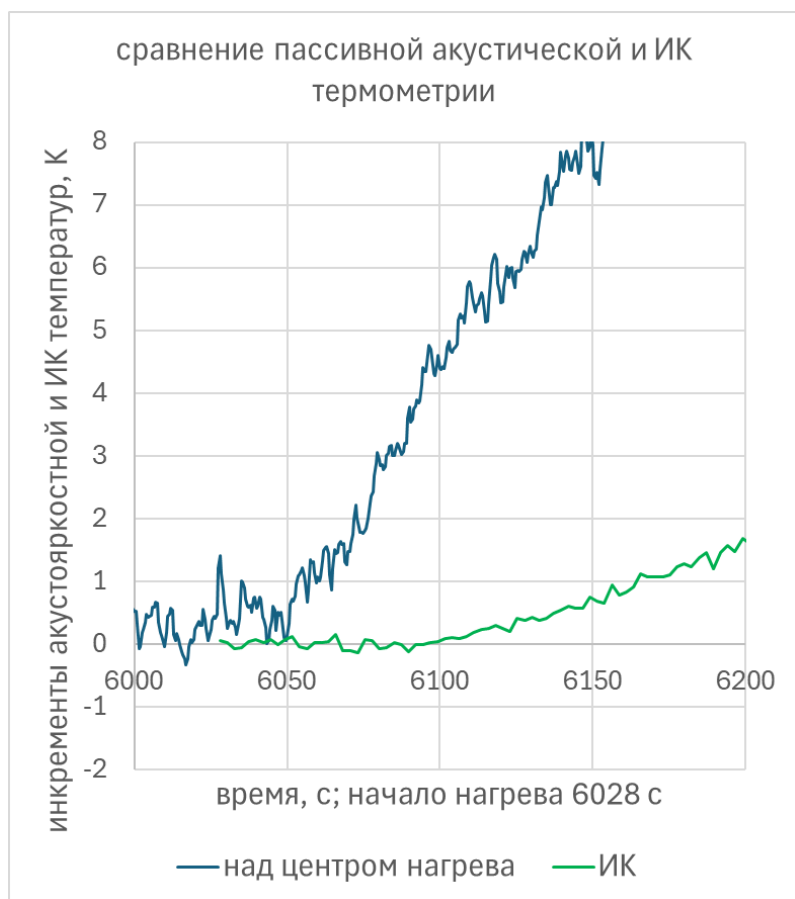


Рисунок 8. Сравнение изменения акустической температуры и поверхностной температуры фантома

Сравнение показало особенности применения методов:

Максимальные величины поверхностных и глубинных температур различны;

Скорости остывания поверхностных и глубинных тканей фантома тоже значительно различаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, с помощью ИКТ определили, как меняются во времени размеры областей циторедукции, в которых температура превышает 45°C и 60°C , а с помощью ПАТ определили величины усредненной акустической температуры нагретой области тканей фантома опухоли головного мозга.

Сравнение результатов позволило сделать вывод, что контроль гипертермии производить с помощью ПАТ эффективнее, так как тепловым потокам в тканях требуется время, чтобы достигнуть поверхности фантома.

Предположительно, ПАТ также дает более достоверную информацию — если бы модельный объект имитировал кровоток, ИКТ показала бы недостоверные величины глубинной температуры из-за того, что поверхностный кровоток экранировал бы глубинную температуру.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пассивная акустическая термометрия (ПАТ) в модельном эксперименте показывает усредненную (акустическую) температуру и может быть использована для контроля температуры при гипертермии.

ПАТ позволяет измерять глубинную температуру и показывает увеличение температуры сразу после начала нагрева. ИК термометрия показывает увеличение температуры с задержкой.

ПАТ показывает момент выделения пузырей, что важно для клинической практики, т.к. показывает критические значения нагрева в центре области нагрева, ИКТ такие данные не демонстрирует.

Полученные данные сравнения ПАТ и ИКТ продемонстрировали, что применение ПАТ более эффективно для контроля локальной гипертермии, чем ИКТ, но данные ИКТ можно использовать для быстрого определения зон нагрева и для расчета нагрева с помощью уравнения теплопроводности.

Измерение глубинной температуры с помощью ПАТ на фантоме опухоли мозга проводилась впервые. В данном эксперименте не моделировался кровоток.

Список литературы / References:

1. Острейко О.В., Черebilло В.Ю., Холявин А.И., Гаврилов Г.В., Гусев А.А., Вековищева О.Ю. Малоинвазивная лазерная гипертермия в комплексном лечении локального продолженного роста глиобластом. *Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова*, 2023, т. XV, № 3 [Ostreiko O.V., Cherebillo V.Yu., Kholyavin A.I., Gavrilov G.V., Gusev A.A., Vekovichcheva O.Yu. Minimally invasive laser hyperthermia in the complex treatment of local continued growth of glioblastomas. *Russian Neurosurgical Journal named after Professor A.L. Polenova*, 2023, vol. XV, no. 3 (In Russ.)].
2. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.С. Определение динамики изменения температуры в модельном объекте методом акустотермографии. *Акуст. журн.*, 2008, т. 54, № 4, с. 540-545 [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazanskii A.S., Mansfeld A.D., Sharakshane A.S. Determination of temperature change dynamics in a model object by acoustothermography. *Akust. zhurn.*, 2008, vol. 54, no. 4, pp. 540-545 (In Russ.)].
3. Аносов А.А., Беляев Р.В., Вилков В.А., Казанский А.С., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.С. Динамическая акустотермография. *Акуст. журн.*, 2009, т. 55, № 4-5, с. 436-444 [Anosov A.A., Belyaev R.V., Vilkov V.A., Kazanskii A.S., Mansfel'd A.D., Sharakshane A.S. Determination of the dynamics of temperature variation in a model object by acoustic thermography. *Acoustical Physics*, 2009, vol. 55, no. 4-5, pp. 436-444 doi: 10.1134/S10637711008040040 (In Russ.)].
4. Аносов А.А. и др. Восстановление глубинной температуры методом акустотермометрии с учетом уравнения теплопроводности. *Радиотехника и электроника*, 2015, т. 60, № 8, с. 855-855 [Anosov A.A. et al. Reconstruction of the depth temperature by acoustothermometry taking into account the thermal conductivity equation. *Radiotekhnika i elektronika*, 2015, vol. 60, no. 8, pp. 855-855 (In Russ.)].
5. Иваницкий Г.Р. Современное матричное тепловидение в биомедицине. *Успехи физических наук*, 2006, т. 176, № 12, с. 1293-1320 [Ivanitsky, G.R. Modern matrix thermal imaging in biomedicine. *Advances in Physical Sciences*, 2006, vol. 176, no. 12, pp. 1293-1320 (In Russ.)].
6. Ерофеев А.В., Аносов А.А., Мансфельд А.Д., Шаракшанэ А.А., Щербаков М.И. Измерение внутренней температуры тела человека методом пассивной акустической термометрии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 2, с. 270-277 [Erofeev A.V., Anosov A.A., Mansfeld A.D., Sharakshane A.A., Shcherbakov M.I. Measuring the core temperature of the human body using passive acoustic thermometry. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 270-277 (In Russ.)].
7. Аносов А.А., Ерофеев А.В., Мансфельд А.Д. Использование акустотермометрии для определения температурного поля в предплечье человека. *Акуст. журн.*, 2019, т. 65, № 4, с. 551-556 [Anosov A.A., Erofeev A.V., Mansfeld A.D. Using acoustic thermometry to determine the temperature field in the human forearm. *Acoust. zhurn.*, 2019, vol. 65, no. 4, pp. 551-556 (In Russ.)].
8. Аносов А.А., Ерофеев А.В., Пешкова К.Ю., Щербаков М.И., Беляев Р.В., Мансфельд А.Д. Совместное использование пассивной акустической и инфракрасной термометрии для контроля УВЧ-нагрева. *Акустический журнал*, 2020, т. 66, № 6, с. 690-696 [Anosov A.A., Erofeev A.V., Peshkova K.Yu., Shcherbakov M.I., Belyaev R.V., Mansfeld A.D. Combined use of passive acoustic and infrared thermometry to control UHF heating. *Acoustic Journal*, 2020, vol. 66, no. 6, pp. 690-696 (In Russ.)].
9. Ерофеев А.В., Грановский Н.В., Селиванова П.И., Шугаева А.И., Шаракшанэ А.С., Щербаков М.И., Мансфельд А.Д., Аносов А.А. Контроль параметров температурного распределения в предплечье человека при процедуре УВЧ-гипертермии методами пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 3, с. 486-492 [Erofeev A.V., Granovsky N.V., Selivanova P.I., Shugaeva A.I., Sharakshane A.S., Shcherbakov M.I., Mansfeld A.D., Anosov A.A. Monitoring the parameters of temperature distribution in the human forearm during the UHF hyperthermia procedure using passive acoustic thermometry and infrared thermography. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 3, pp. 486-492 (In Russ.)].
10. Аносов А.А., Ерофеев А.В., Щербаков М.И., Мансфельд А.Д. Пассивная акустическая термометрия грудной клетки человека, перенесшего COVID-19. *Акустический журнал*, 2022, т. 68, № 3, с. 330-335 [Anosov A.A., Erofeev A.V., Shcherbakov M.I., Mansfeld A.D. Passive acoustic thermometry of the chest of a person who has had COVID-19. *Acoustic Journal*, 2022, vol. 68, no. 3, pp. 330-335 (In Russ.)].
11. Anosov A., Erofeev A.V., Shcherbakov M.I., Mansfeld A.D. Passive Acoustic Thermometry of the Chest of a Person with COVID-19. *Acoustical Physics*, 2022, vol. 68, no. 3, pp. 289-293 (In Russ.)].

JOINT APPLICATION OF PASSIVE ACOUSTIC THERMOMETRY AND INFRARED THERMOGRAPHY METHODS IN MODELING LOCAL HYPERTHERMIA OF THE HUMAN BRAIN

Erofeev A.V.^{1,2}, Ostreyko O.V.⁴, Sharakshane A.S.^{1,2}, Granovsky N.V.¹, Spirin D.V.², Mansfeld A.D.³, Anosov A.A.^{1,2}¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
*Trubetskaya St. 8, Moscow, 119991, Russia; e-mail: averof2364@gmail.com*² Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics of RAS
*Mokhovaya St. 11, Moscow, 125009, Russia*³ A.V. Gaponov-Grekhov Institute of Applied Physics of RAS
*Ulyanov St. 46, Nizhny Novgorod, 603950, Russia*⁴ First Pavlov State Medical University of St. Petersburg
Lev Tolstoy St. 6-8, St. Petersburg, 197022, Russia

Received 29.07.2024

Abstract. During cytoreduction of human brain tumor tissue by local hyperthermia it is important to localize the heating area, control its size and temperature. The study of possibilities to determine the parameters of temperature distribution during local hyperthermia on a brain tissue phantom by joint application of passive acoustic thermometry (PAT) and infrared thermography (IRT) methods was carried out. Local heating of the model object was performed with a 2 W surgical laser at wavelengths of 0.97 μm . Data were obtained on the temperature distribution in the phantom at definite depths of the heat power source and select duration of the procedure by passive acoustic thermometry (PAT). Also, the time variation of the size of the heated regions with temperatures above 45 and 60°C was determined by infrared thermography (ICT). The data obtained show that at a heating source depth of 2 cm, PAT registers an increase in depth temperature immediately, while ICT, apparently after the heating area is extended to the phantom surface, shows the onset of heating only after 1.5 minutes. At the same time, the PAT and IR thermometry data agree well and, when used together, allow a more accurate assessment of the thermal state of tissues.

Key words: *passive acoustic thermometry, infrared thermography, hyperthermia, tumor tissue cytoreduction, human brain tissue phantom.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АЗУЛЕНОВ КАК ЗАЩИТНЫХ ФАКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МЫШЕЙ

Рощина В.В., Сергиевич Л.А.

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

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

Поступила в редакцию 07.08.2024

Аннотация. В настоящей работе оценивалось влияние азуленовых соединений на жизнеспособность мышей. Для исследования были выбраны искусственно синтезированный азулен и такие носители природных азуленов как синие микроспоры хвоща полевого и экстракты из них. Было показано, что включение в питьевой рацион исследуемых животных раствора искусственного азулена (на одно животное в сутки примерно 3-4 мл жидкости, содержащей 0,4-0,6 мг искусственного азулена фирмы Sigma-Aldridge) или водных или спиртовых экстрактов микроспор хвоща полевого, содержащих азулены (извлечение из 20 мг одиночных клеток микроспор) в качестве природного азулен-содержащего источника, в течение всего периода наблюдения не оказывали отрицательного воздействия на организм мышей. Животные не теряли в весе, состояние шерсти не ухудшалось, средняя продолжительность жизни (СПЖ) не отличалась от контрольной, а в случае использования искусственного азулена в среднем на 7 процентов превышала СПЖ в контроле. Кроме указанных экстрактов, для этой же цели использовали интактные микроспоры хвоща полевого (одиночные клетки), из которых азулены освобождались в пищеварительном тракте животных. В случае радиационного облучения мышей, наиболее выраженным радиопротекторным действием обладали спиртовые экстракты микроспор хвоща. Среднее время дожития (СВД) животных после облучения в этой экспериментальной группе составило в среднем $142,3 \pm 38,4$ что было существенно выше по сравнению с облученным контролем и группой мышей, принимающих водные экстракты микроспор хвоща ($60,3 \pm 18,3$ и $55,9 \pm 14,0$ соответственно). Выдвинуто предположение, что антиоксидантные свойства азуленов позволяют предотвращать повреждающее действие активных форм кислорода, образующихся как в обычной жизнедеятельности животных, так и в результате воздействия ионизирующей радиации. Полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего детального изучения защитных свойств азуленов.

Ключевые слова: азулены, азулен-содержащие экстракты, микроспоры хвоща, ионизирующая радиация.

ВВЕДЕНИЕ

Основными характеристиками азуленов являются голубой цвет, особенно яркий в кислой среде, положение максимумов в спектрах поглощения и флуоресценции [1-3]. Матрица основной химической формы синтезированного азулена определяет цвет и характерный максимум поглощения при 580 нм и максимум 395-410 нм в спектре флуоресценции. Природные идентифицированные азулены к матричной основе присоединяют разнообразные боковые группы, в основном CH_2 , CH_3 и OH , что может давать максимумы поглощения в более длинноволновой области спектра [1-3].

Защитные свойства синих пигментов азуленов в косметике известны давно [1-3]. К настоящему времени описаны эффекты, касающиеся лечения животных и человека при разнообразных заболеваниях [2], однако применение их как собственно профилактических лекарственных соединений до сих пор малое исследовано. В этой связи представляют интерес данные о возможной защитной функции азуленов, полученные в модельных экспериментах на животных.

Ранее было показано некоторое защитное антирадиационное действие искусственно синтезированного азулена и природных проазуленов, его метаболитических предшественников, для прорастания одиночных клеток пыльцы растений [4]. Также отмечена возможная защитная функция азуленов, присутствующих на поверхности растительных клеток ряда азулен-содержащих древесных растений, от озона и сопутствующих ему активных форм кислорода [5]. Показано также, что в условиях засоления азулен и некоторые проазулены снижают количество стрессовых метаболитов, таких как гистамин и дофамин, в одиночных клетках растительных микроспор [6].

Весьма актуальной проблемой для животных является доставка азуленов в пищеварительный тракт. Это может представлять интерес для анализа влияния этих голубых пигментов на жизнеспособность животных как в норме, и, например, после радиационного воздействия. Здесь возможно использование твердых транспортеров лекарственных соединений - пыльцы семенных растений и спор споровых видов растений [7-10]. С другой стороны, в питьевом режиме животных допустимо применение экстрактов из азулен-содержащих растений.

Целью настоящего исследования было оценить влияние азуленовых соединений на жизнеспособность мышей в норме и после радиационного воздействия. Для этого использовали искусственный азулен, а в качестве источника природных азуленов – содержащие азулены интактные микроспоры хвоща полевого [11] и экстракты из них. В литературе имеются сведения об антиоксидантных свойствах экстрактов из травы хвоща полевого [12,13], однако это связывали с фенольными соединениями, а не с присутствием азуленов, которые не были

найжены у взрослого растения, в отличие от его спор [11], которые участвуют в размножении этого вида. Они являются одиночными клетками, содержащимися в спорофиллах и после прорастания дающими начало многоклеточному растению. Присутствие в спорах азуленов на начальном этапе размножения, возможно, важно для развития и сохранения формирующихся в дальнейшем цикле половых клеток растения. Обнаружение азуленов в микроспорах хвоща [11] дало основание рассмотреть эти структуры и как самостоятельное лекарственное средство.

МЕТОДЫ

Объекты исследований и условия их содержания. В работе использовали самок и самцов мышей линии C57/Bl в возрасте 5-7 месяцев. Мыши содержались в виварии ИБК РАН по 1-4 мыши в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью. В каждой экспериментальной группе исследовали 4-6 животных. Статистическая обработка данных по выживаемости мышей проводилась с помощью программы SigmaPlot 14. В качестве контролей служили мыши, принимающие чистую воду (интактный контроль) и облученные мыши, принимающие чистую воду (облученный контроль).

Ионизирующее излучение. Облучение мышей проводилось сотрудниками Группы источников излучений Института биофизики клетки РАН г. Пущино на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ 17), $I=15\text{мА}$, $U=200\text{кВ}$, с фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин. Мышей облучали в дозе 6,5 Гр.

Приготовление экстракта и суспензии микроспор хвоща. Микроспоры собирали на лугу в заказнике Луговой в окрестностях города Пущино Московской области весной в конце апреля- мае в течение 2021-2023 годов. 20 мг сухих спор хвоща разводили в 10 мл дистиллированной воды, настаивали 30 мин, а затем фильтровали. Отфильтрованную жидкость разводили в 300 мл водопроводной воды и использовали в качестве питья.

Осадок с фильтра заливали 5 мл 96% этилового спирта, настаивали 30 мин, затем фильтровали и также разводили отфильтрованную жидкость в 300 мл водопроводной воды и использовали в качестве питья.

Для исследования прохождения спор через ЖКТ мыши споры разводили в той же концентрации в водопроводной воде и использовали в качестве питья.

Приготовление раствора азулена. 40 мг препарата азулена (Sigma-Aldridge) растворяли в 1мл 96% этилового спирта, добавляли в 150 мл водопроводной воды и использовали в качестве питья.

Спектральные методы исследования клеток и экстрактов. Спектры поглощения клеток регистрировали с объектов непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США) и микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000 B*, вышеупомянутых конфокального микроскопа и микроспектрофотометра МСФ-15 с камерой *Levenhuk M300 Base* (Россия) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа *Leica TCS SP-5* (Германия-Австрия-США). Спектры поглощения интактных микроспор хвоща полевого *Equisetum arvense* L, были представлены как первая производная по методу Золотарева для выявления небольших максимумов в спектроскопии отражения [14,15]. В микроспектрофотометре/микроспектрофлуориметре МСФ-15, где имеется опция дифференцирования для выявления максимумов в спектрах поглощения. Спектры поглощения водных экстрактов и экстрактов 95 %

этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более) в 1- 0.5 см-кюветах регистрировали с помощью упомянутых выше спектрофотометров. Анализ экскрементов мышей после прохождения микроспор через пищеварительную систему проводили с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000B* (Германия). Все эксперименты проводили при комнатной температуре 20-22 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа использовали три типа препаратов: 1. Этанольные растворы искусственно синтезированного азулена. 2. Интактные микроспоры хвоща полевого, содержащие азулены, 3. Водные и этанольные экстракты из этих спор.

Спектральные характеристики используемых азулен-содержащих препаратов. Перед испытанием на мышах были проведены спектральные исследования природных азулен-содержащих препаратов. На рисунке 1 показаны спектры поглощения искусственного азулена, а также образцов природных источников азуленов, исследованных нами в работе. В этом качестве использовали интактные микроспоры хвоща полевого *Equisetum arvense* и этанольные экстракты из них, поскольку синие пигменты липофильны. Для контроля также были взяты водные экстракты микроспор хвоща. Спектры поглощения одиночной микроспоры хвоща представлены как первая производная по методу Золотарева для выявления небольших максимумов [14,15]. На поверхности микроспоры видны характерные для азуленов максимумы поглощения: небольшой пик 580 нм и главный – 610 нм, а также просвечивает небольшой пик хлорофилла 666 нм. В водном экстракте максимумов азуленов нет, они появляются только в этанольном экстракте. Это максимум 610 нм, свойственный азуленам с присоединенной фенольной группой [1]. Небольшой максимум хлорофилла 680 нм также присутствует.

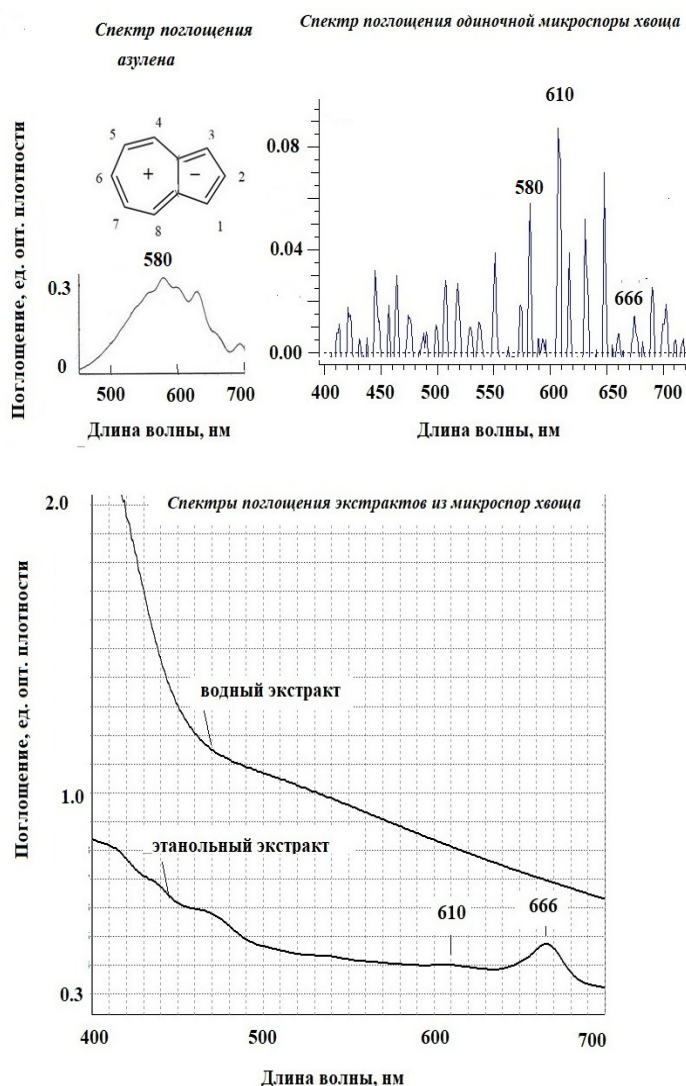


Рисунок 1. Спектры поглощения искусственного азулена, одиночной микроспоры хвоща полевого и экстрактов из этих микроспор

Для исследования влияния на организм мышей как модели млекопитающих, а также возможных радиопротекторных свойств природных азуленов мы использовали, добавляя в питьевую воду, интактные свежие микроспоры хвоща, водные и спиртовые экстракты из них.

Действие искусственного азулена, интактных микроспор хвоща и экстрактов из них на жизнеспособность мышей. Мы исследовали действие различных выше указанных азулен-содержащих препаратов на подопытных мышах при нормальном питьевом режиме. Поскольку искусственно синтезированный азулен имеет специфический запах, важно было оценить его токсичность в первую очередь. Мыши в данном эксперименте пили раствор (примерно 0,7 мг чистого азулена на мышь в сутки) в течение 2 месяцев. Оказалось, что за это время животные не потеряли в весе. Их вес составил $31,7 \pm 2,4$ г перед употреблением раствора азулена и $31,7 \pm 2,9$ г после 2 месяцев употребления азулена, а СПЖ данной группы животных составила $717,3 \pm 62,1$, что примерно на 10% превысила СПЖ контрольной группы животных ($590,3 \pm 32,0$).

Далее были проведены опыты по влиянию природных азулен-содержащих препаратов (табл. 1). В данной работе мы рассмотрели микроспоры хвоща полевого как природного транспортера азуленов по аналогии с публикациями по использованию спор лишайников для доставки лекарств в организм животных [8-11]. В работах [8,9] в качестве лекарственных носителей рассматривалась пыльца растений.

Таблица 1. Показатели СПЖ мышей в зависимости от употребляемого препарата

Препарат	СПЖ, сут
Вода (интактный контроль)	$552,2 \pm 72,3$
Суспензия микроспор	$518,6 \pm 23,6$
Водный экстракт	$515,3 \pm 49,8$
Спиртовой экстракт	$498,5 \pm 23,4$

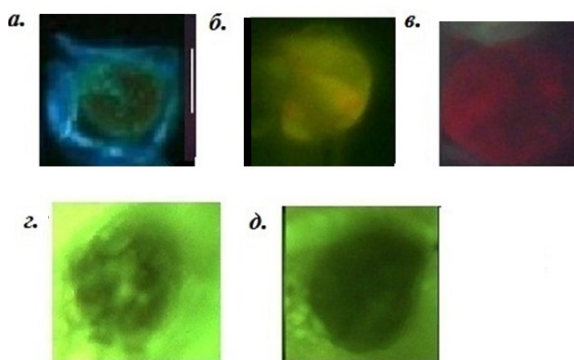


Рисунок 2. Автофлуоресценции микроспор хвоща до (а,б,в) при возбуждении светом соответственно 360, 415 и 515 нм до и после прохождения через желудочно-кишечный тракт мыши (г и д), возбуждение светом 360 нм). Масштаб 15 мкм

Приводились данные о капсулизации в пустые оболочки пыльцы специальных лекарственных препаратов [9]. Однако и сама пыльца, и одноклеточные микроспоры споровых растений, например, таких как хвощ полевой, могут являться природными носителями лекарственных соединений. В таблице 1 приводятся данные о влиянии на мышей как интактных микроспор хвоща, так и экстрактов из них.

В первой экспериментальной группе животных в течение двух месяцев мыши пили суспензию микроспор хвоща, из которых азулены освобождались в пищеварительном тракте животных. Каждая мышь выпивала по 3-4 мл суспензии в сутки. За животными наблюдали до их гибели и оценивали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных. СПЖ мышей в данной группе составила в среднем $518,6 \pm 25,6$ дней, что статистически не отличалась от контрольной группы животных ($552,2 \pm 72,3$). Общее состояние животных не ухудшилось, вес не изменился. Была проведена оценка усвояемости природных азуленов путем измерения автофлуоресценции экскрементов мышей при возбуждении светом различной длины волны (рис. 2) до эксперимента и через один и два месяца после начала приема суспензии. Интактные клетки микроспор хвоща могли флуоресцировать благодаря оболочке и внешним слоям экзины в голубой области спектра (а). После сброса оболочки, спора начинает развиваться, на что указывает появление хлорофилла в клетке (б и в). В таком виде споры проходят через желудочно-кишечный тракт мыши. Где они, как видно на рисунке 2 (г, д), теряют компоненты внешней оболочки, содержащие голубые пигменты. Оболочка уже четко не видна, и внутреннее содержимое слабо или почти не светится.

В другой экспериментальной группе мыши пили жидкость, содержащую водный или спиртовой экстракты спор хвоща (таблица 1), в объеме 3-4 мл на одно животное в сутки на протяжении 4 месяцев. За животными наблюдали до их гибели. Оценивали СПЖ животных и изменение их веса. Было показано, что что не происходило существенного изменения веса животных, употребляющих как водный, так и спиртовой экстракт микроспор хвоща. СПЖ этих животных статистически не отличалась от животных контрольной группы (таблица 1). Таким образом, было показано, что употребление как суспензии микроспор хвоща, так и водного и спиртового экстракта из них, а также раствора искусственного азулена, не имело негативного влияния на состояние (вес, качество шерсти, СПЖ) интактных животных.

Исследование радиопротекторных свойств азулен-содержащих препаратов. Как было ранее показано для пыльцевых клеток [4], азулены могут обладать радиопротекторными свойствами, что мы попытались оценить в опытах на мышах. В данном эксперименте, мыши пили как водные, так и спиртовые экстракты спор хвоща в течение 2 месяцев до и столько же после облучения в дозе 6,5 Гр (таблица 2). За животными наблюдали до их гибели. Оценивали СПЖ животных, изменение их веса, а также СВД (среднее время дожития) после облучения по сравнению с облученным контролем. Было обнаружено, что в группе животных, употреблявших спиртовой экстракт спор хвоща, снижение среднего веса после облучения было менее выраженным и составило минус $3,9 \pm 0,9$ по сравнению с группой животных, употребляющих водный экстракт спор хвоща (минус $7,0 \pm 2,9$). Также спиртовые экстракты микроспор хвоща обладали наиболее выраженным радиопротекторным действием. СВД животных после облучения в этой экспериментальной группе составило в среднем $142,3 \pm 38,4$ что было существенно выше по сравнению с облученным контролем (у него почти в два раза снижена СПЖ по сравнению с интактным контролем в таблице 1). На фоне облученного контроля, СВД и СПЖ у группы мышей, принимающих спиртовые экстракты из микроспор хвоща заметно выше (табл. 2).

Таблица 2. Показатели СВД и СПЖ облученных мышей в зависимости от употребляемого препарата

Препарат	СВД	СПЖ
Вода (облученный контроль)	$55,9 \pm 14,0$	$298,0 \pm 26,7$
Водный экстракт	$60,3 \pm 18,3$	$337,0 \pm 24,4$
Спиртовой экстракт	$142,3 \pm 38,4$	$387,5 \pm 32,3$

Для исследования радиопротекторных свойств искусственного азулена мышей поили его раствором (на одно животное в сутки примерно 3-4 мл жидкости, содержащей 0,4-0,6 мг искусственного азулена) в течение 2 месяцев, а затем облучали в дозе 6,5Гр. Как СПЖ, так и время дожития после облучения у мышей этой группы существенно не отличались от тех же показателей группы контрольных облученных мышей и превысили их примерно на 7%. Результаты этого эксперимента показали, что употребление раствора искусственного азулена в указанной концентрации не были токсичными для мышей и необходимы дальнейшие исследования использования его в качестве радиопротектора.

Таким образом, в работе было показано, что употребление как суспензии микроспор хвоща, так и водного и спиртового экстракта из них, а также раствора искусственного азулена, не имело негативного влияния на состояние (вес, качество шерсти, СПЖ) интактных животных. Что касается радиопротекторных свойств используемых препаратов, то таким эффектом обладал спиртовой экстракт микроспор хвоща. Мы связываем такой эффект с тем фактом, что при обработке спиртом из спор экстрагируются липофильные азулены, в отличие от водной экстракции, где азулены не выделяются. Отсутствие заметного радиопротекторного эффекта раствора искусственного азулена может свидетельствовать о том, что природные азулены, имеющие присоединенные боковые группы (в основном CH_2 , CH_3 и OH) лучше усваиваются организмом, например, хамазулен имеет три боковые группы – две CH_3 и одну $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$. Есть данные [16], что предпосевное гамма-облучение семян азулен-содержащего лекарственного растения *Matricaria recutita* приводит к усиленному образованию хамазулена в проростках. Это означает, что какое-либо радиационное повреждение, так или иначе стимулирует образование азуленов в растениях как защитных соединений, проявляющих антиоксидантное действие против образующихся активных форм кислорода. Необходимы дальнейшие детальные исследования (различные концентрации и схемы введения исследованных препаратов) для оптимизации их использования в качестве радиопротекторов. Следует также отметить возможное применение микроспор хвоща и спиртовых экстрактов из них в качестве натурального лечебно-профилактического средства, которое ранее не изучалось в фармакологии. Пока известен только искусственный синтез азуленов [18], которые еще в медицинские исследования не внедрены.

На основе проведенных исследований выдвинуто предположение, что антиоксидантные свойства азуленов позволяют предотвращать повреждающее действие активных форм кислорода, образующихся в обычной жизнедеятельности животных, так и в результате воздействия ионизирующей радиации. Возможная защитная роль азуленов будет полезна не только для лечения, но и профилактики повреждений. В основе защитного механизма предполагается антиоксидантная способность азуленов как сквенджеров свободных радикалов [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование азулен-содержащих препаратов, как искусственно синтезированного азулена, так и природных препаратов из растений (в наших опытах в виде интактных микроспор хвоща и спиртовых экстрактов из них) в питьевом режиме мышей не является токсичным для них, но положительно влияет на продолжительность жизни животных, подвергнутых радиоактивному облучению.

Список литературы / References:

1. Коновалов Д.А. Природные азулены. *Растительные ресурсы*, 1995, т. 31, № 1, с. 101-130 [Konovalov D.A. Natural azulenes. *Plant Resources*, 1995, vol. 31, no. 1, pp. 101-130 (In Russ.)].
2. Bakun P., Czarczynska-Goslinska B., Goslinski T., Lijewski S. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Med Chem Res*, 2021, vol. 30, no. 4, pp. 834-846, doi: 10.1007/s00044-021-02701-0.
3. Murfin L.C., Lewis S.E. Azulene - a Bright core for sensing and imaging. *Molecules*, 2021, vol. 266, no. 2, pp. 353-362, doi: 10.3390/molecules26020353.
4. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Гордон Р.Я., Коновалов Д.А., Кузин А.М. Исследование радиопротекторного действия проазуленов на хемосенсорной модели пыльцы *Hippeastrum hybridum*. *Доклады РАН*, 1998, т. 348, № 4, с. 548-551 [Roshchina V.V., Melnikova E.V., Gordon R.Ya., Konovalov D.A. Study of the radioprotective effect of proazulenes on a chemosensory model of pollen *Hippeastrum hybridum*. *Doklady of Russian Academy of Sciences*, 1998, vol. 348, no. 4, pp. 548-551 (In Russ.)].
5. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М., Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62 [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kunyev A.R., Soltani G.A., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. The presence of azulenes on the surface of plant cells as a test for sensitivity to ozone. *Biological Membranes*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 54-62, doi: 10.1007/s1990747822010081 (In Russ.)].
6. Roshchina V.V., Konovalov D.A. Single Cell Plant Model of *Equisetum arvense* for the Study Antihistamine Effects of Azulene and Sesquiterpene Lactones. *Future Pharmacology*, 2022, vol. 2, no. 2, pp. 126-134, doi: 10.3390/futurepharmacol2020010.
7. Amer M.S., Tawashi R. Drug loaded pollen grains with an outer coating for for pulsed delivery. U.S. Patent 5, 275, 819 a, 4 January 1994.
8. Diego-Taboada A., Beckett S., Atkin S., Mackenzie G. Hollow pollen shells to enhance drug delivery. *Pharmaceutics*, 2014, vol. 6, no. 16, pp. 80-96.

9. Elkerm Y., Tawashi R. Date palm pollen as a preventative intervention in radiation- and chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. *Integr Cancer Ther.*, 2014, vol. 13, no. 6, pp. 468-472, doi: 10.1177/ 15347354145 47110.
10. Roshchina V.V. *Fluorescence of Living Plant Cells for Phytomedicine Preparations*. Boca Raton: CRC Press, 2020, 212 p.
11. Рощина В.В., Мельникова Е.В., Яшин В.А., Карнаухов В.Н. Автофлуоресценция интактных спор хвоща *Equisetum arvense* L. в процессе их развития. *Биофизика*, 2002, т. 47, № 2, с. 318-324 [Roshchina V.V., Melnikova E.V., Yashin V.A., Karnaukhov V.N. Autofluorescence of intact spores of horsetail *Equisetum arvense* L. during their development. *Biophysics*, 2002, vol. 47, no. 2, pp. 318-324 (In Russ.)].
12. Cetojevic-Simin D.D., Canadanovic-Brunet J.M., Bogdanovic G.M., Djilas S.M., Cetkovic G.S., Tumbas V.T., Stojiljkovic B.T. Antioxidative and antiproliferative activities of different horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *Journal of medicinal food*, 2010, vol. 13, no. 2, pp. 452-459.
13. Canadanovic-Brunet J.M., Cetkovic G.S., Djilas S.M., Tumbas V.T., Savatovic S.S., Mandic A.I., Cvetkovic D.D. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *International journal of food science & technology*, 2009, vol. 2, pp. 269-278.
14. Золотарев В.М. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения. *Оптика и Спектроскопия*, 2012, т. 112, № 1, с. 150-154 [Zolotarev V.M. Application of differentiation in reflection spectroscopy. *Optics and Spectroscopy*, 2012, vol. 112, no. 1, pp. 150-154 (In Russ.)].
15. Рощина В.В., Яшин В.А., Куньев А.Р. Исследование спектральных характеристик поверхности растительной клетки: присутствие азуленов и биогенных аминов. *Биологические мембраны*, 2023, т. 40, № 5, с. 351-361 [Roshchina V.V., Yashin V.A., Kynyev A.R. Study of the Spectral Characteristics of the Plant Cell Surface: Occurrence of Azulenes and Biogenic Amines. *Biochemistry*, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2023, vol. 17, no. 4, pp. 276-285 (In Russ.)].
16. Рощина В.В., Куньев А.Р., Фатерыга В.В., Шовкун М.М. Применение микроспектрофлуориметра/ микроспектрофотометра для исследования поверхности растительных клеток. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 2, с. 137-142 [Roshchina, V.V., Kunyev A.R., Fateryga V.V., Shovkun M.M. Application of microspectrofluorimeter/ microspectrophotometer for the study of the surface of plant cells. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 2, pp. 137-142, doi: 10.29039/rusjbpc.2023.0600 (In Russ.)].
17. Селенина Л.В., Степаненко О.Г. Влияние предпосевного гамма-облучения на продуктивность *Matricaria recutita* L. и содержание действующих веществ в сырье. *Растительные ресурсы*, 1979, т. 15, с. 91-98 [Selenina L.V., Stepanenko O.G. The effect of pre-sowing gamma irradiation on the productivity of *Matricaria recutita* L. and the content of active substances in the raw materials. *Plant Resources*, 1979, vol. 15, pp. 91-98 (In Russ.)].
18. Shoji T., Ito S., Yasunami M. Synthesis of Azulene Derivatives from 2H-Cyclohepta[b]furan-2-ones as Starting Materials: Their Reactivity and Properties. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, pp. 1068-1106, doi: 10.3390/ijms221910686.

THE STUDY OF THE AZULENES' EFFECTS AS PROTECTIVE FACTORS ON THE MOUSE VITALITY

Roshchina V.V., Sergievich L.A.

Institute of Cell Biophysics, Federal Research Centre, Pushchino Scientific Centre for Biological Research of RAS
Institutskaya St., 3, Pushchino, Moscow Region, 142293, Russia; e-mail: roshchinavic@mail.ru

Received 07.08.2024

Abstract. The effects of azulene compounds on the vitality of whole mouse organisms were evaluated. For this aim, artificially synthesized azulene and carriers of natural azulenes as blue horsetail microspores were chosen. It has been shown that the inclusion in the drinking diet of the studied animals of artificial azulene solution (per animal per day about 3-4 ml of liquid containing 0.4-0.6 mg of artificial azulene from Sigma-Aldridge) or aqueous or ethanol extracts of horsetail microspores containing azulenes (extraction from 20 mg of single microspore cells) as natural azulene-containing source did not have a negative effect on the mice during the observation period. The animals did not lose weight, the mouse fur didn't get worse, the average life expectancy (ALS) did not differ from the control, and in the case of using artificial azulene, on average, 7 percent exceeded the ALS in the control. In addition to these extracts, intact horsetail microspores (single cells) were used for the same purpose, from which azulenes were released in the digestive tract of animals. In the case of radiation exposure of mice, ethanol extracts of horsetail microspores had the most pronounced radioprotective effect. The average survival time (AST) of animals after irradiation in this experimental group averaged 142.3 ± 38.4 , which was significantly higher compared with the irradiated control and the group of mice taking aqueous extracts of horsetail microspores (60.3 ± 18.3 and 55.9 ± 14.0 , respectively). It has been suggested that the antioxidant properties of azulenes make it possible to prevent the damaging effect of reactive oxygen species formed in the normal life of animals and as a result of exposure to ionizing radiation. The results obtained indicate the need for further detailed study of the protective properties of azulenes.

Key words: azulenes, azulene-containing extracts, horsetail microspores, ionizing radiation.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА НА МОДЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТОВ

Чжу О.П., Маринич И.И., Аравиашвили Д.Э., Агаджанова Н.Э.

Курчатовский комплекс медицинской приматологии

ул. Академика Лапина, 177, г. Сочи, 354340, РФ; e-mail: olga.chzhu@mail.ru

Поступила в редакцию 08.08.2024

Аннотация. Перекисная концепция развития патологических состояний и необходимость применения антиоксидантной терапии обоснованы при протекании большинства социально-значимых заболеваний. Перекисное окисление в пожилом и старческом возрасте приобретает особую значимость, поскольку до сих пор нет окончательно устоявшегося мнения по поводу динамики физиологического протекания перекисного окисления липидов у данной возрастной категории, критериев превращения перекисных реакций из нормальных в патогенные. Быстрота, точность, простота операций и высокая чувствительность физико-химических методов анализа позволяет контролировать патологический процесс на любой стадии, что особенно важно в медицинской практике. По причине анатомо-физиологического сходства приматы считаются лабораторными двойниками человека. В данной работе отрабатывали определения биомаркеров оксидативного стресса на приматах в динамике (на фоне воздействия эндогенного фактора (введение фармпрепарата) или развития патологического процесса). В качестве биомаркеров были выбраны: малоновый диальдегид, жирорастворимые витамины, супероксиддисмутаза, церулоплазмин в составе белковых фракций. Применение физико-химических методов позволило определить ряд биомаркеров окислительного стресса на приматах, т.к. несмотря на то, что приматы являются лучшими моделями человеческого организма, ряд физиологических процессов у них протекает с индивидуальными особенностями и не всегда могут отслеживаться классическими методами лабораторной диагностики. Полученные данные позволяют оценить возможность разработки систем экспресс индикаторов диагностики антиоксидантной защитной системы организма при возникновении, развитии и коррекции патологического состояния.

Ключевые слова: оксидативный стресс, биомаркеры, патологический процесс, физико-химические методы, приматы.

Перекисная концепция развития патологических состояний и необходимость применения антиоксидантной терапии обоснованы при протекании ряда заболеваний - сахарный диабет, зависимость от психоактивных веществ, посттравматические расстройства, опухолевый рост, ишемическая болезнь сердца, нарушения мозгового кровообращения и др. Применение антиоксидантов может внести вклад в более эффективную профилактику острых сосудистых катастроф в гериатрической практике.

Перекисное окисление в пожилом и старческом возрасте приобретает особую значимость, поскольку до сих пор нет окончательно устоявшегося мнения по поводу динамики физиологического протекания перекисного окисления липидов у данной возрастной категории, критериев превращения перекисных реакций из нормальных в патогенные. Важно не только установить роль процессов окисления липидов в патогенезе различных заболеваний у лиц пожилого и старческого возраста, но и установить наличие и выраженность антиоксидантной активности препаратов разных групп, которые применяются для их профилактики, лечения и реабилитации [1,2].

Выявление определенных особенностей взаиморегулирующего влияния процессов окисления и антиоксидантной системы организма может выступать критерием оценки и прогноза течения патологического процесса при эндогенной токсикации и корректировки лечебной тактики. Исходное нарушение равновесия между процессами перекисного окисления и состоянием антиоксидантной системы организма следует рассматривать как один из факторов риска осложнения течения заболевания и неблагоприятного исхода. В свою очередь правильная оценка и своевременная коррекция этих нарушений позволяет снизить частоту осложнений.

Быстрота, точность, простота операций и высокая чувствительность физико-химических методов анализа позволяет контролировать патологический процесс на любой стадии, что особенно важно в медицинской практике.

Биологические и биомедицинские исследования и медицинская практика на современном уровне требуют нестандартных аналитических решений. Это, в частности, диагностика заболеваний путем обнаружения и определения их биомаркеров в крови, моче, потовых выделениях, в тканях и выдыхаемом воздухе. На фоне известных, длительное время используемых для этой цели методов анализа появляются и новые. Физико-химические методы позволяют определять малое содержание компонентов в анализируемых объектах. Они снизили предел обнаружения до 10⁻⁵–10⁻¹⁰% (в зависимости от метода анализа). Физико-химические методы позволяют проводить анализ достаточно быстро. Экспрессность этих методов дает возможность корректировать технологический процесс. Инструментальные методы анализа позволяют автоматизировать сам процесс анализа, а некоторые приборы – проводить анализ на расстоянии. Анализ можно проводить с помощью физико-химических методов без разрушения анализируемого образца и в какой-то определенной точке.

Клиническая значимость биомаркеров окислительного стресса у людей должна быть доказана

многочисленными исследованиями и стандартизирована для каждого конкретного заболевания, они должны отражать состояние редокс-баланса в организме.

Для достоверной и адекватной клинической интерпретации полученных результатов принципиальное значение имеет не только абсолютная величина показателей, но и их динамика на фоне проведения лечебных мероприятий. Каждый из показателей имеет свои достоинства и недостатки, поэтому в данном случае важен комплексный подход. Основными требованиями, предъявляемыми к лабораторным методам, являются точность, простота выполнения и хорошая воспроизводимость [2].

По причине анатомо-физиологического сходства приматы считаются лабораторными двойниками человека. Данные, полученные в исследованиях на приматах, с минимальной коррекцией можно экстраполировать на людей. Области использования обезьян в медико-биологических исследованиях очень широки – это психология, психиатрия, космическая физиология, физиология и патология старения, психофармакология, эндокринология, эмбриология, тератология, генетика, экспериментальная онкология, иммунология и иммунопатология и др. Приматы используются в фундаментальных исследованиях по изучению функции головного мозга. Многочисленные исследования, выполненные на обезьянах, помогли понять дисфункцию головного мозга, способствовали определению стратегий, способов и схем лечения патологий и травм у пациентов. Обезьяны могут быть ключевой тест-системой в исследованиях, направленных на изучение препаратов для терапии болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера или рассеянного склероза, одним из ключевых моментов возникновения, которых в настоящее время считается оксидативный стресс. При этом несмотря на то, что приматы являются лучшими моделями человеческого организма, ряд физиологических процессов у них протекает с индивидуальными особенностями. Поэтому референсные значения, в том числе и окислительно-восстановительных реакций, отличаются от человека и не определяются классическими методами.

В данной работе отрабатывали определения биомаркеров оксидативного стресса на приматах в динамике (на фоне воздействия эндогенного фактора (введение фармпрепарата) или развития патологического процесса).

В качестве биомаркеров были выбраны:

1. Малоновый диальдегид (МДА) – продукт конечного окисления липидов. Метод определения - ВЭЖХ с градиентным режимом. Метод позволил зафиксировать статистически значимые изменения показателей по группам, что оказалось невозможно сделать классическим ИФА. Исследование проводили с использованием хроматографа типа «1100 Series» фирмы Agilent с диодно-матричным детектором. Для обнаружения МДА проводили дериватизацию с использованием тиобарбитуровой кислоты. Продуктом реакции является триметиновый комплекс, имеющий характерную розовую окраску с $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$ [2].

2. Жирорастворимые витамины Е, А – неферментативные компоненты антиоксидантной системы организма. Метод определения - ВЭЖХ с градиентным режимом. Идентификацию жирорастворимых витаминов А и Е осуществляли по времени удержания и спектру, регистрируемому с помощью с диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200-400 нм. Применение метода ВЭЖХ позволило проводить определение одновременно из одной пробы [2].

3. Супероксиддисмутаза (СОД) - ферментативный компонент антиоксидантной системы организма. Метод определения – спектрофотометрический метод в гемолизате по методике ингибирования реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД, вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления и одновременным участником его последующих стадий. Об интенсивности аутоокисления адреналина судят по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, и опережающим по времени образованием адrenoхрома (с максимумом поглощения при 480 нм).

4. Церулоплазмин (ферроксидаз, содержащая медь) - ферментативный компонент антиоксидантной системы организма. Метод определения – биоакустический метод (косвенно в составе белковых фракций альфа два глобулинов). Метод базируется на измерении скорости УЗ в сыворотке и в модифицированной сыворотке крови (не содержит β - и γ -глобулины), полученной воздействием на сыворотку водными растворами (трихлоруксусной кислоты ~6% и пищевой соды ~2%). Белковые фракции дают аддитивный вклад в относительные изменения скорости ультразвука в сыворотке и модифицированной сыворотке.

Методы отрабатывали на фоне внутримышечного и внутривенного введения иммуномоделирующего и антиоксидантного препарата в группе приматов в возрасте от 75 до 100 лет (рис. 1); при оценке и коррекции состояния организма фармакологически активными веществами у приматов в возрасте от 25 до 45 лет, участвующих в эксперименте по моделированию алкогольной зависимости; при оценке состояния антиоксидантной защиты организма у приматов в возрасте от 25 до 45 лет, участвующих в эксперименте по моделированию развития патологического процесса гепатита Е.

В группе возрастных приматов независимо от способа введения препарата наблюдалось выраженное снижение концентрации МДА в плазме крови (рис. 1). До введения препарата среднее значение МДА по группам составило: экспериментальная – $(0,61 \pm 0,10)$ мкмоль/л, контрольная – $(0,52 \pm 0,15)$ мкмоль/л. После прекращения введения препарата на 40 день эксперимента среднее значение концентрации МДА в экспериментальной группе составило $(0,25 \pm 0,10)$ мкмоль/л, в контрольной – $(0,55 \pm 0,10)$ мкмоль/л.

Это позволяет предположить снижение активности процессов перекисного окисления и активизацию антиоксидантной защиты организма, что особенно важно у возрастных особей.

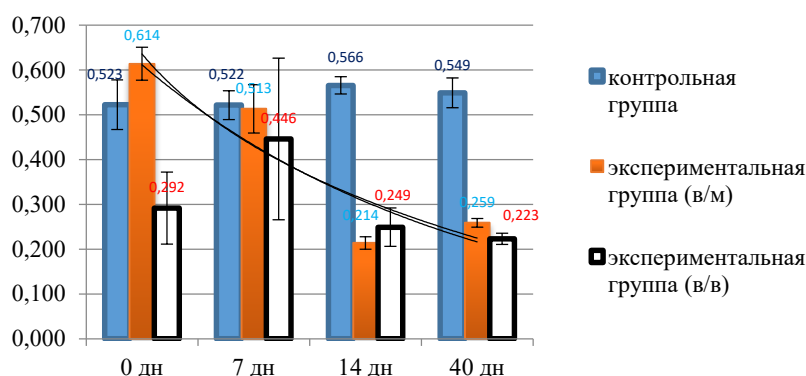


Рисунок 1. Динамика изменения средних значений концентрации МДА на фоне введения препарата в группе пожилых животных (мкмоль/л)

Наблюдение за группой проводилось в течение года, при этом стоит отметить сохранение низких показателей индикатора оксидативного стресса.

При внутривенном введении препарата в течение первых дней наблюдалось увеличение концентрации МДА, что может быть связано либо со способом введения, либо эффектом активации рецепторов, ответственных за механизмы взаимодействия с препаратом.

Особенностью механизма действия препарата можно считать выравнивание показателя оксидативного стресса по всей группе до статистически близких значений через месяц после прекращения введения субстанции независимо от состояния исходного окислительно-восстановительного фона особей, индивидуальных особенностей, различий в возрасте.

До введения препарата среднее значение концентрации витамина Е (рис. 2) составляло в экспериментальной группе ($2,20 \pm 0,49$) мкг/мл, в контрольной группе – ($2,34 \pm 0,34$) мкг/мл. После прекращения введения препарата на 40 день эксперимента среднее значение концентрации витамина Е в экспериментальной группе составило ($3,30 \pm 0,30$) мкг/мл, в контрольной – ($2,11 \pm 0,42$) мкг/мл. Введение препарата сопровождалось увеличением концентрации витамина Е в плазме крови экспериментальных животных, что возможно связано с снижением активности процессов перекисного окисления под действием исследуемого препарата, за счет чего происходит увеличение уровня витамина Е, как одного из основных компонентов антиоксидантной защиты организма.

Метод ВЭЖХ позволил достаточно точно и с хорошей воспроизводимостью определить концентрации МДА и жирорастворимых витаминов в крови приматов, что невозможно было сделать методами иммуноферментного анализа.

При введении препарата с антиоксидантным действием в группе приматов с нарушениями ферментативной активности печени активность СОД в эритроцитах статистически значимо увеличивается от ($4041,95 \pm 450,12$) усл.ед./мин/г до ($6998,56 \pm 830,00$) усл.ед./мин/г и сохраняется в течение двух недель после отмены препарата, снижаясь затем до исходного значения.

Результаты оценки содержания общего белка и белковых фракций приведены в рис. 4. Следует отметить снижение общего белка на 7 сутки опыта и значимое повышение на 56 сутки. Изменение белковых фракций в течение опыта наблюдали с 14 дня сопровождается увеличением доли альфа 2 глобулинов. Фракция альфа2-глобулинов преимущественно включает острофазовые белки — церулоплазмин а также альфа2-макроглобулин, гаптоглобин.

В группе приматов в возрасте от 20 до 45 лет, инфицированных гепатитом, наблюдалась корреляция между ростом МДА в сыворотке крови, биохимическим показателями и появлением антител. Следует отметить, что рост МДА происходил на неделю раньше, чем изменение классических биохимических маркеров,

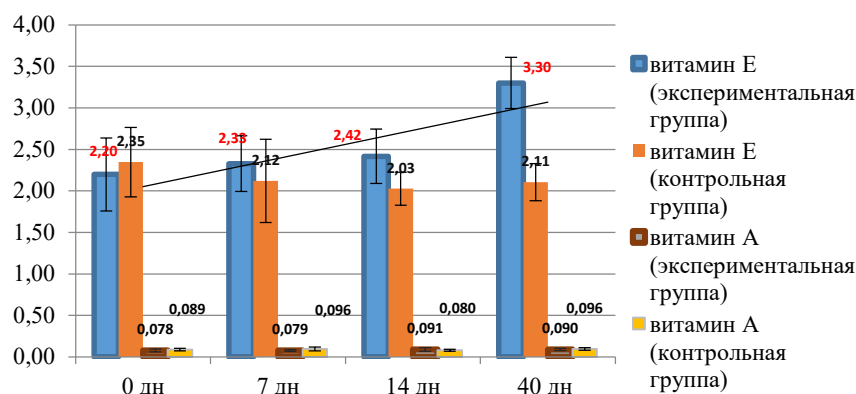


Рисунок 2. Динамика изменения средних значений концентрации жирорастворимых витаминов на фоне введения препарата в группе пожилых животных (мкг/мл)

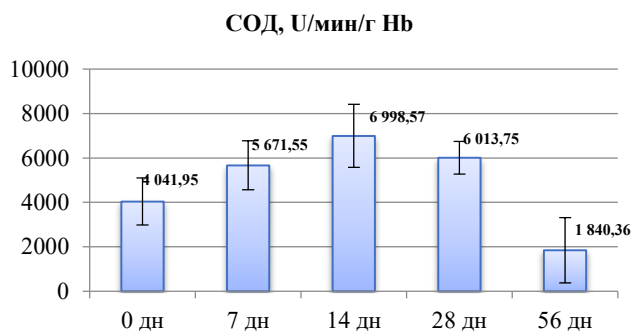


Рисунок 3. Динамика изменения средних значений активности СОД на фоне введения препарата в группе экспериментальных животных (U/мин/г Нб)

сопровождающих инфицирование. Концентрация МДА менялась с 0,17 мкмоль/л на первой неделе эксперимента до 0,42 мкмоль/л на третьей неделе, достигая максимума на 0,70 мкмоль/л на четвертой неделе с последующим снижением до исходных значений. Появление первых антител зафиксировано только на четвертой неделе эксперимента.

Полученные данные позволяют оценить возможность разработки систем экспресс индикаторов диагностики антиоксидантной защитной системы организма при возникновении, развитии и коррекции патологического состояния.

Применение физико-химических методов позволило определить ряд биомаркеров окислительного стресса на приматах, т.к. несмотря на то, что приматы являются лучшими моделями человеческого организма, ряд физиологических процессов у них протекает с индивидуальными особенностями и не всегда могут отслеживаться классическими методами лабораторной диагностики. Кроме того, проведенные исследования позволили показать взаимосвязь между рассмотренными в работе показателями оксидативного стресса и возможностью их применения в качестве биомаркеров ранней диагностики, в частности, по концентрации малонового диальдегида может выступать в качестве маркера ранней диагностики патологических процессов в печени.

Список литературы / References:

1. Харитонов Т.В. *Коррекция нарушений антиоксидантной защиты у лиц пожилого и старческого возраста с артериальной гипертензией*: диссертация кандидата медицинских наук. Санкт-Петербург, 2009, 123 с. [Kharitonova T.V. *Correction of antioxidant protection disorders in elderly and senile persons with arterial hypertension: dissertation PhD. in medical sciences*. St. Petersburg, 2009, 123 p. (In Russ.)].
2. Чжу О.П., Аравияшвили Д.Э., Руденко Н.С., Орлов С.В. Оценка интенсивности свободно-радикальных процессов по изменению концентрации малонового диальдегида при различных способах парентерального введения люминола натрия. *Медико-фармацевтический журнал "Пuls"*, 2023, т. 25, № 4, с. 127-133 [Chzhu O.P., Araviashvili D.E., Rudenko N.S., Orlov S.V. Assessment of the intensity of free radical processes by changing the concentration of malonic dialdehyde in various methods of parenteral drug treatments of sodium luminol. *Medical & pharmaceutical journal "Pulse"*, 2023, vol. 25, no. 4, pp. 127-133 (In Russ.)].

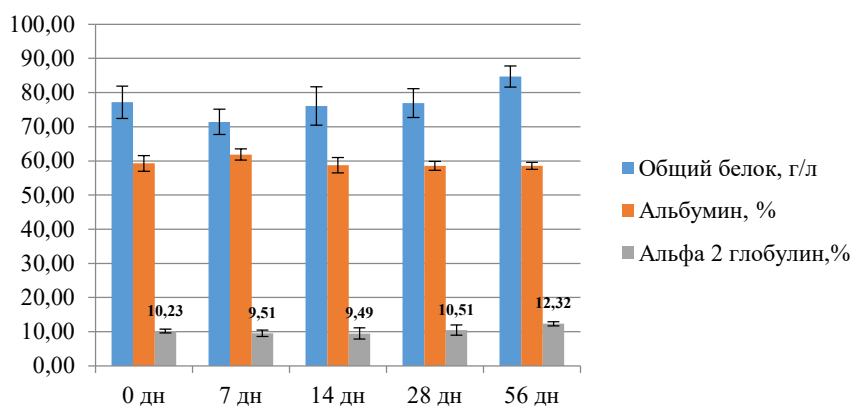


Рисунок 4. Динамика изменения средних значений белковых фракций на фоне введения препарата в группе экспериментальных животных

PHYSICOCHEMICAL METHODS OF DETERMINATION OF OXIDATIVE STRESS INDICATORS AT THE OCCURRENCE AND DEVELOPMENT OF PATHOLOGICAL PROCESS ON THE MODEL OF LABORATORY PRIMATES

Chzhu O.P., Marinich I.I., Aravishvili D.E., Agadzhanova N.E.

Kurchatov complex of medical primatology, Kurchatov Medical Primatology Complex

Akademika Lapin St., 177, Sochi, 354340, Russia; e-mail: olga.chzhu@mail.ru.

Received 08.08.2024

Abstract. The peroxide concept of the development of pathological conditions and the necessity of antioxidant therapy are justified in the course of most socially significant diseases. Peroxidation in the elderly and senile age acquires special significance, since there is still no definitively settled opinion on the dynamics of physiological course of lipid peroxidation in this age category, criteria of transformation of peroxidative reactions from normal to pathogenic. Quickness, accuracy, simplicity of operations and high sensitivity of physico-chemical methods of analysis allows controlling the pathological process at any stage, which is especially important in medical practice. Because of anatomo-physiological similarity primates are considered as laboratory twins of humans. In this work we worked out the determination of oxidative stress biomarkers on primates in dynamics (against the background of endogenous factor exposure (pharmacological drug administration) or pathological process development). The following biomarkers were selected as biomarkers: malonyl dialdehyde, fattyrate-extractable vitamins, superoxide dismutase, ceruloplasmin in protein fractions. Application of physicochemical methods allowed us to determine a number of biomarkers of oxidative stress in primates, because despite the fact that primates are the best models of the human organism, a number of physiological processes in them proceed with individual peculiarities and cannot always be monitored by classical methods. The obtained data allow us to evaluate the possibility of developing systems of express indicators of diagnostics of antioxidant defence system of the organism at occurrence, development and correction of pathological condition.

Key words: *oxidative stress, biomarkers, pathological process, physicochemical methods, primates.*

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ НА АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОПОЭЗА В ТИМУСЕ

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

НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»

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

Поступила в редакцию 08.08.2024

Аннотация. Тимус – центральный орган иммунной системы. Особенностью тимуса является его ранняя возрастная инволюция, которая начинается после полового созревания. Разработка методов замедления темпов инволюции тимуса является очень актуальной проблемой. Поскольку биохимические реакции с участием протия и дейтерия протекают с разной скоростью, замещение протия дейтерием в химических веществах значительно увеличивает энергию разрыва связи и замедляет относительную скорость химических реакций. Эти свойства дейтерированных и обедненных дейтерием веществ дают основание рассматривать баланс изотопов водорода как предполагаемый регулятор метаболических и физиологических процессов. Целью работы было изучение влияния кратковременного и длительного снижения концентрации дейтерия в организме на активность лимфоцитопоэза в тимусе у крыс. Эксперимент выполнен на 24 половозрелых самцах крыс линии Вистар массой тела 320-370 г. Для снижения содержания дейтерия в организме крысам опытной группы (n=12) давали воду с концентрацией дейтерия 10ppm. Результаты исследования показали, что морфогенетические процессы, обеспечивающие тимопоэз, чувствительны к содержанию дейтерия в крови и твердых тканях. При кратковременном снижении концентрации дейтерия в организме отмечалось изменение субпопуляционного состава лимфоцитов в тимусе, однако при длительном снижении соотношение Т-цитотоксических и Т-хелперов вернулось к контрольным значениям, а, следовательно, снижение содержания дейтерия в организме не вызывает существенных изменений баланса Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов. При этом увеличение количества тимобластов и более высокие показатели тимопоэза при длительном снижении концентрации дейтерия в организме говорят о замедлении темпов возрастной инволюции тимуса.

Ключевые слова: стабильные изотопы, дейтерий, протий, тимус, иммунная система.

ВВЕДЕНИЕ

Тимус и красный костный мозг являются центральными органами лимфоцитопоэза. Функция тимуса уникальна, так как другие органы иммунной системы не способны вырабатывать Т-лимфоциты. Т-клетки происходят от ранних предшественников костного мозга, которые мигрируют в тимус. Тимус обеспечивает пролиферацию, дифференцировку, отбор и миграцию зрелых Т-клеток в кровотоки и периферические органы иммунитета [1]. Т-клетки распознают бактериальные, вирусные и опухолевые антигены и поддерживают иммунологическую память и самотолерантность. Они осуществляют адаптивные иммунные реакции и регулируют их интенсивность на протяжении всей жизни. Поэтому поддержание и стимуляция обновления клеток в тимусе привлекли интерес многих исследователей. Помимо своей уникальной функции, тимус обладает физиологическими характеристиками, которые делают его более уязвимой частью иммунной системы, чем костный мозг и вторичные лимфоидные органы. Особенностью тимуса является его ранняя возрастная инволюция, которая начинается после полового созревания [2]. Известно, что помимо возрастных изменений, тимус подвергается инволюции в ответ на стресс, инфекцию, негативные факторы окружающей среды, лучевую терапию и химиотерапию [3-5]. Все эти негативные факторы, приводят к иммуностарению, воспалению и нарушению Т-клеточного иммунитета [6]. Было показано, что тимус восстанавливается после травмы, но его регенеративная способность также зависит от возраста [7,8]. Новые методы восстановления тимуса, такие как трансплантация предшественников Т-клеток, трансплантация ткани тимуса, а также органа целиком, считаются не всегда эффективными, дорогостоящими и трудоемкими методами [9,10]. Альтернативные стратегии включают гормональную и цитокиновую терапию, которые также имеют ограничения [11,12]. Разработка методов замедления инволюции тимуса является очень актуальной проблемой.

Дейтерий, стабильный изотоп водорода, в изобилии встречается в живой природе. Поскольку биохимические реакции с участием протия и дейтерия протекают с разной скоростью, замещение протия дейтерием в химических веществах значительно увеличивает энергию разрыва связи и замедляет относительную скорость химических реакций [13]. Эти свойства дейтерированных и обедненных дейтерием веществ дают основание рассматривать баланс изотопов водорода как предполагаемый регулятор метаболических и физиологических процессов.

Целью работы было изучение влияния кратковременного и длительного снижения концентрации дейтерия в организме на активность лимфоцитопоэза в тимусе у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент был выполнен на половозрелых самцах крыс породы Вистар ($n=24$) массой 320–370 г. Крысы контрольной группы потребляли воду ($n=12$) со стандартным для питьевой воды содержанием дейтерия $[D]=150$ ppm. Крысы опытной группы ($n=12$) потребляли воду с пониженным содержанием дейтерия $[D]=10$ ppm (ИП Селиваненко) *ad libitum*. Для определения содержания дейтерия в воде использовали изотопный анализатор T-LWIA-45-EP (LOS Gatos Research, Inc.) с точностью до 1 ppm. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила через 3 и 28 суток. Измеряли массу тела до и после эксперимента. Тимус взвешивали на аналитических весах («Сартогосм») и рассчитывали относительную массу органа. Для получения культуры клеток для цитофлюорометрического исследования тимус гомогенизировали в среде RPMI 1640 и отделяли клетки от стромы путём продавливания через сетки с диаметром 40 мкм. Клеточную взвесь дважды отмывали путём центрифугирования в течение 5 мин при 1000 об/мин в среде RPMI 1640. Проводили цитофлюорометрическое исследование лимфоцитов тимуса с использованием антител к CD3, CD4, CD8, конъюгированных с флюорохромами (eBioscience). После 30 минутной инкубации отмывали дважды. Для исследования использовали проточный цитофлюориметр FC500 (Beckman Coulter). Определяли процентное соотношение CD3-позитивных клеток, включая трипозитивные (CD3+CD4+CD8+) и монопозитивные (CD3+CD4-CD8+ и CD3+CD4+CD8-) клетки, а также дубль-позитивные (CD4+CD8+) и дубль-негативные (CD4-CD8-) лимфоциты. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.). Количественные данные, имеющие нормальное распределение, описывали средним значением и ошибкой среднего ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали тест Манна-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Проведенное исследование показало, что потребление воды, обедненной дейтерием, не вызывало выраженных физиологических изменений у крыс, но существенно изменяло морфогенетические процессы в тимусе. Оценка массы тела и количества потребляемой воды показала, что снижение концентрации дейтерия в организме не влияет на скорость метаболизма. Опытные и контрольные крысы не имели существенных отличий по массе тела. Была определена абсолютная и относительная масса тимуса у контрольных и опытных крыс через 3 и 28 суток после начала эксперимента. Статистически значимых различий в значениях массы тимуса также не отмечалось.

Исследование фенотипа тимоцитов крыс контрольной группы показало, что большинство клеток представляют собой дубль-позитивные клетки, экспрессирующие молекулы CD4 и CD8. Значительно в меньшей степени были представлены CD3-позитивные клетки, среди которых Т-цитотоксические (CD3+CD4-CD8+) составляли около четверти, Т-хелперы (CD3+CD4+CD8-) приблизительно две трети, остальные приходились на трипозитивные клетки (CD3+CD4+CD8+). Дубль-негативные клетки (CD4-CD8-) представляли собой самую маленькую субпопуляцию лимфоцитов тимуса.

Через 3 суток после начала эксперимента у крыс, потреблявших обедненную дейтерием воду, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации дубль-негативных клеток-предшественников тимоцитов, а также высокодифференцированных CD3+ тимоцитов, которое достигалось за счет снижения процентного содержания Т-цитотоксических лимфоцитов. Концентрация Т-хелперов при этом осталась на уровне контрольных значений. Также было отмечено увеличение концентрации дубль-позитивных (CD4+CD8+) клеток (рис. 1а). Количество CD3+ лимфоцитов в крови не изменилось по сравнению с контрольными значениями (рис. 2).

Через 28 суток после начала эксперимента у крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, количество Т-клеток в тимусе соответствовало контрольным значениям. При этом, их концентрация в крови оказалась значительно выше, чем у крыс контрольной группы (рис. 2). Это свидетельствует об усиленной эмиграции зрелых Т-лимфоцитов из тимуса на этом сроке исследования. Количество низкодифференцированных клеток в тимусе превышало значения контрольной группы более чем в три раза (рис. 1б). Скорость дифференцировки низкодифференцированных клеток в дубль-позитивные клетки соответствовала нормальным значениям. Эти показатели свидетельствуют об активации пролиферации предшественников Т-клеток. Также наблюдалось восстановление баланса между Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами в тимусе по сравнению с предыдущим сроком исследования.

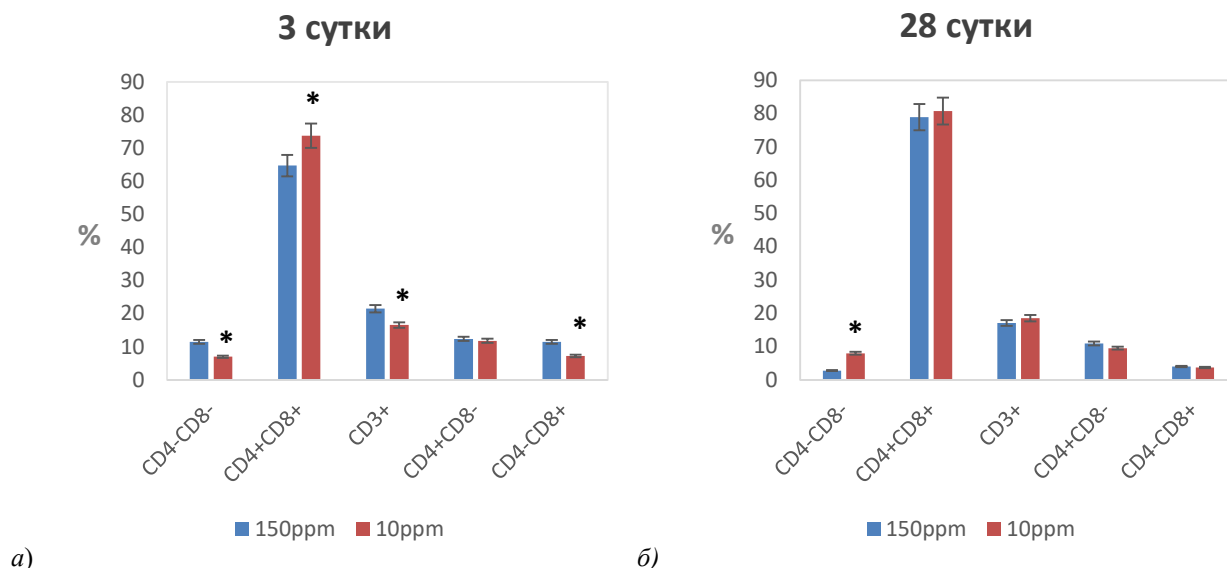


Рисунок 1. Концентрация высокодифференцированных, дифференцирующихся и недифференцированных лимфоцитов в тимусе контрольной группы и группы крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия [D]=10ppm через 3(а) и 28 (б) суток. Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что снижение поступления дейтерия в организм вызывает существенные изменения скорости морфогенетических процессов в тимусе. Через 3 суток потребления крысами воды с пониженным содержанием дейтерия, отмечены изменения количества субпопуляций лимфоцитов в тимусе, которые указывают на ингибирование продукции Т-клеток, что, скорее всего, является причиной функционального истощения и истощения раннего пула клеток-предшественников после отмеченного нами в более ранних исследованиях резкого увеличения морфогенетической активности в тимусе через сутки после снижения уровня дейтерия в организме [14]. Как и в первый день исследования, ингибирование дифференцировки субпопуляций Т-клеток также отличалось. Подавление дифференцировки затрагивало преимущественно Т-цитотоксические лимфоциты.

Восстановление количества недифференцированных клеток и их активная дифференцировка в тимусе после 28 суток воздействия, когда изменение концентрации дейтерия происходит не только в крови, но и в тканях, показывает, что созревание Т-клеток является дейтерийзависимым процессом. Известно, что восстановление дейтерия оказывает антиоксидантное действие на клетки и повышает их чувствительность к гипоксии [15]. Это важный фактор повышения выживаемости клеток. Однако данный факт не объясняет, почему отмечается ускорение процессов дифференциации тимоцитов. Вероятным объяснением активации синтеза корцепторов CD3, CD4 и CD8 в тимоцитах может быть усиление транскрипции соответствующих генов, обусловленное

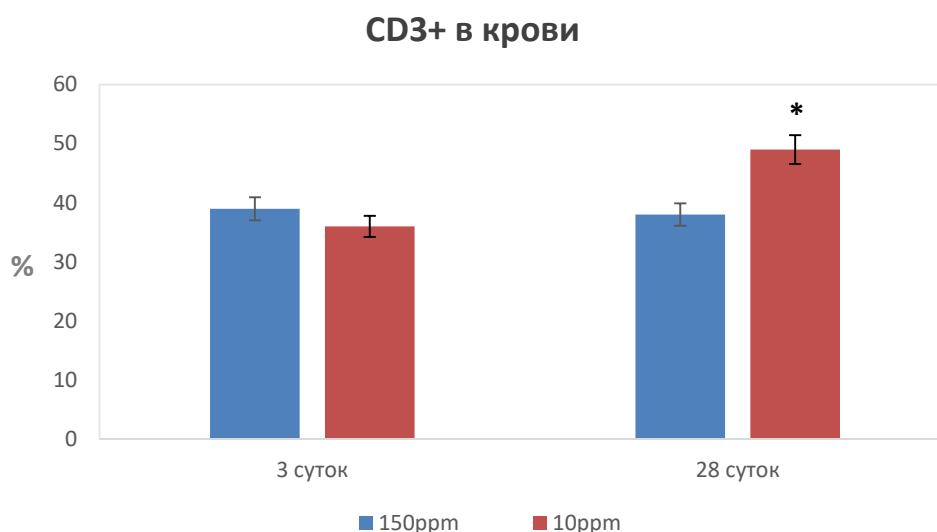


Рисунок 2. Концентрация CD3+ лимфоцитов в крови крыс контрольной группы и группы крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия [D]=10ppm через 3 и 28 суток. Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы

изменением числа открытых состояний в молекуле ДНК. В ряде исследований отмечалось, что формирование открытых состояний ДНК отвечает за «узнавание» точки начала транскрипции и, соответственно, сокращается временной промежуток связывания фермента с его специфическим сайтом [16,17]. Было показано, что снижение содержания дейтерия и замена дейтерия на протий в молекуле ДНК снижает энергию разрыва комплементарных водородных связей между парами оснований, то есть способствует увеличению числа открытых состояний в генах [18]. Такие изменения в структуре клеточной ДНК можно рассматривать как фактор, повышающий возможность транскрипции генов и активации дыхания в клетках, а также фактор, способствующий усилению энергообеспечения процессов трансляции мРНК и синтеза белка. В нашем предыдущем исследовании мы обнаружили значительный стимулирующий эффект кратковременного потребления воды, обедненной дейтерием, на секрецию гормонов щитовидной железы, которые, как известно, способствуют дифференцировке лимфоцитов тимуса [19]. Эти данные позволяют рассматривать тиреоидные гормоны как дополнительный механизм активации дифференцировки Т-клеток.

ВЫВОДЫ

Морфогенетические процессы, обеспечивающие тимопоэз, чувствительны к содержанию дейтерия в крови и твердых тканях. При кратковременном снижении концентрации дейтерия в организме отмечалось изменение субпопуляционного состава лимфоцитов в тимусе, однако при длительном снижении соотношение Т-цитотоксических и Т-хелперов вернулось к контрольным значениям, а, следовательно, снижение содержания дейтерия в организме не вызывает существенных изменений баланса Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов. При этом увеличение количества тимобластов и более высокие показатели тимопоэза при длительном снижении концентрации дейтерия в организме говорят о замедлении темпов возрастной инволюции тимуса.

Исследование выполнено по госзаданию FGFZ-2022-0035.

Список литературы / References:

1. Martins V.C., Ruggiero E., Schlenner S.M., Madan V., Schmidt M., Fink P.J., von Kalle C., Rodewald H.R. Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *J. Exp. Med.*, 2012, vol. 209, pp. 1409-1417.
2. Hale J.S., Boursalian T.E., Turk G.L., Fink P.J. Thymic output in aged mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, pp. 8447-8852.
3. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Effects of low-dose dichlorodiphenyltrichloroethane on the morphology and function of rat thymus. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, vol. 155, pp. 701-704.
4. Obernikhin S.S., Yaglova N.V. Morphological and functional changes in the thymus and spleen of mouse offspring in the development of systemic inflammatory response after a single immunity stimulation in early pregnancy. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, vol. 157, pp. 812-815.
5. Duah M., Li L., Sen J., Lan Q., Pan B., Xu K. Thymus Degeneration and Regeneration. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12, p. 706244.
6. Thomas R., Wang W., Su D.M. Contributions of Age-Related Thymic Involution to Immunosenescence and Inflammaging. *Immun. Ageing*, 2020, vol. 17, no. 2.
7. Kinsella S., Dudakov J.A. When the Damage Is Done: Injury and Repair in Thymus Function. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11, no. 1745.
8. Sunaoshi M., Blyth B.J., Shang Y., Tsuruoka C., Morioka T., Shinagawa M., Ogawa M., Shimada Y., Tachibana A., Iizuka D. et al. Post-Irradiation Thymic Regeneration in B6C3F1 Mice Is Age Dependent and Modulated by Activation of the PI3K-AKT-mTOR Pathway. *Biology*, 2022, vol. 11, no. 449.
9. Kreins A.Y., Graham Davies E. Replacing Defective Thymus Function. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, vol. 20, pp. 541-548.
10. Gaudeaux P., Moirangthem R.D., Bauquet A., Simons L., Joshi A., Cavazzana M., Negre O., Soheili S., Andre I. T-Cell Progenitors as a new immunotherapy to bypass hurdles of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13, p. 956919.
11. Bodart G., Farhat K., Renard-Charlet C., Becker G., Plenevaux A., Salvatori R., Geenen V., Martens H. The severe deficiency of the somatotrope GH-releasing hormone/Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor 1 axis of Ghrh-/- mice is associated with an important splenic atrophy and relative B lymphopenia. *Front. Endocrinol.*, 2018, vol. 9, p. 296.
12. Shang L., Duah M., Xu Y., Liang Y., Wang D., Xia F., Li L., Sun Z., Yan Z., Xu K. et al. Dynamic of plasma IL-22 level is an indicator of thymic output after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Life Sci.*, 2021, vol. 265, p. 118849.
13. Jancso G. *Isotope effects*. In Handbook of Nuclear Chemistry, Vertes A., Nagy S., Klencsar Z., Eds. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2013, vol. 2, pp. 85-116.
14. Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Способ быстрой активации лимфоцитопоэза в тимусе. *Актуальная биотехнология*, 2022, № 1, с. 244-246 [Obernikhin S.S., Yaglova N.V., Nazimova S.V., Timokhina E.P., Yaglov V.V. A method for rapid activation of lymphocytopoiesis in the thymus. *Current biotechnology*, 2022, no. 1, pp. 244-246 (In Russ.)].

15. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., Butina E., Baryshev M., Malyshko V., Moiseev A., Elkina A., Dzhimak S. Reduction of deuterium level supports resistance of neurons to glucose deprivation and hypoxia: Study in cultures of neurons and on animals. *Molecules*, 2022, vol. 27, p. 243.
16. Sulaiman A., Zen F.P., Alatas H., Handoko L.T. Dynamics of DNA breathing in the Peyrard–Bishop model with damping and external force. *Phys. D Nonlinear Phenom.*, 2012, vol. 241, pp. 1640-1647.
17. Nikitiuk A.S., Bayandin Y.V., Naimark O.B. Statistical thermodynamics of DNA with open states. *Phys. A Stat. Mech. Appl.*, 2022, vol. 607, p. 128156.
18. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single 2H/1H replacement in DNA. *Molecules*, 2020, vol. 25, p. 3753.
19. 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.

THE EFFECT OF CHANGED DEUTERIUM BODY CONCENTRATION ON THE ACTIVITY OF LYMPHOCYTOPOIESIS IN THE THYMUS

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

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”

Abrikosovskiy side-street, 2, Moscow, 119991, Russia, e-mail: rodich_k@mail.ru

Received 08.08.2024

Abstract. The thymus and red bone marrow are the central organs of lymphocytopoiesis. A feature of the thymus is its early age-related involution, which begins after puberty. The development of methods for slowing down the rate of thymus involution is a very urgent problem. Since biochemical reactions involving protium and deuterium occur at different rates, the substitution of protium by deuterium in chemicals significantly increases the bond rupture energy and slows down the relative rate of chemical reactions. These properties of deuterated and deuterium-depleted substances give grounds to consider the balance of hydrogen isotopes as a putative regulator of metabolic and physiological processes. The aim of the work was to study the effect of short-term and long-term decrease in deuterium concentration in the body on the activity of lymphocytopoiesis in the thymus in rats. The experiment was performed on 24 mature male Wistar rats weighing 320-370 g. To reduce the deuterium content in the body, the rats of the experimental group (n=12) were given water with a deuterium concentration of 10 ppm. The results of the study showed that the morphogenetic processes that ensure thymopoiesis are sensitive to the deuterium content in the blood and solid tissues. With a short-term decrease in the concentration of deuterium in the body, a change in the subpopulation composition of lymphocytes in the thymus was noted, however, with a long-term decrease, the ratio of T-cytotoxic and T-helpers returned to control values, and, therefore, a decrease in the deuterium content in the body does not cause significant changes in the balance of T-helpers and T-cytotoxic lymphocytes either in the thymus or in the blood. Moreover, an increase in the number of thymoblasts and higher rates of thymopoiesis with a long-term decrease in the concentration of deuterium in the body indicate a slowdown in the rate of age-related involution of the thymus.

Key words: stable isotopes, deuterium, protium, thymus, immune system.

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕЛЕННОЙ КАРОТИНОГЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *COELASTRELLA* SP. В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОЙ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Дробецкая И.В., Минюк Г.С.

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: elina.chelebieva@gmail.com

Поступила в редакцию 08.08.2024

Аннотация. В работе рассматриваются фенотипические и физиолого-биохимические характеристики коллекционного штамма *Coelastrella* sp. (CALU-221= IBSS-10), изолированного из поверхностного слоя почвы в районе г. Севастополя и первоначально идентифицированного как *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov et Mamkaeva 1974 (Chlorophyceae, Chlamydomonadales, Chlorococcaceae). Показано, что, несмотря на более чем 60-летнюю историю коллекционного хранения штамма на агаризованной питательной среде, его морфометрические характеристики и особенности жизненного цикла сохранились неизменными и соответствуют первоописанию штамма. Приведены сведения, характеризующие особенности роста накопительной культуры *Coelastrella* sp. при выращивании на питательной среде BBM 3N по регламенту «зеленой» стадии двухстадийного культивирования продуцентов астаксантина, разработанному в ФИЦ ИнБЮМ. Получены данные по динамике численности, размеров и формы клеток, содержания в них сухой биомассы, фотосинтетических пигментов и основных компонентов сухого вещества (белка, липидов и углеводов). Показано, что наиболее информативными индикаторами состояния клеток водоросли в условиях периодической культуры являются изменения размерной структуры клеточных популяций, содержания хлорофилла *a* в клетках и сухой биомассе, а также соотношения суммарные каротиноиды/хлорофилл *a*.

Ключевые слова: *Coelastrella* sp., каротиногенные микроводоросли, лабораторная накопительная культура.

ВВЕДЕНИЕ

Понятие каротиногенные микроводоросли (МВ) подразумевает разнородную по таксономическому и экологическому статусу группу МВ с выраженной способностью к вторичному каротиногенезу (ВКГ) – специфическому механизму адаптации экстремобионтных видов к резким негативным суточным или сезонным изменениям ключевых факторов внешней среды (температуры, освещенности, обеспеченности питанием, интенсивности УФ-излучения и др.). В основе этого механизма лежит комплекс сопряженных физиолого-биохимических процессов, обеспечивающих выживание клеток в условиях острого абиотического стресса путем их быстрого перехода из состояния активной вегетации в покоящуюся стадию клеточного цикла. Ключевыми физиологическими процессами такого перехода являются прекращение деления вегетативных клеток, ингибирование фотосинтеза, индукция биосинтеза и массивное накопление кетокаротиноидов семейства астаксантина (Аст) и нейтральных липидов [1]. Исследования физиолого-биохимических особенностей продуцентов Аст различной таксономической и экологической специализации (*Haematococcus lacustris*, *Chromochloris zofingiensis*, *Bracteacoccus* spp., *Ettlia carotinos*, *Coelastrella rubescens* и др.) в условиях лабораторной культуры, выполненные в ФИЦ ИнБЮМ начиная с 2007 г, направлены на развитие представлений об особенностях адаптации зеленых МВ к острому абиотическому стрессу, выявление новых объектов массового культивирования для получения Аст и технических липидов и разработку эффективных способов получения их биомассы [2-7]. Методической основой скрининговых исследований является двухстадийная накопительная культура, при которой на I («зеленой») стадии анализируют продукционный потенциал водорослей при оптимальных условиях роста, а на II («красной») стадии оценивают стресс-устойчивость вида к стресс-факторам, индуцирующим биосинтез и накопление целевых продуктов и их выход из литра исходной культуры [3].

Объектом исследования в данной работе служил штамм каротиногенной зеленой микроводоросли IBSS-10, переданный в коллекцию ФИЦ ИнБЮМ (IBSS WDCM 1201) в 2006 г из коллекции водорослей Санкт-Петербургского университета CALU (WDCM 461) как *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva 1974 штамм CALU-221 [8]. Штамм был выделен проф. Б.В. Громовым из поверхностного слоя почвы в районе г. Севастополя и описан как единственный представитель нового рода *Pseudospongiococcum* Gromov & Mamkaeva 1974 [9]. Вид привлек наше внимание не только выраженной способностью к ВКГ, проявляющейся насыщенной оранжево-красной окраской стареющих агаризованных культур, но и рядом необычных особенностей, таких как: не до конца ясный таксономический статус; отсутствие его штаммов в российских и зарубежных коллекциях (за исключением CALU); отсутствие в доступной нам литературе сведений о его нахождении вне Крымского региона [9-12]; отсутствие сведений о морфо-физиологических характеристиках штамма в условиях лабораторной культуры, за исключением данных нашей предварительной работы, выполненной в 2009 г [2]. Проведению данной работы предшествовали исследования по молекулярно-генетической верификации таксономического статуса штамма IBSS-10 = CALU-221. В 2013 г. было показано, что сиквенс 18S рРНК штамма CALU-221 на 100% не совпадает ни с одним из секвенированных видов зелёных водорослей, представленных в NCBI, но во

всех вариантах филогенетических деревьев штамм CALU-221 = IBSS-10 попадет в кладу «*Coelastrella*» семейства Scenedesmaceae [7]. Повторный анализ, выполненный в 2016 г. (KU057947), выявил 100% совпадение штамма CALU-221 со штаммом *Coelastrella* sp. SAG 2471 из Коллекции культур водорослей Гёттингенского университета [13], что позволило нам предварительно идентифицировать объект настоящего исследования как *Coelastrella* sp.

Целью данной работы было исследование динамики морфо-физиологических характеристик коллекционного штамма CALU-221 (=IBSS-10) при его выращивании на питательной среде Болда (BBM 3N) [14] по лабораторному регламенту «зеленой» стадии универсальной схемы двухстадийного культивирования продуцентов Аст, принятой в ФИЦ ИнБЮМ [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рабочей коллекции каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ штамм IBSS-10 (= CALU-221) поддерживается, начиная с 2006 г., в активно вегетирующем состоянии методом субкультуры на стандартной агаризованной (1,5%) среде Болда (BBM) [14] при освещённости 2000 лк, температуре (Т) 13-15 °С с пересевом через каждые 2 месяца.

Адаптацию штамма к условиям автотрофного роста на жидкой среде BBM с утроенным содержанием азота (BBM 3N) и получение синхронизированной культуры инокулята проводили путем многократных пересевов с интервалом 7 сут при световых и температурных условиях, использованных в эксперименте. Водоросль выращивали методом накопительной культуры в стеклянных конических колбах «Bomex» объемом 0,25 л при одностороннем боковом освещении люминесцентными лампами дневного света «Feron» DL 20W T4 6400K (Россия) с плотностью потока фотосинтетических фотонов (ППФ) 120 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ и фотопериоде ФП – 15 ч свет : 9 ч темнота. Культуры круглосуточно продували воздухом со скоростью (v) 0,3 л/мин при помощи воздушного компрессора Resun ACO-9630 (Китай). На протяжении светового периода pH культуральной среды поддерживали в пределах 6,95–7,05 путем дозированной подачи в среду баллонного углекислого газа (объемная доля CO₂ 99,8% по ГОСТ 8050-85), регулируемой цифровым pH-контроллером Aqua Medic pH 2001C (Германия) и электромагнитным клапаном Samozzi A7E (Италия). Объем культур в колбах составлял 0,1 л, начальная численность клеток (*n*) – (2,3-2,5)·10⁶ кл/мл, Т – 25-26 °С, продолжительность периода культивирования (t) – 16 сут.

Динамику численности клеток в культурах контролировали при помощи проточного цитометра Cytomics™ FC 500, снабженного однофазным 488 нм аргоновым лазером (Beckman Coulter, США) [15] и методом прямого счета в 4-х сеточной камере Горяева [16].

Линейные размеры клеток устанавливали по микрофотографиям с применением микроскопа Leica DM-1000, цифровой камеры Leica Microsystem AG и компьютерной программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Для получения изображений поверхности клеток использовали сканирующий электронный микроскоп Hitachi SU3500 (Hitachi High-Technologies, Япония) [17].

Объемы клеток (V, мкм³) определяли по формуле вытянутого сфероида (при соотношении длина/ширина > 1,03) или шара [18]. Величина выборки для оценки размерной структуры клеточных популяций составляла 100 экземпляров.

Среднюю продуктивность (*P*) и удельную скорость роста культур (*μ*) рассчитывали по среднесуточному приросту *n* и сухой биомассы (СБ) [19]:

$$P_n = (n_0 - n_1)/(t_1 - t_0); P_{CB} = (CB_0 - CB_1)/(t_1 - t_0), \quad (1)$$

$$\mu_n = \ln(n_1/n_0)/(t_1 - t_0); \mu_{CB} = \ln(CB_1/CB_0)/(t_1 - t_0), \quad (2)$$

где:

P_n – средняя продуктивность культуры по Δn / (мл/сут);

*n*₀ – начальная численность клеток, кл/мл;

*n*₁ – численность клеток на 11-е сут, кл/мл; (*t*₁ – *t*₀) – продолжительность периода культивирования, сут;

P_{CB} – средняя продуктивность культур по сухой биомассе, г/(л сут.);

*CB*₀ – начальная сухая биомасса, г/л;

*CB*₁ – конечная сухая биомасса, г/л;

μ_n – средняя удельная скорость роста по Δn , 1/сут;

μ_{CB} – средняя удельная скорость роста по ΔCB , 1/сут.

Содержание СБ измеряли гравиметрически (Vonshak, 1986) на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах «Sartorius» (Германия) с размером пор 3,0 мкм.

Пигменты из сырой биомассы экстрагировали ацетоном («Merck», HPLC grade) с соблюдением всех предосторожностей, необходимых при работе с пигментами [20]. Содержание хлорофилла *a* (Хла) и суммарных каротиноидов (Кар) в культурах и биомассе определяли спектрофотометрически на СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) с использованием уравнений Лихтеналера [21].

Содержание основных компонентов сухого вещества (белка, липидов и углеводов) в биомассе, культурах и клетках анализировали общепринятыми в гидробиологической практике методами [22-24].

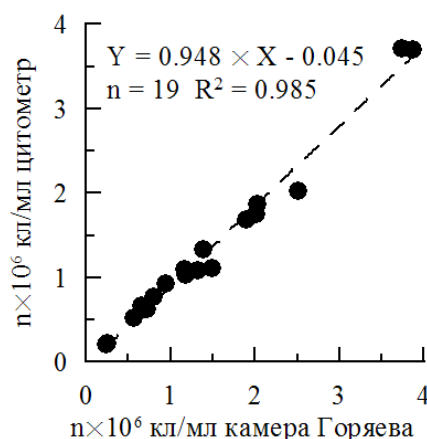


Рисунок 1. Зависимость между численностью клеток в культурах *Coelastrella* sp., рассчитанной методом прямого счета при помощи камеры Горяева и методом проточной цитометрии на приборе Cytomics™ FC 500

Все измерения проводили в трех биологических повторностях с тремя аналитическими повторностями для каждой. На рисунках и в тексте приведены средние значения и их стандартные отклонения, если не указано иное. Достоверность различий между средними определяли по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из распространенных проблем при экспериментальной работе с жидкими культурами коккоидных каротиногенных микроводорослей является способность многих видов образовывать хлопьевидные скопления различной степени агрегированности, затрудняющие применение для оценки численности и размеров клеток таких современных методов анализа, как проточная цитометрия или гемоцитометрия. В этих случаях приходится использовать трудоемкий и времязатратный метод прямого подсчета клеток под световым микроскопом в единице объема культуры. Выбор способа контроля указанных характеристик для каждого вида микроводорослей определяется экспериментально при предполагаемых условиях его культивирования в эксперименте. На рисунке 1 представлена зависимость между результатами одновременного определения численности клеток в периодической культуре *Coelastrella* sp. двумя методами: прямого счета в камере Горяева и с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 при условиях культивирования, указанных в разделе Материал и методы.

Высокий коэффициент корреляции между результатами, полученными разными методами на протяжении 16 суток ($R^2=0,985$), свидетельствует о равноценности и взаимозаменяемости обоих методов для работы с периодическими культурами *Coelastrella* sp. до достижения ими стационарной фазы роста. Следует отметить, что в первоописании штамма [9] указано, что его клетки в жидкой питательной среде образуют неустойчивые рыхлые скопления. По нашим наблюдениям непрерывный воздушный барботаж клеточных суспензий со скоростью 0,3-1,0 л/мин устраняет эту проблему и позволяет использовать метод проточной цитометрии для экспресс-анализа динамики численности клеток в растущих культурах *Coelastrella* sp. (рис. 2а).

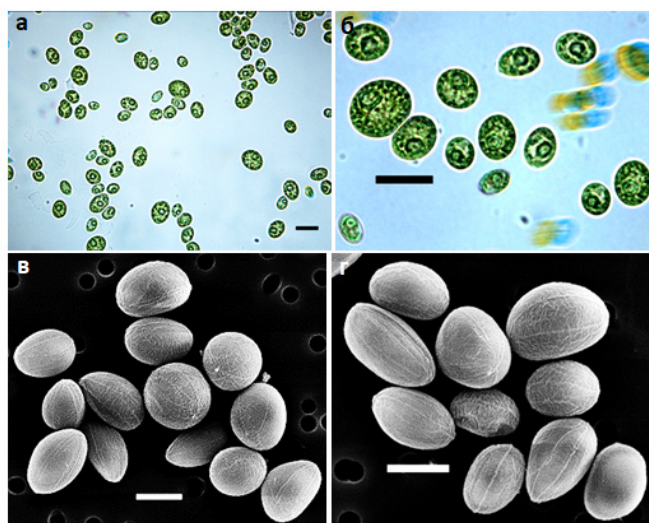


Рисунок 2. Микрофотографии вегетативных клеток штамм IBSS-10 в условиях накопительной культуры, полученные при помощи светового (а, б, шкала 10 мкм) и электронного (в, г, шкала 5 мкм) микроскопов

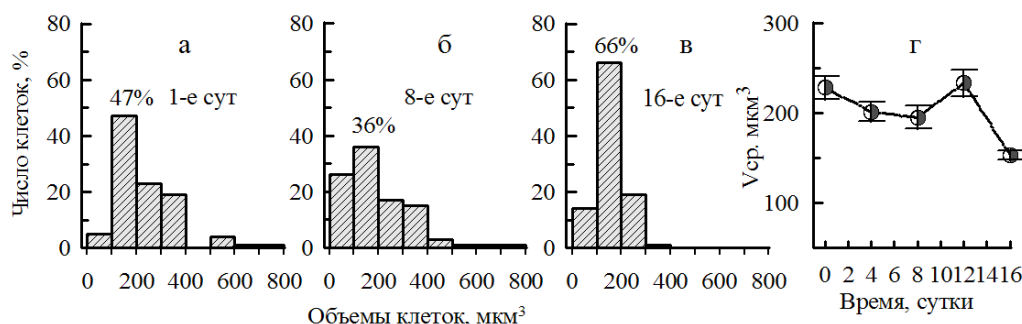


Рисунок 3. Распределение клеток по объему (а-в) и динамика средних объемов клеток (г) в накопительных культурах *Coelastrella* sp.

Морфометрические характеристики клеток штамма IBSS-10 на протяжении всего периода наблюдений соответствовали описанию, приведенному в [9], за исключением описания клеточных стенок. Молодые клетки имели эллипсоидную форму, переходящую по мере старения в шаровидную. Их длина и ширина варьировали в пределах 6-12 мкм и 4-8 мкм соответственно. Диаметр круглых автоспор составлял 12-19 мкм. Одиночный губчатый или сетчатый хлоропласт занимал в клетках пристеночное положение. Молодые клетки содержали, как правило, по одному эксцентрично расположенному пиреноиду. В старых клетках под микроскопом были отчетливо видны многочисленные пиреноиды с крахмальными обертками (рис. 2б). Единственным способом размножения клеток было бесполое размножение автоспорами (чаще всего по 2-4, реже по 8-32 автоспоры в спорангии), высвобождавшимися в среду при разрыве стенок спорангиев. Фрагменты оболочек пустых спорангиев некоторое время сохранялись в культурах. Жгутиковые стадии и половое размножение у исследуемого штамма не зарегистрированы.

В световом микроскопе клеточные стенки действительно выглядели «толстыми и гладкими», как это указали Громов и Мамкаева [9], однако на изображениях поверхности клеток штамма IBSS-10 (= CALU-221), полученных нами при помощи сканирующей электронной микроскопии отчетливо видны меридиональные ребра, идущие к полюсам клеток (рис. 2в, г) – характерный морфологический признак рода *Coelastrella* [25,26]. Это обстоятельство, наряду с молекулярно-генетическими данными [13], позволило нам изменить в нашей Коллекции каротиногенных видов микроводорослей [8] таксономический статус штамма CALU-221 с *Pseudospongiococcum protococcoides* на *Coelastrella* sp.

При заданных условиях культивирования объемы клеток варьировали в пределах 40-930 мкм³, причем на протяжении всех 16 сут в клеточных популяциях доминировала размерная группа с объемом 100-200 мкм³ (рис. 3а-в). Доля этой группы в клеточном пуле определяла характер кривой динамики средних объемов клеток (рис. 3г).

Наиболее вероятной причиной уменьшения объемов клеток *Coelastrella* sp. к концу периода культивирования было ухудшение условий их питания, неизбежно развивающееся по мере накопления биомассы в культурах микроводорослей [27,28].

Направленность динамик удельного содержания сухой биомассы и фотосинтетических пигментов в расчете на клетку и единицу объема клетки *Coelastrella* sp., представленных на рисунке 4в, г, и рисунке 5б, согласуются с этими представлениями, в то время как кривые численности клеток, сухой биомассы (рис. 4а, б) и содержания фотосинтетических пигментов (рис. 5а) в расчете на литр культуры ухудшения их состояния не отражали.

При этом особого внимания в качестве индикатора состояния клеток *Coelastrella* sp. заслуживает динамика соотношения Кар/Хла (содержание суммарных каротиноидов / содержание хлорофилла *a* в клетках). Как было показано нами ранее на примере нескольких каротиногенных видов, увеличение этого коэффициента выше 0,3 указывает на развитие дефицита азота и фосфора в среде, начало подготовки вегетативных клеток к переходу в стадию покоя, а также наступление благоприятного периода для перевода культур на II стадию культивирования, т.е. для стресс-индукции биосинтеза Аст в клетках [3,4]. В данном эксперименте, начиная с 12-х сут, величина

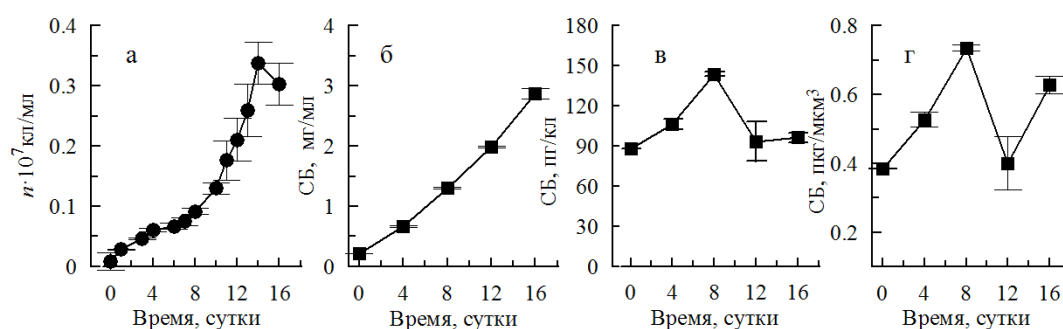


Рисунок 4. Динамика численности клеток (а) и содержания сухой биомассы в накопительных культурах *Coelastrella* sp. в расчете на мл культуры (б), клетку (в) и мкм³ объема клетки (г)

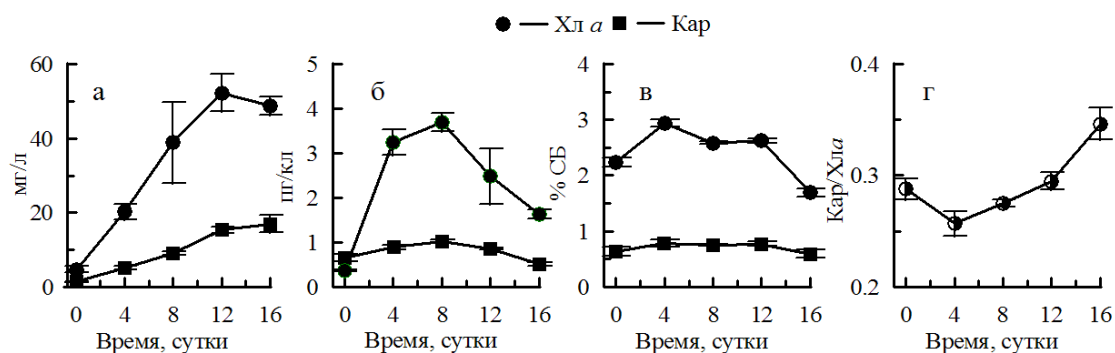


Рисунок 5. Динамика содержания фотосинтетических пигментов в накопительных культурах *Coelastrella* sp.: а – в литре культуры; б – в клетке, в – в сухой биомассе; г – динамика соотношения Кар/Хл а

Таблица 1. Содержание основных компонентов сухой биомассы *Coelastrella* sp. на 16-е сутки культивирования

Компонент биомассы	Содержание компонентов биомассы		
	мг/л культуры	% сухой биомассы	пг/кл
Белок	628,56 ± 25,06	23,10 ± 0,92	20,95 ± 1,15
Липиды	845,61 ± 107,76	28,87 ± 0,96	27,79 ± 0,18
Углеводы	1416,40 ± 65,63	48,25 ± 1,79	47,46 ± 2,66

коэффициента Кар/Хл а начала постепенно преодолевать критическую отметку и на 16-е сутки достигла значения 0,35, что является объективным признаком готовности накопительных культур *Coelastrella* sp. к переводу на «красную» стадию индуцированного ВКГ [3].

Содержание сухой биомассы в литре культуры в это время составило $2,87 \pm 0,08$ г/л при средней продуктивности культур по этому показателю $0,166 \pm 0,004$ мг/(л сут). Главным компонентом СБ являлись углеводы, относительное содержание которых приближалось к 50% (табл. 1).

Вторым по величине компонентом сухой биомассы были липиды, на долю которых приходилось около 30% СБ. По нашим данным, полученным на примере близкородственного вида *Coelastrella rubescens*, к концу «красной» стадии двухстадийной культуры содержание липидов в СБ увеличивается на 15-20 %, по сравнению с концом «зеленой» стадии, что позволяет сделать предварительный положительный прогноз относительно перспективности *Coelastrella* sp. в качестве источника технических липидов.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

несмотря на длительное (более 60-ти лет) коллекционное хранение штамма CALU-221 (= IBSS-10) на твердой среде в коллекциях СПБГУ и ИнБИОМ, его морфометрические характеристики полностью соответствуют первоописанию штамма, выполненному Б.В. Грозовым и К. А. Мамкаевой в 1974 г.;

результаты исследования поверхности клеточных стенок CALU-221 (= IBSS-10) методом сканирующей электронной микроскопии, наряду с ранее полученными результатами молекулярно-генетической верификации его таксономического статуса [13] позволяют идентифицировать данный штамм как *Coelastrella* sp.;

наиболее чувствительными индикаторами состояния клеток *Coelastrella* sp. в условиях накопительной культуры являются изменения размерной структуры клеточных популяций, содержания хлорофилла а в клетках и сухой биомассе, а также соотношения суммарные каротиноиды/хлорофилл а.;

при выращивании *Coelastrella* sp. с использованием газо-воздушного барботажа со скоростью 0,3 л/(мин л) методы определения численности клеток в культурах при помощи проточной цитометрии и прямого счета в камере Горяева дают близкие результаты и могут быть признанными взаимозаменяемыми.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБИОМ «Комплексное исследование экологических и физиолого-биохимических особенностей микроводорослей различных таксономических групп при адаптации к меняющимся условиям среды» (№ гос. регистрации 124021300070-2) и «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1).

Список литературы / References:

1. Solovchenko A., Minyuk G. The physiology of astaxanthin production by carotenogenic microalgae. Global Perspectives on Astaxanthin. Eds: Gokare A. Ravishankar, A. Ranga Rao. Academic Press, 2021, с. 19-35, doi: 10.1016/B978-0-12-823304-7.00026-X.

2. Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов. *Экология моря*, 2009, № 77, с. 77-83 [Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V. Chlorococcal microalgae as source of natural secondary carotenoids. *Ekologiya morya*, 2009, no. 77, pp. 77-83 (In Russ.)].
3. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований. *Экология моря*, 2010, № 80, с. 67-78 [Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Chubchikova I.N., Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S. Screening of green microalgae as potential source of nature ketocarotenoids. The relevance, strategy and study approach. *Ekologiya morya*, 2010, no. 80, pp. 67-78 (In Russ.)].
4. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н. Особенности вторичного каротиногенеза у *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) в условиях двухстадийной культуры. *Альгология*, 2015, т. 25, № 1, с. 21-34 [Minyuk G.S., Chelebieva E.S., Chubchikova I.N. Features of secondary carotenogenesis in *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) under two-stage culture conditions. *Al'gologiya*, 2015, vol. 25, no. 1, pp. 21-34, doi: 10.15407/alg25.01.021 (In Russ.)].
5. Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens*, a producer of value-added keto-carotenoids. *Algae*, 2017, no. 32, p. 245, doi: 10.4490/algae.2017.32.8.6.
6. Minyuk G., Sidorov R., Solovchenko A. Effect of nitrogen source on the growth, lipid, and valuable carotenoid production in the green microalga *Chromochloris zofingiensis*. *Journal Applied of Phycology*, 2020, no. 32, p. 923, doi: 10.1007/s10811-020-02060-0.
7. Челебиева Э.С., Скребовська С.В. Місце в системі Chlorophyta одноклітинної автоспороутворюючої водорості *Pseudospongiococcum protococcoides*. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 2013, вип. 62, с. 75-81 [Chelebieva E.S., Skrebowska S.V. The position of the unicellular autospore-forming alga *Pseudospongiococcum protococcoides* in the Chlorophyta system. *Visnik L'viv's'kogo universitetu. Seriya biologichna*, 2013, vol. 62, pp. 75-81 (In Ukr.)].
8. Данцюк Н.В., Челебиева Э.С., Минюк Г.С. Рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского. *Морской биологический журнал*, 2021, т. 6, № 4, с. 3-18 [Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S., Minyuk G.S. Working collection of carotenogenic microalgae living cultures of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas. *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 3-18, doi: 10.21072/mbj.2021.06.4.01 (In Russ.)].
9. Gromov B.M., Mamkaeva K.A. Morphology and ultrastructure of some chlorococcal algae from the collection of algae strain in Leningrad University. I. *Pseudospongiococcum protococcoides* gen. nov, sp. nov. *Algol. Stud., Arch. Hydrobiol.*, 1974, vol. 46, no. 10, pp. 1-9.
10. Ettl H., Gartner G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Springer, Berlin Heidelberg, 2014, 773 p.
11. Солоненко А.Н. Водоросли различных биотопов косы Арабатская стрелка, Азовское море (Украина). *Альгология*, 2016, т. 26, № 3, с. 304-314 [Solonenko A.N. Algae of various biotopes of the Arabat spit, sea of Azov (Ukraine). *Al'gologiya*, vol. 26, no. 3, pp. 304-314, doi: 10.15407/alg26.03.304 (In Russ.)].
12. Chekanov K. Diversity and distribution of carotenogenic algae in Europe: A review. *Marine Drugs*, 2023, no. 21(2), p. 108, doi: 10.3390/md21020108.
13. Челебиева Э.С., Чеканов К.А., Данцюк Н.В. Молекулярно-генетические исследования как составная часть скрининга каротиногенных микроводорослей. *Морские биологические исследования: достижения и перспективы*, 2016, с. 471-474 [Chelebieva E.S., Chekanov K.A., Dantsyuk N.V. Molecular genetic research as part of screening carotenogenic microalgae. *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy*, 2016, pp. 471-474 (In Russ.)].
14. Bischoff H.W., Bold H.C. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Phycological Studies*, 1963, vol. 4, no. 1, no. 6318, 95 p.
15. Hyka P., Lickova S., Pribyl P., Melzoch K., Kovar K. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 2013, vol. 31, pp. 2-16, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.04.007.
16. Vonshak A. Laboratory techniques for cultivation of microalga. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. A. Richmond (Ed.), CRC Press, 1986, p. 117-145, doi: 10.1016/B978-0-08-031999-5.50025-X.
17. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmeaceae, Chlorophyta) для первичной идентификации с использованием сканирующей электронной микроскопии. *Вопросы современной альгологии*, 2022, № 1 (28), с. 102-109 [Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S. Optimization of freshwater microalgae (Scenedesmeaceae, Chlorophyta) fixation method for primary taxonomic identification by scanning electron microscopy. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2022, no. 1 (28), pp. 102-109, doi: 10.33624/2311-0147-2022-1(28)-102-109 (In Russ.)].
18. Брянцева Ю.В., Лях А.М., Сергеева А.В. Расчёт объёмов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Чёрного моря. *Препринт НАН Украины Институт биологии южных морей*, Севастополь, 2005, 25 с. [Bryanceva, Yu.V., Lyah, A.M., Sergeeva, A.V. Calculation of biovolumes and surface areas of black sea microalgae. *Preprint NAN Ukrainy` Institut biologii yuzhny`kh morej*, Sevastopol, 2005, 25 p., doi: 10.13140/rg.2.1.4180.0167 (In Russ.)].

19. Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures. *Algal Culturing Techniques*. Ed. Andersen R.A. Burlington: *Elsevier Academic Press*, 2005, pp. 269-285, doi: 10.1016/B978-012088426-1/50019-6.
20. Britton G. Functions of Intact Carotenoids. In: Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds) *Carotenoids*. *Carotenoids, Birkhäuser Basel*, 2008, vol. 4., doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0_10.
21. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*, 1987, no. 148, pp. 350-382, doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
22. Lopez C.V.G., Garcia M.D.C.C., Fernandez F.G.A., Bustos C.S., Chisti Y., Sevilla J.M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource technology*, 2010, vol. 101, no. 19, pp. 7587-7591, doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.077.
23. Ahlgren G. Merino L. Lipid analysis of freshwater microalgae: a method study. *Arch. Hydrobiol.*, 1991, vol. 121, no. 3, pp. 295-306, doi: 10.1127/archiv-hydrobiol/121/1991/295.
24. Strickland J.D.H., Parsons T.R. *A practical handbook of seawater analysis*. 1972, 328 c.
25. Kaufnerova V., Elias M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta). *Nova Hedwigia*, 2013, vol. 97, no. 3-4, pp. 415-428, doi: 10.1127/0029-5035/2013/0116.
26. Wang Q., Song H., Liu X., Liu B., Hu Z., Liu G. Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrella* sensu lato (Scenedesmaceae, Sphaeropeales), including the description of three new species and two new varieties. *Journal of phycology*, 2019, vol. 55, no. 6, pp. 1290-1305, doi: 10.1111/jpy.12915.
27. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Дробецкая И.В., Сахонь Е.Г., Чивкунова О.Б., Чеканов К. А., Лобакова Е.С., Сидоров Р.А., Соловченко А.Е. Влияние pH и CO₂ на рост и метаболизм микроводоросли *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens*. *Физиология растений*, 2016, т. 63, с. 601-610 [Minyuk G.S., Chelebievaa E.S., Chubchikova I.N., Dantsyuk N.V., Drobetskaya I.V., Sakhon E.G., Chivkunova O.B., Chekanov K.A., Lobakova E.S., Sidorov R.A., Solovchenko A.E. pH and CO₂ effects on *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* growth and metabolism. *Fiziologiya rastenij*, 2016, vol. 63, pp. 601-610, doi: 10.7868/S0015330316040102 (In Russ.)].
28. Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens*, a producer of value-added keto-carotenoids. *Algae*, 2017, no. 32, p. 245, doi: 10.4490/algae.2017.32.8.6.

MORPHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE GREEN CAROTENOGENIC MICROALGA *COELASTRELLA* SP. IN BATCH CULTURE UNDER LABORATORY CONDITIONS

Chelebieva E.S., Chubchikova I.N., Dantsyuk N.V., Drobetskaya I.V., Minyuk G.S.

FSBSI FRC "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS"

Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: elina.chelebieva@gmail.com

Received 08.08.2024

Abstract. This work deals with phenotypic and physiological and biochemical characteristics of a collection strain of *Coelastrella* sp. (CALU-221= IBSS-10) isolated from the surface soil layer near Sevastopol and initially identified as *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov et Mamkaeva 1974 (Chlorophyceae, Chlamydomonadales, Chlorococcaceae). It is shown that despite more than 60-year history of collection storage of the strain on agarized nutrient medium, its morphometric characteristics and life cycle peculiarities remained unchanged and correspond to the first description of the strain. The data characterizing the growth peculiarities of the batch culture of *Coelastrella* sp. when growing on BBM 3N nutrient medium according to the protocol of the "green" stage of two-stage cultivation of astaxanthin producers developed in FRC IBSS are presented. The data on the dynamics of cell number, size and shape, content of dry biomass, photosynthetic pigments and main components of dry matter (protein, lipids and carbohydrates) were obtained. It is shown that the most informative indicators of the algal cell state under periodic culture conditions are changes in the size structure of cell populations, chlorophyll a content in cells and dry biomass, and the total carotenoids/chlorophyll a ratio.

Key words: *Coelastrella* sp., carotenogenic microalgae, laboratory batch culture.

ВЛИЯНИЕ АТМОСФЕРНЫХ ОСАДКОВ, ВОЛНОВОГО ПЕРЕМЕШИВАНИЯ, ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ НА ЧИСЛЕННОСТЬ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ В ПРИБРЕЖНЫХ НАНОСАХ (НА ПРИМЕРЕ ПРИБРЕЖНОЙ АКВАТОРИИ СЕВАСТОПОЛЯ, ЧЁРНОЕ МОРЕ)

Бурдиян Н.В.

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: burdiyan_nv@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 08.08.2024

Аннотация. В данной работе показано распределение тионовых (ТБ), денитрифицирующих (ДНБ) и сульфатредуцирующих (СРБ) групп бактерий, обитающих в прибрежных наносах акватории Севастополя, в зависимости от температуры морской воды и воздуха, окислительно-восстановительных условий, волнового перемешивания и атмосферных осадков. Отбор проб и последующая обработка материала осуществлены на основе стандартных методов гидробиологии и общей микробиологии. За полуторогодовалый период наблюдений диапазон температуры составлял: воды от $+8^{\circ}$ до $+26^{\circ}$ С, воздуха от -1° до $+30^{\circ}$ С. Прямой зависимости между численностью исследуемых групп бактерий и температурой воды и воздуха повсеместно не наблюдалось и для указанных групп бактерий данный фактор не является основным, ограничивающим их рост. Выяснено, что в прибрежных наносах обозначенные группы бактерий развиваются при окислительных условиях среды: от $+30$ до $+480$ (мВ). Коэффициент корреляции между СРБ и величиной окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) в прибрежных наносах района открытого моря составлял $r = -0,75$, в бухте $r = -0,51$ ($P < 0,05$). Между величиной ОВП и численностью как ТБ, так и ДНБ взаимосвязи не обнаружено. Волновое перемешивание, атмосферные осадки оказывают определённое влияние на численность исследуемых групп бактерий, однако более существенным фактором для последних, по всей видимости, являются наличие органических соединений и процессов, приводящих к созданию анаэробных условий.

Ключевые слова: прибрежные наносы, анаэробные бактерии, Чёрное море.

Контактная зона «суша – море» с глубинами 1,5–2 м в сторону моря и до района заплеска волн в сторону берега представляет значительный интерес в санитарно-биологическом плане [1]. Эта зона особенно уязвима при аварийных ситуациях, когда в море сбрасываются тысячи кубических метров сточных вод или происходят разливы нефти и нефтепродуктов. В контактной зоне «суша-море» должны происходить более сложные процессы бактериальной деградации углеводородов нефти, поскольку здесь сталкиваются потоки загрязняющих веществ, идущих как с суши, так и со стороны моря [2]. Помимо этого, особенности контактной зоны состоят в том, что, находясь на границе между суши и морем, она испытывает воздействие сильнейших, а иногда и сокрушительных изменений во внешней среде, располагается на мелководье [2], отличается своеобразием биоты и наиболее интенсивным контактом людей с морем. Подвижность прибрежных наносов в результате волнового воздействия создаёт смену аэробных и анаэробных условий, значительная доля в процессе анаэробной деградации принадлежит сульфатредуцирующим, тионовым и денитрифицирующим бактериям, которые также принимают участие и в процессах преобразования углеводородов нефти в морской среде [3-7]. Изучение анаэробных бактерий, обитающих на линии уреза воды в прибрежных наносах, существенно дополняет характеристику экологического состояния контактной зоны «суша – море» и в этой связи получение более подробной характеристики физических параметров, влияющих на количественный состав обозначенных групп бактерий, позволит в определенной степени судить об энергии микробиологических процессов в данной экосистеме и подойти, в дальнейшем, к оценке её самоочищения.

Целью работы было оценить влияние температуры морской воды и воздуха, атмосферных осадков, волнового перемешивания, окислительно-восстановительных условий на численность анаэробных бактерий в прибрежных наносах акватории Севастополя.

МЕТОДЫ

Наблюдения проводили на станциях, расположенных в бухтах Севастопольская (ст. 1) и Круглая (ст. 2), а также на участке открытого побережья – пляже Учкеевка (ст. 3). Ст. 1 находится на северной стороне Севастопольской бухты в непосредственной близости от действующего причала на расстоянии 0,7 мили от входа в бухту. Ст. 2 расположена на западном побережье бухты Круглая, на территории детского пляжа. От бухты Круглая до входа в Севастопольскую бухту 5,5 км. Ст. 3 расположена на побережье открытого моря в районе пляжа Учкеевка. Учкеевка – пляж протяженностью более километра, находится в пределах административной территории города Севастополя, имеет развитую рекреационную инфраструктуру. Пробы отбирали ежемесячно, в течение полутора лет, в утренние часы в один день, что предполагало равнозначное воздействие на рост микроорганизмов таких факторов, как температура воздуха, морской воды, осадков. Различное положение станций относительно направления ветра определяло разницу в интенсивности волнового перемешивания

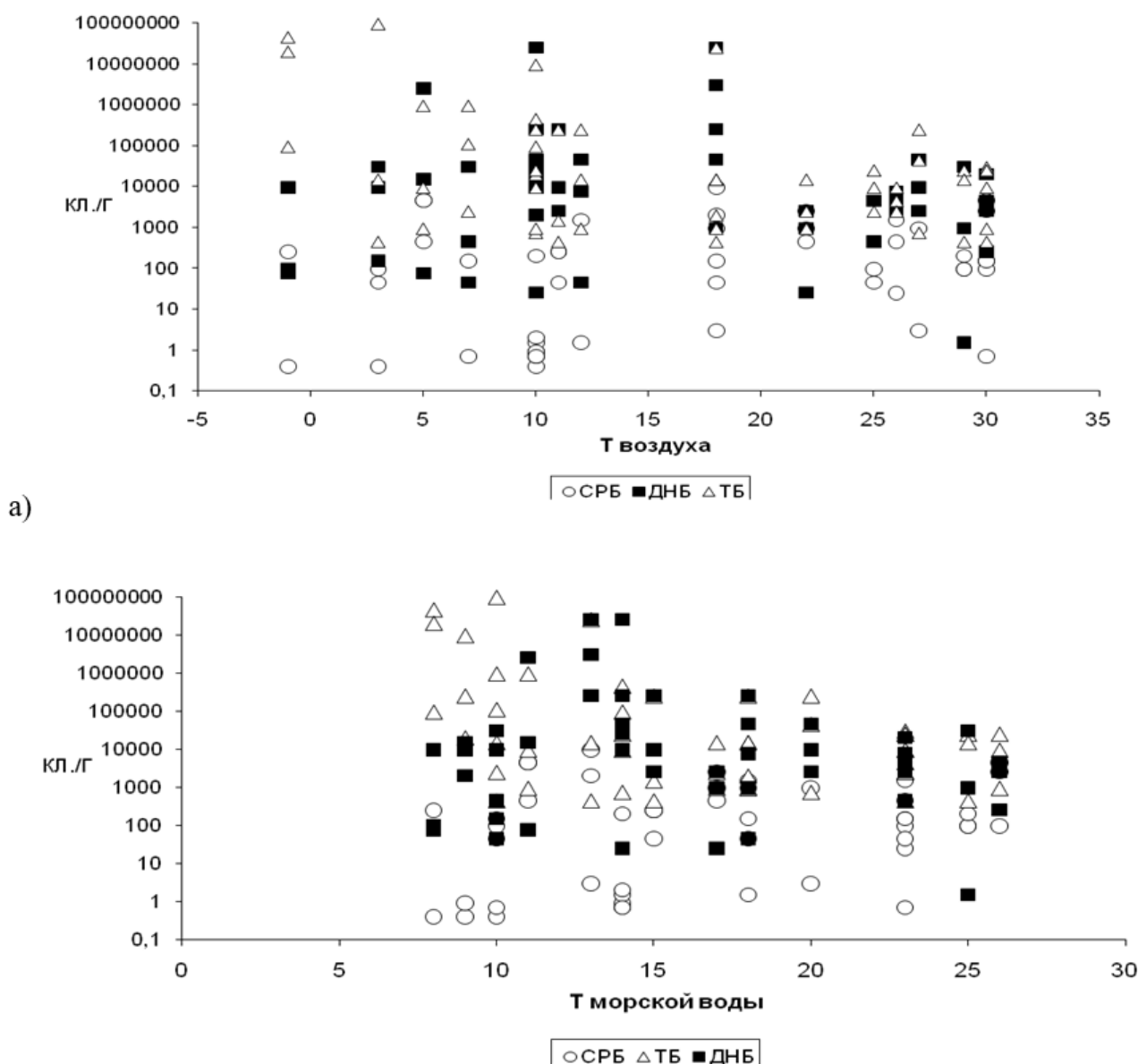


Рисунок 1. Отношение численности анализируемых бактерий в прибрежных наносах на ст. 1, 2 и 3 к температуре воды (а) и воздуха (б)

прибрежных наносов на каждой станции. Прибрежные наносы с поверхностного слоя (не глубже 5 см) на линии уреза отбирали стерильным шпателем. В момент отбора проб проводили измерение температуры воздуха и морской воды (ртутным термометром), окислительно-восстановительного потенциала (ионметром И-102, в трех повторностях), учитывали атмосферные осадки, волновое перемешивание. В каждой пробе определяли количественный состав тионовых (ТБ), сульфатредуцирующих (СРБ) и денитрифицирующих (ДНБ) групп бактерий. Количество микроорганизмов в пробе определяли методом предельных разведений с последующим посевом 1 мл из каждого разведения в селективные среды [8]. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объема рассчитывали по таблице Мак-Креди, основанной на методе вариационной статистики [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За указанный период наблюдений диапазон температуры составлял: воды от $+8^{\circ}$ до $+26^{\circ}$ C, воздуха от -1° до $+30^{\circ}$ C. Формирование как сравнительно высокой, так и низкой численности исследуемых групп бактерий происходило при широком диапазоне полученных температурных значений. Максимумы численности также выделялись при различном температурном диапазоне и не были приурочены к тёплым месяцам (рис. 1). Таким образом, прямой зависимости между численностью бактерий и температурой воды и воздуха повсеместно не наблюдалось и для указанных групп бактерий данный фактор не является основным, ограничивающим их рост.

Как известно, содержание органического вещества и нефтепродуктов в прибрежной зоне могут значительно увеличивать продолжительные интенсивные ливни [9,10]. Мы поставили задачу проанализировать численность исследуемых бактерий, отобранных во время дождя и после него. На исследуемых станциях непосредственно во время дождя отобрано 22 % проб, а в случае, если дождь шёл накануне или ночью перед отбором, - 28 % проб.

Однозначного влияния атмосферных осадков на численность исследуемых групп бактерий нами не обнаружено. В обоих случаях наблюдался широкий диапазон численности бактерий: например, на ст. 1 численность СРБ во время дождя колебалась от 1 до 200 кл./г, на ст. 2 – от 1 до 250 кл./г, а на ст. 3 – от 0 до 1 кл./г. Если же дождь шёл накануне или ночью перед отбором, колебания численности СРБ на ст. 1 составляли от 95 до 1500 кл./г, на ст. 2 – от 1 до 4500 кл./г, а на ст. 3 – от 0 до 95 кл./г. Широкие колебания численности, как во время, так и после дождя наблюдались в группе тионовых и денитрифицирующих бактерий. Однако в большинстве случаев наибольшее количество клеток анализируемых бактерий на станциях высевалось после прошедшего за день до отбора проб дождя, что связано с поступлением органического вещества с ливневым потоком, а также, по всей видимости, кратковременным изменением солености на более оптимальную для роста некоторых видов исследуемых бактерий. Увеличение численности бактерий после дождя в акватории бухт Севастополя отмечено в работе [11].

Гидродинамические процессы в прибрежных наносах приводят к постоянному перемещению частиц грунта, смыву с них органических веществ [12], являющихся островками жизни для бактерий. При волновом перемешивании происходит также насыщение прибрежных наносов кислородом, растворенным в морской воде, что негативно влияет на жизнедеятельность анаэробов. Различное местоположение станций определяло разницу в интенсивности волнового перемешивания прибрежных наносов. Наиболее часто (в 61 % проб) волновой накат отмечен на ст. 3, расположенной на открытом побережье. В бухте Севастопольской на ст. 1 во время волнового воздействия отобрано 22 % проб, а в бухте Круглая на ст. 2 – только 11 % от общего количества проб. Результаты наших исследований показали, что высокая численность тионовых и денитрифицирующих микроорганизмов получена в пробах, отобранных как во время штиля, так и во время прибой. В некоторых пробах, отобранных во время интенсивного волнового перемешивания, наблюдался рост сульфатредуцирующих бактерий. По всей видимости, СРБ, обитающие в прибрежных наносах, проявляют устойчивость к кислороду и выживают при различной аэрации среды. В то же время не во всех пробах, отобранных во время штиля, получен ожидаемый рост СРБ, что можно объяснить микроразнообразием распределением бактерий.

Нестабильный кислородный режим в прибрежных наносах должен оказывать влияние на численность анаэробных бактерий, необходимым условием размножения которых являются восстановленные условия среды. Измерение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) производили в полевых условиях на ст. 1 и 3, на ст. 2 измерение не проводили по техническим причинам (постоянное засорение электрода песком). Как известно, в грунтах, даже однородных по составу, величина ОВП может различаться уже на небольшом расстоянии. Различия во влажности, аэрации, концентрации и составе органических веществ, интенсивности процессов их разложения, гранулометрического состава – все это создает местные очаговые изменения окислительно-восстановительного потенциала. Возможно, именно это объясняет тот факт, что в полевых условиях в 100 % наблюдений мы получили окислительные условия среды (таблица 1). Облигатные анаэробные бактерии в целом очень чувствительны к кислороду, но могут встречаться и в аэробных зонах [13]. Многие не образующие спор облигатные анаэробы обнаружены в местах, где наблюдается активное развитие облигатных аэробов. Вероятно, облигатные аэробы, активно потребляющие молекулярный кислород создают тем самым зоны с низкой концентрацией O_2 , благоприятные для развития строго анаэробных видов, какими являются сульфатредуцирующие бактерии. Это и объясняет существование данных бактерий при положительном значении Eh.

Показатели Eh в прибрежных наносах на ст. 3 выше, чем на ст. 1, что может быть вызвано большей аэрацией грунта на ст. 3. На обеих станциях корреляционный анализ показал отрицательную взаимосвязь между численностью СРБ и рассматриваемым параметром. Коэффициент корреляции в прибрежных наносах открытого моря (ст. 3) был более выраженным ($r = -0,75$), чем в бухте на станции 1, где $r = -0,51$ ($n = 12$, $P < 0.05$). Между величиной ОВП в прибрежных наносах и численностью как тионовых, так и денитрифицирующей микрофлоры взаимосвязи не обнаружено, что объяснимо различным отношением к кислороду наблюдаемых групп бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные наблюдения показали, что прямой зависимости между численностью бактерий и температурой воды и воздуха повсеместно не наблюдалось и для указанных групп бактерий данный фактор не является основным, ограничивающим их рост. Выяснено, что в прибрежных наносах сульфатредуцирующие, тионовые и денитрифицирующие бактерии развиваются при окислительных условиях среды: от +30 до +480 (мВ). Корреляционный анализ показал отрицательную взаимосвязь между численностью СРБ и ОВП.

Таблица 1. Показатель ОВП (Eh, мВ) в прибрежных наносах на ст. 1 и 3

Месяц	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь
Ст. 1	+200	+180	+110	+180	+30	+100
Ст. 3	+320	+420	+380	+260	+400	+480
Месяц	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Ст. 1	+160	+120	+40	+180	+160	+140
Ст. 3	+360	+350	+200	+380	+300	+240

Коэффициент корреляции в прибрежных наносах открытого моря составлял $r = -0,75$, в бухте: $r = -0,51$ ($n = 12$, $P < 0,05$). Между величиной ОВП в прибрежных наносах и численностью как тионовой, так и денитрифицирующей микробиоты взаимосвязи не обнаружено. Волновое перемешивание, атмосферные осадки оказывают определённое влияние на численность указанных бактерий, однако более существенным фактором для последних, по всей видимости, являются наличие органических соединений и процессов, приводящих к созданию анаэробных условий.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Изучение биогеохимических закономерностей радиоэкологических и хемотропических процессов в экосистемах водоемов Азово-Черноморского бассейна в сравнении с другими акваториями Мирового океана и отдельными водными экосистемами их водосборных бассейнов для обеспечения устойчивого развития на южных морях России» (№ гос. регистрации 124030100127-7).

Список литературы / References:

1. Zaitsev Y. *An introduction to the Black Sea ecology*. Odessa: Smil. Ed. Publ. Agency Ltd., 2008, 229 pp.
2. Миронов О.Г. Санитарно-биологические направления исследований акватории контактной зоны «суша-море». *Экология моря*, 2001, вып. 57, с. 85-90 [Mironov O.G. Sanitary and biological directions of research in the water area of the land-sea contact zone. *Ecologiya moray*, 2001, vol. 57, pp. 85-90 (In Russ.)].
3. Belyakova E.V., Rozanova E.P., Borzenkov I.A. et al. The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil field. *Microbiology*, 2006, vol. 75, no 2, p. 161-171.
4. Shelton T.B., Hunter I.V. Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. *J. Wat. Pollut. Contr. Feder.*, 1975, vol. 47, no. 9, pp. 2256-2270.
5. Spormann A.M., Widdel F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 2000, vol. 11, no. 2-3, pp. 85-105.
6. Schocher Riet J., Seyfried B., Vazquez I. F. et al. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 1991, vol. 157, no. 1, pp. 7-12.
7. Бурдиян Н.В. Способность бактерий тионовой группы использовать углеводороды нефти как единственный источник углерода и энергии. *Экология моря*, 2009, вып. 79, с. 67-69 [Burdian N.V. Ability of thionic bacteria to use petroleum hydrocarbons as the sole source of carbon and energy. *Ecologiya moray*, 2009, vol. 79, pp. 67-69 (In Russ.)].
8. Нетрусов А.И. *Практикум по микробиологии: учеб. пособие*. М.: Академия, 2005, 603 с. [Netrusov A.I. *Practical guidelines for microbiology*. Moscow: Akademiya, 2005, 603 p. (In Russ.)].
9. Беляева О.И. Влияние ливневого стока на нефтяное загрязнение в бухте Казачья (Черное море). *Экология моря*, 2004, вып. 66, с. 17-21 [Belyaeva O.I. The effect of stormwater runoff on oil pollution in Kazachya Bay (Black Sea). *Ecologiya moray*, 2004, vol. 66, pp. 17-21 (In Russ.)].
10. Беляева О.И. О загрязнении ливневых стоков, поступающих в прибрежную зону Черного моря (обзор). *Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия: География*, 2012, т. 25, вып. 64, № 2, с. 20-27 [Belyaeva O.I. On the pollution of stormwater runoff entering the coastal zone of the Black Sea (review). *Scientific notes of V.I. Vernadsky Tauride National University. Series: Geography*, 2012, vol. 25, iss. 64, no. 2, pp. 20-27 (In Russ.)].
11. Куфтапова Е.А., Губанов В.И., Ковригина Н.П. и др. Экологическая оценка современного состояния вод в районе взаимодействия Севастопольской бухты с прилегающей частью моря. *Морской экологический журнал*, 2006, вып. 5, № 1, с. 72-91 [Kuftapova E.A., Gubanov V.I., Kovrigina N.P. et al. Ecological assessment of the current state of waters in the area of interaction of Sevastopol Bay with the adjacent part of the sea. *Marine Environmental Journal*, 2006, vol. 5, no. 1, pp. 72-91 (In Russ.)].
12. Горбенко Ю.А. *Экология морских микроорганизмов перифитона*. Киев: Наук. думка, 1977, 252 с. [Gorbenko Yu. A. *Ecology of marine microorganisms of the periphyton*. Kiev: Nauk. Dumka, 1977, 252 p. (In Russ.)].
13. Гусев М.В. *Микробиология*. М.: Издательский центр «Академия», 2003, 464 с. [Gusev M.V. *Microbiology*. Moscow: Akademiya, 2003, 464 p. (In Russ.)].

THE INFLUENCE OF ATMOSPHERIC PRECIPITATION, WAVE MIXING, REDOX CONDITIONS ON THE NUMBER OF ANAEROBIC BACTERIA IN COASTAL SEDIMENTS (ON THE EXAMPLE OF THE COASTAL WATERS OF SEVASTOPOL, THE BLACK SEA)

Burdiyan N.V.

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

Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: burdiyan_nv@ibss-ras.ru

Received 08.08.2024

Abstract. The present work covers a distribution of thionic (TB), denitrifying (DNB) and sulfate reducing (SRB) groups of bacteria inhabiting the coastal sediments of the coastal water area of Sevastopol (Black Sea), depending on the temperature of seawater and air, redox conditions, wave mixing and precipitation. Sampling and subsequent processing of the material were carried out on the basis of standard methods of hydrobiology and general microbiology. Over one and a half-year observation period, the temperature range was: water from +8 to +26 °C, air from -1 to +30 °C. There was no direct relationship between the number of studied groups of bacteria and the temperature of water and air everywhere, and for these groups of bacteria this factor is not the main one limiting their growth. It was found out that in coastal sediments, the designated groups of bacteria develop under oxidative environmental conditions: from +30 to +480 (mV). A negative correlation was found between the ORP value and the number SRB. The correlation coefficient for SRB of the open sea was $r = -0.75$, in the bay $r = -0.51$ ($P < 0.05$). There is no reliable relationship between the ORP values of the medium and the number of DNB and TB. Wave mixing and precipitation have a certain effect on the number of studied groups of bacteria, but a more significant factor for the latter, apparently, is the presence of organic compounds and processes leading to the creation of anaerobic conditions.

Key words: Black Sea, anaerobic bacteria, coastal sediments.

МНОГОЛЕТНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА АКВАТОРИЙ РЕГИОНА СЕВАСТОПОЛЯ ПО БИОТИЧЕСКИМ ИНДЕКСАМ И СТРУКТУРНЫМ ПОКАЗАТЕЛЯМ ОСНОВНЫХ ВИДОВ МАКРОЗООБЕНТОСА

Алёмов С.В.

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: alyomov_sv@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 09.08.2024

Аннотация. В работе проанализированы изменения структурных показателей (численность, биомасса, средний вес особей) основных видов макрозообентоса, вносящих значительный вклад в общую численность и биомассу на донных отложениях различной степени загрязнения в севастопольской прибрежной акватории за период с 1973 по 2009 гг. Для анализа выбраны два вида брюхоногих моллюсков (*Tritia reticulata*, *Hydrobia acuta*), два вида двустворчатых моллюсков (*Abra segmentum*, *Cerastoderma glaucum*) и два вида полихет (*Capitella capitata*, *Heteromastus filiformis*). Концентрации хлороформ-экстрагируемых веществ и структурные показатели макрозообентоса взяты из архивных документов лаборатории хемотропологии ФИЦ ИнБЮМ. Анализ данных проводился в программном пакете *Microsoft Excel*. Для более крупных видов моллюсков (*T. reticulata*, *A. segmentum*, *C. glaucum*) наибольшие значения численности и биомассы отмечены при II и IV уровнях загрязнения. При усилении загрязнения донных отложений количественные показатели представителей видов снижались, кроме *H. acuta*, у которой наблюдали рост численности. Для церастодермы и тритии наблюдается тренд снижения среднего индивидуального веса с увеличением загрязнённости донных отложений. В то же время для абры отмечена небольшая тенденция увеличения среднего индивидуального веса при росте загрязнённости морских грунтов. Изменения среднего индивидуального веса мелких детритоядных моллюсков (*H. acuta*) и полихет (*C. capitata*, *H. filiformis*) не носили выраженного характера во временном аспекте.

Ключевые слова: экологический статус, биотические индексы, загрязнение, зообентос, Чёрное море.

Макрозообентос является одним из узловых звеньев биотического круговорота вещества и энергии в прибрежных экосистемах. Пространственная стабильность и относительное долголетие макробентосных организмов и сообществ делает их наиболее удобными объектами в исследовании долговременных изменений морской среды под воздействием различных факторов среды [1-3]. А легко интерпретируемые количественные характеристики, такие как биомасса, численность, количество видов положены в основу большинства используемых в экологическом мониторинге индексов видового разнообразия и "индексов бентосного здоровья" [4-7]. В настоящее время в мировой практике применяется более 60 методов мониторинга по зообентосу, среди которых нет универсального, общепринятого. Одним из рекомендованных группой экспертов по интеркалибрации показателей для определения экологического статуса акватории Чёрного моря является индекса Шеннона (Shannon-Wiener Diversity Index) [8].

Севастопольская бухта, а соответственно и бентосные организмы, населяющие её, длительное время подвергались нефтяному загрязнению. Как известно, состав макрозообентоса в значительной мере зависит от типа донного осадка, а нормальное функционирование его жизненных систем – от их качества. Кроме того, физико-химические свойства донных осадков, степень их загрязнённости определяют развитие и количественные характеристики сообществ донных организмов, обитающих в тех или иных районах. Донные осадки портовых акваторий содержат в 10-100 раз больше нефтепродуктов, чем в рекреационных зонах [9]. В соответствии с этим крайне неравномерно распределен и макрозообентос [10-13]. Хроническое нефтяное загрязнение бухт приводит к обеднению видового состава бентосных сообществ, выраженному доминированию одного или нескольких устойчивых к загрязнению видов.

Мониторинговые исследования бентосных сообществ в регионе Севастополя проводятся отделом морской санитарной гидробиологии (ныне лаборатория хемотропологии) ИнБЮМ с 1973 г. по регулярной сетке станций [9,14-16]. Представленные исследования основаны на собственных материалах автора (1985-2009 гг.) и архивных материалах ОМСГ (1973-1982 гг.). К середине 80-х годов XX века в регионе Севастополя на отмечалось снижение количественных показателей макрозообентоса, на наиболее загрязнённых участках донные организмы отсутствовали. Однако, к 1994-1997 гг. средняя биомасса макрозообентоса в портовых акваториях Севастополя превышала 150 г·м⁻², а численность – 1500 экз·м⁻². Даже на наиболее загрязнённых участках, где макроорганизмы до этого практически полностью отсутствовали, количественные показатели обилия макробентоса приближались к значениям, характерным для относительно чистых районов. Анализ видовой структуры сообществ макрофауны показал, что, несмотря на некоторые колебания биомассы и численности макрозообентоса, в течение последнего десятилетия XX столетия в целом наблюдалось улучшение состояния бентосных сообществ. Однако в 2006 г. отмечалось снижение биомассы и численности макрозообентоса по сравнению с 1991-1997 гг. В портовых акваториях по-прежнему доминируют немногие виды, устойчивые к

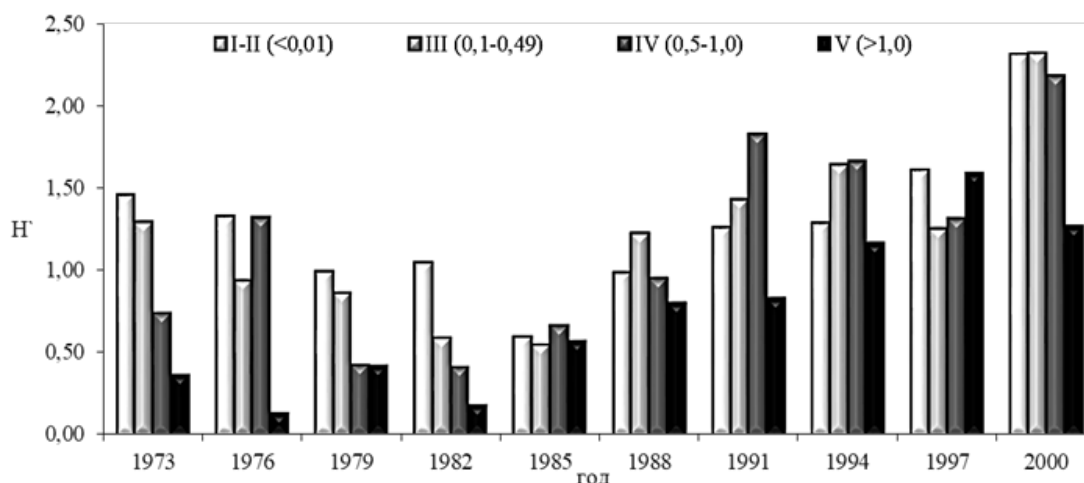


Рисунок 1. Среднее значение индекса видового разнообразия Шеннона (H') для макрозообентоса при различных уровнях загрязнения в регионе Севастополя

нефтяному загрязнению: *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805), *Cerastoderma glaucum* (Bruguère, 1789), *Bittium reticulatum* (da Costa, 1778), *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), *Capitella capitata* (Fabricius, 1780), *Polydora limicola* (Annenkova, 1934).

С 1985 г. в регионе Севастополя наблюдается рост числа видов на донных отложениях всех уровней загрязнения. В соответствие с этими процессами наблюдается возрастание значений индекса разнообразия Шеннона с середины 80-х годов. Так, на ДО с V уровнем загрязнения индекс Шеннона составлял от 0,5 до 0,6, а к 2000 г. увеличился до 1,25. На участках меньшими уровнями загрязнения (от I до IV уровня) значения индекса Шеннона в 2000 г. составляли более 2,0 (рис. 1).

Анализ многолетних данных по г. Севастополю за период с 1973 по 1979 гг. показал, что существовала достаточно сильная и значимая корреляция между биомассой бентоса и уровнем загрязнения. С годами зависимость становится менее четкой и более нестабильной. С 1994 по 2000 гг. высокие значения биомассы бентоса наблюдались как на относительно чистых участках акватории, так и на сильно загрязнённых. Возможно, это связано с тем, что с начала 90-х годов снизилась антропогенная нагрузка на прибрежные акватории, а также с приспособлением сообществ к внешней среде, выраженным в увеличении роли крупных организмов, устойчивых к загрязнению, и, как следствие, в росте общей биомассы. Таким образом, в период с 1991 по 2003 гг. биомасса зообентоса распределена практически равномерно по незагрязнённым и загрязнённым акваториям, за исключением участков с наибольшей концентрацией хлороформ-экстрагируемых веществ (ХЭВ).

Проанализированы изменения структурных показателей (численность, биомасса, средний вес особей) основных видов макрозообентоса, вносящих значительный вклад в общую численность и биомассу на донных отложениях (ДО) различной степени загрязнения за период с 1973 по 2009 гг. Для анализа выбраны два вида брюхоногих моллюсков (*Tritia reticulata*, *Hydrobia acuta*), два вида двустворок (*Abra segmentum*, *Cerastoderma glaucum*) и два вида полихет (*Capitella capitata*, *Heteromastus filiformis*). Гидробия и церастодерма являются массовыми представителями зообентоса в различных участках крымского побережья [17,18].

Биомасса и численность *T. reticulata* на загрязнённых ДО на протяжении всего периода выше, чем в районах до II уровня загрязнения (рис. 2). В донных осадках всех уровней загрязнения прослеживается тенденция увеличения биомассы тритии, только на IV уровне загрязнения биомасса тритии на протяжении с 1988 по 2000 гг. остаётся достаточно стабильной.

Численность *T. reticulata* на слабозагрязнённых ДО (до II уровня) возрастает с 1985 г. по 2000 г. На III и IV уровнях загрязнения в 1988 г. отмечается существенное увеличение численности тритии, которая снижается к 2000 г. На наиболее загрязнённых ДО (V уровень) пик численности пришёлся на 1994 г. Наблюдалась тенденция возрастания среднего веса тритий на всех уровнях загрязнения (рис. 2).

C. glaucum не встречалась в чистых ДО в 1988 г., в 1985 и 1994 гг. обнаруживали только небольшое количество молоди. Биомасса церастодермы на чистых ДО в несколько раз ниже, чем на загрязнённых. Существенный рост её биомассы в ДО с III по V уровень загрязнения отмечается в период с 1994 по 1997 гг., впоследствии биомасса снижается. Средняя численность церастодермы, не превышает 50 или 60 экз.·м⁻², только в 1988 г. средняя численность в районах с IV-м уровнем загрязнения была выше 300 экз.·м⁻². В период с 1994 по 1997 гг. наблюдался рост численности церастодермы на всех типах ДО.

Мелкий брюхоногий моллюск *H. acuta* встречался с начала 80-х годов на различных типах осадков. В этот период его биомасса составляла менее 0,5 г·м⁻², а численность не более 100 экз.·м⁻². В 90-х годах наблюдался резкий рост численности и биомассы гидробии на загрязнённых ДО. Наиболее высокими биомасса и численность гидробии были на ДО с IV и V уровнем загрязнения – более 3 г·м⁻² и более 1000 экз.·м⁻². В отдельных районах

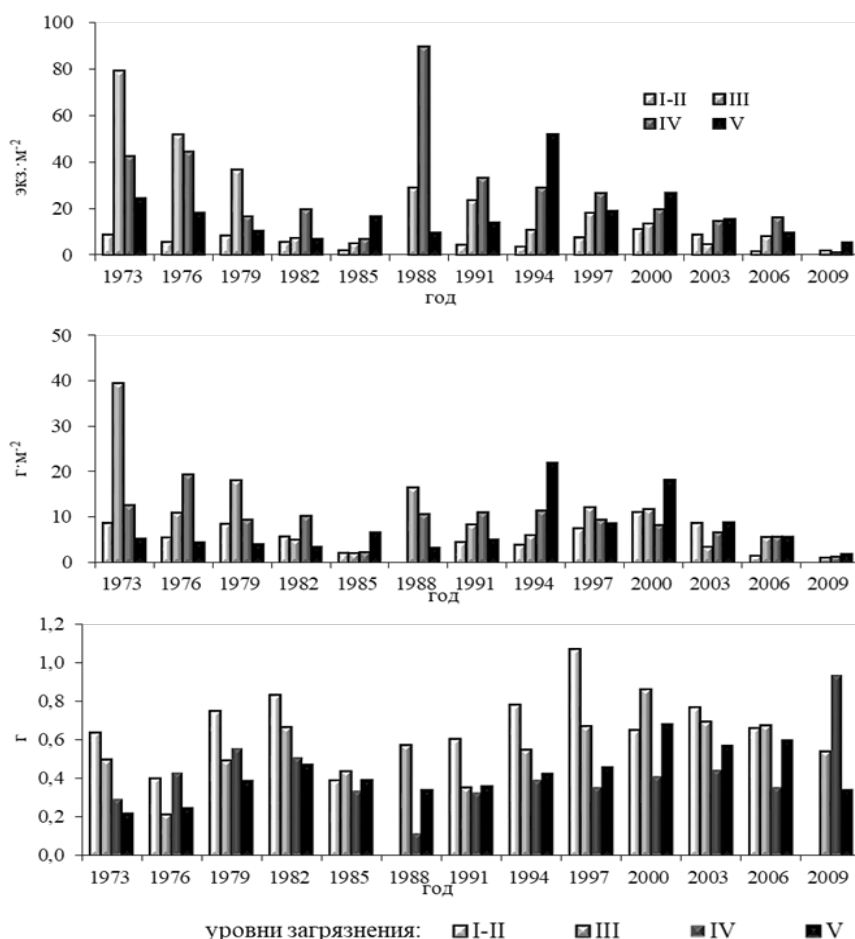


Рисунок 2. Средние значения численности (А), биомассы (Б) и среднего веса 1 особи (С) *T. reticulata* на донных отложениях с различным уровнем загрязнения

численность гидробии достигала до 5 и 6 тыс. экз.·м⁻². В начале XXI века показатели численности гидробии на загрязнённых ДО резко снизились, но до III уровня включительно оставались на достаточно высоком уровне (в среднем от 600 до 800 экз.·м⁻²).

Для более крупных видов моллюсков (*T. reticulata*, *A. segmentum*, *C. glaucum*) наибольшие значения численности и биомассы отмечены при II и IV уровнях загрязнения (рис. 3). При усилении загрязнения донных отложений количественные показатели представителей видов снижались, кроме гидробии, у которой наблюдали рост численности.

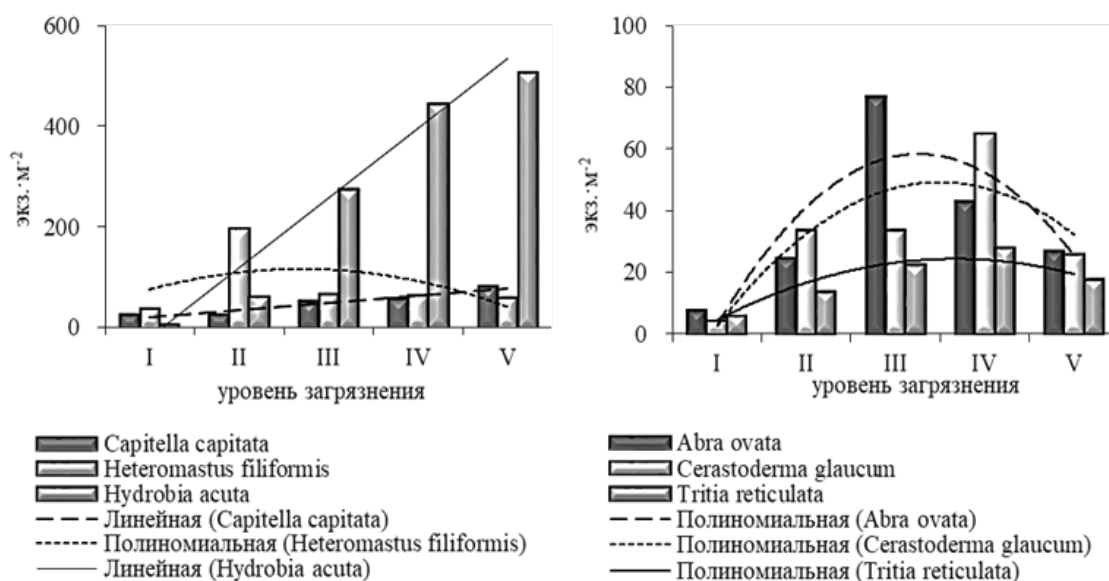


Рисунок 3. Средние значения численности массовых видов макрозообентоса на донных отложениях с различным уровнем загрязнения

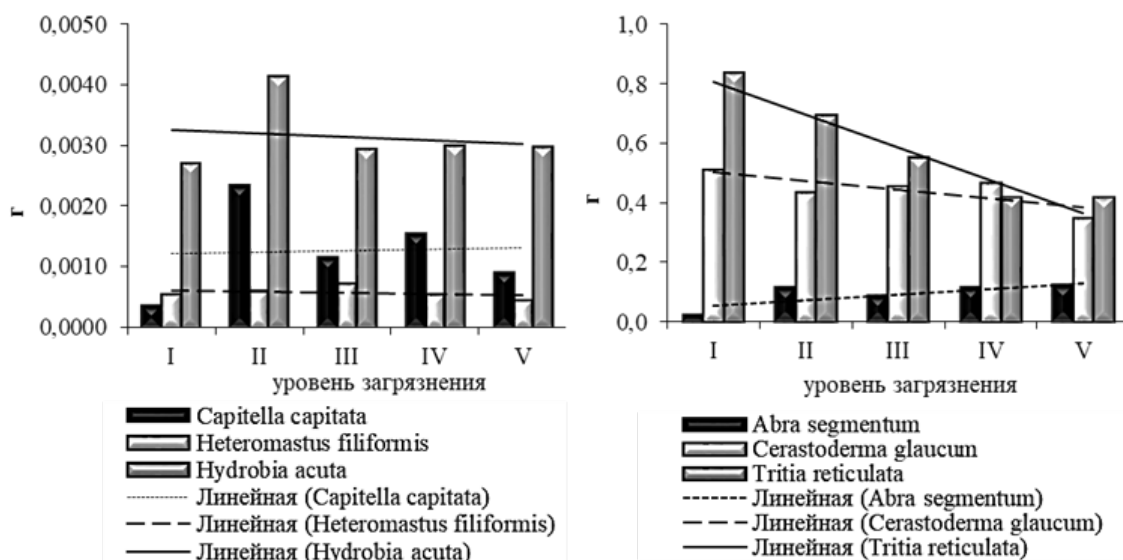


Рисунок 4. Средний вес 1 особи массовых видов макрозообентоса на донных отложениях с различным уровнем загрязнения

Отмечено увеличение значений среднего индивидуального веса *T. reticulata* с 1988 по 1997 гг. и последующее снижение к 2000 г. на ДО с низкими уровнями загрязнения. На ДО с IV уровнем загрязнения флуктуации среднего веса тритии были незначительными, а при V уровне отмечается постепенное увеличение её среднего веса к 2000 г. Для *C. glaucum* максимальные значения среднего веса отмечены в период с 1979 по 1982 гг. и с 1991 по 1994 гг. Отмечаются значительные вариации среднего веса 1 особи церастодермы как на ДО с различным уровнем загрязнения, так и во временном аспекте. В периоды 1997 по 2000 гг. вариации среднего веса 1 особи церастодермы на ДО различной степени загрязнённости наименьшие. Средний её вес в 90-е годы выше, чем в 80-е годы XX века и в начале XXI века. Изменения среднего веса гидробии не носили ярко выраженного характера.

Для церастодермы и тритии наблюдается тренд снижения среднего индивидуального веса с увеличением загрязнённости ДО (рис. 4). В то же время для абры отмечена небольшая тенденция увеличения среднего индивидуального веса при росте загрязнённости ДО. Возможно, это связано с различием в типе питания этих моллюсков. Абра является детритофагом, и по увеличению обогащения ДО органическими веществами создаются более благоприятные условия для особей этого вида моллюсков.

Изменения среднего индивидуального веса мелких детритоядных моллюсков (*H. acuta*) и полихет (*C. capitata*, *H. filiformis*) не носили выраженного характера во временном аспекте. При этом средний индивидуальный вес у данных устойчивых к органическому загрязнению, видов на наиболее загрязнённых участках (III – IV уровень) снижается.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Изучение биогеохимических закономерностей радиоэкологических и хемозоологических процессов в экосистемах водоемов Азово-Черноморского бассейна в сравнении с другими акваториями Мирового океана и отдельными водными экосистемами их водосборных бассейнов для обеспечения устойчивого развития на южных морях России» (№ гос. регистрации 124030100127-7).

Список литературы / References:

1. Choirunnisa and Takarina N.D. Community Structure of Macrozoobenthos at Blanakan Fish Pond, Subang, West Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, vol. 284, no. 1, art. 012027.
2. Mimier D., Zbikowski J. Effect of substrate change on macrozoobenthos structure. *Ecological Questions*, 2017, vol. 27, no. 3, pp. 109-118.
3. Yunita F., Leiwakabessy F., Rumahlatu D. Macrozoobenthos Community Structure in the Coastal Waters of Marsegu Island, Maluku, Indonesia. *International Journal of Applied Biology*, 2018, vol. 2 no. 1, pp. 1-11.
4. Dauer D.M. Biological criteria, environmental health and estuarine macrobenthic community structure. *Mar. Poll. Bull.*, 1993, 26, pp. 249-257.
5. Eka Maïda, Adhiana, Zurian. Macrozoobentos Diversity Index as a Bioindicator in Krueng Cunda River to Support the Success of the Shrimp Agribusiness at Lhokseumawe City, Aceh. *Proceedings of MICoMS, Emerald Reach Proceedings Series*, 2017, vol. 1 pp. 157-163.
5. Алёмов С.В. Современное состояние макрозообентоса Севастопольской бухты по данным бентосной съёмки 1997 г. *Экология моря: сборник науч. трудов*, Севастополь, 1999, вып. 48, с. 73-75 [Alyomov S.V. The current state of the macrozoobenthos of the Sevastopol Bay according to benthic survey data in 1997. *Ecology of the Sea: a collection of scientific papers*, Sevastopol, 1999, iss. 48, pp. 73-75 (In Russ.)].

6. Wilson J.G. Evaluation of estuary quality status at system level using the Biological Quality Index and the pollution load index. *Biology and Environment: Proceeding of the Royal Irish Academy*, 2003, vol. 103B, no. 2, pp. 49-57.
7. Wilson J.G., Jeffrey D.W. Europe wide indices for monitoring estuarine pollution. Richardson D.H.S. (ed.) *Biological indicators of pollution*. Dublin: Royal Irish Academy, 1987, pp. 225-242.
8. Wilhm J.L., Dorris T.C. Species diversity of benthic macroinvertebrates in a stream receiving domestic and oil refinery effluents. *American midland Naturalist*, 1966, vol. 76, no. 2, pp. 427-429.
9. Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Алёмов С.В. Санитарно-биологические аспекты экологии Севастопольских бухт в XX веке. Севастополь, 2003, 185 с. [Mironov O.G., Kiryukhina L.N., Alyomov S.V. *Sanitary and biological aspects of the ecology of Sevastopol bays in XX century*. Sevastopol, 2003, 185 p. (In Russ.)].
10. Болтачёва Н.А., Ревков Н.К. Донная фауна бухты Круглая (Чёрное море, Крым). Сообщение III: сезонные изменения макрозообентоса рыхлых грунтов. *Биоразнообразие и устойчивое развитие*, 2023, т. 8, № 4, вып. 28, с. 3-19 [Boltacheva N.A., Revkov N.K. Bottom fauna of Kruglaya Bay (Black Sea, Crimea). Communication III: seasonal changes in macrozoobenthos of loose sediments. *Biodiversity and sustainable development*, 2023, vol. 8, no. 4, iss. 28, pp. 3-19 (In Russ.)].
11. Болтачёва Н.А., Ревков Н.К., Бондаренко Л.В., Макаров М.В., Надольный А.А. Донная фауна бухты Круглой (Чёрное море, Крым). Сообщение II. Таксономический состав и количественное развитие макрозообентоса рыхлых грунтов. *Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН*, 2022, т. 7, № 2, вып. 22, с. 3-22 [Boltacheva N.A., Revkov N.K., Bondarenko L.V., Makarov M.V., Nadolny A.A. Bottom fauna of Kruglaya Bay (Black Sea, Crimea). Message II. Taxonomic composition and quantitative development of macrozoobenthos of loose sediments. *Proceedings of the Karadag Scientific Station named after T.I. Vyazemsky – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences*, 2022, vol. 7, no. 2, iss. 22, pp. 3-22 (In Russ.)].
12. Макаров М.В., Витер Т.В. Пространственно-временные изменения в макрозообентосе устья реки Черной и вершины Севастопольской бухты (Юго-Западный Крым). *Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия*, 2021, т. 7, № 4, с. 92-107 [Makarov M.V., Viter T.V. Spatial and temporal changes in the macrozoobenthos of the mouth of the Chernaya River and the top of Sevastopol Bay (Southwestern Crimea). *Scientific notes of the V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry*, 2021, vol. 7, no. 4, pp. 92-107 (In Russ.)].
13. Revkov N.K., Petrov A.N., Kolesnikova E.A., Dobrotina G.A. Comparative analysis of long-term alteration in structural organization of zoobenthos under permanent anthropogenic impact (Case study: Sevastopol Bay, Crimea). *Marine ecological journal*, 2008, vol. 3, no. 7, pp. 37-49.
15. Алёмов С.В. Сообщества макрозообентоса в регионе г. Севастополя: современное состояние и многолетние тренды. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту ім. Гнатюка. Сер.: Біологія. Спец. вип. «Гідроекологія»*, 2005, № 4, вып. 27, с. 7-9 [Alyomov S.V. Macrozoobenthos communities in the region of Sevastopol: a modern state and long-term trends. *Ternopol National Pedagogical University named after Hnatyuk. Ser.: Biology. special iss. "Hydroecology"*, 2005, no. 4, iss. 27, pp. 7-9 (In Russ.)].
16. Миловидова Н.Ю., Кирюхина Л.Н. Черноморский макрозообентос в санитарно-биологическом аспекте. – Киев: Наукова думка, 1985, 101 с. [Milovidova N.Yu., Kiryukhina L.N. *The Black Sea macrozoobenthos in the sanitary and biological aspect*. Kiev: Naukova dumka, 1985, 101 p. (In Russ.)].
17. Макаров М.В., Копиков В.Г. Распределение и экологические особенности моллюска *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805) у побережья Крыма. *Водные биоресурсы и среда обитания*, 2024, т. 7, № 2, с. 21-34 [Makarov M.V., Kopikov V.G. Distribution and ecological features of the mollusk *Hydrobia acuta* (Draparnaud, 1805) off the coast of Crimea. *Aquatic bioresources and habitat*, 2024, vol. 7, no. 2, pp. 21-34 (In Russ.)].
18. Щербань С.А., Макаров М.В., Мельник А.В. *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) (Cardiidae) – малоизученный вид двустворчатых моллюсков Черного моря: распространение и некоторые аспекты биологии и физиологии. Обзор. *Экосистемы*, 2022, № 32, с. 73-84 [Shcherban S.A., Makarov M.V., Melnik A.V. *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere, 1789) (Cardiidae) is a poorly studied species of bivalve mollusks of the Black Sea: distribution and some aspects of biology and physiology. Overview. *Ecosystems*, 2022, no. 32, pp. 73-84 (In Russ.)].

LONG-TERM CHANGES IN THE ECOLOGICAL STATUS OF THE SEVASTOPOL REGION'S WATER
AREAS BY BIOTIC INDICES AND STRUCTURAL INDICATORS OF THE MAIN SPECIES OF
MACROZOOBENTHOS

Alyomov S.V.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nakhimov Ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: alyomov_sv@ibss-ras.ru
Received 09.08.2024

Abstract. The paper analyzes changes in structural parameters (abundance, biomass, average weight of individuals) of the main macrozoobenthos species that make a significant contribution to the total abundance and biomass on sea bottom sediments of varying degrees of pollution in the Sevastopol coastal waters for the period from 1973 to 2009. Two species of gastropods (*Tritia reticulata*, *Hydrobia acuta*), two species of bivalves (*Abra segmentum*, *Cerastoderma glaucum*) and two species of polychaeta (*Capitella capitata*, *Heteromastus filiformis*) were selected for analysis. Concentrations of chloroform-extractable substances and structural parameters of macrozoobenthos were taken from archival documents of the chemoecology laboratory of the IBSS. Data analysis was performed in the *Microsoft Excel* software package. For larger mollusc species (*T. reticulata*, *A. segmentum*, *C. glaucum*), the highest values of abundance and biomass were noted at pollution levels II and IV. With increasing pollution of sea bottom sediments, the quantitative indicators of species representatives decreased, except for *H. acuta*, which showed an increase in abundance. For *C. glaucum* and *T. reticulata*, a trend of decreasing average individual weight with increasing pollution of sea bottom sediments is observed. At the same time, for *A. segmentum*, a slight trend of increasing average individual weight with increasing pollution of marine soils is noted. Changes in the average individual weight of small detritivorous mollusks (*H. acuta*) and polychaeta (*C. capitata*, *H. filiformis*) were not pronounced in the temporal aspect.

Key words: ecological status, biotic indices, pollution, zoobenthos, Black Sea.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ЭКТОПИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА

Тужилкин Д.А., Бородин А.С., Бер К.И.

Национальный исследовательский Томский государственный университет
просп. Ленина, 36, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: tda@mail.tsu.ru

Поступила в редакцию 09.08.2024

Аннотация. В работе приводятся результаты исследования опосредованности желудочковых и наджелудочковых экстрасистол внутренними и внешними параметрами. Показано, что эктопическая активность сердца имеет выраженную суточную динамику, большее число нарушений деятельности сердца приходится на дневное время суток. Определены эмпирические коэффициенты множественной регрессии и корреляции для эктопической активности сердца человека в зависимости от частоты сердечных сокращений, а также параметров физических полей окружающей среды. Показано, что динамика количества желудочковых экстрасистол может зависеть от вариаций факторов внешней среды, тогда как изменение количества наджелудочковых экстрасистол обусловлено внутренними причинами, связанными с функциональным состоянием организма. Обнаружено, что среди рассмотренных в работе геофизических факторов окружающей среды значимой составляющей, модулирующей эктопическую активность сердца человека, является геомагнитная возмущенность.

Ключевые слова: эктопическая активность, экстрасистолы, геомагнитная активность, метеофакторы.

Исследованию влияния условий окружающей среды на человека на индивидуальном и популяционном уровне посвящено множество научно-исследовательских работ. При этом наиболее изученным фактором является набор метеорологических состояний, а термин «метеочувствительность» в наши дни является весьма известным и широко употребляемым в повседневной жизни. Фактор «космической погоды» рассматривается в качестве одного из основных естественных физических факторов еще с 20-х годов прошлого века. При этом практически не существует работ, исследующих комплексный набор состояний естественных физических полей среды обитания различной (в том числе электромагнитной) природы на человека, ввиду сложности учета одновременно большого числа факторов, а также по причине отсутствия технической возможности проведения синхронных мониторинговых исследований с участием человека [1]. Кроме того, исследования именно эктопической активности сердца человека в качестве индикатора влияния на организм условий внешней среды эпизодичны, и представлены в основном в исследованиях по влиянию на человека космических полетов и условий невесомости [2].

Эктопическая активность сердца, или экстрасистолия, представляет собой внеочередное преждевременное сердечное сокращение, либо деполяризация и сокращение сердца или отдельных его камер. Является наиболее часто регистрируемым видом аритмий – экстрасистолы можно обнаружить у 60-70% людей. В основном они носят функциональный характер, обусловлены в первую очередь внутренними причинами, а также их появление связывают со стрессом, употреблением алкоголя, курением и т.д.

В работе анализировались суточные записи электрокардиограммы волонтера мужского пола без диагностированных отклонений в состоянии здоровья (всего 68 записей), полученные с использованием холтеровских регистраторов аппаратно-программного комплекса «Валента». Для данного волонтера характерным являлось среднесуточное количество желудочковых экстрасистол 152, наджелудочковых 34, что соответствует физиологической норме. В качестве действующих факторов внешней среды рассматривались такие метеофакторы, как температура (Т), давление на уровне станции (Р₀), влажность (U), а также числа Вольфа (рис. 1), Кр- и Ар-индексы в качестве факторов «космической погоды».

Оценка сопряженности геофизических факторов и эктопической активности CCC человека проводилась на основе двух наборов данных, содержащих соответствующие зависимые и независимые переменные с различным интервалом усреднения – один час и одни сутки. Связано это с форматом представления данных Мировым центром данных по солнечно-земной физике в Москве (<http://www.wdcb.ru/>). Так, например, широко используемый показатель солнечной активности – число солнечных пятен – представлен в открытом доступе как среднегодовое, среднесуточное и ежедневное число солнечных пятен. При этом Кр и связанные с ним ар и Ар индексы геомагнитной активности имеют значения как 3-х часовые (Кр и ар), так и ежедневные (Кр и Ар). Данные по метеорологическим факторам места проживания предоставлены из базы данных комплексного мониторинга параметров окружающей среды кафедры космической физики и экологии НИ ТГУ. Исходя из того, что диагностическая система «Валента» предоставляет данные по общей статистике сердечного ритма, а также эктопической активности (желудочковые и наджелудочковые экстрасистолы, паузы и т.д.) с усреднением за 1 час, было принято решение привести все используемые показатели к часовому интервалу. Те независимые переменные, которые в исходной базе данных представляли собой трехчасовые значения, пересчитывались в часовые на основе временных рядов соответствующих данных, где пропуски заполнялись посредством простой линейной интерполяции. Таким образом, набор данных с дискретом измерений 1 час содержит локальное время для г. Томска (time), максимальное, минимальное и среднее значение пульса (maxp, minp и mp), наджелудочковые

и желудочковые экстрасистолы (sw и w), общее (суммарное) количество экстрасистол (N_{arr}) – с одной стороны, и соответствующие им по локальному томскому времени геофизические параметры – температура (Т), давление на уровне станции (Р₀), влажность (U), температура точки росы (Т_d), ар индекс в качестве показателя планетарной геомагнитной активности.

В свою очередь, суточная таблица данных представлена теми же переменными, что и часовая, соответственно ар индекс представлен как Ар (который, согласно определению, получается осреднением восьми значений ар за день), а также дополнена Кр индексом возмущенности геомагнитного поля и количеством солнечных пятен (SN).

Все метеорологические и геофизические индексы, перечисленные выше, вычисляются и публикуются по всемирному времени UT. В связи с этим, решалась задача по приведению всех данных к локальному (томскому) времени. Так интервал времени охватывает длительный период времени – с 2004 по 2023 год, эта задача требует учета происходивших в последние десятилетия изменений на территории Российской Федерации с переводом стрелок на «летнее» и «зимнее» время, отказом от перевода стрелок и переходом на постоянное «зимнее» время, а затем возврат Томской области на постоянное «летнее» время.

Полученный набор данных позволяет провести анализ суточной динамики эктопической активности сердца и оценить основные статистические показатели ее изменчивости. Как показано на рисунке 1, для желудочковых и наджелудочковых экстрасистол распределение подчиняется экспоненциальному закону. В обоих случаях наиболее вероятными значениями являлись нулевые значения в час. В процентном соотношении, исходя из рисунка 1а, в 22% случаев наблюдалось отсутствие желудочковых экстрасистол. В рисунке 1б замечена похожая ситуация, но т.к. наджелудочковые экстрасистолы встречаются наиболее редко, в отличие от желудочковых, в процентном соотношении, в 57 % случаев наблюдалось их отсутствие.

На рисунке 2 представлен график зависимости количества эпизодов эктопической активности сердца в зависимости от времени суток, где в качестве доверительных интервалов выступает стандартная ошибка среднего (SE – standart error). Видно, что за все время выборочной статистики для желудочковых экстрасистол характерно наличие выраженной суточной динамики, а максимальное их количество приходится на дневное время суток. Наджелудочковые экстрасистолы возникают крайне редко, хотя при этом наблюдается некоторая особенность – повышение их числа около 3 часов ночи.

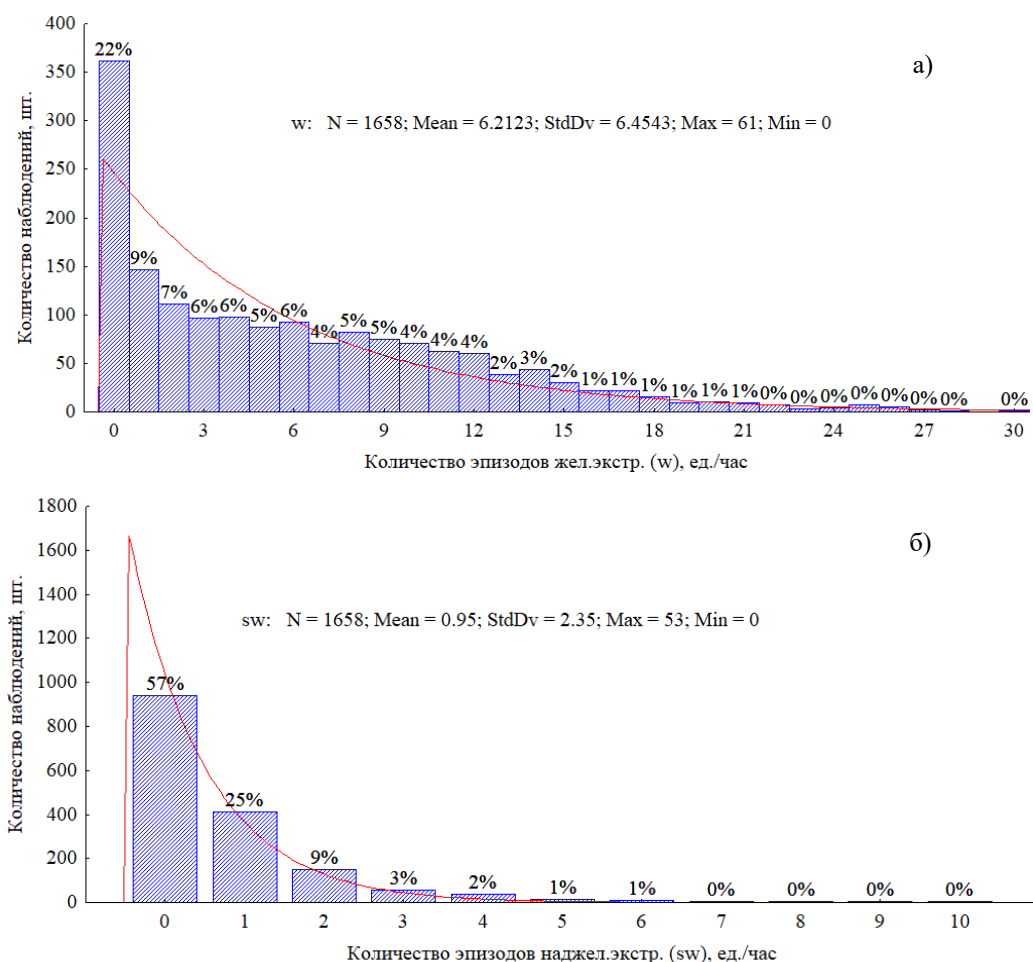


Рисунок 1. Гистограмма распределения количества эпизодов (а) желудочковых и (б) наджелудочковых экстрасистол

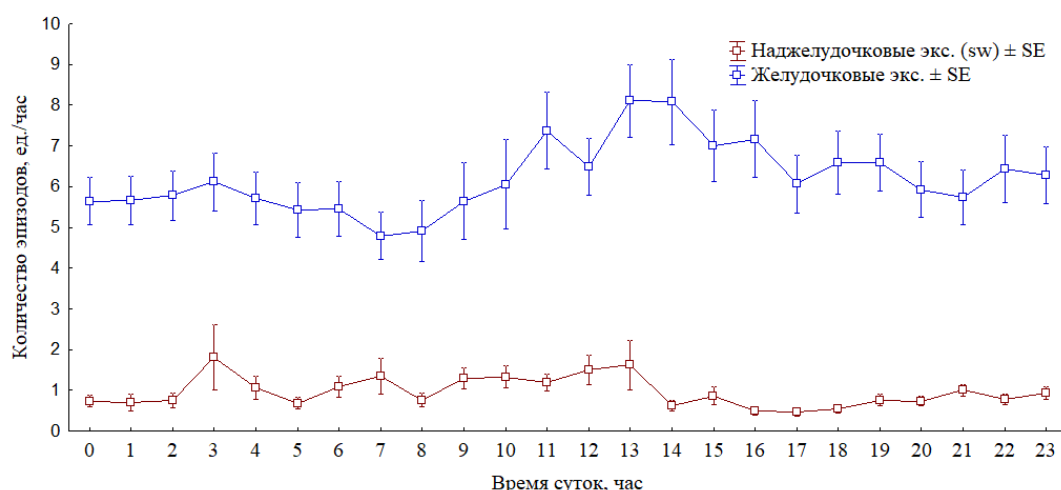


Рисунок 2. График зависимости количества эпизодов от времени суток

Если рассмотреть зависимость числа желудочковых и наджелудочковых экстрасистол от средней частоты сердечных сокращений (рис. 3) в рамках однофакторного дисперсионного анализа, то оказывается, что с вероятностью 95% число желудочковых экстрасистол зависит, а число наджелудочковых экстрасистол не зависит от средней частоты сердечных сокращений. При этом коэффициент линейной корреляции Пирсона, числа желудочковых экстрасистол с ЧСС достоверен и равен 0,34 (уровень доверительной вероятности равен 95%), а наджелудочковых – недостоверен, и равен -0,02. В пределах наблюдаемой изменчивости этих переменных вид функции является линейным.

На следующем этапе работы была проведена статистическая оценка связности параметров активности ССС и используемых в работе физических факторов окружающей среды. Проводился расчет линейной корреляции Пирсона между парами соответствующих зависимых и независимых переменных. В таблице 1 приведены результаты для данных с интервалом усреднения в 1ч. В соответствии с этими коэффициентами, средний уровень функционирования ССС, за который ответственен показатель ЧСС_{средн.}, в большей степени сопряжен с влажностью ($R = -0,18$), температурой ($R = -0,08$), а также тесно связанной с этими метеофакторами температурой точки росы ($R = -0,11$). Отрицательные значения коэффициента корреляции показывают, что исследуемые показатели изменялись в противоположных направлениях. Похожая качественно картина наблюдается и для максимального и минимального значений пульса, но для минимального пульса обнаруживается еще слабая положительная сопряженность с давлением.

Что касается эктопической активности сердца, то наджелудочковые экстрасистолы не обнаруживают достоверных коэффициентов корреляции с рассматриваемыми физическими факторами, что в целом хорошо согласуется с литературными данными, в которых утверждается о том, что этот тип аритмии обусловлен полностью внутренними причинами. В свою очередь желудочковые экстрасистолы характеризуются наличием достоверной, хотя и слабой, корреляцией со всеми рассматриваемыми факторами.

Температура окружающего воздуха, как и температура точки росы имеют в данном случае наибольшие коэффициенты ($R = -0,14$ и $R = -0,13$), а давление, влажность и ар-индекс геомагнитной активности характеризуются слабой положительной корреляцией ($R=0,09$, $R=0,06$, $R=0,06$ соответственно).

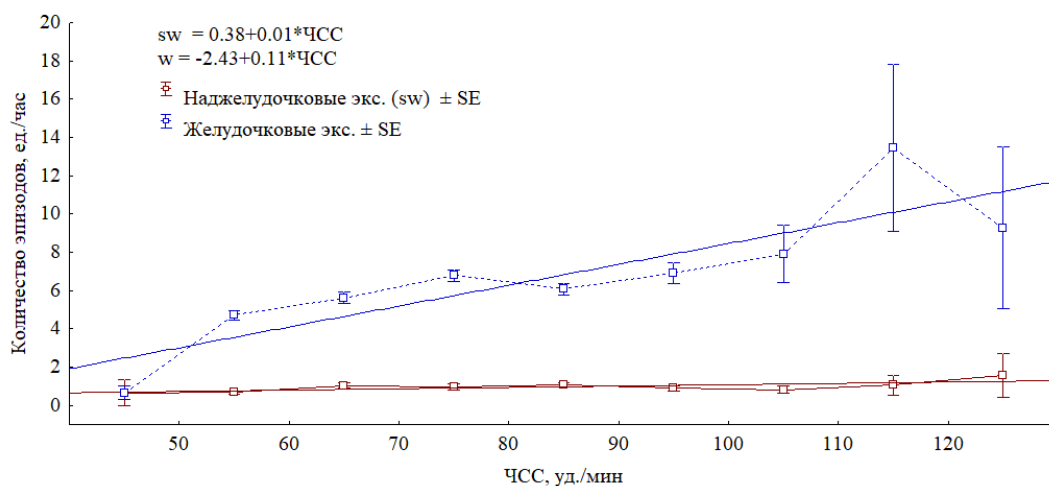


Рисунок 3. Зависимость количества эпизодов от частоты сердечных сокращений

Таблица 1. Коэффициенты корреляции параметров сердечно-сосудистой деятельности и факторов окружающей среды, достоверные ($p < 0,05$) коэффициенты выделены жирным шрифтом

	ЧССмакс	ЧССмин	ЧССсредн	Надж.экс.	Жел.экс.
Температура	-0,07	-0,13	-0,08	0,01	-0,14
Давление	0,00	0,07	0,03	-0,01	0,09
Влажность	-0,10	-0,20	-0,18	-0,00	0,06
Точка росы	-0,09	-0,16	-0,11	0,01	-0,13
ар-индекс	-0,02	0,01	0,00	0,01	0,06

На следующем этапе анализировались среднесуточные значения случаев возникновения наджелудочковых и желудочковых экстрасистол при воздействии таких факторов окружающей среды как солнечная активность, выраженная в числах Вольфа, геомагнитная активность (Кр и Ар индексы), а также метеофакторы – температура, давление, влажность и точка росы. Большинство анализируемых в данной работе суточных записей ЭКГ, за исключением нескольких суток, пришлось на периоды низкой солнечной активности, когда значение числа Вольфа не превышало 60. Для целей последующего анализа было принято решение исключить эти несколько дней, пришедшиеся на период повышенной солнечной активности, из рассмотрения, по причине малой статистики этих эпизодов. Таким образом, все исследуемые далее эпизоды эктопической активности сердца происходили в сравнимых условиях спокойного солнца.

На рисунке 4 представлена зависимость и количество эпизодов желудочковых экстрасистол от чисел Вольфа. В данном случае с высокой долей вероятности можно предположить существование линейной сопряженности этих параметров. Исходя из полученного уравнения регрессии можно констатировать, что увеличение чисел Вольфа на единицу приводит к увеличению количества желудочковых экстрасистол у данного волонтера более чем на 5 штук. Для наджелудочковых экстрасистол подобной закономерности не наблюдается.

Рассчитанные далее коэффициенты корреляции (табл. 2) подтверждают хорошую сопряженность количества эпизодов желудочковых экстрасистол с интегральной солнечной активностью, что выражается в высоком положительном значении линейной корреляции Пирсона $R = 0,53$. Коэффициент детерминации в этом случае составляет 0,28, что можно интерпретировать как обусловленность на 28% изменения числа желудочковых экстрасистол влиянием солнечной активности. Сопряженность с температурой окружающего воздуха можно воспринимать как проявление сезонности в динамике числа экстрасистол. Геомагнитная возмущенность также демонстрирует хорошую корреляцию с желудочковыми экстрасистолами, до 10% их вариаций могут быть обусловлены ее изменчивостью. Наджелудочковые экстрасистолы, как и прежде не обнаруживают достоверных коэффициентов корреляции с факторами окружающей среды.

Таким образом, проведенное исследование позволяет предположить, что естественные физические факторы внешней среды способны оказывать значительное влияние на эктопическую активность сердца. Различные условия окружающей среды, такие как изменения солнечной активности, геомагнитные вариации,

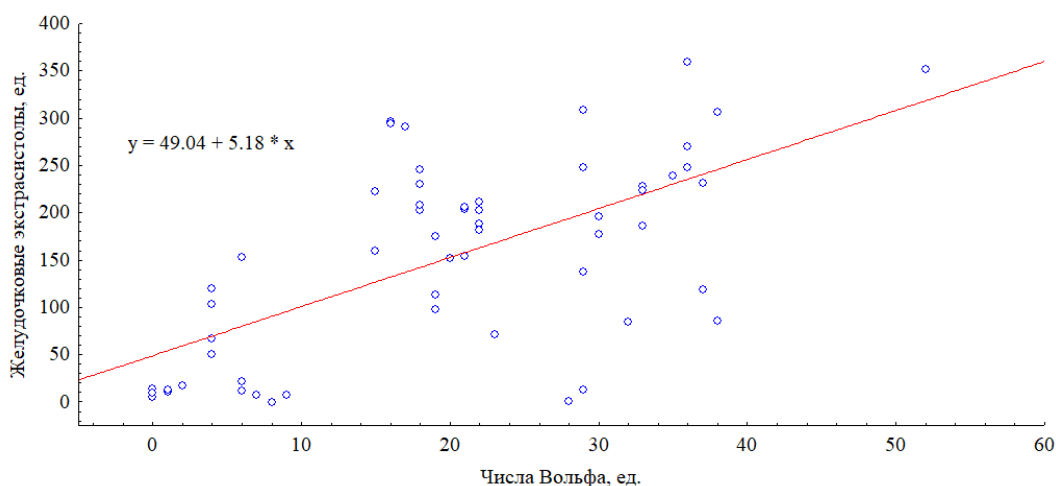


Рисунок 4. Регрессионная оценка количества случаев желудочковых экстрасистол числами Вольфа

Таблица 2. Коэффициенты корреляции параметров сердечно-сосудистой деятельности и факторов окружающей среды, достоверные ($p < 0,05$) коэффициенты выделены жирным шрифтом

	Числа Вольфа	Кр-индекс	Температура	Давление	Влажность	Ар-индекс
Надж.экс.	0,08	-0,11	-0,06	0,09	-0,09	0,00
Жел.экс.	0,53	0,24	-0,27	0,18	0,13	0,31

метеорологические условия могут привести к нарушениям в работе сердечно-сосудистой системы. Показано, что изменчивость числа желудочковых экстрасистол может быть обусловлена влиянием факторов внешней среды, тогда как изменение количества наджелудочковых экстрасистол обусловлено внутренними причинами, связанными с функциональным состоянием организма. Обнаружено, что геомагнитная возмущенность является значимой составляющей, модулирующей эктопическую активность сердца человека.

Список литературы / References:

1. Владимирский Б.М., Темурьянц Н.А., Мартынюк В.С. *Космическая погода и наша жизнь*. Фрязино: «Век 2», 2004, 224 с. [Vladimirsky B.M., Temuryants N.A., Martynyuk V.S. *Space weather and our life*. Fryazino: «Vek 2», 2004, 224 p. (In Russ.)].
2. Khine H.W., Steding-Ehrenborg K., Hastings J.L., Kowal J., Daniels J.D., Page R.L. et al. Effects of prolonged spaceflight on atrial size, atrial electrophysiology, and risk of atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2018, vol. 11, e005959.

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON ECTOPIC ACTIVITY OF THE HUMAN HEART

Tuzhilkin D.A., Borodin A.S., Ber K.I.

National Research Tomsk State University

Lenina Ave., 36, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: tda@mail.tsu.ru

Received 09.08.2024

Abstract. The paper presents the results of a study of the mediation of ventricular and supraventricular extrasystoles by internal and external parameters. It is shown that ectopic cardiac activity has a pronounced daily dynamic, with a greater number of cardiac disorders occurring during the daytime. Empirical coefficients of multiple regression for ectopic cardiac activity in humans are determined depending on the parameters of physical fields in the environment. It is shown that the dynamics of the number of ventricular extrasystoles may depend on variations in environmental factors, while changes in the number of supraventricular extrasystoles are due to internal causes associated with the functional state of the body. It is found that among the geophysical environmental factors considered in the paper, geomagnetic disturbance is a significant component modulating ectopic cardiac activity in humans.

Key words: *ectopic activity, extrasystoles, geomagnetic activity, meteorological factors.*