

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 9, № 4
2024**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 9, № 4
2024**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 9, No. 4, 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, № 4, 2024

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

А.Д. Подгурская, В.А. Цвеляя, М.М. Слотвицкий, К.И. Агладзе

Распространение волн возбуждения в монослое кардиомиоцитов крыс при влиянии различных доз ацетальдегида 299

В.С. Ключкова, А.С. Лелеков

Применение однокомпонентного подхода при моделировании линейного роста культуры микроводорослей различных систематических групп 304

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

С.В. Филиппов

Визуально-дифференциальный анализ (био-)макромолекул: методы исследования молекулярных структур с высокой степенью гомологии 311

Я.В. Мегер, Е.А. Пацановская, И.В. Дегтяр, О.И. Хохлова, А.О. Лантушенко

Генотипирование паразитического клеща, поражающего медоносных пчел рода *Apis* на крымских пасеках 320

Л.И. Исмаилова, Н.А. Ахмедов

Пространственная организация трипептидного и тетрапептидного аналогов молекулы ноцицептина 325

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

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

Экстраклеточные частицы (EPs). Классификация, свойства, биогенез (Обзор).....333

Е.В. Бутенко

Патохимические особенности рака молочной железы на фоне приёма бигуанида 359

А.С. Ботин, А.М. Пулин, Л.А. Каминская, А.О. Макарова, А.В. Кордова

Оценка возможности производства и применения бактериофагов при профилактике и лечении туберкулеза.....364

А.С. Ботин, М.Г.Х. Ризк, И.С. Логвиненко, А.В. Кордова

Перспективы применения графенсодержащих перевязочных материалов для заживления ран различной природы.....378

А.Р. Куулар Мангалтепе, А.С. Ботин

Комбинация биофизической микрополяризации с другими методами в комплексной реабилитации неврологических заболеваний. Базовые и новые варианты 388

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ**Т.Б. Сигачева, Е.Н. Скуратовская, Т.М. Чекмарева**Анализ популяционных, биохимических и токсикологических показателей бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) из двух районов Азовского моря 396**Ю.В. Дорошенко**

Бактериобентос и его роль в индикации загрязнений (на примере Стрелецкой бухты, Севастополь, Чёрное море) 402

Н.В. Шадрин, А.В. Празукин, Д.Д. Гассиев, Е.В. АнуфриеваПерспективы использования зеленых нитчатых водорослей *Cladophora* в животноводстве 407**Е.В. Ануфриева, М.Е. Гохер, М.Н. Григорьев, Н.В. Шадрин**

Изменение абиотических показателей в экосистемах искусственных озер пустынной депрессии Вади-эль-Райан (Египет) в период с 1984 по 2022 гг. 411

Е.В. Брилькова, А.А. Суханова, А.В. Брильков, Ю.Ю. Логинов

Оценка выживаемости и конкурентоспособности аборигенных микроорганизмов в процессах биоаугментации почв, загрязненных отходами деревообрабатывающих производств 417

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2024 ГОД..... 424

CONTENTS

Volume 9, No. 4, 2024

GENERAL AND MOLECULAR BIOPHYSICS

A.D. Podgurskaya, V.A. Tsvelaya, M.M. Slotvitsky, K.I. Agladze

Propagation of excitation waves in the monolayer of rat cardiomyocytes under the influence of various acetaldehyde doses.....299

V.S. Klochkova, A.S. Lelekov

Application of one-component approach in modeling linear growth of microalgae culture of different systematic groups.....304

MODELLING IN BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

S.V. Filippov

Visual differential analysis of (bio-)macromolecules: methods of studying molecular structures with a high degree of homology.....311

Ya.V. Meger, E.A. Patsanovskaya, I.V. Degtyar, O.I. Khokhlova, A.O. Lantushenko

Genotyping of a parasitic mite infecting honey bees of the genus *Apis* in crimean apiaries 320

L.I. Ismailova, N.A. Akhmedov

Spatial organization of the tripeptide and tetrapeptide analogues of nociceptin molecule..... 325

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

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

Extracellular particles (EPs). Classification, properties, biogenesis (Review)..... 333

E.V. Butenko

Pathochemical features of breast cancer against the background of biguanide intake..... 359

A.S. Botin, A.M. Pulin, L.A. Kaminskaya, A.O. Makarova, A.V. Cordova

Assessment of the possibility of production and use of bacteriophages in the prevention and treatment of tuberculosis.....364

A.S. Botin, M.G.H. Rizk, I.S. Logvinenko, A.V. Cordova

Prospects for the use of graphene-containing dressings for wound healing of various nature 378

A.R. Kuular Mangaltepe, A.S. Botin

Combination of biophysical micropolarization with other methods in the complex rehabilitation of neurological diseases. Basic and new options 388

BIOPHYSICAL ECOLOGY AND BIOLOGICAL RESOURCES**T.B. Sigacheva, E.N. Skuratovskaya, T.M. Chekmareva**Analysis of population, biochemical and toxicological parameters of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) from two areas of the Sea of Azov.....396**Yu.V. Doroshenko**

Bacteriobenthos and its role in pollution indication (on the Streletskaia bay example, Sevastopol, Black Sea) 402

N.V. Shadrin, A.V. Prazukin, D.D. Gassiev, E.V. AnufriievaProspects for the use of green filamentous algae *Cladophora* in animal husbandry.....407**E.V. Anufriieva, M.E. Goher, M.N. Grigorev, N.V. Shadrin**

Changes in abiotic parameters in artificial lake ecosystems of the desert depression of Wadi el-Rayan (Egypt) from 1984 to 2022 411

E.V. Brilkova, A.A. Suhanova, A.V. Brilkov, Yu.Yu. Loginov

Assessment of survival and competitiveness of transgene microorganisms in the processes of bioaugmentation of soil contaminated with waste from wood processing products 417

INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2024 424

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВОЛН ВОЗБУЖДЕНИЯ В МОНОСЛОЕ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС ПРИ ВЛИЯНИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ АЦЕТАЛЬДЕГИДА

Подгурская А.Д.^{1,2}, Цвеляя В.А.^{1,3}, Слотвицкий М.М.^{1,3}, Агладзе К.И.^{1,3}

¹ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского
ул. Щепкина, 61/2, г. Москва, 129110, РФ

² ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН
пр. Академика Семенова, 7, г. Черноголовка, 142432, РФ

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)
Институтский переулок, 9, г. Москва, 141701, РФ

Поступила в редакцию 12.08.2024

Аннотация. Ацетальдегид (АА), образующийся в организме при метаболизме этанола и также при гипоксии, может вызывать тахикардии, сердечную недостаточность, и, при хроническом алкоголизме, алкогольную кардиомиопатию. АА разрушает сократительный аппарат, нарушает функции митохондрий и ионный гомеостаз кардиомиоцитов. Известно, что АА в миллимолярных дозах не влияет на потенциал-зависимые натриевые ионные каналы, снижает амплитуду кальциевого транзистента и тока через кальциевые каналы L-типа. В данном исследовании методом оптического картирования изучено распространение волн возбуждения в монослой неонатальных крысиных кардиомиоцитов при остром воздействии АА в концентрациях 30–200 мМ. Ре-ентри при воздействии АА в концентрациях 30–200 мМ не образовывалось. Получено снижение скорости проведения волны возбуждения в 2 раза и более в диапазоне концентраций АА 60–200 мМ и необратимое снижение площади проведения при 100 мМ АА и 200 мМ АА на $18\pm 4\%$ и $29\pm 12\%$ соответственно. Данные результаты могут говорить о ингибировании веществом на щелевых контактах и разрушении цитоскелета кардиомиоцитов и, следовательно, о его проаритмогенном действии на целое сердце.

Ключевые слова: кардиомиоцит, ацетальдегид, волна возбуждения, оптическое картирование.

ВВЕДЕНИЕ

Активный метаболит этанола, ацетальдегид (АА), в 10–30 раз токсичнее этанола. Употребление алкоголя может провоцировать фибрилляцию предсердий [1]. При этом даже малые дозы алкоголя могут быть опасны для пациентов с дисплазией соединительной ткани, т.к. могут привести к внезапной сердечной смерти [2]. При хроническом злоупотреблении алкоголем более 10 лет может возникнуть алкогольная кардиомиопатия, обусловленная токсическим действием АА на клетки сердца вплоть до некроза. Наблюдается возникновение сердечной недостаточности из-за нарушения структур сократительного аппарата сердечных клеток при влиянии АА [3]. А также АА способствует образованию коллагена и фиброзу сердца - апоптозу и некрозу кардиомиоцитов с дальнейшим замещением их соединительной тканью [4]. Помимо метаболизма алкоголя, ацетальдегид образуется в организме при гипоксии из-за нарушения первого этапа окислительного фосфорилирования [5].

Концентрации АА в крови здорового человека европеоидной расы $>1 \mu\text{M}$ после умеренного употребления алкоголя, когда как половина японской популяции имеют в крови 10–50 μM , в результате чего образуется гиперемия и тахикардия [6].

Напрямую ацетальдегид воздействует на транспорт и связывание кальция и функцию митохондрий кардиомиоцитов, в связи с чем индуцируется окислительный стресс и клеточная гибель. Изолированные взрослые крысиные кардиомиоциты культивировали от 4 до 6 часов с АА (1–100 μM), в результате чего значительно увеличивалось содержание малонового диальдегида [7]. Изолированные взрослые мышинные кардиомиоциты инкубировали с АА 100 μM 18 часов, после чего кардиомиоциты дегенерировали до круглой формы и полной потери саркомерной ультраструктуры [8]. Изолированные миоциты фетального сердца человека (коммерческая линия) инкубировали с АА 100 μM и 200 μM 24–48 ч, что вызывало образование активных форм кислорода и апоптоз [9].

При пролонгированном внутрибрюшинном или ингаляционном введении ацетальдегида крысам интоксикация ацетальдегидом при поддержании его концентрации в крови порядка 0,2–1 мМ на протяжении 1 часа сопровождается повышением концентрации адреналина и норадреналина в сердце, оказывает повреждающее действие на миокард и усиливает кардионекротическое действие адреналина [10]. Ацетальдегид в условиях перфузии изолированного сердца в концентрациях больше либо равных 0,2–1 мМ, не вызывает некротических повреждений сердца, что свидетельствует об отсутствии их прямого некрозогенного действия на миокард, и не влияет на выраженность кардионекротического действия адреналина [10]. АА может индуцировать разрушение митохондрий сердечных клеток (110 мг/кг и 220 мг/кг вводили внутрибрюшинно крысам), что было проверено с помощью трансмиссионной электронной микроскопии спустя 4 недели [11].

В изолированных из взрослой крысы (7 недель) желудочковых миоцитах АА увеличивал амплитуду кальциевого транзистента при 1 μM и 10 μM и уменьшал при 100 μM [12]. В изолированных из взрослой крысы (25 недель) желудочковых миоцитах АА увеличивал амплитуду кальциевого транзистента в дозах $<3 \text{ mM}$ максимально на 19% при 0,3 мМ и уменьшал в дозах $>3 \text{ mM}$ максимально на 37% при 30 мМ [13]. В

гладкомышечных клетках A7r5 AA снижал кальциевый ток L-типа при 30 мМ на $21 \pm 4\%$ при 4 минутах инкубирования и на $39 \pm 7\%$ при 8 минутах инкубирования [14].

AA ингибирует IK_1 в предсердных миоцитах крыс при 3 μM [15] и у изолированных взрослых желудочковых миоцитов крыс при 3 μM и $54 \pm 8 \mu\text{M}$ [16]. Ток через потенциал-зависимые кальциевые каналы желудочковых миоцитов морской свинки активировался при воздействии 300 μM AA [17]. Возрастание кальциевого тока L-типа было обнаружено на предсердных миоцитах лягушки-быка [18] при влиянии 300 μM и 500 μM AA. С другой стороны, не было эффекта на IK_1 , на INa , на задержанный выпрямляющий калиевый ток (IK) при концентрации 500 μM и 1 мМ на той же модели [18]. 400 μM AA являлась критической дозой выживаемости первичной культуры предсердных кардиомиоцитов [19]. Не наблюдалось влияния на потенциал-зависимые натриевые каналы до 150 мМ AA, кальциевые каналы L-типа были ингибированы при воздействии 10–30 мМ AA в клетках гладкой мускулатуры грудной аорты крысы [20].

Целью данной работы являлось изучить распространение волн возбуждения (скорость волны, площадь проведения – процент клеток, проводящих возбуждение, и наличие ре-ентри) в монослое неонатальных крысиных кардиомиоцитов при остром воздействии AA в концентрациях 30–200 мМ методом оптического картирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные кардиомиоциты были получены из неонатальных крыс 3–4 дней от роду из питомника Андреевка согласно модифицированному протоколу Worthington. Клетки высаживали для получения конфлюентного монослоя на круглые стекла и осуществляли оптическое картирование образцов с кальций-зависимым красителем fluo-4. Ацетальдегид добавляли к клеткам в растворе Тирода и инкубировали с закрытой крышкой, образцы нагревали до 37°C при необходимости. Все данные представлены в виде среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, статистическая значимость определена ANOVA. Видео оптического картирования были обработаны в ImageJ Wolfram Mathematica. Более подробное описание методов представлено в предыдущей статье авторов [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Монослой неонатальных крысиных кардиомиоцитов были использованы для изучения распространения волн возбуждения при воздействии AA в концентрациях 30–200 мМ. Во всем диапазоне концентраций скорость падала, при воздействии AA в концентрациях от 80 мМ до 200 мМ в 2 раза и более (рис. 1).

На рисунке 2 представлены значения скоростей после отмывок AA. После воздействия 30 мМ и 50 мМ AA значения скорости восстанавливались, тогда как воздействие 60–200 мМ было необратимым (при 60–100 мМ восстановление в среднем до 90%, $p < 0,05$ и при 200 мМ восстановление максимально до 56%, $p < 0,001$). При частоте стимуляции 1 Гц, подаваемой на монослой при определении скорости, на скорость оказывает влияние проводимость потенциал-зависимых натриевых каналов и щелевых контактов. Так как, согласно литературным данным, AA не воздействует на потенциал-зависимые натриевые каналы, можно предположить об обратимом влиянии AA на щелевые контакты.

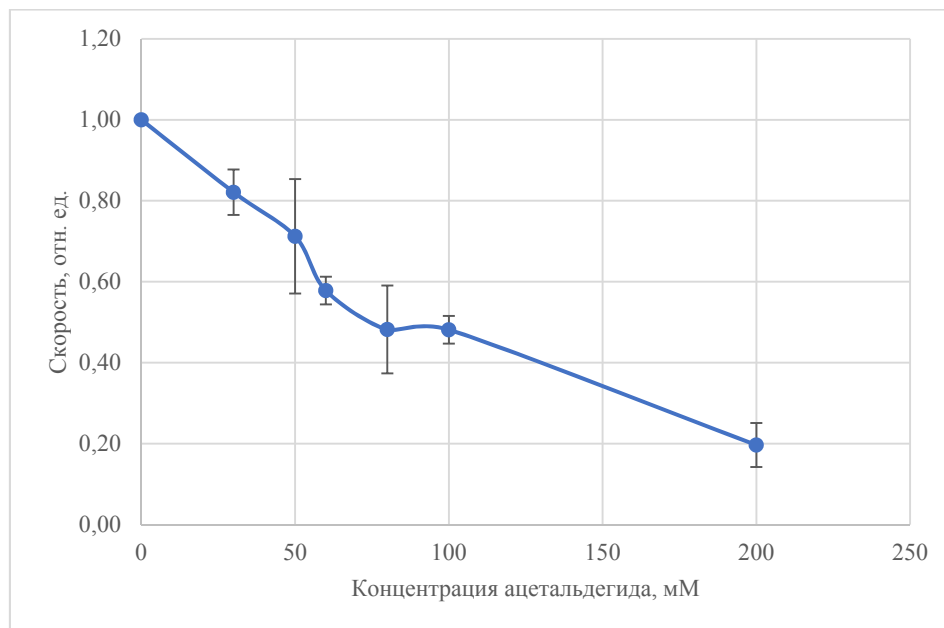


Рисунок 1. Эффект ацетальдегида на скорость проведения возбуждения в монослое крысиных кардиомиоцитов ($n=3$, $p < 0,01$). Скорость была измерена при частоте стимуляции 1 Гц. Скорость в контроле: 68 ± 8 мм/с. Скорость была измерена спустя 5 минут после добавления раствора AA

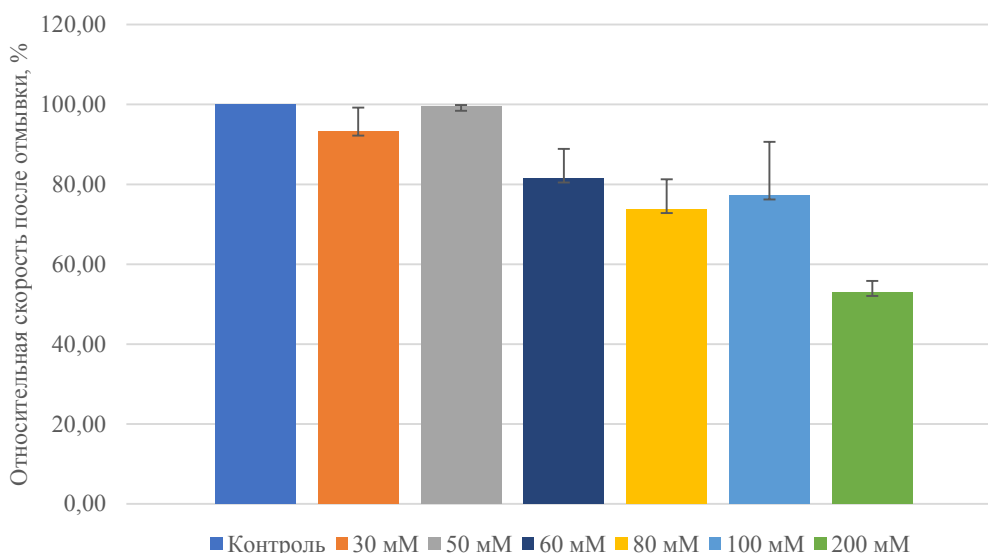


Рисунок 2. Скорость распространения ВВ в контроле и после отмывок АА в течение 5 минут ($n=3$, $p < 0,05$)

На рисунке 3 представлены активационные карты проведения возбуждения в монослое крысиных КМ при концентрациях АС 50 мМ, 100 мМ, 200 мМ. Ре-ентри не образовывалось, сокращалась площадь проведения при концентрациях 100 мМ и 200 мМ на $18 \pm 4\%$, $p < 0,001$, и $29 \pm 12\%$, $p < 0,01$, соответственно, без восстановления после отмывок. Согласно литературным данным АА повреждает саркомерную структуру кардиомиоцитов [8]. Наличие необратимо непроводящих областей (находящихся по периферии образцов) в проведенных экспериментах может быть связано с повреждением цитоскелета, аналогично представленному и описанному в [22].

Известно, что уменьшение скорости волны возбуждения является условием для возникновения ре-ентри в сердце человека [23]. Полученное нами снижение скорости распространения волны возбуждения согласуется с результатами, полученными на организменном уровне [24], и позволяет сделать вывод о проаритмическом воздействии ацетальдегида посредством возможного блокирования щелевых контактов.

Работа выполнена по Государственному заданию по разделу наука №55, тема: «Разработка персонализированных методов клеточных технологий в кардиохирургии» Правительства Московской области.

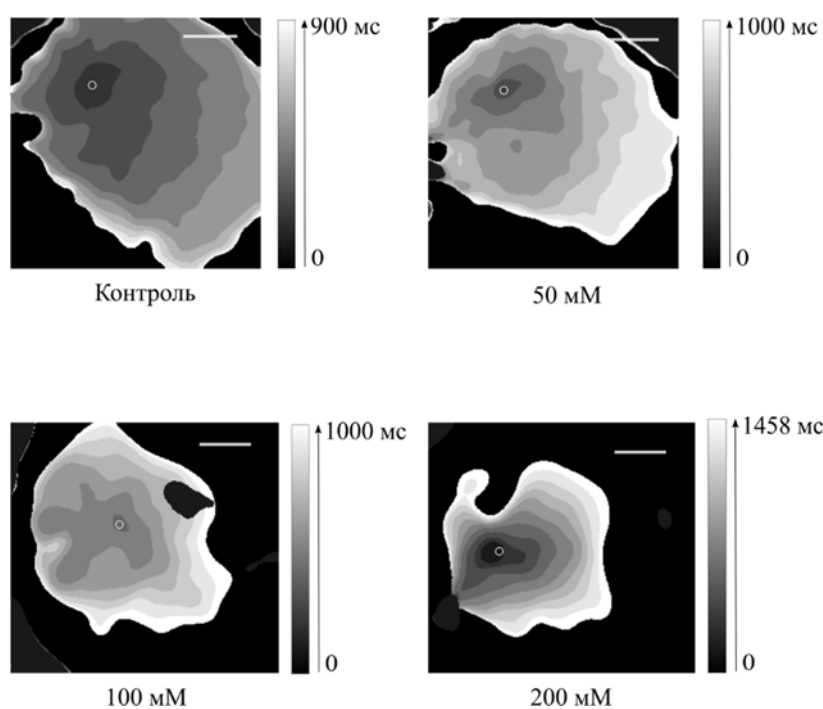


Рисунок 3. Распространение волны возбуждения в монослое неонатальных крысиных кардиомиоцитов под влиянием ацетальдегида. Активационные карты монослоя кардиомиоцитов с АА. Время активации показано цветом. Белые окружности соответствуют местам расположения стимулирующего электрода. Шкала 3,8 мм

Список литературы / References:

1. Voskoboinik A., Marcus G.M. The Impact of Alcohol Intake on Atrial Fibrillation. *Curr. Cardiol. Rep. Curr Cardiol Rep*, 2020, vol. 22, no. 10.
2. Шилова М.А. Внезапная сердечная смерть лиц молодого возраста: факторы риска, причины, морфологические эквиваленты. *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний*, 2015, № 6 [Shilova M.A. Sudden cardiac death in young people: risk factors, causes, morphological equivalents. *International Journal of Heart and Vascular Diseases. Cardioprogress Foundation for the Promotion of Cardiology*, 2015, vol. 3, no. 6 (In Russ.)].
3. Соколова О.В., Ягмуров О.Д., Насыров Р.А. Судебно-медицинская оценка морфологических изменений в миокарде, влияющих на его сократительную способность в случаях смерти от алкогольной кардиомиопатии. *Педиатр*, 2018, №1 [Sokolova O.V., Yagmurov O.D., Nasyrov R.A. Forensic medical assessment of morphological changes in the myocardium affecting its contractility in cases of death from alcoholic cardiomyopathy. *Pediatrician*, 2018, no.1 (In Russ.)].
4. Чернякова Н.С., Борщев А.В., Мерхи А.В., Иванчура Г.С. К вопросу о диагностике и лечении алкогольной кардиомиопатии. 2016, № 5 [Chernyakova N.S., Borshchev A.V., Markhi A.V., Ivanchura G.S. On the diagnosis and treatment of alcoholic cardiomyopathy. 2016, no. 5 (In Russ.)].
5. Леонидов Н.Б., Яковлев Р.Ю., Кулакова И.И., Лисичкин Г.В. Антигипоксикант и способ его получения. 2014 [Leonidov N.B., Yakovlev R.Yu., Kulakova I.I., Lisichkin G.V. *Antihypoxant and method of its preparation*. 2014 (In Russ.)].
6. Lindros K.O. Human Blood Acetaldehyde Levels: With Improved Methods, a Clearer Picture Emerges. *Alcohol. Clin. Exp. Res. John Wiley & Sons, Ltd*, 1983, vol. 7, no. 1, pp. 70-75.
7. Aberle N.S., Ren J. Short-Term Acetaldehyde Exposure Depresses Ventricular Myocyte Contraction: Role of Cytochrome P450 Oxidase, Xanthine Oxidase, and Lipid Peroxidation. *Alcohol. Clin. Exp. Res. John Wiley & Sons, Ltd*, 2003, vol. 27, no. 4, pp. 577-583.
8. Brandt M. et al. NOX2 amplifies acetaldehyde-mediated cardiomyocyte mitochondrial dysfunction in alcoholic cardiomyopathy. *Sci. Reports. Nature Publishing Group*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 1-16.
9. Li S.Y. et al. Attenuation of acetaldehyde-induced cell injury by overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene in human cardiac myocytes: role of MAP kinase signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol. J Mol Cell Cardiol*, 2006, vol. 40, no. 2, pp. 283-294.
10. Забирова И.Г. Кардиотоксическое действие этанола, ацетальдегида, тетрама и его фармакологическая коррекция в эксперименте. 1985 [Zabirova I.G. *Cardiotoxic effect of ethanol, acetaldehyde, teturam and its pharmacological correction in the experiment*. 1985. (In Russ.)].
11. Jin Y.Z. et al. Effects of acetaldehyde and L-carnitine on morphology and enzyme activity of myocardial mitochondria in rats. *Mol. Biol. Rep. Kluwer Academic Publishers*, 2014, vol. 41, no. 12, pp. 7923-7928.
12. Oba T. et al. Cellular redox state protects acetaldehyde-induced alteration in cardiomyocyte function by modifying Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008, vol. 294, no. 1.
13. Oba T., Maeno Y. Acetaldehyde alters Ca²⁺-release channel gating and muscle contraction in a dose-dependent manner. *Am. J. Physiol. Cell Physiol. Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, vol. 286, no. 5.
14. Morales J.A. et al. Acetaldehyde Inhibits Current through Voltage-Dependent Calcium Channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol. Academic Press*, 1997, vol. 143, no. 1, pp. 70-74.
15. Horakova Z. et al. Effect of ethanol and acetaldehyde at clinically relevant concentrations on atrial inward rectifier potassium current IK1: separate and combined effect. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2016, vol. 67, no. 3, pp. 339-351.
16. Bebarova M., Matejovic P., Simurdova M. Acetaldehyde at Clinically Relevant Concentrations Inhibits Inward Rectifier Potassium Current I^h sub K1^h in Rat Ventricular Myocytes. *Physiological*, 2015.
17. Chen F., Momose Y., Yamamura S. Effects of acetaldehyde on membrane potentials and ionic currents in single cardiac myocytes. *Pharm.*, 1999.
18. Chen F.S. et al. Effects of acetaldehyde on action potentials and ca²⁺ currents in single atrial myocytes from the bullfrog. *Pharmacology. Karger Publishers*, 2012, vol. 90, no. 3-4, pp. 216-222.
19. Zhao Y. et al. Effect of ethanol and its metabolites on acetylcholine-sensitive K (+) channel Kir3. 1 protein expression of neonatal rat primary atrial cardiomyocytes. *Zhonghua xin xue Guan Bing za zhi.*, 2015, vol. 43, no. 7, pp. 609-613.
20. Handlechner A.G., Weiger T.M., Hermann A. Acetaldehyde and Ion Channels. *Acetaldehyde: Biochemistry, Applications and Safety Concerns*; Editor: Madeline Stone., Nova Science Publishers, 2015, pp. 41-78.
21. Podgurskaya A.D. et al. Effect of heptanol and ethanol on excitation wave propagation in a neonatal rat ventricular myocyte monolayer. *Toxicology in Vitro*, 2018, vol. 51, pp. 136-144.
22. Podgurskaya A.D. et al. Cyclophosphamide arrhythmogenicity testing using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Scientific reports*, 2021, vol. 11, no. 1, p. 2336.
23. Елькин Ю.Е., Москаленко А.В. Базовые механизмы аритмий сердца. *Клиническая аритмология*, 2009, vol. 45, no. 978-985, p. 98803.
24. Lai Y.J. et al. Slow conduction and gap junction remodeling in murine ventricle after chronic alcohol ingestion. *J. Biomed. Sci. BioMed Central*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 1-9.

PROPAGATION OF EXCITATION WAVES IN THE MONOLAYER OF RAT CARDIOMYOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS ACETALDEHYDE DOSES

Podgurskaya A.D.^{1,2}, Tselaya V.A.^{1,3}, Slotvitsky M.M.^{1,3}, Agladze K.I.^{1,3}¹ Moscow Regional Research Clinical Institute M.F. Vladimirsky
Shchepkina St., 61/2, Moscow, 129110, Russia² Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of RAS
Academician Semenov Ave., 1, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia³ Moscow Institute of Physics and Technology
Institutskiy side-St., 9, Moscow, 141701, Russia

Received 12.08.2024

Abstract. Acetaldehyde (AA), formed in the body during the metabolism of ethanol and also under hypoxia, might cause tachyarrhythmias, heart failure, and, in chronic alcoholism, alcoholic cardiomyopathy. AA disrupts the contractile apparatus, the functions of mitochondria and ionic homeostasis in cardiomyocytes. It is known that AA in millimolar doses does not affect voltage-gated sodium ion channels, reduces the calcium transient amplitude and current through L-type calcium channels. In this study, the propagation of excitation waves in a monolayer of neonatal rat cardiomyocytes under acute AA exposure at concentrations of 30–200 mM was studied by optical mapping. Re-entry was not formed under the influence of 30–200 mM AA. A decrease in the conduction velocity by 2 times after 60–200 mM AA exposure and an irreversible conductivity area decrease at 100 mM AA and 200 mM AA by $18\pm4\%$ and $29\pm12\%$, respectively, were obtained. These results may indicate the gap junctions blockage by AA and cardiomyocyte sarcomere structure disruption by AA and, consequently, its proarrhythmogenic effect.

Key words: cardiomyocyte, acetaldehyde, excitation wave, optical mapping.

ПРИМЕНЕНИЕ ОДНОКОМПОНЕНТНОГО ПОДХОДА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЛИНЕЙНОГО РОСТА КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

Клочкова В.С.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

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

просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию 26.08.2024

Аннотация. В работе проведена верификация модели линейного роста микроводорослей различных систематических групп в условиях светолимитирования. Обзор литературы показал возможность применения простейшего однокомпонентного подхода для объяснения механизмов светозависимого роста накопительной культуры микроводорослей. Используемое в данной работе выражение зависимости удельной скорости роста от концентрации хлорофилла *a* основывается на линейной связи нормированной продуктивности и плотности потока субстрата. Верификация модели проводилась на красной морской водоросли *Porphyridium purpureum*, цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* и на диатомовой морской водоросли *Phaeodactylum tricorutum*. На основе анализа зависимости коэффициента поглощения света от плотности культуры определены область применимости модели. Полученные результаты свидетельствуют об универсальности предлагаемого теоретического подхода. Сделано предположение о том, что ключевым мультиферментным комплексом, на котором происходит сопряжение окислительных и восстановительных реакций, является РБФК. Учитывая приведённые в литературе стехиометрические соотношения хлорофилл/белок, хлорофилл/*P*₇₀₀ и РБФК/белок, оценена активность РБФК. Данный параметр для *A. platensis* составил 12 с⁻¹, что соответствует литературным данным. Таким образом, простейшая модель позволяет не только объяснять и прогнозировать рост культуры микроводоросли в условиях светолимитирования, но и определять характеристики ключевого мультиферментного комплекса.

Ключевые слова: интенсивность света, хлорофилл *a*, удельная скорость роста, удельное поглощение света, фотосинтетическая единица, активность РБФК.

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли – модельные объекты исследований для биофизики, биотехнологии и альгологии, которые являются огромным биоресурсом химических веществ (калий, кальций, хром, медь, железо, магний, марганец, фосфор, селен, натрий, цинк и т.д.), а также являются источниками биологически активных соединений. Большинство работ с культурами микроводорослей выполнено для малой оптической плотности, когда клетки пребывают в оптимальных условиях для роста. Кроме того, с методической точки зрения, работа с низкими концентрациями клеток уменьшает вероятность ошибок в связи с отсутствием разбавления суспензии при определении биомассы тем или иным способом. Росту оптически плотных интенсивных культур микроводорослей в литературе посвящено значительно меньшее количество исследований. Не приводятся результаты изучения влияния лимитирующих факторов на продукционные и оптические характеристики роста культуры и их количественную взаимосвязь с параметрами окружающей среды. В плотных культурах микроводоросли получают недостаточное количество света для фотосинтеза и роста, то есть, иными словами, клетки пребывают в условиях светолимитирования. В таком случае, в отсутствие лимитирования биогенными элементами питательной среды, на накопительной кривой роста обычно наблюдается продолжительная линейная фаза.

В работе [1] проведён обзор классических однокомпонентных моделей, позволяющие описать зависимости скорости роста микроводорослей от лимитирующих факторов, в том числе и от интенсивности света. Авторами другой статьи [2] проанализированы наиболее распространённые в литературе модели фотосинтеза и роста морского фитопланктона. В обоих работах показаны недостатки перечисленных уравнений, заключающиеся в том, что в своём большинстве модели являются эмпирическими и не могут быть изменены в соответствии с новыми данными о фотобиосинтезе микроводорослей. Авторами отмечено, что рассматриваемые модели являются однофакторными, т. е. описывают зависимость скорости роста культуры только от одного лимитирующего фактора, а также не учитывают размерную структуру популяции клеток, т. е. не являются распределёнными [3]. Для учёта совместного действия нескольких факторов авторы предлагают комбинировать (путем сложения или перемножения) различные уравнения [1,2,4].

Другая группа моделей подразумевает рассмотрение биомассы микроводорослей как суммы двух или более компонентов. Широкое распространение получили двухкомпонентные модели роста, которые базируются на положении, что поглощённая клеткой энергия преобразуется в резервные углеводы [5], которые расходуется на процессы биосинтеза клеточных структур и "темнового" дыхания. Стехиометрические соотношения, как для резервной, так и структурной составляющей считаются постоянными, что согласуется с предложенной ранее

концепцией для гетеротрофов [3]. По сравнению с однокомпонентным подходом, двухкомпонентные модели обладают существенно большим набором неизвестных параметров, что затрудняет интерпретацию коэффициентов. Таким образом, для простейшего описания роста оптически плотной культуры микроводоросли достаточно использовать однокомпонентный подход, который в свою очередь имеет прогностический характер, а у определяемых параметров достаточно просто установить физический и биологический смысл.

В связи с этим нами ранее предложена модель, позволяющая описать линейный рост культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* [6]. Модель основана на том, что линейная фаза роста оптически плотных культур микроводорослей обусловлена адаптацией клеток микроводорослей к постоянно меняющимся световым условиям и снижением количества световой энергии на единицу хлорофилла *a*, кроме того, позволяет определить размер фотосинтетической единицы (ФСЕ) при различной поверхностной облучённости. Однако, возникает вопрос о применимости такого подхода для описания роста культур низших фототрофных организмов различных систематических групп. В последние годы в литературе большое внимание уделяется морским видам микроводорослей. Например, *Porphyridium purpureum* привлекает к себе большое внимание благодаря своему потенциалу производства В-фикоэритрина, длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот и экзополисахаридов, которые являются отличным сырьём для производства продуктов питания, нутрицевтиков и фармацевтических препаратов [7]. Морская диатомовая микроводоросль *Phaeodactylum tricornutum* – потенциальный источник полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и фукоксантина, морского каротиноида, который, как сообщается, обладает антиканцерогенным действием [8]. Однако, наиболее распространённым объектом альготехнологии по-прежнему является цианопрокариота *Arthrospira platensis*, которая известна как богатый источник биологически активных соединений: β -каротина, хлорофилла, астаксантина, лютеина, фикобилипротеинов, аминокислот и белков, полиненасыщенных жирных кислот и витаминов [9].

Цель работы – провести верификацию однокомпонентной модели линейного роста микроводорослей различных систематических групп в условиях светолимитирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись: цианобактерия *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Gomont (1932), красная морская водоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew & Ross (1965) и диатомовая морская водоросль *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (1898) из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ “Коллекция гидробионтов Мирового океана”. Выращивание культур микроводорослей проводилось в накопительном режиме в культиваторах плоскопараллельного типа объёмом 1 л и толщиной слоя 2 см, используя среду Заррук [10] для *A. platensis* и среду для морских водорослей [11] для *P. purpureum* и *Ph. tricornutum*. В качестве источника освещения использовали световую решётку из люминесцентных лампы холодного света Philips Daylight 18 Вт. Освещённость поверхности фотобиореактора для всех объектов исследования составляла 5 клк, что составляет 16 Вт м⁻² или 75 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ с учётом спектра излучения лампы. Температуры культур стабилизировали на одном уровне: *A. platensis* – 26±1 °С; *P. purpureum* – 28±1 °С; *Ph. tricornutum* – 20±1 °С. Барботаж осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0,1 мм. Скорость барботажа: 1 л воздуха на литр культуры в минуту. Для каждого объекта исследования проводился контроль СО₂ по рН. Для культур *P. purpureum* и *Ph. tricornutum* оптимальные значения рН не превышали 8 единиц, для *A. platensis* – 9 единиц.

Отбор проб для определения оптической плотности проводили ежедневно. Оптическую плотность определяли на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. Кюветы (1 см) располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить погрешность измерения оптической плотности культуры, связанную с светорассеянием. Для определения сухого веса 5 – 10 мл суспензии центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об·мин⁻¹, сливали надосадочную жидкость, осадок промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали и сушили в течение суток при 55 °С. В результате получена линейная зависимость сухого веса от оптической плотности D_{750} , а коэффициенты пропорциональности составили: для *P. purpureum* – 1,1, *A. platensis* – 1, *Ph. tricornutum* – 0,55 г СВ л⁻¹ ед. опт. пл⁻¹. Концентрацию хлорофилла *a* определяли с помощью ранее разработанного метода разделения истинных спектров поглощения на кривые Гаусса [12]. Также по спектру рассчитывался интегральный коэффициент поглощения света.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке 1 представлены накопительные кривые роста для трёх исследуемых объектов при низкой интенсивности света 16 Вт м⁻², т. е. в условиях светолимитирования. Важно отметить, что все остальные факторы поддерживались на оптимальных уровнях. На кривых роста определены максимальная удельная скорость роста μ_m на экспоненциальной фазе и максимальная продуктивность P_m на линейной фазе согласно [6]. Для исследуемых объектов экспоненциальная фаза длилась около 3 суток, μ_m оставалась неизменной и составляла для *P. purpureum* 0,71 сут⁻¹ (0,03 ч⁻¹), *A. platensis* – 0,87 сут⁻¹ (0,04 ч⁻¹), *Ph. tricornutum* – 0,7 сут⁻¹ (0,03 ч⁻¹). Полученные значения в целом соответствуют известным литературным данным с учётом уровня облучённости: максимальная

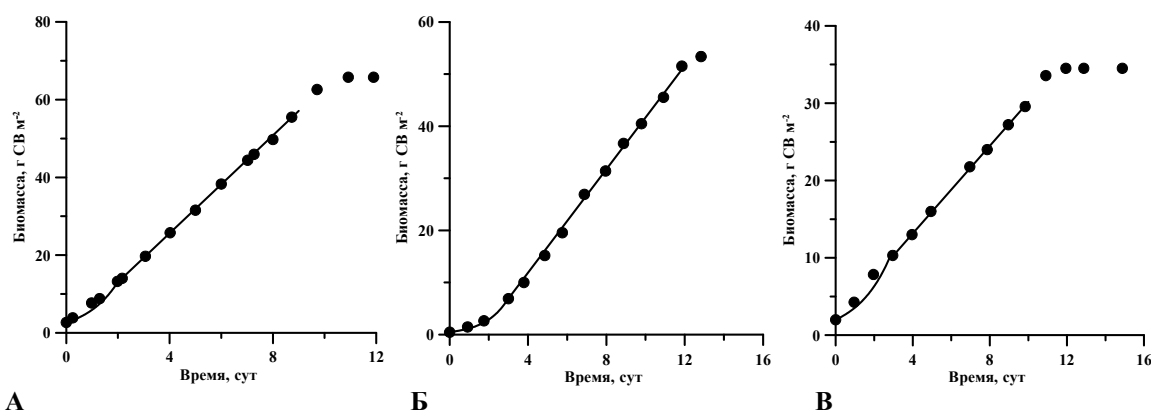


Рисунок 1. Накопительные кривые роста культур *P. purpureum* (А), *A. platensis* (Б) и *Ph. tricornutum* (В). Чёрная линия – аппроксимация экспоненциальной и линейной фаз; значения коэффициентов в тексте и таблице 1

скорость роста *A. platensis* $0,1 \text{ ч}^{-1}$, *P. purpureum* – $0,08 \text{ ч}^{-1}$ [14], *Ph. tricornutum* – $0,06 \text{ ч}^{-1}$ [15]. Зависимость μ_m от облучённости для культур микроводорослей невысокой оптической плотности описывается многочисленными моделями, которые в своём большинстве показывают сложную нелинейную взаимосвязь данных величин. Кроме того, на характер такой зависимости влияет предыстория культуры, её биохимический состав, что впервые продемонстрировано в работе [13] на основе разделения световой и темновой стадий фотобиосинтеза.

Линейная фаза культуры *P. purpureum* продолжалась на протяжении 6 суток, *A. platensis* – 8 суток, *Ph. tricornutum* – 5 суток, максимальная продуктивность составила $6,29 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ для культуры *P. purpureum*, *A. platensis* – $4,96 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$, *Ph. tricornutum* – $2,77 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$.

В процессе накопительного роста при переходе культуры из экспоненциальной фазы в линейную культура микроводоросли становится полупоглощающей, т. е. интегральный коэффициент поглощения α достигает 0,5 единиц или 50 %. Зависимость α от биомассы, представленная на рисунке 2, позволяет установить, при какой биомассе культура перестаёт быть разбавленной, а при какой становится оптически плотной:

$$\alpha = 1 - e^{-k_B \cdot B}, \quad (1)$$

где k_B – удельный коэффициент поглощения света биомассой, $\text{м}^2 \text{ г СВ}^{-1}$;

B – биомасса, г СВ м^{-2} .

Анализируя рисунок 2, можно заметить, что при использовании 2 см фотобиореактора культура *P. purpureum* стала полупоглощающей ($\alpha \approx 0,5$) при 8 г СВ м^{-2} , *A. platensis* – 3 г СВ м^{-2} , *Ph. tricornutum* – 5 г СВ м^{-2} . Выражение (1) позволяет с высокой точностью ($R^2 = 0,98$) определить удельный коэффициент поглощения света биомассой k_B . Результаты расчётов показывают, что он равен 0,09 для *P. purpureum*, 0,26 для *A. platensis* и 0,16 для *Ph. tricornutum*. Это значит, что при 1 г при 1 м^2 клетки *P. purpureum* поглощают 9 % падающего света, *A. platensis* – 26 %, а *Ph. tricornutum* – 16 %, что обусловлено различным пигментным составом, эффективностью усвоения и преобразования световой энергии. Полученные коэффициенты удельного поглощения могут быть использованы для определения α при различной плотности культуры.

В соответствии с поставленной целью опишем линейный рост трёх видов микроводорослей выражением, приведённым в работе [6]:

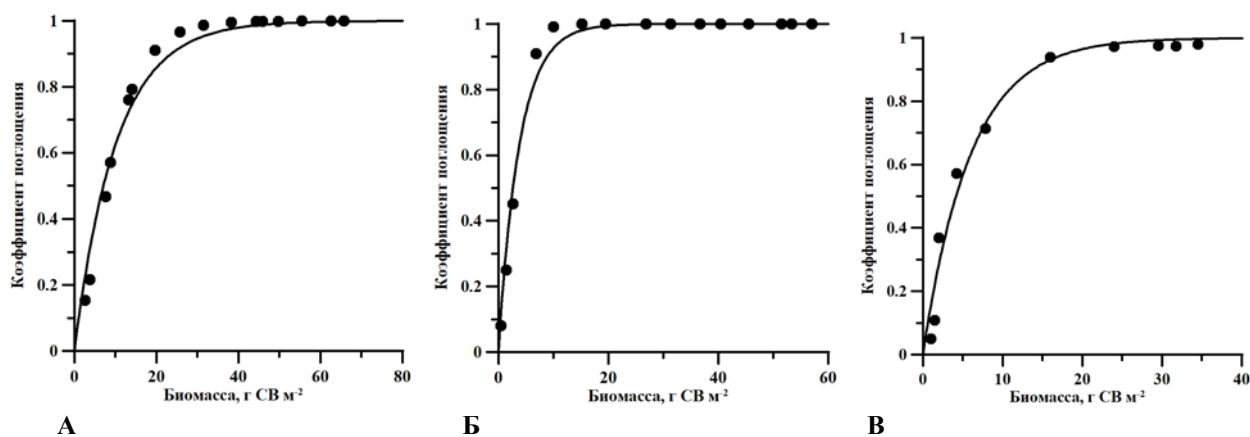
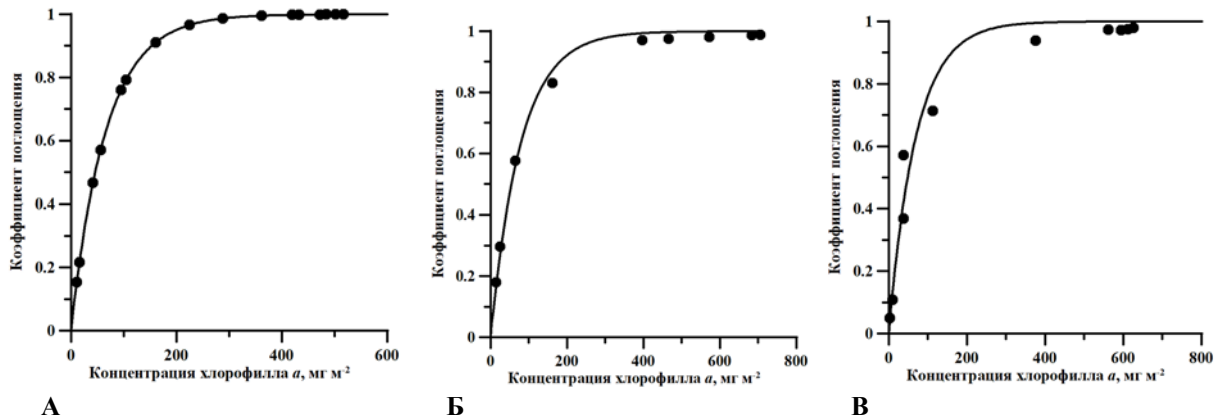


Рисунок 2. Зависимость коэффициента поглощения от биомассы культур *P. purpureum* (А), *A. platensis* (Б) и *Ph. tricornutum* (В). Чёрная линия – аппроксимация данных моделью (1); значения коэффициентов в тексте и таблице 1



А

Б

В

Рисунок 3. Зависимость коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла a культур *P. purpureum* (А), *A. platensis* (Б) и *Ph. tricornutum* (В). Чёрная линия – аппроксимация данных законом Бугера-Ламберта-Бера (4). Значения коэффициентов в тексте и таблице 1

$$\mu = (\mu_m + \mu_r) \cdot A \cdot I_0 \cdot \frac{\alpha}{\pi} - \mu_r, \quad (2)$$

$$A = \frac{\varphi_e}{\mu_e \cdot \chi} \cdot \psi, \quad (3)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость роста, сут⁻¹;

μ_r – удельная скорость эндогенного расхода биомассы, сут⁻¹;

A – обобщённый параметр, мг хл a Вт⁻¹;

α – коэффициент поглощения света; I_0 – облучённость поверхности фотобиореактора, Вт м⁻²;

φ_e, μ_e – эффективность и активность ключевого мультиферментного комплекса;

χ – коэффициент пропорциональности концентрации ключевого мультиферментного комплекса и P_{700} ; π – концентрация хлорофилла a , мг м⁻²;

ψ – размер ФСЕ.

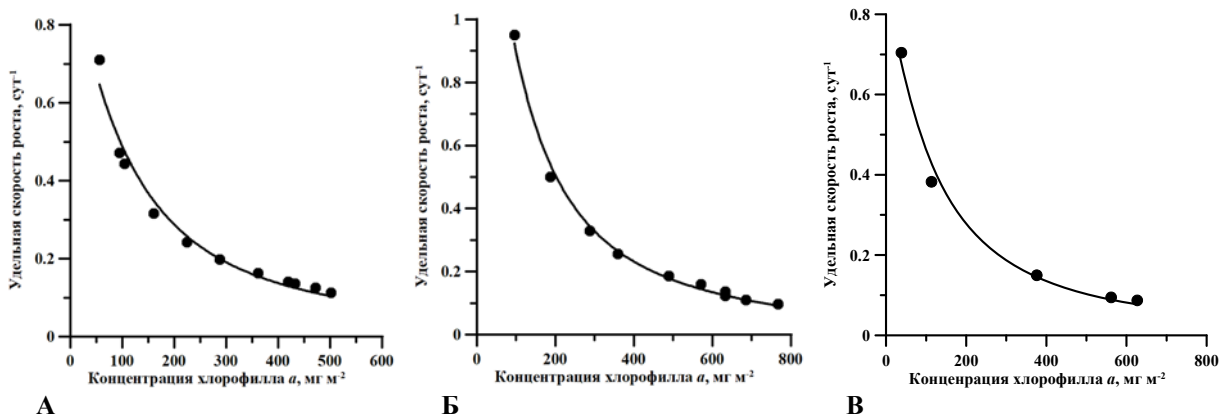
В выражении (2) α определяется согласно (4), потому что в общем случае поглощение света осуществляется не биомассой, а фотосинтетическими пигментами, которые в последующем передают всю энергию на хлорофилл. Для определения удельного коэффициента поглощения света хлорофиллом построена зависимость α от концентрации хлорофилла, представленная на рисунке 3:

$$\alpha = 1 - e^{-k_\pi \cdot \pi}, \quad (4)$$

где k_π – удельный коэффициент поглощения света хлорофиллом a , м² мг хл⁻¹;

π – концентрация хлорофилла a , мг хл м⁻².

Результаты верификации однокомпонентной модели линейного роста (2) микроводорослей различных систематических групп в условиях светолимитирования представлены на рисунке 4 и в таблице 1.



А

Б

В

Рисунок 4. Зависимость удельной скорости роста от концентрации хлорофилла a культур *P. purpureum* (А), *A. platensis* (Б) и *Ph. tricornutum* (В). Чёрная линия – аппроксимация данных моделью (2). Значения коэффициентов в тексте и таблице 1

Таблица 1. Продукционные и оптические характеристики исследуемых видов низших фотоавтотрофов

	μ_m , сут ⁻¹	P_m , г СВ м ⁻² сут ⁻¹	k_B , м ² ·г ⁻¹	k_π , м ² ·мг хл ⁻¹	A , мг хл·Вт ⁻¹	m_r , сут ⁻¹
<i>P. purpureum</i>	0,71	6,29	0,09	0,015	5,39	0,03
<i>A. platensis</i>	0,87	4,96	0,26	0,013	7,26	0,06
<i>Ph. tricornutum</i>	0,7	2,77	0,16	0,014	5,58	0,03

Анализируя константы k_π , полученные из выражения Бугера-Ламберта-Бера (4), можно сказать, что удельный коэффициент поглощения света хлорофиллом a практически одинаков для трёх исследуемых объектов и в среднем составил 0,014 м² мг хл⁻¹. Смысл этого параметра заключается в том, что при поверхностной концентрации хлорофилла a мг·м⁻² клетки культур микроводоросли поглощают 1,4 % падающего света. Полное поглощение ($\alpha \approx 1$) культуры *P. purpureum* наблюдается при концентрации хлорофилла a выше 160 мг м⁻², *A. platensis* – 200 мг м⁻², *Ph. tricornutum* – 200 мг м⁻². Аналогичные расчёты проведены для зелёных морских водорослей [16], где удельный коэффициент поглощения составил 0,008 м² мг⁻¹. Согласно литературным данным, параметр k_π зависит от спектрального состава света и может варьироваться в диапазоне от 0,005 до 0,03 м² мг⁻¹ для различных систематических групп низших фотоавтотрофов [17]. В настоящей работе использовали световые решётки из люминесцентных ламп одного и того же спектрального состава. Поэтому полученные значения удельных коэффициентов поглощения света хлорофиллом оказались практически одинаковыми для культур микроводорослей различных систематических групп.

В основе модели линейного роста культуры микроводорослей (2) лежит положение о том, что нормированная скорость синтеза биомассы пропорциональна приведённой плотности светового потока. Результаты моделирования показывают, что простейшая модель линейного роста является универсальной, потому что описывает с высокой точностью экспериментальные данные светолимитированного роста культур микроводорослей различных систематических групп. Кроме того, модель позволяет рассчитать характеристики ключевого мультиферментного комплекса. Многие исследователи предполагают, что ключевым мультиферментным комплексом F_0 выступает РБФК (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза оксигеназа) [18,19]. Этот фермент играет ключевую роль в процессе фотосинтеза, обеспечивая фиксацию углекислого газа и присоединения его к первичному акцептору.

Оценим активность РБФК для трёх исследуемых видов микроводорослей. Некоторые авторы установили, что содержание РБФК в общем белке принимает значения от 2 до 16 % для разных видов микроводорослей [18]. Для расчёта используем минимальное значение данного параметра 2 %, потому что оно отмечено при отсутствии лимитирования роста водорослей углекислым газом. Также для расчётов используем литературные данные о линейной корреляции концентрации хлорофилла с P_{700} [20–22] и белком [23–25] (см. табл. 2). Из аппроксимации экспериментальных данных зависимости удельной скорости роста от концентрации хлорофилла a (см. рис. 4) моделью (2), получены значения обобщённого параметра A , представленные в таблице 1. Ранее нами показано, что данная константа определяется активностью, эффективностью ключевого мультиферментного комплекса и соотношением хлорофилла и P_{700} согласно выражению (3). Отметим, что в процессе роста накопительной культуры размер ФСЕ остаётся постоянным, он определяется световыми условиями на момент запуска накопительной культуры [6]: у цианобактерий и зелёных видов микроводорослей с увеличением интенсивности света размер ФСЕ увеличивается [20]; у морских диатомовых и красных водорослей размер ФСЕ уменьшается с ростом интенсивности света [26]. Для оценки величины эффективности ϕ_e учтём калорийность АТФ 7 ккал моль⁻¹ и пропорциональность АТФ и концентрации хлорофилла a [27]. Полученное значение активности РБФК для культуры *A. platensis* соответствует данным для цианобактерий [19]. Для *P. purpureum* и *Ph. tricornutum* этот параметр близок к литературным данным [28]. Отметим, что полученные значения активности РБФК являются оценочными, на их величину сильно влияют приведённые стехиометрические соотношения биохимических компонентов, а также лимитирующие рост культуры факторы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена верификация однокомпонентной модели линейного роста микроводорослей различных систематических групп в условиях светолимитирования. Показано, что использование однокомпонентного подхода позволило получить информацию о параметрах ключевого мультиферментного комплекса. Отметим, что применение модели подразумевает учёт степени обеспеченности световой энергией, которую отображает зависимость коэффициента поглощения света от биомассы. Универсальность модели подтверждает гипотезу

Таблица 2. Стехиометрические соотношения биохимических компонент биомассы микроводорослей и активности РБФК

	РБФК/белок	белок/хл	хл/ P_{700}	μ_e , с ⁻¹
<i>P. purpureum</i>	0,02 [18]	30 [23]	160 [22]	31
<i>A. platensis</i>		58 [24]	122 [20]	12
<i>Ph. tricornutum</i>		38 [25]	880 [21]	24

линейной взаимосвязи скорости роста от приведённой плотности потока (квантов света). Точность расчётов продукционных параметров и кинетических коэффициентов определяется надёжностью экспериментальных данных не только по биомассе, но и по её биохимическим компонентам.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1).

Список литературы / References:

1. Yuvraj A., Padmanabhan P. Improvements in Conventional Modeling Practices for Effective Simulation and Understanding of Microalgal Growth in Photobioreactors: an Experimental Study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2021, vol. 26, pp. 483-500.
2. Звалинский В.И. Моделирование фотосинтеза и роста морского фитопланктона. *Океанология*, 2016, т. 56, № 4, с. 577-591 [Zvalinsky V.I. Modeling of photosynthesis and growth of marine phytoplankton. *Oceanology*, 2016, vol. 56, no. 4, pp. 577-591, doi: 10.7868/S0030157416040134 (In Russ.)].
3. Минкевич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. М.: Ижевск, 2005, 352 с. [Minkevich I.G. *Material-energy balance and growth kinetics of microorganisms*. Moscow: Izhevsk, 2005, 352 p. (In Russ.)].
4. Martinez-Ruiz M., Vazquez K., Losoya L., Gonzalez S., Robledo-Padilla F., Aquines O., Iqbal H.M., Parra-Saldivar R. Microalgae growth rate multivariable mathematical model for biomass production. *Heliyon*, 2023, vol. 9, no. 1.
5. Monaco C.J. Applicability of dynamic energy budget (DEB) models across steep environmental gradients. *Scientific reports*, 2018, vol. 8, doi: 10.1038/s41598-018-34786-w.
6. Лелеков А.С., Ключкова В.С. Моделирование роста и фотоадаптации накопительной культуры *Porphyridium purpureum*. *Математическая биология и биоинформатика*, 2024, т. 19, № 1, с. 169-182 [Lelekov A.S., Klochko V.S. Modeling of growth and photoadaptation of *Porphyridium purpureum* accumulation culture. *Mathematical Biology and Bioinformatics*, 2024, vol. 19, no. 1, pp. 169-182, doi: 10.17537/2024.19.169 (In Russ.)].
7. Patel A.K., Laroche C., Marcati A., Ursu A.V., Jubeau S., Marchal L., Petit E., Djelveh G., Michaud P. Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.*, 2013, vol. 145, pp. 345-350.
8. Owens T.G., Wold E.R. Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* I. Isolation and characterization of pigment-protein complexes. *Plant Physiol.*, 1986, vol. 80, pp. 732-738.
9. Michalak I., Mironiuk M., Godlewska K., Trynda J., Marycz K. *Arthrospira (Spirulina) platensis*: An effective biosorbent for nutrients. *Process Biochemistry*, 2019, doi: 10.1016/j.procbio.2019.10.004.
10. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D thèse. Paris, 1966, 114 p.
11. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82 [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. A series of biological sciences*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 75-82 (In Russ.)].
12. Чернышев Д.Н., Ключкова В.С., Лелеков А.С. Модель декомпозиции нативного спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum*. *Вестник Самарского университета. Естественная серия*, 2024, т. 30, № 1, с. 122-131 [Chernyshev D.N., Klochko V.S., Lelekov A.S. Model of decomposition of native absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* culture. *Vestnik of Samara University. Natural Science Series*, 2024, vol. 30, no. 1, pp. 122-131 (In Russ.)].
13. Тренкеншу Р.П. Влияние света на рост микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности. *Вопросы современной альгологии*, 2019, № 1 (19), с. 1-7 [Trenkenshu R.P. Effect of light on microalgae growth in continuous culture of low density. *Questions of modern algology*, 2019, no. 1 (19), pp. 1-7 (In Russ.)].
14. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу Р.П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. Новосибирск: Наука, 1980, с. 136 [Belyanin V.N., Sidko F.Ya., Trenkenshu R.P. *Energy of photosynthetic microalgae culture*. Novosibirsk: Science, 1980, 136 p. (In Russ.)].
15. Шоман Н.Ю., Акимов А.И. Действие света и температуры на удельную скорость роста диатомовых водорослей *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia sp.* № 3. *Морской экологический журнал*, 2013, т. 12, № 1 [Shoman N.Yu., Akimov A.I. Effect of light and temperature on the specific growth rate of diatom algae *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia sp.* № 3. *Marine Ecological Journal*, 2013, vol. 12, no. 1 (In Russ.)].
16. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 1, с. 53-60 [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Marine Biological Journal*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 53-60, doi: 10.21072/mbj.2018.03.1.06 (In Russ.)].
17. Ефимова Т.В. Действие спектрального состава света на структурные и функциональные характеристики микроводорослей: автореф. дис. канд. биол. наук. Севастополь, 2021, 28 с. [Efimova T.V. *Action*

- of spectral composition of light on structural and functional characteristics of microalgae: Cand. of Biological Sciences. Sevastopol, 2021, 28 p. (In Russ.).
18. Losh J.L., Young J.N., Francois M.M. Morel. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton. *New Phytologist*, 2013, vol. 198, no. 1, pp. 52-58, doi: 10.1111/nph.12143.
 19. Tcherkez G.G., Farquhar G.D., Andrews T.J. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, vol. 103, no. 19, pp. 7246-7251, doi: 10.1073/pnas.0600605103.
 20. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. *Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды*. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011, 152 с. [Zavorueva E.N., Zavoruev V.V., Krum S.P. *Lability of the first photosystem of phototrophs in different environmental conditions*. Krasnoyarsk: Siberian Federal University, 2011, 152 p. (In Russ.).]
 21. Friedman A.L., Alberte R.S. A diatom light-harvesting pigment-protein complex: purification and characterization. *Plant Physiol*, 1984, vol. 76, no. 2, pp. 483-489, doi: 10.1104/pp.76.2.483.
 22. Cunningham F.X., Dennenberg R.J., Mustardy L., Jursinic P.A., Gantt E. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. *Plant Physiol*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1179-1187, doi: 10.1104/pp.91.3.1179.
 23. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Lelekov A.S., Avsiyan A.L. Effect of specific irradiance on productivity and pigment and protein production of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) semi-continuous culture. *Bioresource Technology*, 2023, vol. 374, doi: 10.1016/j.biortech.2023.128771.
 24. Минюк Г.С. и др. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* при различных условиях азотного питания. *Экология моря*, 2002, вып. 62, с. 61-66 [Minyuk G.S. et al. Growth and biochemical characteristics of *Spirulina platensis* under different conditions of nitrogen nutrition. *Marine Ecology*, 2002, vol. 62, pp. 61-66 (In Russ.).]
 25. Jallet D., Caballero M.A., Gallina A.A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 2016, vol. 18, pp. 51-60, doi: 10.1016/2016.05.014.
 26. Falkowski P.G., Owens T.G. Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.*, 1980, vol. 66, pp. 592-595.
 27. Hunter B.L., Laws E.A. ATP and chlorophyll *a* as estimators of phytoplankton carbon biomass. *Limnology and Oceanography*, 1981, vol. 26, no. 5, pp. 944-956, doi: 10.4319/lo.1981.26.5.0944.
 28. Heureux A.M.C., Young J.N., Whitney S.M., Eason-Hubbard M.R., Lee R.B.Y., Sharwood R.E., Rickaby R.E.M. The role of Rubisco kinetics and pyrenoid morphology in shaping the CCM of haptophyte microalgae. *J. Exp. Bot.*, 2017, vol. 68, no. 14, pp. 3959-3969, doi: 10.1093/jxb/erx179.

APPLICATION OF ONE-COMPONENT APPROACH IN MODELING LINEAR GROWTH OF MICROALGAE CULTURE OF DIFFERENT SYSTEMATIC GROUPS

Klochkova V.S., Lelekov A.S.

¹Sevastopol State University

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

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

Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia

Received 26.08.2024

Abstract. In this work, we verified the model of linear growth of microalgae of different systematic groups under light-limiting conditions. The literature review showed the possibility of using the simplest one-component approach to explain the mechanisms of light-dependent growth of an accumulating culture of microalgae. The expression of the dependence of specific growth rate on chlorophyll *a* concentration used in this work is based on a linear relationship between normalized productivity and substrate flux density. Verification of the model was carried out on the red seaweed *Porphyridium purpureum*, the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* and on the diatom seaweed *Phaeodactylum tricornutum*. Based on the analysis of the dependence of the light absorption coefficient on the culture density, the applicability area of the model was determined. The obtained results indicate the universality of the proposed theoretical approach. It is assumed that RBPC is the key multienzyme complex where the conjugation of oxidative and reductive reactions takes place. Taking into account the stoichiometric ratios of chlorophyll/protein, chlorophyll/*P*₇₀₀ and RBPC/protein given in the literature, the activity of RBPC was estimated. This parameter for *A. platensis* was 12 s⁻¹, which is in agreement with literature data. Thus, the simplest model allows not only to explain and predict the growth of microalgae culture under light-limiting conditions, but also to determine the characteristics of the key multienzyme complex.

Key words: light intensity, chlorophyll *a*, specific growth rate, specific light absorption, photosynthetic unit, RBPC activity.

ВИЗУАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ (БИО-)МАКРОМОЛЕКУЛ: МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР С ВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ ГОМОЛОГИИ

Филиппов С.В.

ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН
ул. проф. Виткевича, 1, г. Пушкино, 142290, РФ; e-mail: fsv141@mail.ru
Поступила в редакцию 13.08.2024

Аннотация. Рассматривается методика и средства визуально-дифференциального анализа (VDA) применительно к исследованию молекулярных структур, полученных в ходе релаксации к равновесному состоянию во время расчетов замещений атомов кальция на цинк, магний и марганец в структуре гидроксиапатита методами теории функционала плотности с применением гибридных функционалов в модели суперъядейки. Все замещённые релаксации Ca1 и Ca2, представляют из себя молекулярные структуры с высокой степенью гомологии. Для сравнительного исследования гомологичных рядов таких структур были разработаны методы и реализующие их программные средства, призванные обеспечить соотносимость полученных результатов – как численных величин, так и проекционных карт поверхностей гомологичных молекулярных структур. Для стороннего программного обеспечения были составлены необходимые управляющие команды, а также написаны программные утилиты на языке Python, предназначенные для согласования форматов входных и выходных данных, а в программы, реализующие метод VDA, был внедрён функционал, необходимый для корректного и согласованного размещения гомологичных структур в 3D-пространстве: предварительный расчёт минимальных и максимальных расстояний от каждого атома молекулярной структуры до «проекционного центра» и автоматическое построение согласованных для всех исследуемых структур проекционных поверхностей. В том числе и динамических. Исследуемые структуры были размещены в едином «аналитическом пространстве», был выбран структурно один и тот же ОН-канал, были установлены одинаковые осевые линии для расчёта кратчайших расстояний, был определён согласованный (общий) диапазон расстояний, отображаемых на гипсометрических картах. Всё это позволило построить и проанализировать совмещённые графики изменений межатомных расстояний в ходе релаксаций с разными вариантами качественных и количественных замещений Ca1 и Ca2 – Mg, Mn, Zn, а также построить и проанализировать согласованные гипсометрические проекционные карты всех гомологичных структур.

Ключевые слова: визуально-дифференциальный анализ, VDA, гидроксиапатит.

В исследовании (био-)макромолекул нередко возникает необходимость анализа целого ряда гомологичных молекулярных структур, конформационные различия которых можно охарактеризовать как малозаметные. Такими молекулами очень часто выступают дуплексы ДНК с одинаковой нуклеотидной последовательностью, но с модифицированными основаниями (например, 8-оксигуанином вместо нативного гуанина) [1], (био-)молекулярные структуры со стереоизомерами [2] или же биополимеры с одинаковой последовательностью, но полученные в разных условиях численного или натурального эксперимента. Для сравнительных исследований таких молекулярных структур необходимо разместить их в едином «аналитическом пространстве». То есть, обеспечить согласованность размещения как самих гомологичных структур, так и их проекционных поверхностей в 3D-пространстве, установить единый для всех молекул диапазон расстояний-высот на гипсометрических картах их поверхностей и, наконец, обеспечить согласование форматов входных и выходных данных.

Все эти задачи были решены в ходе анализа изменений межатомных расстояний и построения динамических гипсометрических проекционных карт [3,4] поверхностей в структуре гидроксиапатита (ГАП), полученной релаксацией к равновесному состоянию, во время расчетов замещений атомов кальция на цинк, магний и марганец методами теории функционала плотности (ТФП) с применением гибридных функционалов в модели суперъядейки [5]. У всех релаксаций замещения проводились в позициях Ca1 и Ca2 (рис. 1) и в соответствии с этим «проекционные центры», необходимые для расчёта кратчайших расстояний до центра каждого атома, были размещены на оси ОН-канала (структурно – одного и того же для всех релаксаций), что естественным образом продиктовало и выбор цилиндрической проекции для построения гипсометрических карт поверхностей в структуре гидроксиапатита.

Исходные данные о ходе релаксации структур ГАП с замещениями были представлены в OUT-формате Quantum ESPRESSO [6], однако для [PDBImp for VDA ver. 5.14](#) [7] входным форматом описания молекулярных структур является PDB [8] в форме одного файла, если модель молекулярной структуры статична и серии файлов – если динамична. В последнем случае каждый файл описывает конформационное состояние (snapshot) молекулярной структуры в заданный момент времени.

Конвертация OUT-файла в PDB-файл выполнялась в программе Jmol ver. 16.1.41 [9] посредством вводимой

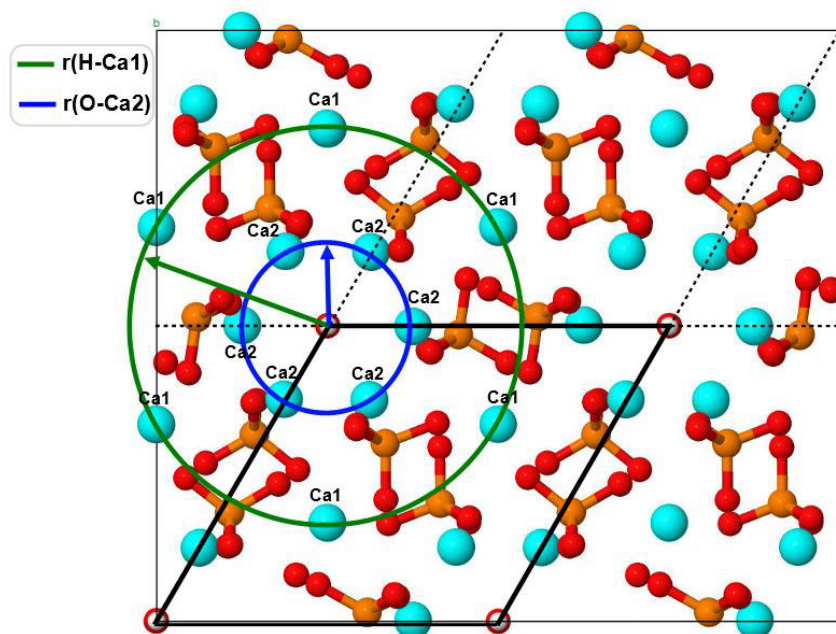


Рисунок 1. Модель суперячейки ГАП (352 атома) и ее геометрическая связь с моделью гексагональной элементарной ячейки, содержащей 44 атома (отмечена черными толстыми линиями, черная пунктирная линия показывает ее периодическое повторение), в проекции по оси z . Два типа позиций кальция, Ca1 (зеленая окружность) и Ca2 (синяя окружность), расположены вокруг оси канала OH-групп. Соответствующие радиусы окружностей – $r(\text{H}-\text{Ca1})$ и $r(\text{O}-\text{Ca2})$. Обозначения атомов: бирюзовый – Ca, красный – O, оранжевый – P, белый – H

в её консоли команды `write out.pdb`, где `out.pdb` – имя выходного PDB-файла, содержащего все конформационные состояния шагов релаксации, заключённые в текстовых блоках `<MODEL n>...<ENDMDL>`, где n – номер шага релаксации.

Для выделения конформационных состояний в виде отдельных PDB-файлов была написана Python-программа `pdb_splitter`, которая помимо разделения файла обеспечивает и сквозную нумерацию атомов в `snapshot-ax` – в каждом файле она начинается с нуля. Это важно: в серии конформационных состояний у одних и тех же атомов одинаковыми должны быть и их номера.

В результате для каждой из девяти релаксаций были получены серии PDB-файлов, описывающие ход этих вычислительных экспериментов (табл. 1). В качестве интервала для интерполяции смежных конформационных состояний было выбрано значение 4 кадра, дающее в итоге комфортную для восприятия скорость анимации при частоте кадров 24 к/с и возможность её изменения путём изменения частоты кадров.

Как уже было сказано выше, позиции замещений Ca1 и Ca2, а также сама структура гидроксиапатита определили позиционирование цилиндрических проекционных поверхностей – внутри канала OH-групп ГАП и соосно с ним. Ось канала была условно проведена через его OH-группы и фактически была назначена «центром проецирования» (рис. 2а). Координаты двух точек, лежащих на этой оси, были получены усреднением координат центров всех атомов, составляющих OH-группы в их стартовой конформации, которая соответствует незамещённому ГАП и одинакова для всех вариантов замещений.

Таблица 1. Перечень полученных PDB-последовательностей, определяющих динамику релаксации ГАП-структур с замещениями, с указанием качественных и количественных параметров замещений, а также длительности анимации, демонстрирующей ход каждой релаксации

ГАП-структура с замещением			Длительность релаксации - Длина PDB-послед-ти, шаг - файл	Длительность анимации в кадрах	Длительность анимации, сек
Заместитель	Число замещений	Позиция замещения			
Mg	16	Ca1	141	564	23.5
Mg	16	Ca2	94	376	15.7
Mn	8	Ca1	115	460	19.2
Mn	8	Ca2	76	304	12.7
Zn	8	Ca1	201	804	33.5
Zn	8	Ca2	132	528	22.0
Zn	12	Ca1	201	804	33.5
Zn	16	Ca1	201	804	33.5
Zn	16	Ca2	94	376	15.7

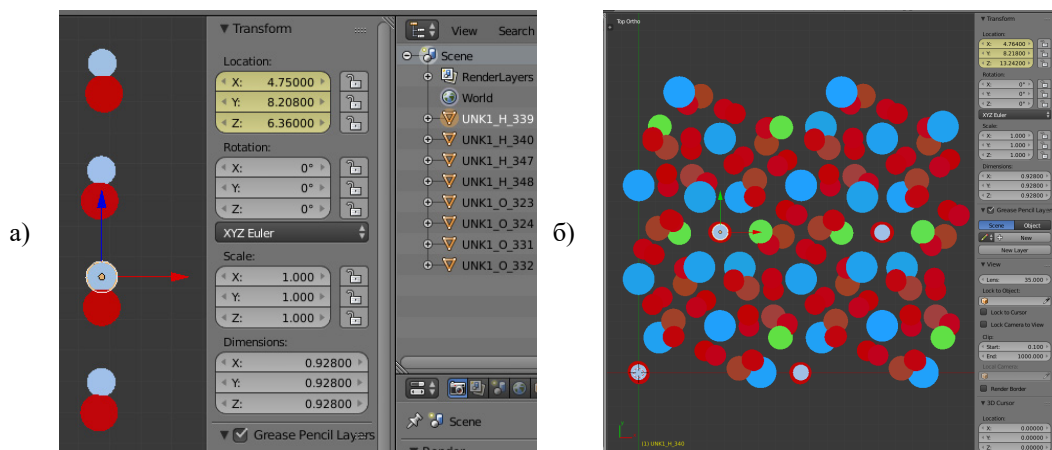


Рисунок 2. Канал гидроксипатита, выбранный для проецирования его поверхности в виде гипсометрической карты рельефа: ОН-группы, определяющие его ось (а) и вид на канал сверху (б)

Выбранный из соображений «геометрический полноты» канал для проецирования его внутренней поверхности, показан на рисунке 2б.

После расчёта усреднённых координат осевой канала ОН-групп / линии «проекционного центра» в электронной таблице LibreOffice Calc ver. 7.6.5 [10], их значения были записаны в качестве параметров в PDBImp for VDA ver. 5.14 [7] следующим образом:

```
line_point_1 = Vector((4.72863888888889, 8.22173611111111, 2.0))
line_point_2 = Vector((4.72863888888889, 8.22173611111111, 12.0))
plane_point_3 = Vector((4.72863888888889, 8.22173611111111, 12.0))
```

Эти же координаты были внесены и в программу автоматизированной генерации проекционных поверхностей ProjGeomMaker ver. 1.4 для того, чтобы оси цилиндров проекционных поверхностей у каждой релаксации совпадали с «проекционным центром».

Чтобы задать единый для всех конформационных состояний релаксаций всех замещений диапазон высот-расстояний гипсометрических карт, в PDBImp for VDA ver. 5.14 [7] был реализован расчёт минимальных и максимальных расстояний атомов всей молекулярной структуры без построения её 3D-модели, а также была реализована возможность работы с атомами, перечень которых задан списком (selection-файлом, в роли которого может выступать исходный PDB-файл, в котором удалены строки, соответствующие исключённым из расчёта атомам).

Минимальное, то есть, расстояние до самого близко расположенного к «проекционному центру» атома (без учёта атомов ОН-групп канала ГАП), было получено путём предварительного расчёта в PDBImp for VDA и отбора минимального значения среди всех конформационных состояний релаксаций всех вариантов замещений. Оно составило 1.855871 Å. Для всех проекционных гипсометрических карт это самая «высокая точка» и во встроенных в PDBImp for VDA трансфер-функциях таким точкам назначается красный цвет у цветных карт и белый – у монохромных.

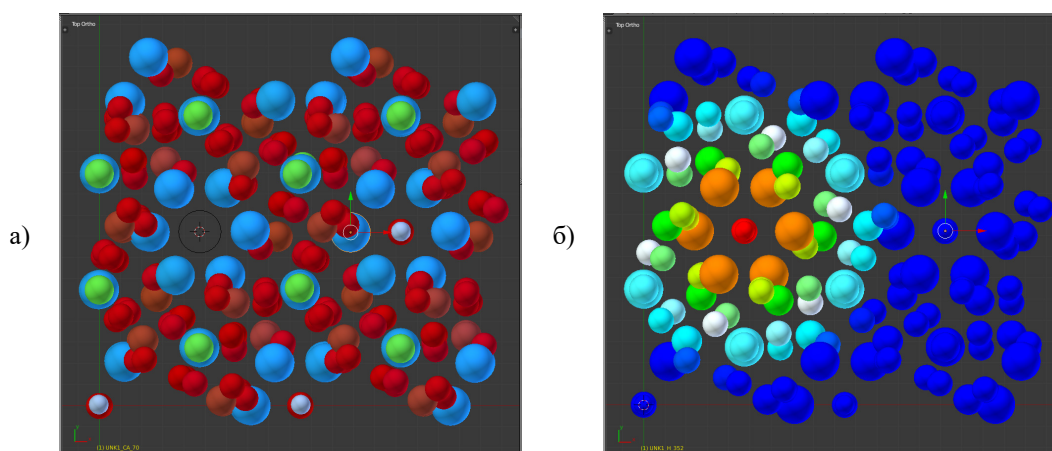


Рисунок 3. Выбор максимального расстояния (или предельной глубины на гипсометрических картах) по расстоянию до атома № 70 (Са или его замены): «Проекционный центр» обозначен 3D-курсором, а наиболее удалённый от него атом № 70 – координатными осями и выделением оранжевого цвета (а). Гипсометрическая окраска атомов согласно их удалению от «проекционного центра» эффективно отображает их взаиморасположение относительно оси канала ОН-групп ГАП, а также исключает из рассмотрения атомы, сильно удалённые от искомого канала, то есть – с «высотами» на картах «ниже дна» (б)

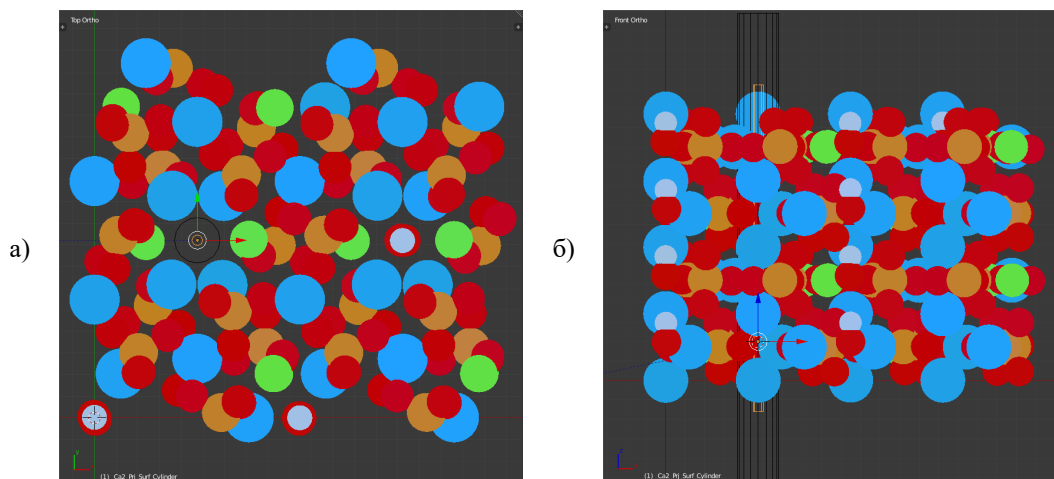


Рисунок 4. Размещение проекционной поверхности в канале ОН-групп ГАП. Полигональный каркас представляющего эту цилиндрическую поверхность, нарисован ярко-оранжевым цветом. Большой тёмно-серый цилиндр – осветительная поверхность, необходимая только при рендеринге поверхности макромолекулы в условно фотореалистичном режиме – то есть, с активированной ветвью BSDF-шейдера в материалах сфер: (а) – вид сверху, демонстрирующий диаметр цилиндра проекционной поверхности относительно диаметров сфер, обозначающих атомы; (б) – вид сбоку, демонстрирующий размер и размещение проекционной поверхности относительно высоты модели супер ячейки

Максимальное, то есть расстояние до самого удалённого от «проекционного центра» атома, было получено иначе – путём выбора максимального значения среди расстояний одного из атомов, условно принадлежащих ОН-каналу, ближайшему к тому каналу, поверхность которого проецируется в форме гипсометрической карты (рис. 3а). Такой подход был выбран, во-первых, чтобы исключить из рассмотрения сильно удалённые от искомого ОН-канала атомы, которые, будучи окрашенными в цвет самой низкой точки карты («дна»), будут исключены из визуального анализа, а во-вторых, для того, чтобы повысить цветовое разрешение интересующего нас диапазона расстояний (рис. 3б).

Также, как и в случае с минимальным расстоянием, выбор значения максимальной дистанции осуществлялся среди всех конформационных состояний релаксаций всех вариантов замещений.

Как уже было сказано выше, построение проекционных поверхностей и генерация материала, фиксирующего проекцию в форме текстуры, выполнялось при помощи программы ProjGeomMaker ver. 1.4. При этом, для радиуса цилиндра проекционной поверхности было установлено достаточно маленькое значение $0.25 \text{ \AA}$, гарантирующее, что в процессе релаксации ни одна из сфер атомов, радиусом $0.5 \cdot VdW$, не пересечёт проекционную поверхность (рис. 4а). Для высоты проекционного цилиндра было выбрано значение, $16.8 \text{ \AA}$, достаточное, чтобы уместить в себе полную высоту проекции модели суперъядейки (рис. 4б).

Размер гипсометрических карт был установлен равным ~ 7 Мегапикселей (3456×2048 пикселей). Его величина обычно подбирается опытным путём исходя из сложности проецируемой части макромолекулы и требуемого соотношения сторон проекции, диктуемых геометрией той части молекулярной структуры, рельеф поверхности которой проецируется.

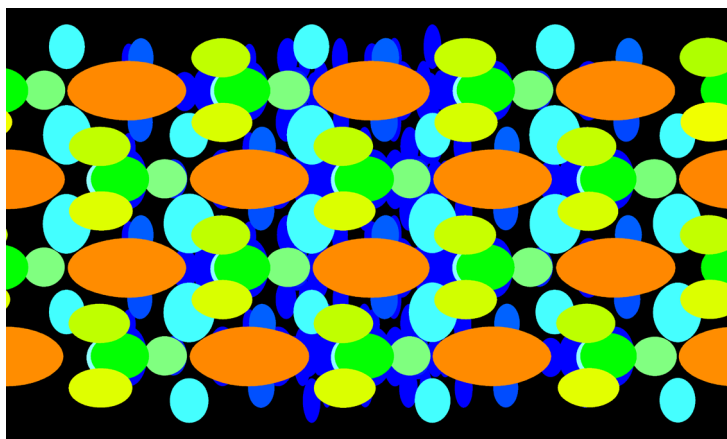


Рисунок 5. Исходный вид проекционной гипсометрической карты внутренней поверхности канала ОН-групп гидроксипатита в стартовом конформационном состоянии (при котором позиции всех атомов ГАП с замещением 16 Mg Ca1 соответствуют таковым у ГАП-структуры без замещений). Цвет эллиптических проекций сфер атомов отражает близость их центров к «проекционному центру» и к оси канала ОН-групп гидроксипатита

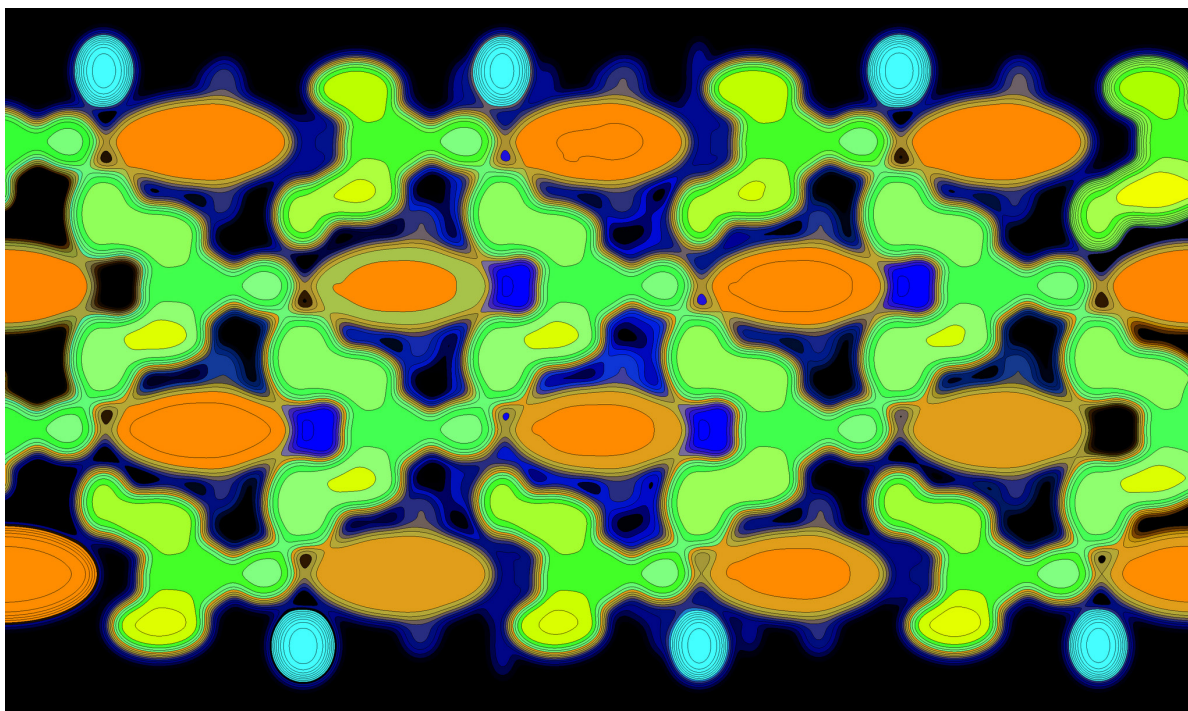


Рисунок 6. Проекционная гипсометрическая карта начального состояния внутренней поверхности канала ОН-групп ГАП-структуры с замещением 16 Mg Ca1, приведённая к «топографическому» виду

Построение динамических 3D-моделей ГАП-структур в ходе их релаксации к равновесному состоянию, во время расчетов замещений атомов Ca на Zn, Mg и Mn выполнялось программой PDBImp for VDA ver. 5.14 [7], работающей в среде свободного 3D-редактора Blender ver. 2.79b [11], а генерация серий проекционных карт, каждая из которых представляет из себя гипсометрическую или парную ей «идентификационную» [12] карту текущего конформационного состояния поверхности ОН-канала ГАП – Python-программой Anim Bake ver. 0.1.

Полученные таким образом гипсометрические карты конформационных состояний исследуемых молекулярных структур, имеют вид, представленный на рисунке 5.

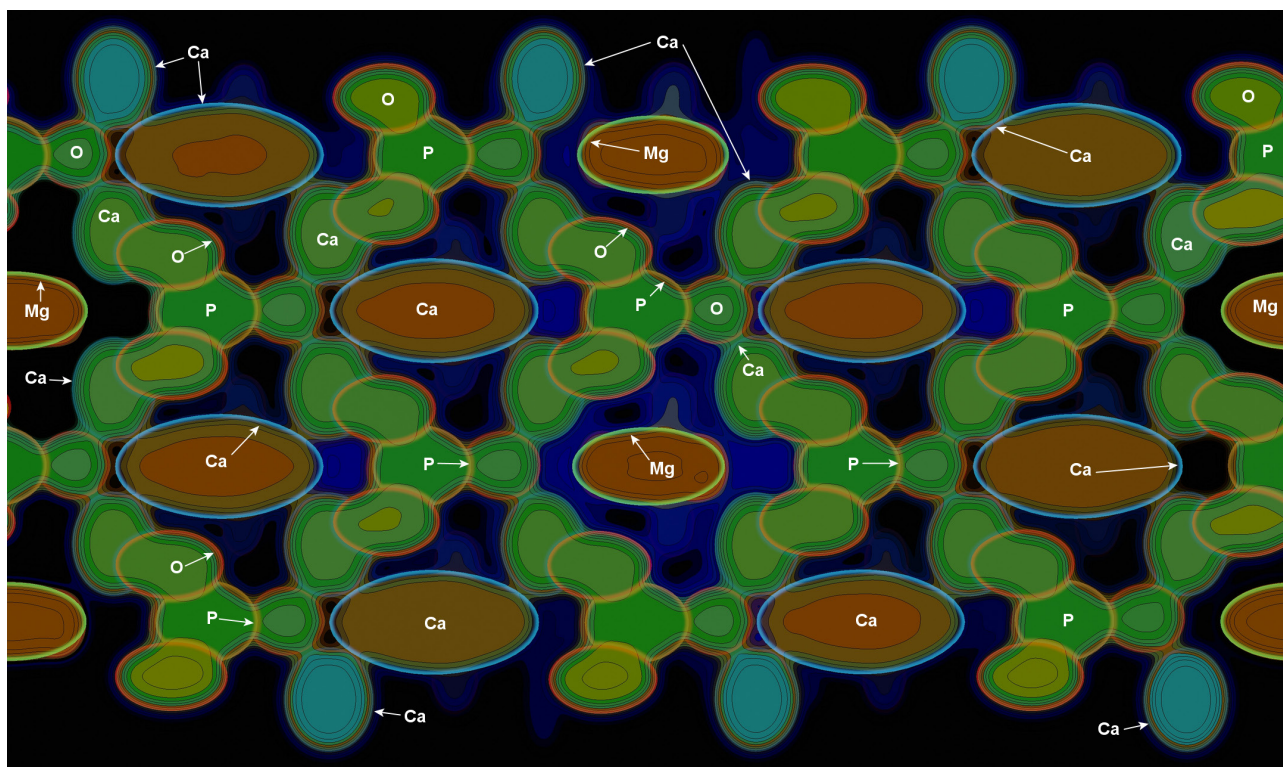


Рисунок 7. Совмещённое «методом Дмитрича» представление гипсометрической и идентификационной карт начальной конформации гидроксиапатита с замещением 16 Mg Ca2. Текстовые метки добавлены для наглядности

Однако представленная на рисунке 5 форма представления гипсометрической карты не вполне привычна и удобна для восприятия, поэтому её можно преобразовать в более привычный «топографический» вид. Сделать это можно при помощи программного пакета G'MIC [13], используя команду:

`gmic -i inp_map.png +topographic_map 16,25 -o out_map_topo.png`, где параметр `+topographic_map 16,25` задаёт тип графического преобразования («топографический»), определяет уровень сглаживания 25 и число уровней «высот» – 16, а параметры `-i inp_map.png` и `-o out_map_topo.png` задают имена входного и выходного графических файлов соответственно.

Для пакетной обработки всей серии карт конформационных snapshot-ов в среде ОС Windows использовалась команда, преобразующая к «топографическому виду» все файлы в текущем каталоге:

```
for %i in (*) do gmic -i %i +topographic_map 16,25 -o %i
```

Таким образом все гипсометрические карты были преобразованы к виду, представленному на рисунке 6.

Несложно заметить, что вышеприведённое гипсометрическое представление проекций поверхностей молекулярных структур не содержит в себе информации о типах атомов, формирующих отображённый на картах рельеф. Эту информацию содержат «параллельные» идентификационные карты [12], генерируемые PDBImp for VDA.

Для разрешения затруднений с восприятием информации из двух параллельных источников, мы предприняли ряд попыток совмещения двух «параллельных» карт на одном изображении при помощи композитинга графических слоёв в модуле Compositing 3D-редактора Blender 3.x. Комплекс таких методик совмещения гипсометрических карт был нами назван «методом Дмитрия». Один из возможных вариантов такого результирующего совмещения показан на рисунке 7, а нодовая сеть, реализующая данный тип представления информации показана на рисунке 8.

Кроме графического гипсометрического представления рельефа внутренней поверхности канала ОН-групп гидроксипатита с замещением атомов Ca на Zn, Mg и Mn, PDBImp for VDA формирует и «параллельный» текстовый вывод «картографической информации» в формате (CSV), пригодном для обработки с помощью электронных таблиц. На его основе ранее уже был построен и проанализирован ряд графиков и таблиц [14]. Эти данные вкпе с анализом двух граничных (стартового и конечного) конформационных состояний релаксаций (пример одной из которых приведён на рисунке 9) позволили сделать ряд выводов как относительно самого хода этого процесса, так и в отношении конформационных особенностей итоговых ГАП-структур с замещением, сформировавшихся в ходе их релаксации к равновесному состоянию, во время ТФП-расчетов:

1. К наибольшему изменению размеров элементарной гексагональной ячейки приводит замещение 16 ионов Ca шестнадцатью ионами Mg.

2. Замещающие ионы Mg вызывают заметное изменение геометрии элементарной гексагональной ячейки ГАП независимо от позиции замещения – Ca1 или Ca2. Хотя, в случае замены в «малом кольце» Ca2, «подвижность структуры» оказалась чуть меньше.

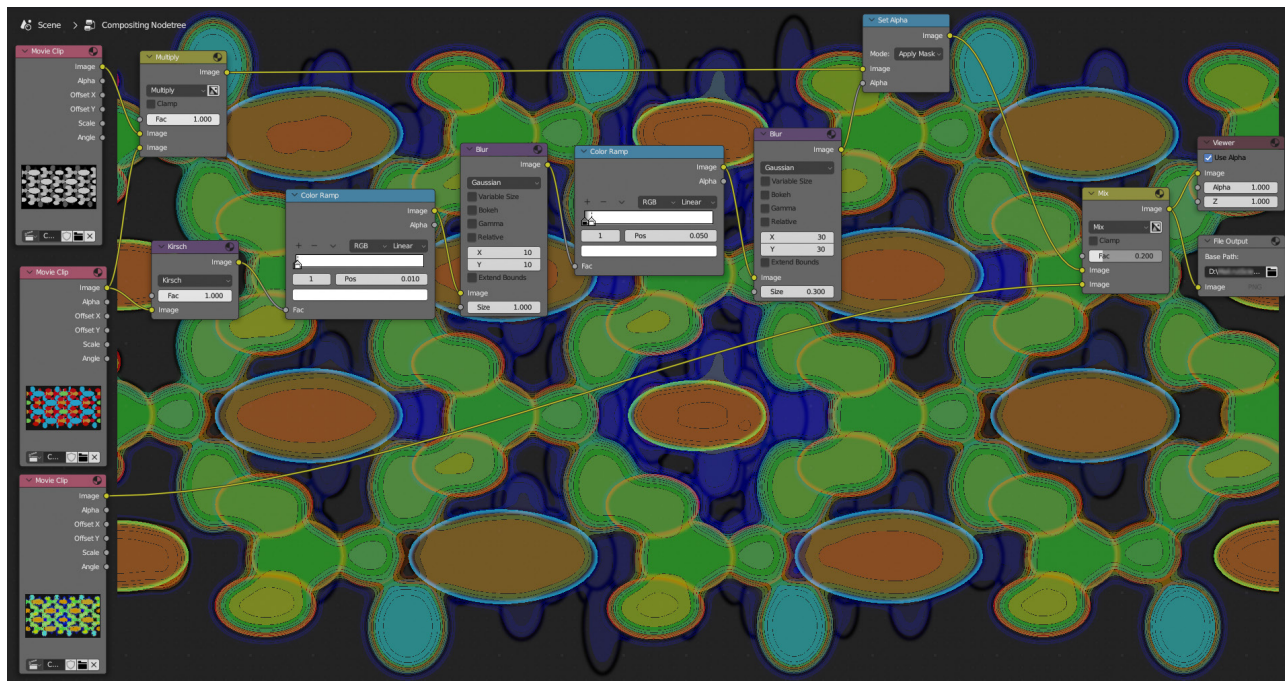


Рисунок 8. Нодовая сеть композера Blender 3.x, совмещающая гипсометрические и идентификационные представления рельефа внутренней поверхности канала ОН-групп ГАП с замещением 16 Mg Ca2 в стартовой конформации. Баланс между интенсивностью отображения гипсометрической карты и идентифицирующими атомы «ореолами» определяется параметром Fac последнего в конвейере узла Mix. Идентифицирующая информация для «дальних» атомов скрывается при помощи затенения – в узле Mix, смешивающем идентификационную карту с монохромной гипсометрической при помощи операции умножения (Multiply)

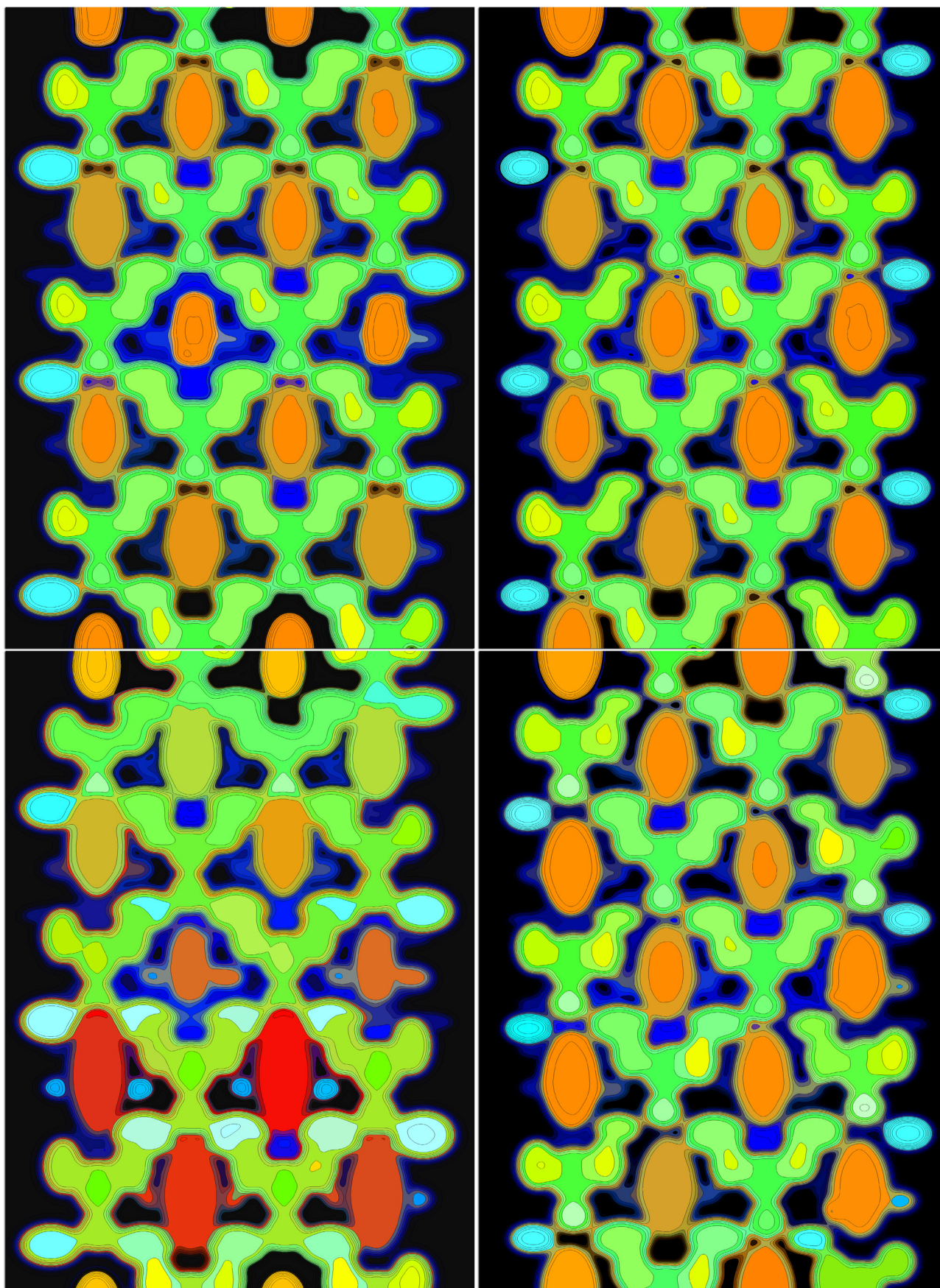


Рисунок 9. Гипсометрическое представление стартовой (вверху) и конечной (внизу) конформации внутренней поверхности канала гидроксиапатита с замещением 16 Mg Ca₂ (слева) и 16 Mg Ca₁ (справа)

1. Замещающие ионы Mn, несмотря на меньшее их количество (восемь), находясь в «большом кольце» Ca1, оказывают практически такое же изменение геометрии ячейки, как и вдвое большее (16) число ионов Mg.
2. При замещении ионов Ca ионами Mn, их положение (Ca1 или Ca2) для геометрии гексагональной ячейки имеет гораздо большее значение, нежели таковое у ионов Mg. Так, ионы Mn в «большом кольце» Ca1 изменяют геометрию ячейки заметно больше, нежели они же это делают в «малом кольце» Ca2.
3. Цинк и Марганец в ГАП ведут себя очень похоже: в большом кольце Ca1 они «синхронно» изменяют как внешний радиус ячейки, так и радиус канала ОН-групп. А в «малом» (Ca2) – изменяют внешний радиус гораздо сильнее, нежели внутренний радиус ОН-канала.
4. Ионы Цинка меньше всего изменяют геометрию ячейки ГАП.

Все вышеприведённые аналитические выводы получили своё подтверждение при помощи других методов исследований – теоретических и экспериментальных [14].

Заключение. Отдельные элементы вышеописанных методик и программных средств ранее уже успешно применялись и были верифицированы другими методами исследований [2, 14, 15]. Изложенный же в данной работе методический комплекс показал свою способность обеспечить соотносимость полученных результатов для гомологичных молекулярных структур (как численных величин, так и проекционных карт их поверхностей) и может претендовать на роль цельного метода теоретических исследований. Опыт его успешного применения в анализе конформационных особенностей поверхностей (био-)макромолекулярных структур, обладающих ярко-выраженной цилиндрической симметрией и высокой степенью гомологии, таких, как структуры гидроксиапатита с замещением атомов Ca атомами Mg, Mn, Zn, показал эффективность и достоверность предлагаемых подходов и средств, и также был подтверждён другими методами исследований – экспериментальными и теоретическими [5].

Всё это позволяет рекомендовать как сами методы, так и созданные в рамках данной работы программные средства, для исследований (био-)макромолекулярных структур других типов, обладающих сходными характеристиками. Например, дуплексов ДНК, белковых ионных каналов [14,15], пептидных нанотрубок [2] и им подобных структур, также обладающих ярко-выраженной цилиндрической симметрией и высокой степенью гомологии их структур.

Список литературы / References:

1. Филиппов С.В., Нестерова Е.Н., Чуприна В.П., Полтев В.И. Моделирование изменений конформации и стабильности двойной спирали ДНК при генотоксической модификации оснований. I. Низкоэнергетические конформации нативного дуплекса. *Молекулярная биология*, 1997, т. 31, № 5, с. 847-854 [Filippov S.V., Nesterova E.N., Chuprina V.P., Poltev V.I. Modeling of changes in conformation and stability of DNA double helix at genotoxic modification of bases. I. Low-energy conformations of the native duplex. *Molecular Biology*, 1997, vol. 31, no. 5, pp. 847-854 (In Russ.)].
2. Филиппов С.В., Быстров В.С. Визуально-дифференциальный анализ структурных особенностей внутренних полостей двух хиральных форм дифенилаланиновых нанотрубок. *Биофизика*, 2020, т. 65, № 3, с. 445-452 [Filippov S.V., Bystrov V.S. Visual-differential analysis of structural features of internal cavities of two chiral forms of diphenylalanine nanotubes. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 445-452, doi: 10.31857/S0006302920030035 (In Russ.)].
3. Филиппов С.В., Полозов Р.В., Сивожелезов В.С. Визуализация пространственных структур (био)макромолекул в виде подобных гипсометрическим карт. *Препринты ИПМ им. М.В.Келдыша*, 2019, № 61, 14 с. [Filippov S.V., Polozov R.V., Sivozhelezov V.S. Visualization of spatial structures of (bio)macromolecules in the form of similar hypsometric maps. *Keldysh IPM Preprints*, 2019, no. 61, 14 p., doi: 10.20948/prepr-2019-61 (In Russ.)].
4. Филиппов С.В., Полозов Р.В., Сивожелезов В.С. Визуализация пространственных структур (био)макромолекул: построение «гипсометрических» карт. *Информационные технологии и математическое моделирование (ИТММ-2019): Материалы XVIII Международной конференции имени А.Ф. Терпугова (26-30 июня 2019 г.)*, Томск: Изд-во НТЛ, 2019, часть 1, с. 163-168 [Filippov S.V., Polozov R.V., Sivozhelezov V.S. Visualization of spatial structures of (bio)macromolecules: construction of “hypsometric” maps. *Information Technologies and Mathematical Modeling (ITMM-2019): Proceedings of the XVIII International Conference named after A.F. Terpigov (June 26-30, 2019)*, Tomsk: NTL Publishing House, 2019, part 1, pp. 163-168 (In Russ.)].
5. Быстров В.С., Парамонова Е.В., Филиппов С.В., Авакян Л.А., Чайкина М.В., Еремина Н.В., Макарова С.В., Булина Н.В. Цинк-замещенные структуры гидроксиапатита: моделирование и эксперимент. *Математическая биология и биоинформатика*, 2023, т. 18, № 2, с. 580-601 [Bystrov V.S., Paramonova E.V., Filippov S.V., Avakyan L.A., Chaikina M.V., Eremina N.V., Makarova S.V., Bulina N.V. Zinc-substituted structures of hydroxyapatite: modeling and experiment. *Mathematical Biology and Bioinformatics*, 2023, vol. 18, no. 2, pp. 580-601, doi: 10.17537/2023.18.580 (In Russ.)].
6. Paolo Giannozzi et al. QUANTUM ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2009, vol. 21, no. 39, 395502, doi: 10.1088/0953-8984/21/39/395502.
7. Филиппов С.В. PDBImp for VDA: Гос.регистрация программы для ЭВМ, регистрационный № 2024610662 от 12.01.2024 [Filippov S.V. PDBImp for VDA: State registration of the program for computer, registration no. 2024610662 from 12.01.2024 (In Russ.)].

8. *PDB File Format Documentation*. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.wwpdb.org/documentation/file-format>.
9. *Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D*. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.jmol.org/>.
10. *LibreOffice*. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.libreoffice.org/>.
11. *Blender is the free and open source 3D creation suite*. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.blender.org/>.
12. Филиппов С.В. Метод идентификации атомов макромолекул, визуализируемых в 3D редакторах. *Препринты ИПМ им. М.В.Келдыша*, 2019, № 97, 10 с. [Filippov S.V. Method of identification of atoms of macromolecules visualized in 3D editors. *Keldysh IPM Preprints*, 2019, no. 97, 10 p., doi: 10.20948/prepr-2019-97 (In Russ.)].
13. *G'MIC (GREYC's Magic for Image Computing) is a free and open-source framework for image processing*. URL: <https://gmic.eu>.
14. Филиппов С.В., Сивожелезов В.С. Метод построения динамических молекулярных моделей в среде открытой 3D-платформы Blender на примере β_2 -адренорецептора. *Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика»*. Под ред. В.Д. Лахно. Пущино: ИМПБ РАН, 2018, т. 7, № е45 [Filippov S.V., Sivozhelezov V.S. Method of building dynamic molecular models in the environment of open 3D-platform Blender on the example of β_2 -adrenoreceptor. *Reports of the International Conference "Mathematical Biology and Bioinformatics"*. Edited by V.D. Lakhno. Pushchino: IMPB RAS, 2018, vol. 7, no. e45, doi: 10.17537/icmbb18.23 (In Russ.)].
15. Сивожелезов В.С., Филиппов С.В. Картографическое проецирование пространственной структуры внутренней поверхности канала коннексина-26 для лучшего понимания его функции. *Марчуковские научные чтения, 2019: Тезисы Международной конференции «Актуальные проблемы вычислительной и прикладной математики»*, Ин-т вычислительной математики и матем. геофизики СО РАН. Новосибирск, 1-5 июля 2019 г., Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2019, 167 с. [Sivozhelezov V.S., Filippov S.V. Cartographic projection of the spatial structure of the inner surface of the connexin 26 channel for a better understanding of its function. *Marchukov Scientific Readings, 2019: Abstracts of the International Conference "Actual Problems of Computational and Applied Mathematics"*, Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics SB RAS. Novosibirsk, July 1-5, 2019, Novosibirsk: IPC NSU, 2019, 167 p., doi: 10.24411/9999-017A-2019-10321 (In Russ.)].

VISUAL DIFFERENTIAL ANALYSIS OF (BIO-)MACROMOLECULES: METHODS OF STUDYING MOLECULAR STRUCTURES WITH A HIGH DEGREE OF HOMOLOGY

Filippov S.V.

IMPB of RAS - Branch of KIAM RAS

Professor Vitkevich St., 1, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: fsv141@mail.ru

Received 13.08.2024

Abstract. The article discusses the methods and tools of visual differential analysis (VDA) as applied to the study of molecular structures obtained during relaxation to an equilibrium state during calculations of substitutions of calcium atoms for zinc, magnesium and manganese in the hydroxyapatite structure. All substituted relaxations represent molecular structures with a high degree of homology.

For their comparative study, methods and software tools implementing them in Python were developed, designed to ensure the correlation of the obtained results - both numerical values and projection maps of the surfaces of homologous molecular structures: matching the formats of input and output data, as well as introducing into programs implementing the VDA method the functionality necessary for the correct and consistent placement of homologous structures in 3D space. The structures under study were placed in a single "analytical space", the same OH channel was selected structurally, identical axial lines were established for calculating the shortest distances, and a consistent (common) range of distances displayed on hypsometric maps was determined. All this made it possible to construct and analyze combined graphs of changes in interatomic distances during relaxations of Ca1 and Ca2 with different variants of qualitative and quantitative substitutions - Mg, Mn, Zn, as well as to construct and analyze consistent hypsometric projection maps of all homologous structures.

Key words: visual differential analysis, VDA, hydroxyapatite.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКОГО КЛЕЩА, ПОРАЖАЮЩЕГО МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ РОДА *APIS* НА КРЫМСКИХ ПАСЕКАХ

Мегер Я.В., Пацановская Е.А., Дегтяр И.В., Хохлова О.И., Лантушенко А.О.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию 30.08.2024

Аннотация. В работе исследованы клещи, которые за последние несколько лет впервые появились на пасеках Крыма. При исследовании генетического материала клеща-паразита медоносных пчел была показана несостоятельность использования стандартных универсальных баркодирующих праймеров LCO1490/НСО2198, и были разработаны более подходящие для данной задачи праймеры. Секвенирование с применением специфических праймеров показало принадлежность клеща к виду *Tropilaelaps mercedesae*. Данный вид является наиболее опасным для пчел, т.к. способен к быстрому размножению, причиняет ущерб пчелам, находящимся в основном на стадии куколок и личинок, при этом у взрослых медоносных пчел наблюдается значительно большее количество ран и вирусных инфекций. Определение вида паразитов позволит разработать стратегию борьбы с ними и впоследствии использовать видоспецифичные препараты, токсичные только для клещей и безопасные для пчел и потребителей продуктов пчеловодства.

Ключевые слова: пчёлы, клещи-паразиты, генетический анализ, *Tropilaelaps mercedesae*

ВВЕДЕНИЕ

Опылители, особенно род *Apis*, имеют решающее значение для выращивания сельскохозяйственных культур и поддержания экосистем. В последние десятилетия численность медоносных пчел и их биологическое разнообразие постоянно сокращаются, что представляет потенциальную угрозу существованию видов и глобальной продовольственной безопасности [1]. Одним из наиболее важных факторов, способствующих сокращению популяции пчел, является заражение паразитами, которое привело к потере тысяч колоний по всему миру [2]. Предыдущие исследования показали, что паразитические клещи из рода *Varroa* и *Tropilaelaps* являются основными факторами, вызывающими гибель европейской медоносной пчелы (*Apis mellifera*) в Азии [3-6]. Клещи рода *Tropilaelaps* – паразиты расплода медоносных пчел. Питание личинками и куколками пчел вызывает недоразвитость расплода, смерть пчел и последующее сокращение колонии или слет пчел. Развитие занимает около 1 недели, клещи распространяются на пчелах.

Клещи *Tropilaelaps* изначально были паразитами гигантских азиатских медоносных пчел и подразделялись на четыре вида (*T. clareae*, *T. koenigerum*, *T. mercedesae* и *T. thaiti*) в зависимости от генетической и морфологической изменчивости [7,8]. За последние несколько десятилетий ученые в основном сосредоточили свое внимание на клеще *Varroa*, поскольку он является самым опасным вредителем пчел во всем мире, в то время как клещи *Tropilaelaps* встречаются только в Азии.

Однако обнаружение клещей *Tropilaelaps* в Африке [9] демонстрирует, что эти клещи могут преодолевать большие расстояния. Кроме того, успешное распространение *T. mercedesae* в Южной Корее, где зима может быть суровой, а выращивание пчелиного расплода ограничено, показывает, что эти клещи могут процветать в таких же умеренных климатических условиях, как клещи *Varroa*. Последние в настоящее время распространены по всему миру и наносят ущерб колониям *A. mellifera* [10,11]. Таким образом, вполне вероятно, что клещи *Tropilaelaps* также распространятся по всему миру.

Два вида рода *Tropilaelaps* (*T. clareae* и *T. mercedesae*) поражают популяции медоносных пчел *Apis mellifera* и являются наиболее опасными. Другие два вида (*T. koenigerum* и *T. thaiti*), судя по всему, являются безвредными для *A. mellifera* – следовательно не нуждаются в наблюдении.

В данной работе исследованы клещи, которые за последние несколько лет впервые появились на пасеках Крыма. Определение вида паразитов позволит разработать стратегию борьбы с ними и впоследствии использовать видоспецифичные препараты, токсичные только для клещей и безопасные для пчел и потребителей продуктов пчеловодства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор материала производился работниками пасеки в нестерильные пробирки объемом 1,5 мл с последующей транспортировкой в лабораторию. Фото клеща представлено на рисунке 1.

Образцы предварительно подвергались гомогенизации. Для выделения геномной ДНК был использован набор “ДНК-ЭКСТРАН-2” (“Синтол”, Россия). Контроль чистоты выделенного продукта и концентрация ДНК в нем контролировалась спектрофотометрически с помощью нанофотометра Implen N60 (“Implen”, Германия), см. рисунок 2.



Рисунок 1. Микрофотография клеща – паразита медоносных пчел с крымской пасеки. Размерная шкала в мм

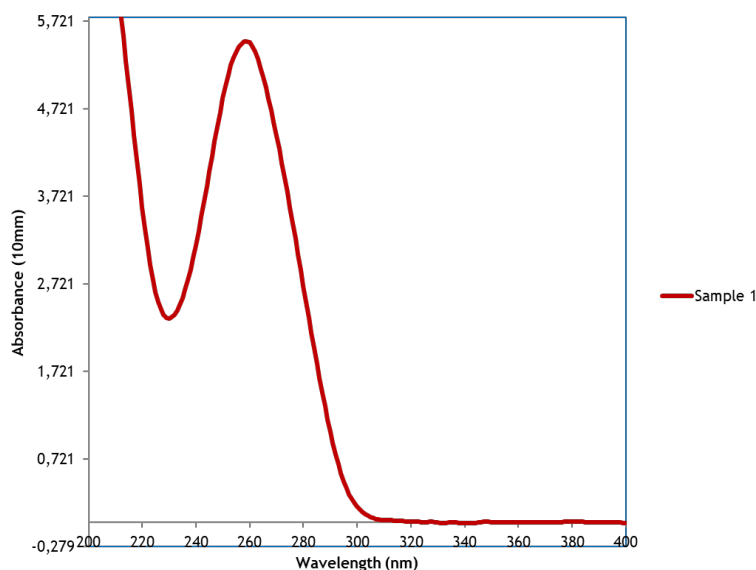


Рисунок 2. Спектр поглощения полученной ДНК

Для генотипирования был использован участок митохондриального генома, кодирующего ген *COI*. Были использованы как стандартные LCO1490 и HCO 2198, так и разработанные более специфические для данного рода праймеры.

Разработка праймеров проводилась с помощью Primer-BLAST по доступным фрагментам *COI* рода *Tropilaelaps* в базе NR. Исползованные в работе праймеры показаны в таблице 1.

Амплификация проводилась в термоциклере Bio-Rad T100 (“Bio-Rad Laboratories”, США) с использованием готовой ПЦР смеси “5x Screen-Mix” (“Евроген”, Россия).

Контроль результатов амплификации и анализ размерного состава полученных ампликонов проводился с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в TBE буфере (см. рис. 3). Очистка продуктов амплификации производилась с помощью набора “ColGen” (“Синтол”, Россия).

Реакция секвенирования по Сэнгеру проводилась в термоциклере Bio-Rad T100 (“Bio-Rad Laboratories”, США), с помощью готовой смеси с для секвенирования “GENSEQ” (“Синтол”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя и тем же набором праймеров, что и в амплификации. Очистка реакционной смеси производилась осаждением в спирте и EDTA. Капиллярный электрофорез проводился на генетическом анализаторе “Нанофор-05” (“Синтол”, Россия), см. рис. 4. Наличие двойных пиков на рис. 4, а) свидетельствует,

Таблица 1. Используемые в данной работе праймеры

Наименование	Последовательность
<i>LCO 1490</i>	(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')
<i>HCO 2198</i>	(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')
<i>TropCOIF</i>	(5'-CTATCCTC AATTATTGAAATAGGAAC-3')
<i>TropCOIR</i>	(5'-TAGCGGCTGTGAA ATAGGCTCG-3')

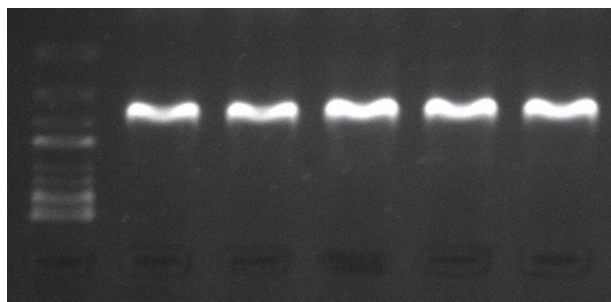


Рисунок 3. Гель электрофорез амплифицированных COI продуктов. Колонка слева – маркёр длин, средняя длина полученных продуктов составила около 650 п.н.

что в образце одновременно присутствуют ПЦР продукты и клеща, и пчелы. На рисунке 4б представлен однозначно интерпретируемый фрагмент.

Первичная обработка сиквенсов (бейсколлинг) проводился с помощью программы “Mutation Surveyor” (“SoftGenetics”, США). Далее декомпозиция полиалельного сигнала производилось с помощью *tracy decompose*. Поиск гомологичных последовательностей к полученным фрагментам гена *COI* выполнялся с помощью BLAST по нередуцированной базе NR (NCBI, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При работе с ДНК особей-паразитов исследователи практически всегда сталкиваются с проблемой контаминации исследуемого образца генетическим материалом хозяина (в данном случае пчелы).

Выделение ДНК и амплификация на основе универсальной пары праймеров *LCO 1490* и *HCO 2198* прошла успешно. Полученные ПЦР-продукты имели весьма гомогенный размерный состав, визуализация результата электрофореза показана на рисунке 3.

Однако секвенирование по Сенгеру показало присутствие значительной части гетерогенных сайтов, что указывает на разнородность изначального продукта. Пример электрофореграммы представлен на рисунке 4. Исходя из предположительно гомологичности к *COI* фрагменту полученной композиции сигналов была произведена декомпозиция хроматограммы на отдельные сигналы, сходные с *COI*-референтом. Среди полученных фрагментов наиболее представлены последовательности, гомологичные организму - хозяину *Apis mellifera*. В данных ампликонах не удалось выделить отдельные фрагменты, гомологичные роду клеща *Tropilaelaps*.

Исходя из полученных данных при применении универсальных праймеров, была разработана пара более специфичных к данному роду праймеров, для отделения от фрагментов ДНК пчелы. При разработке праймеров были отданы предпочтения паре с наибольшим числом замен к выявленной в результате первого секвенирования, полученные праймеры показаны в таблице 1. Амплификация на данной паре праймеров прошла успешно, гель-электрофорез показал размерную однородность ампликонов.

Секвенирование по Сенгеру данных ПЦР-продуктов, несмотря на более специфичные праймеры, также показало наличие двойных пиков в некоторых областях электрофореграммы, что свидетельствует о неоднородности полученной матрицы. Аналогичный предыдущей итерации подход к декомпозиции сигнала позволил выделить фрагмент длины 288 н.п., подходящий для последующего анализа. С помощью процедуры BLASTN базы данных NCBI была определена таксономическая принадлежность исследованной особи к виду *Tropilaelaps mercedesae*.

Важно отметить, что в последние годы инвазия *T. mercedesae* нанесла серьезный ущерб колониям *A. mellifera* в Китае, и в настоящее время эти инвазии угрожают всей отрасли пчеловодства [12]. По сравнению с клещом рода *Varroa*, *T. mercedesae* более опасен для *A. mellifera* из-за своего короткого жизненного цикла и форетической стадии, которые способствуют быстрому развитию популяции в колониях *A. mellifera* [13]. Действие паразита

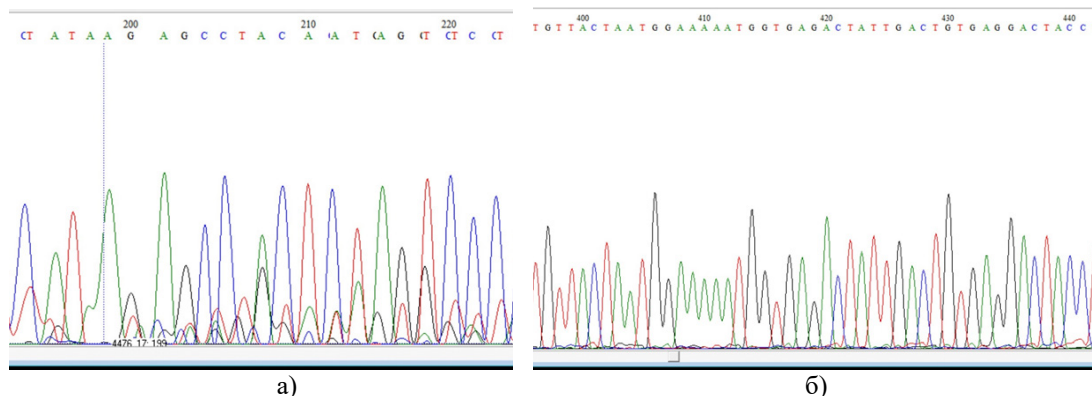


Рисунок 4. Результат капиллярного электрофореза продуктов секвенирования по Сенгеру; пояснения в тексте

может проявиться в течение сравнительно короткого времени после попадания клеща в пчелу. Хотя вид *T. mercedesae* причиняет ущерб пчелам, находящимся в основном на стадии куколок и личинок, негативные последствия могут сохраняться и до взрослой стадии, при этом у взрослых медоносных пчел наблюдается значительно большее количество ран и вирусных инфекций [14]. Поэтому заражение пчел крымских пасек клещом вида *Tropilaelaps mercedesae* является серьезной угрозой, требующей разработки комплекса мероприятий по борьбе с паразитом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании генетического материала клеща-паразита медоносных пчел была показана несостоятельность использования стандартных универсальных баркодирующих праймеров LCO1490/HCO2198, и были разработаны более подходящие для данной задачи праймеры.

Секвенирование с применением специфических праймеров показало принадлежность клеща к виду *Tropilaelaps mercedesae*.

Результаты, полученные в данной работе, способствуют как решению прикладных задач по лечению клещевого заражения, так и упрощают фундаментальные исследования количественной оценки динамики распространения клещевого заражения в регионах. Данный вопрос будет рассмотрен в дальнейших работах.

Список литературы / References:

1. Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O., Kunin W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution*, 2010 vol. 25, no. 6, pp. 345-353.
2. Piou V., Tabart J., Urrutia V., Hemptinne J.L., Vetillard A. Impact of the Phoretic Phase on Reproduction and Damage Caused by *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) to Its Host, the European Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 4, e0153482.
3. Ramsey S.D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery J.D., Cohen A. et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, vol. 116, no. 5, pp. 1792-1801.
4. Khongphinitbunjong K., Neumann P., Chantawannakul P., Williams G.R. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* reduces western honey bee, *Apis mellifera*, longevity and emergence weight, and promotes Deformed wing virus infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, vol. 137, pp. 38-42.
5. Khongphinitbunjong K., de Guzman L.I., Burgett M.D., Rinderer T.E., Chantawannakul P. Behavioral responses underpinning resistance and susceptibility of honeybees to *Tropilaelaps mercedesae*. *Apidologie*, 2012, vol. 43, no. 5, pp. 590-599.
6. Chantawannakul P., Ramsey S., van Engelsdorp D., Khongphinitbunjong K., Phokasem P. *Tropilaelaps* mite: an emerging threat to European honey bee. *Current Opinion in Insect Science*, 2018, vol. 26, pp. 69-75.
7. Anderson D.L., Morgan M.J. Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Experimental and Applied Acarology*, 2007, vol. 43, no. 1, pp. 1-24.
8. De Guzman L.I., Williams G.R., Khongphinitbunjong K., Chantawannakul P. Ecology, Life History, and Management of *Tropilaelaps* Mites. *Journal of Economic Entomology*, 2017, vol. 110, no. 2, pp. 319-332, doi: 10.1093/jee/tow304.
9. Kumar N.R., Kumar R., Mbaya J., Mwangi R.W. *Tropilaelaps clareae* found on *Apis mellifera* in Africa. *Bee World*, 1993a, vol. 74, pp. 101-102.
10. Higes M., Meana A., Bartolome C., Botias C., Martín-Hernández R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2013, vol. 5, pp. 17-29.
11. Neumann P., Pettis J.S., Scheafer M.O. Quo vadis *Aethina tumida*? Biology and control of small hive beetles. *Apidologie*, 2016, vol. 47, pp. 427-466.
12. Luo Q.-H., Zhou T., Dai P.-L., Song H.-L., Wu Y.-Y., Wang Q. Prevalence, intensity and associated factor analysis of *Tropilaelaps mercedesae* infesting *Apis mellifera* in China. *Experimental and Applied Acarology*, 2011, vol. 55, no. 2, pp. 135-146.
13. Forsgren E., de Miranda J.R., Isaksson M., Wei S., Fries I. Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental and Applied Acarology*, 2009, vol. 47, no. 2, pp. 87-97.
14. Phokasem P., de Guzman L.I., Khongphinitbunjong K., Frake A.M., Chantawannakul P. Feeding by *Tropilaelaps mercedesae* on pre- and post-capped brood increases damage to *Apis mellifera* colonies. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9.

GENOTYPING OF A PARASITIC MITE INFECTING HONEY BEES OF THE GENUS APIS IN CRIMEAN APIARIES

Meger Ya.V., Patsanovskaya E.A., Degtyar I.V., Khokhlova O.I., Lantushenko A.O.

Sevastopol State University

Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: yvmeger@sevsu.ru

Received 30.08.2024

Abstract. The work examines ticks that have appeared for the first time in the apiaries of the Crimea over the past few years. In the study of the genetic material of the honeybee parasite mite, the inconsistency of using standard universal barcoding primers LCO1490/HCO2198 was shown, and primers more suitable for this task were developed. Sequencing using specific primers showed that the tick belongs to the species *Tropilaelaps mercedesae*. This species is the most dangerous for bees, because it is capable of rapid reproduction, causes damage to bees, which are mainly at the pupal and larval stages, while adult honey bees have a significantly higher number of wounds and viral infections. Determining the type of parasites will allow us to develop a strategy to combat them and subsequently use species-specific drugs that are toxic only to ticks and safe for bees and consumers of bee products.

Key words: bees, parasite mites, genetic analysis, *Tropilaelaps mercedesae*

SPATIAL ORGANIZATION OF THE TRIPEPTIDE AND TETRAPEPTIDE ANALOGUES OF NOCICEPTIN MOLECULE

Ismailova L.I., Akhmedov N.A.

Baku State University, Institute for Physical Problems

Z. Khalilov St., 23, Baku, 1148, Azerbaijan; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru

Received 09.09.2024

Abstract. This scientific work is devoted to study the spatial structure and conformational possibilities of the tripeptide Phe1-Gly2-Gly3 and tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 molecules. The knowledge of the structural and functional properties of these peptide molecules is of great practical importance for medicine and pharmacology. This neuropeptide molecules are stable analogues of the nociceptin molecule. The calculations were carried out by the method of theoretical conformational analysis with regard to nonvalent, electrostatic and torsional interactions, energy of the hydrogen bonds and a special computer program. The low-energy conformations of these molecules and the values of the dihedral angles of the main chains and side chains are found and the energy of the intra- and inter-residue interactions were estimated. 15 low-energy conformations were found for tripeptide for four spatial structures and 12 low-energy conformations were found for tetrapeptide for six spatial structures. It is revealed that low energy conformations of these molecules have the half-folded and folded type of backbone. The side chains of the Phe1 and Phe4 amino acids in low-energy conformations carry out effective interactions and are conformationally labile amino acids. They bring together sections of the main chain and side chains of amino acids that are part of the tri- and tetrapeptide, which leads to important interactions.

Key words: structure, molecule, tripeptide, tetrapeptide, conformation.

INTRODUCTION

It is known, that new families of the regulatory peptides are being discovered and their properties are being studied. One of these families is nociceptins. For medicine and pharmacology, knowledge of the structure-functional properties of these peptide molecules is of great practical importance. Nociceptin is an opioid-related peptide with strong anti-analgetic properties. It is widely present in the central nervous system, affecting motor, anxiety and pain sensitivity. It is important to note that the original synthetic analogues of the N-terminal fragment of nociceptin, the tripeptide Phe1-Gly2-Gly3 (FGG) and tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 (FGGF). It causes the binding of natural nociceptin to a specific ORL1 receptor [1,2].

More recently, new nociceptin analogues FGGF-GP, FGGF-PGP and FGGF-VGP have been synthesized. It has been shown that the FGGF-VGP peptide, like natural nociceptin, significantly reduces the level of locomotor activity of animals [3,4]. The most pronounced effect of FGGF-GP was the anxiolytic effect. Our scientific work is devoted to study the spatial structure and conformational possibilities of the tripeptide Phe1-Gly2-Gly3 and tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 molecules. It was found that the N-terminal tripeptide and tetrapeptide of this molecule are active [5,6].

The short linear regulatory peptides in solutions do not have a fixed spatial structure. Usually, the amino acid sequence and physicochemical properties of the solvent determine the set of low-energy conformations of the peptide molecule. The biologically active conformation of this peptide molecule, which is realized upon interaction with the receptor molecule, is included in the set of low-energy structures. Therefore, the study of the spatial structure and conformational capabilities of peptide molecules is of great interest. The peptide molecules and their biological functions in living systems are related with their specific spatial structures. Therefore, to understand the mechanism by which the peptides function it is necessary to know their three-dimensional structures. It is important to know the full complement of low-energy conformational states.

The calculations were carried out by the method of theoretical conformational analysis with regard to nonvalent, electrostatic and torsional interactions, energy of the hydrogen bonds and a special computer program [7]. The low-energy conformations of this molecule and the values of the dihedral angles of the main chain and side chains are found and the energy of the intra- and inter-residue interactions was estimated. The present paper is an extension of our previous investigations of structural and functional organization of peptide molecules [8-16].

METHOD

Neuropeptides play an important role in all nervous systems and structure-functional studies of these peptides is one approach to understanding this role. The objects of our scientific research are the analogues of nociceptin molecule tripeptide Phe1-Gly2-Gly3 and tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4. These molecules have the amino acid Gly, which has no side chain and amino acid Phe with large and labile side chain. Our calculations were carried out by the method of theoretical conformational analysis. The potential energy of these molecules were chosen as the sum of the nonvalent, electrostatic and torsional interaction energies and the energy of hydrogen bonds. Non-valent interactions were assessed using the Lennard-Jones potential. Electrostatic interactions were calculated in the monopole approximation according to Coulomb's law using partial charges on atoms. The conformational properties of these molecules were studied in an

aqueous environment, and therefore the dielectric constant was taken to be 10. The energy of hydrogen bonds was estimated using the Morse potential.

In presenting the results of the calculation of the spatial structure of these molecules we used the classification suggested in the work [17]. All structural versions according to it break down into shapes including certain forms of the main chain, each form is represented by a set of conformations. The conformations are determined by the number of rotational degrees of freedom of the side chains of the residues being included in the molecule. The conformational state of each amino residue is conveniently described by the backbone ϕ , ψ , ω and side chain χ_1 , χ_2 ... dihedral angles. The terms "conformation" used in the following analysis will always imply exact quantitative characteristics of residue or fragment geometry. For a stable conformation, the ϕ and ψ dihedral angles are located in low-energy region R, B, L and P of the conformational map. We introduce the notion "form of a residue" to denote the region of its backbone dihedral angle. The conformation of the backbone forms of residue in a given amino acid sequence will specify the backbone form of a fragment. Forms belonging to a particular shape have an analogous peptide chain contour and a similar mutual arrangement of backbones and side chains. Designations indications of dihedral angles have been measured up to the generally accepted nomenclature [18].

RESULTS AND DISCUSSION

The three-dimensional structure and conformational possibilities of the tripeptide Phe1-Gly2-Gly3 and tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 molecules were determined based on the stable conformations of the mono peptides. It is known that the active site of the nociceptin molecule that activates the receptor is the N-terminal tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 [5, 6].

The conformational properties of the tripeptide Phe1-Gly2-Gly3 were studied based on the stable conformations of the mono peptides N-acetyl-L-phenylalanine and N-acetyl-L-glycine. For a given tripeptide containing 37 atoms and 10 variable dihedral angles, 4 shapes are possible (ee, ef, fe and ff), represented by 16 forms of the main chain. In total, about 100 conformations were calculated, all of them were minimized in energy, and their geometric and energy parameters were estimated. The calculation results are presented in table 1. The geometric parameters of the four low-energy conformations of the tripeptide molecule are presented in table 2.

The calculation revealed the presence of a sharp energy differentiation in the forms of the main chain and shapes. Just as in the experimental work [2], these conformations can represent four structures. The B21BL conformation has the lowest energy ($U_{\text{total}} = -2.6$ kcal/mol), which belongs to the ef shape. This semi-folded shape is represented by the largest number of low-energy conformations - 12. In the global conformation of B21BL ($\Delta U_{\text{rel}} = 0$ kcal/mol), the energy of nonvalent interactions is -6.4 kcal/mol, electrostatic 2.3 kcal/mol and torsional 1.5 kcal/mol. The fully unfolded form of the main chain B21BR ($U_{\text{total}} = -2.0$ kcal/mol) of the ee shape is inferior to it by only 0.6 kcal/mol. The conformations of the completely folded shape ff B21PR ($U_{\text{total}} = -0.6$ kcal/mol) are low-energy. More than 3 kcal/mol is inferior to the conformation of another half-folded shape fe B11PL ($U_{\text{total}} = 0.4$ kcal/mol). It should be noted that the main contribution to the energy of low-energy conformations is made by dipeptide and tripeptide interactions. The main energy contribution comes from nonvalent interactions. This contribution varies in the range from -1.1 to -7.0 kcal/mol. Figures 1-4 represent schematically the backbone forms and positions of residues in four low-energy conformations B21BR (0.6 kcal/mol), B21BL (0.0 kcal/mol), B21PL (2.8 kcal/mol) and R21PL (1.5 kcal/mol) of the tripeptide molecule Phe1-Gly2-Gly3 (table 2).

Table 1. The energy parameters: mono peptide (U_1 , U_2 , U_3), dipeptide (U_{12} , U_{23}), tripeptide (U_{13}) energies, relative energy (U_{rel}) and energy of nonvalent (U_{nv}), electrostatic (U_{el}) and torsion (U_{tors}) interactions of optimal conformations of tripeptide molecule

№	Shapes, conformations	U_1 mono pep	U_2 tide	U_3 energy	U_4	U_{12}	U_{23}	U_{34}	U_{13}	U_{24}	U_{14}	U_{nv}	U_{el}	U_{tors}	U_{rel}
1	eee B ₁₁ BBB ₁₁	-0.2	1.3	1.2	-0.3	-1.7	-0.2	-2.3	-3.0	-3.2	-1.5	-13.1	3.4	2.1	2.4
2	R ₂₁ PLB ₂₁	1.3	1.3	1.3	-0.3	-1.8	0.3	-2.8	-3.5	-1.6	-2.3	-12.3	4.0	2.2	4.1
3	efe B ₂₁ BLB ₁₁	-1.0	1.2	1.3	-0.3	-2.3	-0.3	-1.9	-2.6	-0.7	-6.1	-13.5	3.2	2.1	1.8
4	B ₂₁ BLR ₁₁	1.2	1.2	1.3	-0.2	-2.3	-0.3	-1.9	-2.6	-0.7	-6.0	-13.2	3.2	2.0	2.1
5	eff B ₁₁ RRB ₁₁	0.3	1.3	1.3	-0.4	-1.8	-0.4	-2.1	-1.8	-0.7	-6.6	-13.4	2.7	2.0	1.3
6	B ₁₁ RRR ₁₁	0.1	1.3	1.3	-0.5	-2.0	-0.3	-2.5	-2.1	-0.7	-6.6	-14.6	2.6	1.9	0.0
7	fee B ₁₁ PLB ₁₁	-0.2	1.3	1.3	-0.3	-1.4	0.2	-2.8	-1.2	-1.6	-4.4	-12.0	3.2	2.2	3.4
8	ffe B ₁₁ PBR ₂₁	-0.1	1.3	1.3	-0.1	-1.4	0.1	-1.4	-1.0	-1.2	-3.2	-10.2	2.9	2.5	5.3
9	fff B ₁₁ PRB ₁₁	0.3	1.3	1.3	-0.4	-1.4	-0.2	-2.0	-1.2	-0.6	-6.8	-11.0	0.9	2.0	2.1
10	B ₁₁ LPB ₁₁	-0.1	1.3	1.3	-0.4	-1.6	0.3	-1.6	-0.4	-1.6	-7.0	-10.9	0.8	2.0	2.0
11	B ₁₁ LPR ₁₁	-0.1	1.3	1.3	-0.2	-1.6	0.1	-1.6	-0.4	-1.6	-7.4	-10.8	0.8	2.0	2.0
12	B ₁₁ PRR ₁₁	0.2	1.3	1.3	-0.3	-1.4	-0.3	-1.7	-1.2	-0.8	-7.3	-11.3	1.0	1.9	1.7

Table 2. Geometric parameters (degree) of the optimal conformations of Phe-Gly-Gly tripeptide molecule

Residues	Shape (conformation)			
	ee (B ₂₁ B R)	ef (B ₂₁ B L)	fe (B ₂₁ P L)	ff (R ₂₁ P L)
Phe 1	-61 149 178 174 80	-59 153 180 180 86	-59 150 179 180 86	-56 -69 -177 170 73
Gly2	-83 69 180	-78 78 177	82 - 70 180	81 -69 180
Gly3	-93 -84 180	94 71 176	88 92 180	93 85 178

Note: The values of dihedral angles are given in the sequence $\varphi, \psi, \omega, \chi^1, \chi^2, \dots$

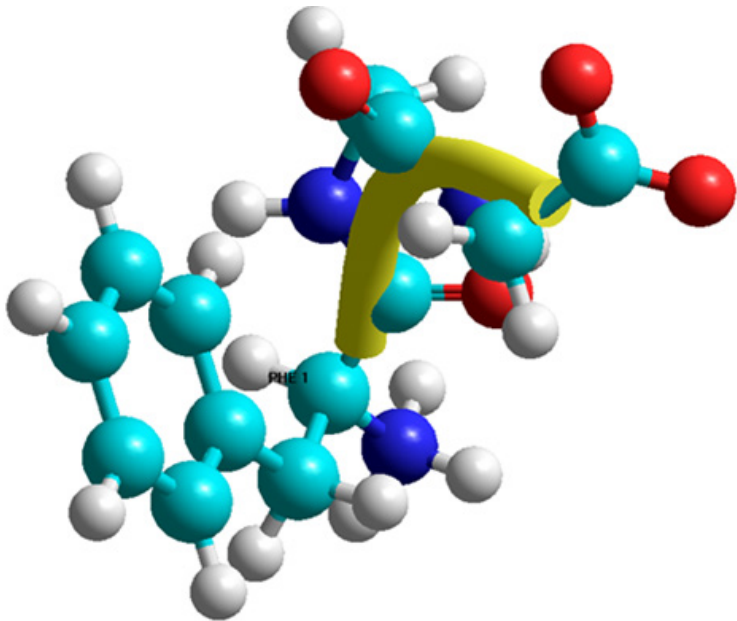


Figure 1. Spatial structure of the low energy conformation B21BR (0.6 kcal/mol) of the tripeptide molecule

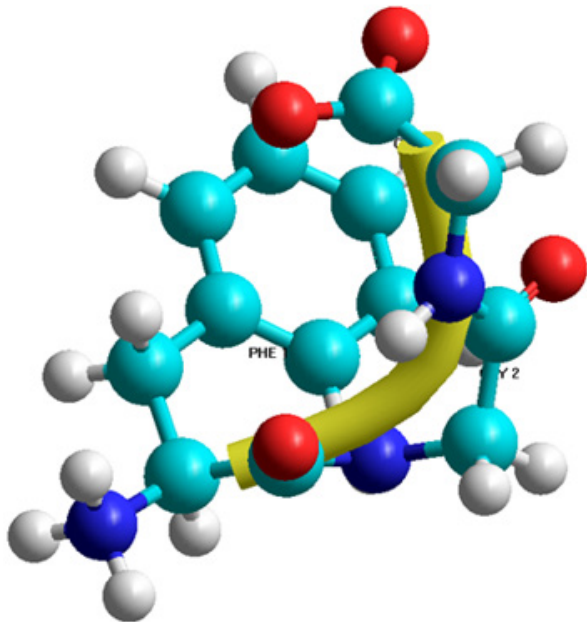


Figure 2. Spatial structure of the low energy conformation B21BL (0.0 kcal/mol) of the tripeptide molecule

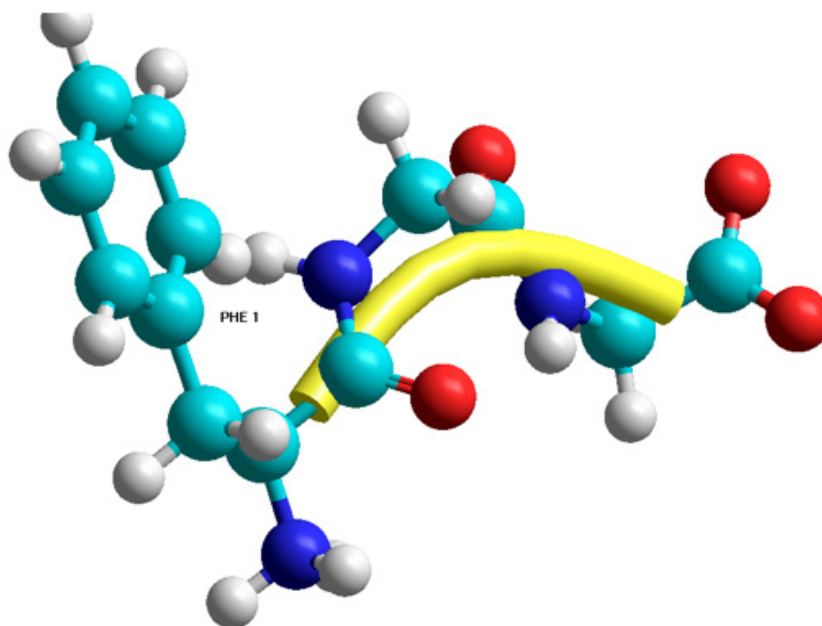


Figure 3. Spatial structure of the low energy conformation B21PL (2.8 kcal/mol) of the tripeptide molecule

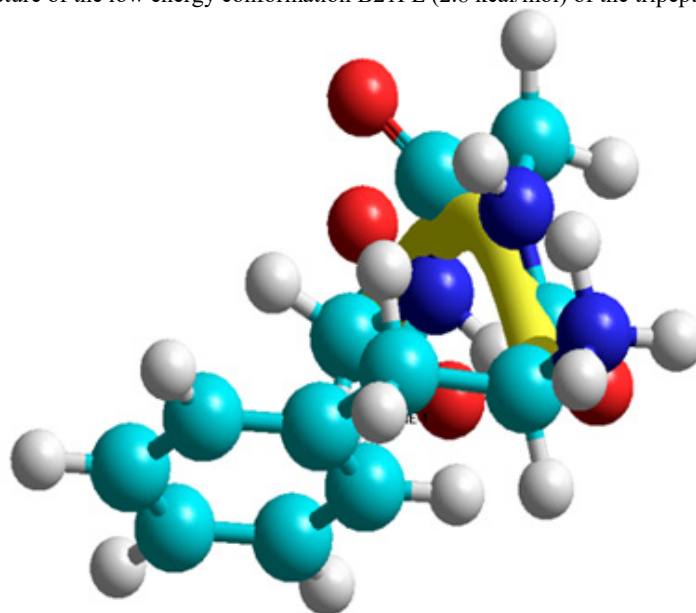


Figure 4. Spatial structure of the low energy conformation R21PL (1.5 kcal/mol) of the tripeptide molecule

Figure 1b shows that in the global conformation B21BL (0.0 kcal/mol) of the tripeptide molecule, the phenylalanine side chain hangs over the backbone of the two glycines. This promotes efficient di- and tripeptide interactions. In the case of a fully folded structure R21PL (1.5 kcal/mol), the phenylalanine side chain is folded into the solvent and can interact with the receptor. All low-energy conformations of the tripeptide molecule were taken into account when calculating the structure of the tetrapeptide molecule Phe1-Gly2-Gly3-Phe4.

The amino acid sequence of the tetrapeptide molecule included two amino acids each phenylalanine and glycine. Tetrapeptide Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 contains 57 atoms and 15 variable dihedral angles. The specificity of the amino acid side chains of the tetrapeptide molecule determined the number of initial approximations. In total, over 150 conformations were calculated, belonging to 64 forms of the main chain and 8 possible shapes for this molecule. All of them were minimized in energy, and their geometric and energy parameters were estimated. The calculation showed the presence of a sharp energy differentiation of conformations. Representatives of 22 forms of the main chain fall into the energy range 0–4 kcal/mol. The relative energy of the conformations of the tetrapeptide molecule varied within the range 0–8 kcal/mol. There is the energy differentiation both in respect of the conformations, and forms of the main chain and shapes. The low-energy conformations of the tetrapeptide molecule are presented in table 3.

Table 3. The energy parameters: contributions of mono-peptide (U_1, U_2, U_3, U_4), di-peptide (U_{12}, U_{23}, U_{34}), tri-peptide (U_{13}, U_{24}), tetra-peptide (U_{14}) energies, relative energy (U_{rel}) and energy contributions of nonvalent (U_{nv}), electrostatic (U_{el}), torsion (U_{tors}) interactions of optimal conformations of the tetra-peptide molecule

No	Shapes, conformations	U_1	U_2	U_3	U_4	U_{12}	U_{23}	U_{34}	U_{13}	U_{24}	U_{14}	U_{nv}	U_{el}	U_{tors}	U_{rel}
1	eee B ₁₁ BBB ₁₁	-0.2	1.3	1.2	-0.3	-1.7	-0.2	-2.3	-3.0	-3.2	-1.5	-13.1	3.4	2.1	2.4
2	R ₂₁ PLB ₂₁	1.3	1.3	1.3	-0.3	-1.8	0.3	-2.8	-3.5	-1.6	-2.3	-12.3	4.0	2.2	4.1
3	efe B ₂₁ BLB ₁₁	-1.0	1.2	1.3	-0.3	-2.3	-0.3	-1.9	-2.6	-0.7	-6.1	-13.5	3.2	2.1	1.8
4	B ₂₁ BLR ₁₁	1.2	1.2	1.3	-0.2	-2.3	-0.3	-1.9	-2.6	-0.7	-6.0	-13.2	3.2	2.0	2.1
5	eff B ₁₁ RRB ₁₁	0.3	1.3	1.3	-0.4	-1.8	-0.4	-2.1	-1.8	-0.7	-6.6	-13.4	2.7	2.0	1.3
6	B ₁₁ RRR ₁₁	0.1	1.3	1.3	-0.5	-2.0	-0.3	-2.5	-2.1	-0.7	-6.6	-14.6	2.6	1.9	0.0
7	fee B ₁₁ PLB ₁₁	-0.2	1.3	1.3	-0.3	-1.4	0.2	-2.8	-1.2	-1.6	-4.4	-12.0	3.2	2.2	3.4
8	ffe B ₁₁ PBR ₂₁	-0.1	1.3	1.3	-0.1	-1.4	0.1	-1.4	-1.0	-1.2	-3.2	-10.2	2.9	2.5	5.3
9	fff B ₁₁ PRB ₁₁	0.3	1.3	1.3	-0.4	-1.4	-0.2	-2.0	-1.2	-0.6	-6.8	-11.0	0.9	2.0	2.1
10	B ₁₁ LPB ₁₁	-0.1	1.3	1.3	-0.4	-1.6	0.3	-1.6	-0.4	-1.6	-7.0	-10.9	0.8	2.0	2.0
11	B ₁₁ LPR ₁₁	-0.1	1.3	1.3	-0.2	-1.6	0.1	-1.6	-0.4	-1.6	-7.4	-10.8	0.8	2.0	2.0
12	B ₁₁ PRR ₁₁	0.2	1.3	1.3	-0.3	-1.4	-0.3	-1.7	-1.2	-0.8	-7.3	-11.3	1.0	1.9	1.7

The global conformation of this molecule ($U_{rel}=0$ kcal/mol) is B₁₁RRR₁₁. The contribution of the stabilizing nonvalent to this conformation is (−14.6) kcal/mol, where as electrostatic interactions account for 2.6 kcal/mol and torsion for 1.9 kcal/mol. The main contributions of the interresidual interactions in this conformation were dipeptide contributions (−4.8) kcal/mol, tripeptide (−2.8) kcal/mol, tetrapeptide (−6.6) kcal/mol. In this conformation, amino acid residues Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 form folded structure. The geometric parameters of this conformation of the tetrapeptide molecule are presented in table 4. It is revealed that low energy conformations of this molecule have the folded and half folded types of backbone. These folded forms bring parts of the backbone and the side chains of the amino acids together, and they result in convenient interactions.

The results can be used to study the spatial structure of tetrapeptide molecule as well as to study the conformational capabilities of side chains of the Phe1 and Phe4 when interacting with receptor molecules. The side chains of these residues have conformational freedom in the low-energy structures of the tetrapeptide molecule. Thus, the theoretical conformational analysis of this peptide molecule led to such structural organizations of molecules that do not exclude the realization by the molecule of a number of various functions that require strictly specific interactions with various receptors.

Figures 5-8 represent schematically the backbone forms and positions of residues in low-energy conformations B₁₁RRR₁₁, B₂₁BLB₁₁, B₁₁LPRB₁₁ and B₁₁PLB₁₁ of the tetrapeptide molecule. The figures show that this molecule has folded N-terminal fragment of the molecule. Conformational possibilities of side chains of Phe1 and Phe4 in the best low energy conformations of peptide molecule have been investigated by plotting conformational maps. The conformational maps show that side chains of this residues have conformational freedom.

Table 4. Geometric parameters (degree) of the optimal conformations of Phe-Gly-Gly-Phe tetrapeptide molecule

Residues	Shape (conformation)			
	eff (B ₁₁ R R R ₁₁)	efe (B ₂₁ B L B ₁₁)	fff (B ₁₁ L P B ₁₁)	fee (B ₁₁ P L B ₁₁)
Phe 1	-67 161 176	-71 156 179	-80 166 179	-85 163 179
Gly2	-90 -69 180	-84 84 175	79 -74 176	79 -73 176
Gly3	-81 -62 -179	90 93 -179	-77 -51 -179	81 83 175
Phe 4	-150 -37 180	-147 151 180	-143 -43 180	-140 151 180
U_{rel} (kcal/mol)	0.0	1.8	1.7	3.4

Note: The values of dihedral angles are given in the sequence $\varphi, \psi, \omega, \chi^1, \chi^2, \dots$

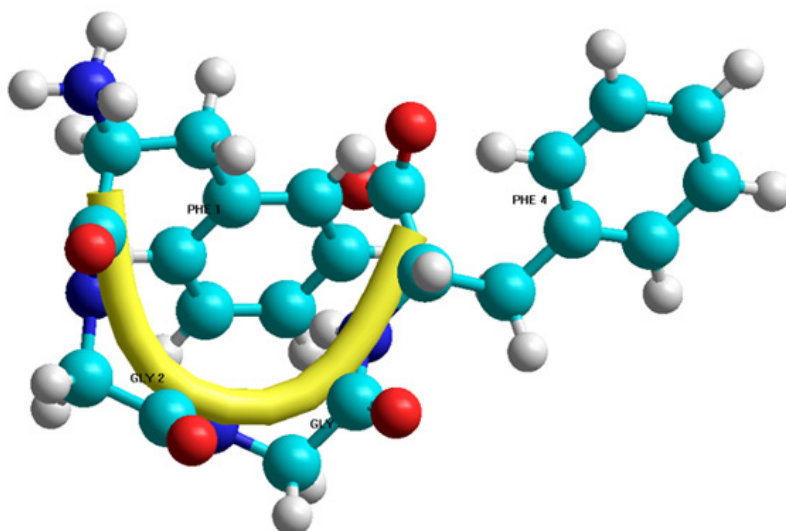


Figure 5. Spatial structure of the low energy conformation B₁₁ R R R₁₁ of the tetrapeptide molecule

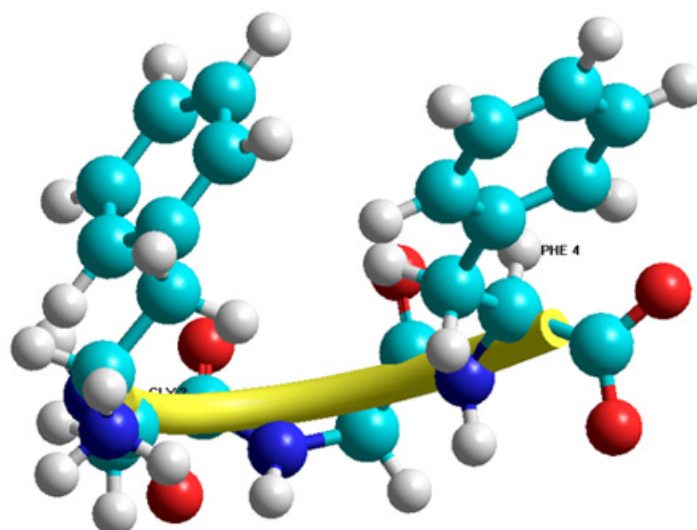


Figure 6. Spatial structure of the low energy conformation B₂₁ B L B₁₁ of the tetrapeptide molecule

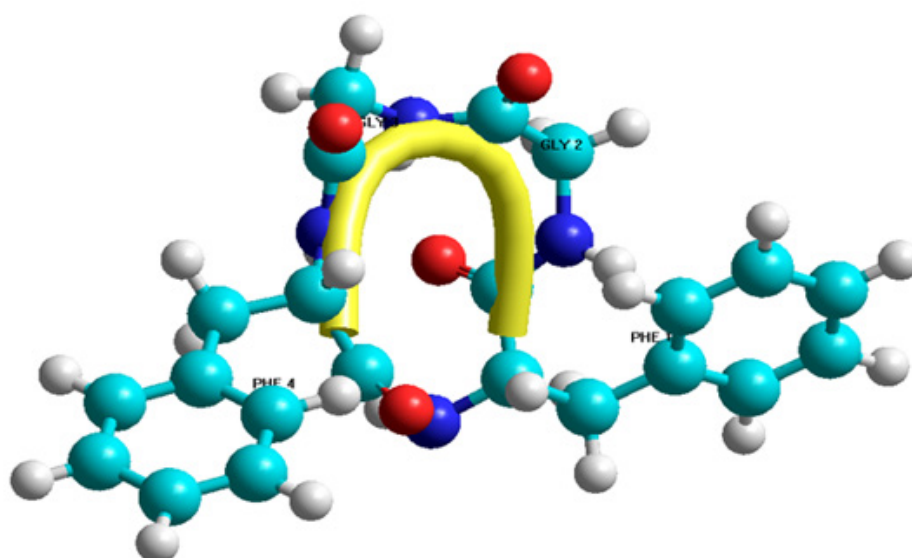


Figure 7. Spatial structure of the low energy conformation B₁₁ L P B₁₁ of the tetrapeptide molecule

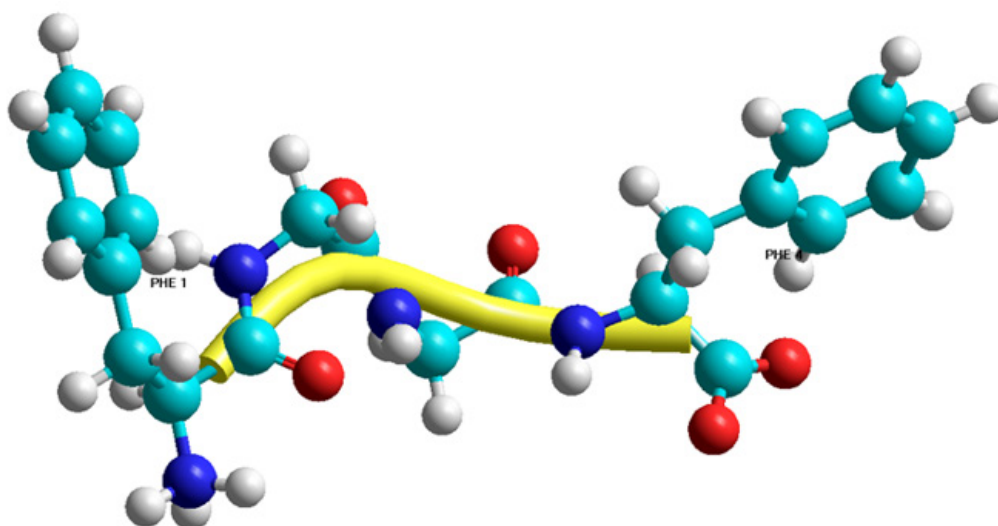


Figure 8. Spatial structure of the low energy conformation B₁₁ P L B₁₁ of the tetrapeptide molecule

CONCLUSION

We have studied in detail the spatial structure and conformational properties of tri- and tetrapeptide molecules Phe1-Gly2-Gly3 and Phe1-Gly2-Gly3-Phe4. The conformational possibilities of these molecules were studied by the method of theoretical conformational analysis. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valence, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The low-energy conformations of these molecules, the values of the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues were found, the energy of intra- and inter-residual interactions was estimated. The spatial structure of the tripeptide and tetrapeptide molecules were calculated based on the low-energy conformations of the corresponding amino acid residues. It has been shown that the spatial structure of the tripeptide molecule can be represented by 15 low-energy conformations for four spatial structures and the spatial organization of the tetrapeptide can be represented by 12 low-energy conformations.

Conformational maps were constructed around the dihedral angles of the Phe1 and Phe4 side chains. The conformational maps show that almost complete conformational freedom is possible around the dihedral angles χ_1 of the Phe1 and Phe4 residues. The positions of the Phe1 and Phe4 side chains found by us are energetically the most favorable. It is revealed that low energy conformations of these molecules have the half-folded and folded type of backbone.

Список литературы / References:

1. Witkin J.M., Statnick M.A., Rorick-Khin L.M., Pintar J.E. et al. The biology of Nociceptin/ Orphanin FQ(N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence. *Pharmacol. Ther.*, 2014, vol. 141, no. 3, pp. 283-299.
2. Reha D., Valdes H., Vondrasek J., Hobza P. et al. Structure and IR spectrum of phenylalanyl-glycyl-glycine tripeptide in the gas-phase: IR/UV experiments ab initio quantum chemical calculations, and molecular dynamic simulations. *Chemistry, A European Journal*, 2005, vol. 11, no. 23, pp. 6803-6817.
3. Ivanova E.A., Sarycheva N.Yu., Dubynin V.A., Malyshev A.V. et.al. Behavioral effects of original tetrapeptide an analog of N-terminal nociceptin fragment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, vol. 13, no. 2, pp. 851-857.
4. Wilson K.R., Cruz M.J., Nicolas Ch., Belau L. et. al. Thermal vaporization of biological nanoparticles: fragment-free vacuum ultraviolet photoionization mass spectra of tryptophan, phenylalanine-glycine-glycine, and beta-carotene. *J. Phys.Chem.*, 2006, vol. 110, no. 6, pp. 2106-2113.
5. Wtorek K., Janecka A. Potential of Nociceptin/Orphanin FQ Peptide Analogs for Drug Development. *Chem. Biodivers*, 2021, vol. 18, no. 1, p. 2000871.
6. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M. A computer program for calculation of conformations of molecular systems. *J. Struc. Chem.*, 1983, vol. 24, pp. 147-148.
7. Ismailova L.I., Akverdieva G.A., Demukhamedova S.D., Akhmedov N.A. Molecular modelling of Pro-Gly gliproline and its complexes. *Moscow University Physics Bulletin*, 2023, vol. 78, no. 5, pp. 668-680.
8. Akhmedov N.A., Gadjiyeva Sh.N., Abbasli R.M. Structural organization of Asp-Pro-Lys-Gln-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ molecule. *Cur.Top. in Pept.&Prot.Res.*, 2009, vol. 10, pp. 57-62.
9. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Gocayev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Cur.Top. in Pept.&Prot. Res.*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
10. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Abbasli R.M., Agayeva L.N., Akhmedova S.R. Spatial structure of Octarphin molecule. *IOSR JAP*, 2016, vol. 8, pp. 66-70.
11. Akhmedov N., Agayeva L., Akverdieva G., Abbasli R., Ismailova L. Spatial structure of the ACTH-(6-9)-PGP molecule. *J.Chem.Soc.Pak.*, 2021, vol. 43., no. 5, pp. 500-504.

12. Akhmedov N., Agayeva L., Akhmedova S., Abbasli R., Ismailova L. Spatial structure of the β -Casomorphin-7 Molecule". *IOSR Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)*, 2021, vol. 13, iss. 5, pp. 62-67.
13. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Computer modeling of the spatial atructure of nonapeptide molecule. *Proceedings of the 7-th International Conference on Control and Optimization with Industrial Applications*, 2020, vol. I, pp. 218-220.
14. Akhmedov N.A., Agayeva L.N., Ismailova L.I., Godjaev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Current Topics in Peptide and Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
15. Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А. Структурная организация молекулы Gly-Pro-Arg-Pro. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 1, с. 53-56 [Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Structural organization of the Gly-Pro-Arg-Pro molecule. *Russian Journal of Biological Physics and Chemisrty*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 53-56 (In Russ.)].
16. Popov E.M. An Approach to calculations of the problem of structure functional organization of natural peptides. *Mol. Biol.*, 1985, vol. 19, pp. 1107-1138.
17. IUPAC-IUB, Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 1988, vol. 39.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРИПЕПТИДНОГО И ТЕТРАПЕПТИДНОГО АНАЛОГОВ МОЛЕКУЛЫ НОЦИЦЕПТИНА

Исмаилова Л.И., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru
Поступила в редакцию 09.09.2024

Аннотация. Данная научная работа посвящена изучению пространственной структуры и конформационных возможностей трипептидной Phe1-Gly2-Gly3 и тетрапептидной Phe1-Gly2-Gly3-Phe4 молекул. Знание структурных и функциональных свойств этих пептидных молекул для медицины и фармакологии имеет большое практическое значение. Эти нейропептидные молекулы являются стабильными аналогами ноцицептина. Расчеты проводились методом теоретического конформационного анализа с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий, энергии водородных связей и специальной компьютерной программы. Найдены низкоэнергетические конформации этих молекул, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей входящих аминокислот, оценена энергия внутри- и меж остаточных взаимодействий. Обнаружено 15 низкоэнергетических конформаций, принадлежащих четырем структурным шейпам трипептидной молекулы, а также 12 низкоэнергетических конформаций тетрапептида. Выявлено, что низкоэнергетические конформации этих пептидов имеют полусвернутый и свернутый тип основной цепи. Боковые цепи аминокислот Phe1 и Phe4 в низкоэнергетических конформациях тетрапептидной молекулы осуществляют эффективные взаимодействия и являются конформационно лабильными аминокислотами. Они сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в три- и тетрапептид, что приводит к важным взаимодействиям.

Ключевые слова: структура, молекула, трипептид, тетрапептид, конформация.

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ЧАСТИЦЫ (EPs). КЛАССИФИКАЦИЯ, СВОЙСТВА, БИОГЕНЕЗ (ОБЗОР)

Ланда С.Б.¹, Верлов Н.А.¹, Эмануэль В.Л.²

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»
ул. Орлова роца 1, г. Гатчина, 188300, РФ; e-mail: sergey.landa@gmail.com

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
ул. Льва Толстого, 8, г. Санкт-Петербург, 197022, РФ

Поступила в редакцию 08.08.2024

Аннотация. Исследование экстраклеточных частиц (EPs) быстро расширяется, поскольку недавние открытия показали гораздо большую сложность и разнообразие видов EPs, чем считалось всего несколько лет назад. В последние годы были описаны новые типы EPs. Клетки взаимодействуют друг с другом, выделяя сигнальные молекулы, включая белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Клетки могут упаковывать эти сигнальные молекулы в EPs, чтобы, помимо прочего, избежать быстрой деградаци и уйти от иммунного надзора, что приводит к локальной и дальней межклеточной коммуникации. Экстраклеточные везикулы (EVs), - пузырьки, заключенные в бислойную мембрану, которые выделяются всеми типами клеток, изученными до настоящего времени, как в норме, так и при патологии и обнаруживаются во всех тканях и жидкостях организма. Последние достижения в области выделения и аналитических методов исследования привели к выявлению все большего числа видов EVs. Становится все более очевидным, что невезикулярные внеклеточные частицы (NVEPs), лишенные липидной двухслойной мембраны, присутствуют и часто в большом количестве во внеклеточном пространстве и жидкостях организма. NVEP включают в себя не только хорошо известные объекты, такие как липопротеины, нуклеосомы и так называемые ваулт-частицами (vaults), но также недавно открытые экзомы и супермеры. Таким образом, наше понимание клеточной биологии и межклеточных коммуникаций, которым способствует высвобождение EVs и NVEPs, постоянно меняется. В докладе мы попытались описать различные типы EP, осветить последние достижения в области исследований EP и указать на основные нерешенные вопросы.

Ключевые слова: Экстраклеточные частицы, EVs, NVEPs, классификация, биогенез, биомаркеры, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение внеклеточных везикул (EPs) в настоящее время стали мейнстримом в области клеточной и молекулярной биологии. Ежегодно выходят десятки публикаций, посвященных свойствам, молекулярному составу, происхождению и роли EPs в организме. Мир EPs чрезвычайно разнообразен. К настоящему времени открыто более двух десятков различных видов EPs. Диапазон размеров EPs колеблется от 10 нм до 10 000 нм. Чрезвычайно разнообразен молекулярный состав и функции EPs в различных тканях и жидкостях организма, от клеточных систем до органов.

Последние достижения в области выделения и аналитических методов привели к выявлению все большего числа типов EPs [1–3]. Следует отметить особую роль публикации [4], приведшей к открытию нового класса EPs – невезикулярных экстраклеточных частиц (NVEPs) и разделения EPs на везикулярные (EVs) и невезикулярные NVEPs частицы. NVEPs включают в себя не только хорошо известные объекты, такие как липопротеиновые частицы, нуклеосомы и Ваулт-частицы, но также недавно открытые экзомы [1,4] и супермеры [5–7]. Расширение мира EPs во многом обусловлено совершенствованием методов и методологии, а также растущим осознанием их сложности и неоднородности, что стимулировало активный поиск новых подмножеств частиц.

Следует отметить, что расширение мира EPs за счет NVEPs вызвало у некоторых исследователей «головокружение от успехов». Было высказано предложение включать в состав EPs практически все объекты субклеточного размера, и в первую очередь, вирусных частиц. Поэтому, нам кажется целесообразным дать определение EPs, и таким образом ограничить круг претендентов. Мы готовы предложить для обсуждения свой вариант такого определения:

Экстраклеточные частицы (EPs) - субклеточные объекты, не обладающие собственным обменом веществ, образующиеся в процессе жизнедеятельности клеток или программируемой клеточной гибели, путем специальных молекулярных механизмов биогенеза, обнаруживаемые в биологических жидкостях и кондиционированной среде после культивации в ней клеточных культур и обладающие рядом характерных признаков. К таковым относятся: происхождение (результат жизнедеятельности нормальной/патологической клетки или результат программируемой гибели клетки), строение оболочки (бислойная мембрана, липидный или гликопротеиновый монослой, протеиновый капсид), биогенез, размеры, плавучая плотность, наличие специфических биомаркеров, содержание характерных белков, липидов, нуклеиновых кислот, клеточных органелл/фрагментов органелл.

В качестве главных аргументов включения вирусов в состав EPs выдвигаются следующие факты:

Вирусные частицы размером от 30 до 300 нм могут высвобождаться в виде частиц, покрытых липидной оболочкой в виде двухслойной мембраны (сродни EVs) или без оболочки (сродни NVEPs) [8,9]. Кроме того, вирусы могут передаваться внутри EVs, что может усиливать их вирулентность, а также позволяет вирусу ускользать от распознавания иммунной системой [8,10,11]. EVs могут взаимодействовать с вирусами различными способами. EVs из инфицированных клеток могут содержать вирусные белки и РНК [9,12]. Вирусы могут использовать для выхода из клетки молекулярные механизмы, используемые EPs [12]. Все приведенные данные свидетельствуют, что вирусы для более эффективного выживания используют/приспосабливают под себя различные молекулярные механизмы клетки. К этим данным можно добавить использование вирусами для проникновения в клетку клеточных рецепторов на мембране и клеточных механизмов транскрипции и трансляции для синтеза вирусных белков. Все эти свойства вирусы получили в процессе эволюции. В тоже время, вирусы ни в коем случае не являются ни продуктами жизнедеятельности клетки, ни продуктами программируемой клеточной гибели, а наоборот являются внешними инфицирующими агентами, привнесенными в организм и не имеющими отношения к EPs, как части функционирования организма. Поэтому на наш взгляд, они не могут считаться EPs

Краткая история EPs. Первые наблюдения за EPs и их значимостью произошли примерно одновременно в различных физиологических условиях, при этом не было осознания того, что эта форма функционирования является универсальным биологическим свойством клеток. Первой описанной EPs можно считать липопротеин высокой плотности, который был открыт в 1949 году Мишелем Машбёфом. Он выделил из сыворотки лошади богатый липидами альфа-глобулин [13]. В 1967 году в плазме крови Питером Вольфом были открыты микровезикулы, которые он назвал «тромбоцитарной пылью» [14]. Ранние наблюдения также включали матриксные везикулы, выявленные Андерсоном в 1969 году во время кальцификации костей [15]. В 1970-1980-х годах отдельные независимые исследования включали выделение везикул плазматической мембраны из микроворсинок аденомы прямой кишки [16], сообщения о вирусоподобных частицах в культурах клеток человека и бычьей сыворотке [17,18] и обнаружение везикул, позже названных простасомами [19], в семенной плазме [20]. В 1983 году подробные ультраструктурные исследования показали, что везикулы также высвобождаются мультивезикулярными тельцами (MVB), которые сливаются с клеточной мембраной во время дифференцировки незрелых эритроцитов [21,22] Тогда же возник термин «экзосома» [23].

В 1986 году были открыты Ваулт-частицы [24], но, поскольку, они не были везикулярными, то это событие не вызвало особого интереса.

В 2006-2007 годах EVs были выделены из большинства типов клеток и биологических жидкостей, таких как слюна, моча, жидкость для промывания носа и бронхов, околоплодные воды, грудное молоко, плазма, сыворотка и семенная жидкость [25–30].

В 2008 году Янушем Раком и его коллегами впервые были описаны «крупные онкосомы». [31]. Онкосомы представляют собой любой подтип EVs, которые секретируются раковыми клетками и содержат онкогенный «груз» [32,33], в 2015 г. были обнаружены «миграсомы» [34], в 2016 эктосомы [35].

Значимым шагом в последних разработках в области экстраклеточных везикул также стало создание в 2011 году Международного общества экстраклеточных везикул (ISEV). С этого времени члены ISEV активно сотрудничают с целью унификации номенклатуры и методологий EVs. Важнейшим этапом в исследованиях EPs стало открытие в 2018 году экзомов [4] и признание ISEV нового типа EPs невезикулярных экстраклеточных частиц. NVEPs [37]. После этого в состав EPs были включены как известные ранее липопротеины и ваулт-частицы [38], так и открытые после 2018 года экзомы [4], супермеры [5] и супрамолекулярные атакующие частицы (SMAP) [39].

На рисунке 1 представлены основные типы EPs, известные на 2024 год. К настоящему времени стало ясно, что морфология, размеры, протеом и липидом у различных EPs в высшей степени разнообразны. В данном обзоре мы попытаемся как охарактеризовать основные виды EPs, так и попытаться упорядочить и классифицировать их.

Известны, по крайней мере, три основных типа биогенеза: апоптотический, когда апоптотические EVs образуются в результате фрагментации клеток в процессе программируемой гибели; эктосомальный – микровезикулы/эктосомы образуются путем прямого отпочкования выгнутой наружу плазматической мембраны; экзосомальный, когда на клеточной мембране образуются пазухи, из которых путем отделения от мембраны внутри клетки возникают эндосомальные компартменты, где и протекает процесс формирования везикул, в частности экзосом (рис. 2). После завершения процесса формирования экзосом экзосомы сливаются с плазматической мембраной и экзосомы элиминируются в межклеточное пространство. Функционирование каждого из вышеперечисленных способов биогенеза существуют специальные молекулярные механизмы. Более подробно на каждом из этих механизмов мы остановимся ниже, сейчас же только отметим, что для функционирования этих механизмов, требуется наличие определенных белков, могут быть использованы в качестве биомаркеров для идентификации конкретного вида EPs. Правда, в случае, когда конкретный механизм биогенеза универсален, например, в случае эктосомального механизма, участвующие в нем биомаркеры утрачивают специфичность. Поэтому идентификацию вида EPs нельзя основывать только на наличии у определяемых EPs биомаркеров данного типа. Необходимо применять комплексный подход, основанный на учете совокупности идентификационных признаков.

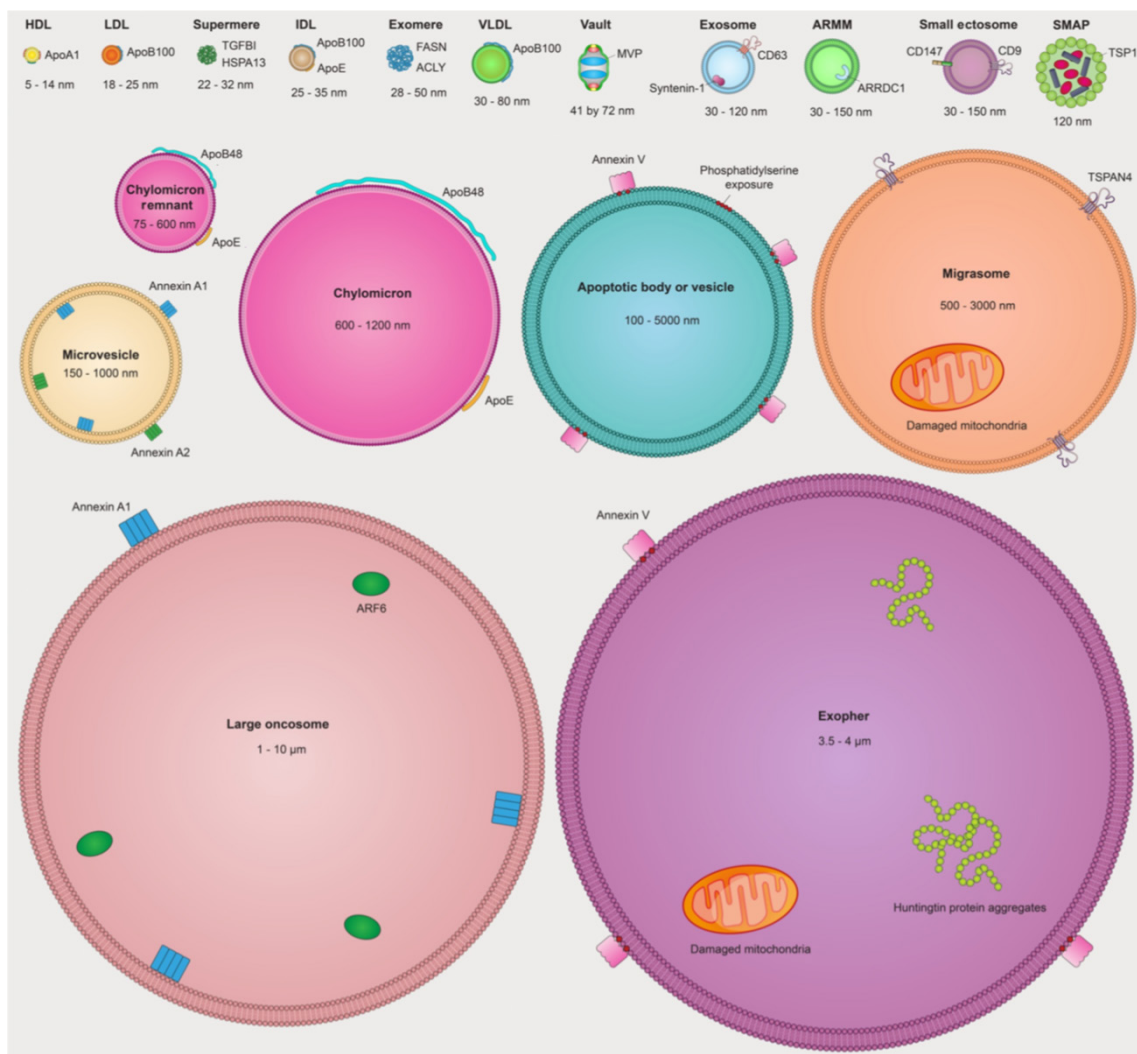


Рисунок 1. Мир внеклеточных везикул (EPs). Большинство клеток млекопитающих имеют диаметр от 10 до 100 мкм и могут выделять разнообразные гетерогенные EVs и невезикулярные внеклеточные частицы (NVEPs) размером от ~5 нм до >5 мкм. Сокращения: ACLY – АТФ-цитратлиаза; ARMM – микровезикула, опосредованная белком, содержащим аррестинный домен1; (ARRDC1)ж FASN – синтаза жирных кислот HSPA13 – член 13 семейства белков теплового шока (Hsp70)ж MVP – основной белок капсида Ваулт-частиц; SMAP – супрамолекулярная атакующая частица; TGFB1 – бета-индуцированный трансформирующий фактор роста; TSP1 – тромбоспондин 1; HDL – липопротеин высокой плотности; IDL – липопротеин промежуточной плотности; LDL – липопротеин низкой плотности; VLDL – липопротеин очень низкой плотности. По [36]

Отметим также, что идентификационные признаки имеют разный «таксонометрический вес». Например: наличие фосфотидилсерина (PS) на внешнем листе бислойной мембраны EPs свидетельствует о принадлежности изучаемой частицы к типу частиц, возникающих в процессе программируемой гибели клеток, а наличие у этих частиц самой бислойной мембраны, говорит об их принадлежности к классу EVs. Если же в полости данных везикул обнаружатся митохондрии или нуклеосомы, то их можно будет отнести к апоптотическим телам, в отличие от экзоферов, у которых хотя в полости и присутствуют митохондрии, на внешнем листе мембраны отсутствует фосфотидилсерин, и, поэтому, этот вид частиц относится к типу частиц, возникающих в процессе жизнедеятельности клеток. Как мы видим, такой подход позволяет не только идентифицировать EPs, но и построить иерархическую классификационную систему. Исходя из этого, еще раз подчеркнем важность всестороннего изучения свойств, биогенеза и возможных функций данных EPs в организме, отбора среди массы параметров идентификационных признаков и определение их «таксонометрического веса».

Описание Eps

EVs вырабатываемые клетками в процессе жизнедеятельности. Эктосомальный тип биогенеза.

К данному классу EPs относятся: ARRDC1 опосредованные микровезикулы ARMMs, малые эктосомы, микровезикулы, миграсомы и крупные онкосомы.

ARRDC1 опосредованные микровезикулы ARMMs. В 2012 году Джозеф Набхан с соавторами впервые

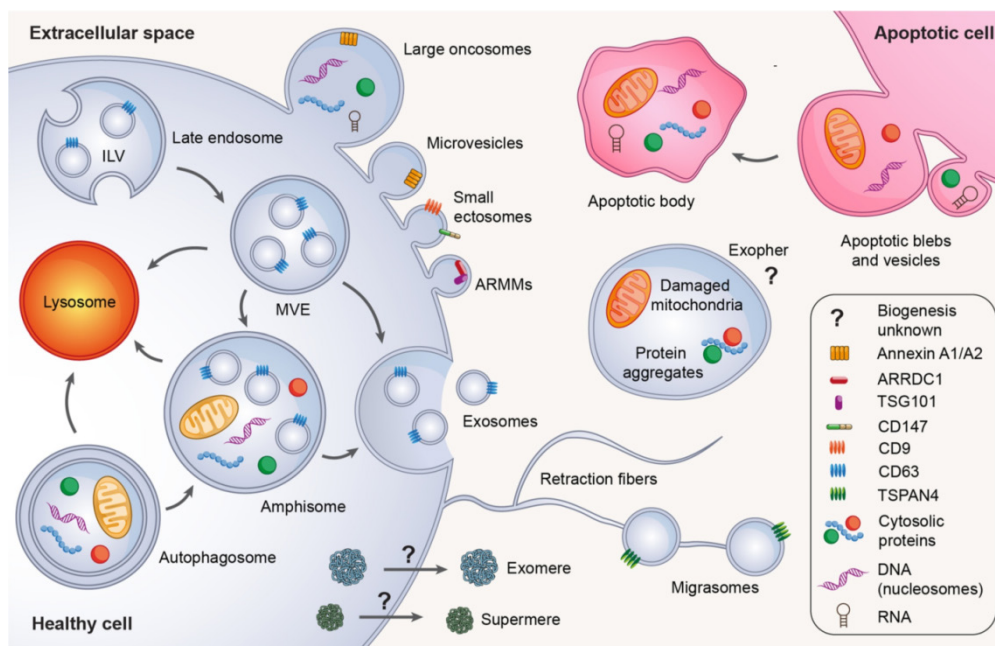


Рисунок 2. Современное понимание путей биогенеза внеклеточных везикул (EVs) и (NVEPs). Сокращения: ILV – внутрипросветные везикулы; MVE – Мультивезикулярная эндосома; ARMMs – Белок, содержащий домен аррестина 1 (ARRDC1) опосредованные микровезикулы; по [36]

описали новый вид EVs эктосомального типа, отличающегося от классического отпочкования эктосомы от клеточной мембраны тем, что такое отпочкование обусловлено специфическим взаимодействием вспомогательного белка TSG101 ESCRT-комплекса с белком, содержащим домен аррестина 1 (ARRDC1), который локализован на плазматической мембране [40]. Это взаимодействие приводит к перемещению TSG101 из эндосом на плазматическую мембрану и опосредует высвобождение микровезикул, содержащих TSG101-ARRDC1 комплекс и другие клеточные белки. Размер частиц колеблется от 30 – 150 нм [36]. В отличие от экзосом, которые образуются из MVB, в ARRD1-опосредованных микровезикулах (ARMMs) отсутствуют известные эндосомальные маркеры. Для образования ARMM требуется АТФаза VPS4, которая усиливается лигазой ITCH E3, в свою очередь взаимодействующей с WWP2, что приводит к убиквитинированию ARRD1 [40]. Было показано, что ARMM содержат активные рецепторы NOTCH и опосредуют неканонический межклеточный сигнал NOTCH [41]. Авторы идентифицировали более 100 белков, которыми обогащены ARMMs, включая ARRD1, TSG101 и белки комплекса ESCRT. Примерно треть из них составляют белки клеточной мембраны, включая рецептор NOTCH2. Включение NOTCH2 в ARMMs облегчается лигазой ITCH E3 и металлопротеазой ADAM10, которые, также секретируются в ARMMs. NOTCH2 присутствующий в ARMS доставляется ими в клетки-реципиенты, и при активации расщепляется γ -секретазой.

Рецепторы NOTCH представляют собой высоко консервативные белки плазматической мембраны, которые выполняют широкий спектр важнейших физиологических функций, таких как эмбриональное развитие, гомеостаз тканей, иммунитет и функция стволовых клеток [42,43]. Каноническая передача сигналов NOTCH требует прямого контакта между соседними клетками [44]. В дополнение к этому классическому пути, NOTCH также может активироваться в эндосомальных компартментах посредством неканонического пути, который не зависит от лиганда [45].

Было доказано, что рецепторы NOTCH специально задействованы в ARMM для внеклеточного высвобождения и, что еще более важно, показано, что NOTCH, содержащийся в ARMS, может быть передан клеткам-реципиентам для передачи специфической сигнализации NOTCH [46]. Таким образом, была выявлена важная физиологическая роль ARMM и раскрыт новый сигнальный путь рецептора NOTCH, который опосредован EVs и не зависит от прямого межклеточного контакта.

Эктосомы/Отпочковывающиеся микровезикулы. Эктосомы, или Отпочковывающиеся микровезикулы, представляют собой подтип EVs, диаметр которых варьирует от 100 до 1000 нм, и которые секретируются в ECM при отрыве «почки» от клеточной мембраны [35]. Плавающая плотность составляет 1.14 – 1.20 г/мл [47]. Доказано, что эктосомы инкапсулируют множество компонентов белков, например: ферменты метаболизма – GAPDH, Энолазу1, пируват-киназуM; Аннекины – Аннексин A1, A2, V; белок RAB7; Белки цитоскелета: Актин, α -актин-4, тубулин, кератин; белки, участвующие в создании микроРНК6 Ago1, 2, 3, 4, HSP90; Белки связывания микроРНК: EEF2, eEF1A1, PARK7, RPS8; EGFR, матриксные металлопротеиназы (MMPs) и фактор роста сосудистого эпителия (VEGF), что позволяет предположить влияние, эктосом на многие процессы в организме, в частности, на рост клеток и ангиогенез [1]

Таблица 1. Классификационные признаки ARMMs

Наименование	Белок, содержащий домен аррестина1 опосредованные микровезикулы (ARMMs)
Категория	Small EVs
Размер	30-150 нм
Плотность	Неизвестно
Мембрана	Липидный бислой
Биогенез	Эктосомальный путь, связанный с белком, содержащим домен аррестина 1 (ARRDC1)
Маркеры	ARRDC1, TSG101
МикроРНК	Неизвестно

Клеточные механизмы, лежащие в основе секреции exRNA, а также их отбора и сортировки по различным путям секреции, до сих пор остаются предметом дискуссий. Было показано, что микровезикулы содержали мало или вообще не содержали рибосомной РНК. [48]. Было показано, что большинство микроРНК в микровезикулах имеют происхождение, соответствующее модели неселективной секреции [49]. Также было показано, загрузка микроРНК в микровезикулы зависит от активности аннексина 2. Наиболее значимыми аннексин 2 сцепленными микроРНК, являются miR-16, miR-21, miR-24, miR-29a, miR-100, miR-125h, let-7a, let-7b. [50].

Биогенез эктосом в основном осуществляется путем скоординированных изменений в распределении фосфолипидов внутри плазматической мембраны, а также в сократительной способности компонентов цитоскелета [35]. Во время образования эктосом флоппаза, она же АТФ-связывающий кассетный транспортер1 (ABCA1), вызывает экзоплазматическую транслокацию фосфотидилсерина (PS), тем самым приводит к асимметричному распределению фосфолипидов между слоями в мембране, что, в свою очередь, приводит к структурному дисбалансу внутри плазматической мембраны [52–54] сигнальный каскад, который приводит к сокращению актин-миозиновой цепи, позволяя эктосомам отделяться от плазматической мембраны. В частности, связывание GTP ARF6 приводит к активации фосфолипазы D (PLD), которая способствует привлечению и активации на плазматической мембране внеклеточной киназы, регулируемой сигналом (ERK), которая впоследствии фосфорилирует киназу легких цепей миозина (MLCK). При активации MLCK фосфорилирует легкую цепь миозина, тем самым вызывая сокращение актин-миозинового комплекса [55].

Миграсомы. В 1963 году Тейлор и Роббинс [56] зарегистрировали ретракционные волокна у мигрирующих клеток с помощью оптического и просвечивающего электронного микроскопа. В течение длительного времени исследователи сосредоточились на соединении ретракционных волокон и клеточной мембраны, пренебрегая характеристиками самих ретракционных волокон. Только в 2015 году Ма и соавторами. впервые описали присутствие миграсом во внеклеточном матриксе (ВКМ), где они наблюдали секрецию мембраносвязанных структур овальной формы из мигрирующих клеток [34]. Это требует первоначального формирования ретракционных волокон, которые представляют собой длинные трубчатые выступы, богатые актиновыми нитями, которые в конечном итоге отделяются от заднего конца клеток во время миграции [56–58]. Впоследствии было показано, что биогенез миграсом происходит на концах или в местах разветвления ретракционных волокон через недавно выявленный клеточный процесс, известный как миграцитоз. Во время миграцитоза цитозоль и его содержимое перемещаются в просвет миграсом, и при отслоении ретракционных волокон миграсомы высвобождаются во внеклеточный матрикс [34,59]. Диаметр секретируемых миграсом составляет от 500 до 3000 нм, и, что интересно, в просвете миграсом находится множество везикул меньшего размера, которые выступают в виде открытых структур, похожих на гранат [34]. Из-за наличия просветных пузырьков миграсомы имеют тесную морфологическое сходство с мультивезикулярными тельцами (MVBs), которые представляют собой позднюю эндосомальную структуру, дающую начало эктосомам [34,60]. Однако экспрессия маркера MVBs, лизосомально-ассоциированного мембранного белка 1 (LAMP1), в миграсомах обычно отсутствует [34].

С момента открытия секреции миграсом клетками млекопитающих, полученных из различных источников, таких как нормальная почка крысы, эмбриональные фибробласты мыши, аденокарцинома человека, рак молочной железы человека и карцинома желудка человека, удалось показать, что процесс биогенеза зависит от полимеризации актиновых нитей, обогащения интегринами, а также образования микродоменов, содержащих кластеры холестерина и тетраспанинов (TSPANs), в частности TSPAN4. [34, 61, 62]. Миграсомы содержат

Таблица 2. Классификационные признаки эктосом

Наименование	Малые эктосомы	Микровезикулы
Категория	Small EV	От Small EV до Large EV
Размер	30-150 нм	150-1000 нм
Плотность	1.13-1.18 г/мл	1.14-1.20 г/мл
Мембрана	Липидный бислой	Липидный бислой
Биогенез	Эктосомальный тип	Эктосомальный тип
Маркеры	CD147, CD9	Аннексин A1, Аннексин A2, α -актинин 4
МикроРНК	Неизвестно	miR-16, miR-21, miR-24, miR-29a, miR-100, miR-125h, let-7a, let-7b

Таблица 3. Классификационные признаки миграсом

Наименование	Миграсомы
Категория	Крупные EVs
Размер	500–3000 нм
Плотность	Неизвестна
Мембрана	Липидный бислой
Биогенез	Экtosомальный путь. Отпочковывание от ретракционного волокна
Маркеры	TSPAN4, Интегрин альфа 5, Интегрин бета 1, NDST1, PIGK, CPQ, EOGT, поврежденные митохондрии
МикроРНК	miR-1303, miR-490-5p, miR-548a, miR-611, miR-661

большое количество N-ацетиллазы и N-сульфотрансферазы 1 (NDST1), фосфатидилинозитолгликановых якорей класса K (GPI-K), карбоксипептидазы Q (CPQ) и специфичный для домена EGF O-связанный N-ацетилглюкозамин трансфераз (EOGT) [62]. Ранее было показано, что NDST1 и CPQ вовлечены в миграцию клеток и инвазивность опухоли, тогда как GPI-K и EOGT вовлечены в клеточную адгезию и взаимодействие клетки с ECM, соответственно [63]. Хотя эти белки, наряду с TSPAN4, могут служить потенциальными маркерами миграсом, общие физиологические функции, а также точные процессы, участвующие в биогенезе миграсом, исследователям еще предстоит выяснить. [34,64].

В изолированных миграсомах были обнаружены высокие уровни miR-1303, miR-490-5p, miR-548a, miR-611 и miR-661 [65].

Крупные онкосомы. Термин “онкосомы” был впервые введен Янушем Раком и его коллегами в 2008 году в исследовании, описывающем опосредованную везикулами циркуляцию варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), онкогенной формы EGFR среди клеток глиомы [31]. Онкосомы представляют собой любой подтип EV, которые секретируются раковыми клетками и содержат онкогенный «груз» [32,33]. Они несут уникальные идентификаторы опухолевой клетки, из которой они происходят, в виде белков, липидов и нуклеиновых кислот. Они могут способствовать горизонтальному распространению онкогенов и связанного с ними трансформирующего фенотипа среди подмножеств раковых клеток. [31,33,66]. Точная роль этих циркулирующих переносчиков в микроокружении опухоли, метастазировании и возможности их использования в диагностических целях в настоящее время активно изучается. О крупных онкосомах сообщили в 2009 году ДиВизио и соавт., и они были описаны как необычно крупные EVs, секретируемые клетками рака предстательной железы при стимуляции активацией EGFR и сверхэкспрессии мембранонаправленного Akt1 [67]. Они имеют диаметр 1000-10 000 нм и образуются из мембранных пузырьков амебоидных опухолевых клеток [68,69]. Плавающая плотность крупных онкосом составляет 1,15 г/мл [70]. Следует отметить, что крупные онкосомы представляют собой специфический подтип EVs, секретируемых только амебоидными опухолевыми клетками, и отличаются от термина «онкосомы», который относится к любым EVs, несущим онкогенный груз. Сообщается, что крупные онкосомы обнаруживаются в опухолевых тканях и плазме у пациентов с запущенными формами рака, и предполагается, что их присутствие в крови может служить признаком метастазирования опухоли [68]. Таким образом, эти крупные онкосомы могут быть обнаружены в опухолевых тканях и плазме у пациентов с запущенными формами рака. Онкосомы содержат идентификаторы, состоящие из характерных РНК, микроРНК (miR-1227 и miR-125a), кавеолина-1, металлопротеиназ и фактора рибозилирования ADP 6 (ARF6) которые способствует метастазированию опухоли [68,69,71]. Этот груз способен вызывать изменения в микроокружении опухоли, индуцируя иммуно-инвазивные эффекты и повышая регуляцию проонкогенного фенотипа в клетках-реципиентах [72]. Кроме того, ферменты, участвующие в метаболических процессах, связанных с раком, такие как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), лактатдегидрогеназа В (LDHB), белок теплового шока 5 массой 70 кДа (HSPA5), малатдегидрогеназа (MDH) и глюкозо-6-фосфатизомераза (GPI) были в избытке идентифицированы в ходе протеомных исследований крупных онкосом [70,73,74].

В крупных онкосомах обнаруживаются около двух десятков различных miRNA. Особо отмечаются «онкогенные» микро-РНК miR-141, miR-375, miR-205, miR-1227, miR-1228 [72].

Фенотипический переход клеток от эпителиальной к мезенхимальной и амебоидной природе повышает пластичность клеток и был описан как способ миграции раковых клеток, ведущий к метастазированию. Более того, амебоидные раковые клетки демонстрируют везикулярную морфологию в результате активации GTPase RhoA или Rho-ассоциированной спиральной протеинкиназы (ROCK) [75]. Биогенез крупных онкосом был охарактеризован как выброс неапоптотических везикул из этих амебоидных клеток, что позволяет предположить, что амебоидные клетки могут использовать более одного механизма миграции и метастазирования [67]. Кроме того, обогащение ARF6 в микровезикулах мембранного происхождения, которое связано с отделением микровезикул от клеточной мембраны, может свидетельствовать о существовании дополнительных альтернативных путей, важных для биогенеза крупных онкосом [56,76].

В стромальных клетках наблюдалась интернализация крупных онкосом посредством фагоцитоза, который приводит к перепрограммированию фибробластов, стимулируя образование трубочек в эндотелиальных клетках и способствуя росту опухоли *in vivo* [77].

Таблица 4. Классификационные признаки крупных онкосом

Имя	Крупные онкосомы
Категория	Крупные EVs
Размер	1–10 мкм
Плотность	1.15 г/мл
Мембрана	Липидный бислой
Биогенез	Экзосомальный тип, Выброс неапоптотических везикул из этих амебоидных клеток?
Маркеры	ARF6, V-ATФаза G1, CK18, аннексин A1
МикроРНК	miR-141, miR-375, miR-205, miR-1227, miR-1228

EVs, вырабатываемые клетками в процессе жизнедеятельности. Эндосомальный тип биогенеза.

Экзосомы. Наиболее изученным типом малых EVs являются экзосомы. Термин «экзосома» был введен доктором Роуз Джонстон в стремлении понять биологический процесс, лежащий в основе трансформации ретикулоцита в зрелый эритроцит [23]. Доктор Джонстон заметил, что созревающие ретикулоциты содержат в своей цитоплазме большие полости, окруженные мембраной, заполненные маленькими везикулами, размером менее 120 нм, также окруженными мембраной. Плавающая плотность экзосом составляет 1,08–1,13 г/мл [78]. Было показано, что секреция этих мелких везикул является механизмом, с помощью которого удаляются молекулярные компоненты. Поскольку процесс секреции везикул был сродни обратному эндоцитозу, маленькие экстрадированные везикулы были названы «экзосомами» [79].

Методом просвечивающей электронной микроскопии было показано, что существуют две субпопуляции экзосом: малые экзосомы (Ехo-S) размером 60–80 нм и крупные экзосомы (Ехo-L) размером 90–120 нм. Вестерн-блоттинг анализ подтвердил наличие экзосомных маркеров Tsg101 и Alix для Ехo-S и Ехo-L. Измерение размеров частиц каждого типа, на ТЕМ изображениях, показали статистически достоверные различия [4]. Были показаны существенные различия между протеомами Ехo-S и Ехo-L. Ехo-S были обогащены Флотиллином 1, флотиллином 2, тетраспанином 14 и субъединицей ESCRT-I VPS37B. Напротив, в Ехo-L уровни таких белков, как аннексин A1/A4/A5, белок теплового шока Hsp40 и миозин IC были относительно выше. Можно предположить, что Ехo-S, скорее всего, являются каноническими экзосомами, тогда как Ехo-L могут представлять собой неканонические экзосомы или, вероятно, EVs другого субклеточного происхождения [4].

С момента их первоначального открытия вопрос о биогенезе экзосом был тщательно изучен. Экзосомы образуются внутри эндоплазматического мембранного компартмента, который получил наименование «эндосомы», где формируются внутрипросветные везикулы (ILVs). Эндосомы можно подразделить на три группы: ранние эндосомы, поздние эндосомы и рециркулирующие эндосомы. Ранние эндосомы сливаются с эндоцитарными пузырьками и включают свое содержимое в те, которые предназначены для рециркуляции, деградации или экзоцитоза. Эндосомы сортируются и направляются их к соответствующим местам назначения: лизосомам или клеточной мембране. При этом одни эндосомы нацелены на некоторые белки/липиды. Содержимое, предназначенное для вторичной переработки, сортируется в эндосомы, предназначенные для лизосомальной деградации, которые сливаются с лизосомами. Слияние с лизосомой приводит к разрушению содержимого поздней эндосомы.

Оставшиеся ранние эндосомы затем подвергаются ряду преобразований, превращаясь в поздние эндосомы. Во время этого преобразования содержимое, предназначенное для экспорта. Специфически сортируется в ILVs размером менее 150 нм, располагающиеся в просвете поздних эндосом. Учитывая наличие множества мелких везикул в этих поздних эндосомах, они также известны как многовезикулярные тела (MVB) [80]. Слияние с плазматической мембраной приводит к выделению везикул размером менее 150 нм во внеклеточное пространство. Эти выделяемые везикулы являются экзосомами.

Исследования, проведенные на перевиваемых клеточных культурах [81,82] показывают, что образование ILV требует двух различных процессов. Первый включает в себя организацию мембраны эндосом в специализированные ячейки, обогащенные классом мембранных белков, называемых тетраспанинами [83]. Эти специализированные участки мембранных белков называются микродоменами, обогащенными тетраспанином, или TEMs. Тетраспанины названы так потому, что состоят из четырех трансмембранных доменов, которые образуют стереотипную третичную структуру [84]. Последовательности, соединяющие четыре трансмембранных домена, изменчивы и определяют специфические белок-белковые взаимодействия. Считается, что TEMs группируют белки, необходимые для образования ILV, посредством этих межбелковых взаимодействий. Три тетраспанина, которые, как полагают, играют важную роль в формировании экзосом, включают CD9, CD63 и CD81. CD9 и CD63 служат наиболее часто используемыми идентификаторами экзосом и были предназначены для селективного выделения [85, 86].

Второй этап формирования ILV/экзосом включает в себя ряд комплексов, называемых эндосомальными сортировочными комплексами, необходимыми для транспортировки, или сокращенно ESCRTs. Для образования ILV необходимы четыре мультибелковых комплекса, которые называются ESCRT 0, I, II и III [87, 88]. Мембраны ранних эндосом характеризуются обилием фосфатидилинозитол-3-фосфата (PIP3). Присутствие PIP3, убиквитинированной нагрузки и изогнутая топология мембраны индуцируют рекрутинг ESCRT-I и ESCRT-II [89]. Активное участие в формировании экзосом и транспортировке в них белков принимает еще один белок – Синтенин 1 [90].

Таблица 5. Классификационные признаки экзосом

Наименование	Ехо-S	Ехо-L
Категория	Small EV	Small EV
Размер	60-80 нм	90-120 нм
Плотность	1.08-1.12 г/мл	1.08-1.12 г/мл
Мембрана	Липидный бислой	Липидный бислой
Биогенез	ESCART-зависимый путь	ESCART-зависимый путь
Маркеры	CD9, CD63, CD81, Флотиллином 1, 26, ESCRT-I, VPS37B	CD9, CD63, CD81, аннексин A1/A4/A5, HSP40, миозин IC
МикроРНК	Неизвестно	miR-142-3p, miR-150, miR-155, miR-223, miR-339, miR-451,

В транспортировке везикул, и высвобождении экзосом участвует семейство малых G-белков RAB. RAB участвуют во многих аспектах транспорта по эндоцитарному пути. RAB7 [91], RAB11 [92] и RAB35 [93] регулируют секрецию экзосом, а RAB27A и RAB27B участвуют в более поздних стадиях MVE-зависимого переноса ILV на поверхность клетки для высвобождения в виде экзосом [91,94,95]. Ингибирование нормальной функции этих RAB-белков снижает секрецию экзосом [95, 96].

Становится все более очевидным, что участки мембранного контакта между эндоплазматическим ретикуломом (ER) и эндосомами могут быть вовлечены в биогенез [97] и выбор содержимого экзосом [98]. Формирование места контакта ER с эндосомой зависит от RAB7 [97].

Неизвестный тип биогенеза.

Экзоферы. Экзоферы – это тип мембраносвязанных внеклеточных везикул (EVs), которые высвобождаются при отпочковывании из клеток во внеклеточное пространство. Экзоферы могут выделяться нейронами нематоды *Caenorhabditis elegans* [99], а также мышцами [100], и кардиомиоцитами мышей [101]. Экзоферы отличаются своими большими размерами, (средний диаметр $3,5 \pm 0,1$ мкм; средний объем $31,0 \pm 2,5$ мкм) и способны выводить из клеток в качестве груза целые органеллы, такие как митохондрии и лизосомы [99]. В отличие от крупных онкосом [102], экзоферы продуцируются физиологически нормальными, клетками

Считается, что выработка экзоферов является механизмом, который клетки используют для сохранения гомеостаза. Экзоферы вырабатываются в ответ на многочисленные стрессовые факторы, включая агрегацию внутриклеточных белков, активные формы кислорода (АФК), [99] высокую температуру, осмотическую инертность, голодание [103]. Было показано, что многие митохондриальные белки экзоферах не функциональны [104]. Кроме того, было доказано отсутствие в экзоферах фрагментов ядра. Таким образом, эти данные выявили преимущественную, но не исключительную экструдицию митохондрий в экзоферы для выделения из здоровых кардиомиоцитов [101].

Молекулярный механизм биогенеза экзоферов до настоящего времени не описан. Известно только, что выработка экзоферов запускается сигналами от внеклеточных рецепторов. Существует два сигнальных пути участвующих в выработке экзоферов у нематод: активация митоген-активируемой протеинкиназы MAPK, и запуск сигналов через эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста фибробластов (FGF), [103]. Также известно, что внеклеточный сигнальный рецептор MERTK, экспрессируемый макрофагами, в сердце, необходим для выведения экзоферов из сердечной ткани мыши путем фагоцитоза [101].

Экзоферы могут быть связаны с заболеваниями. В сердце мыши уничтожение макрофагов или блокирование их способности поглощать экзоферы приводит к воспалению и нарушению регуляции желудочков [101]. При нейродегенеративных заболеваниях экзоферы могут также способствовать распространению патологических прионных белков, включая человеческий поли-Q-расширенный хантингтин, [99]. Экзофер изначально может оставаться прикрепленным к клетке, которая его произвела, с помощью мембранной нити, напоминающей туннельную нанотрубку [105–107].

NVEPs, вырабатываемые клетками в процессе жизнедеятельности.

Биогенез липопротеинов.

Липопротеины. Липопротеины состоят из различных типов липидов и белков. Они накапливаются в кишечнике и печени и являются основным средством транспортировки липидов в водной среде плазмы. Основная структура липопротеинов состоит из двухслойной мембраны, охватывающей почти сферическое ядро [108]. Гидрофильные компоненты, такие как холестерин, фосфолипиды и белки, включая аполипопротеины, являются частью мембраны, а гидрофобный эфир холестерина и триглицериды (ТГ) составляют ядро. Аполипопротеины выполняют различные функции. Они могут действовать как лиганд для рецепторов в клетках-мишенях или как кофактор для активации или ингибирования различных ферментов.

Существует пять основных типов липопротеинов: хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Размер частицы находится в обратной зависимости от ее плотности. ЛПВП – это самая маленькая частица, а хиломикроны и ЛПОНП – самые крупные.

Таблица 6. Классификационные признаки экзоферов

Наименование	Экзоферы
Категория	Крупные EVs
Размер	3,5–4 мкм
Плотность	Неизвестно
Мембрана	Липидный бислой
Биогенез	Неизвестно, связано с аутофагией?
Маркеры	Хантингтин, тау-белок, LC3, аннексин V (фосфатидилсерин), поврежденные митохондрии.
МикроРНК	Неизвестно

Семейство липопротеинов низкой плотности.

Хиломикроны – это частицы сферической формы диаметром от 80 нм до 500 нм и плавучей плотностью менее 0.95 г/мл. Хиломикроны накапливаются в эпителии кишечника. Абсорбированные жирные кислоты переэтерифицируются с образованием триглицеридов и добавляются к ApoB48 для образования хиломикронов [109]. Эти триглицериды, наряду с фосфолипидами и холестерином, добавляются к аполипопротеину ApoB48 для образования незрелых хиломикронов или предхиломикронов [110]. ApoB48 образуется из ApoB100 с помощью ферментативного комплекса для редактирования ApoB48 (ApoBec). ApoB48 содержит первые 48% аминокислот, входящих в состав ApoB100, и вырабатывается только в кишечнике. После синтеза в эпителии гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭР) зародышевые хиломикроны транспортируются в аппарат Гольджи белками SAR1B [111]. Транспортировке предхиломикронов по секреторному пути способствуют белковые транспортные везикулы (PCTV). PCTV уникально оснащены белками v-SNARE и VAMP-7, которые способствуют их слиянию с цис-компарментом Гольджи. Этому транспорту способствуют белки COPII, включая Sec23/24, которые отбирают груз и способствуют отделению пузырьков от мембраны ER [112]. Во время прохождения через систему Гольджи предхиломикроны подвергаются ферментативной модификации и липидизации, что приводит к образованию зрелых хиломикронов. Зрелые хиломикроны высвобождаются через базолатеральную мембрану энтероцитов в лимфатические капилляры в ворсинках тонкой кишки [113]. Лимфатическая система циркуляции переносит хиломикроны по лимфатическим протокам, а затем по подключичным венам хиломикроны поступают в венозную систему общего кровообращения [114]. Циркулируя в крови, липопротеины высокой плотности (ЛПВП) передают в хиломикроны важные компоненты, включая аполипопротеин C (ApoC2) и аполипопротеин E (ApoE). Причем, аполипопротеин ApoC-II, присутствующий в основном в хиломикронах и ЛПОНП, активирует ЛПНП, а аполипопротеин – ApoC-III, подавляет их активность.

Остатки хиломикронов. Как только запасы ТГ в хиломикронах уменьшаются, они возвращают ApoC2 в ЛПВП, сохраняя при этом ApoE, превращаясь в остатки хиломикронов. ApoB48 и ApoE важны для определения остатков хиломикронов в печени, а также для эндоцитоза и распада. Остатки хиломикронов также имеют сферическую форму. Их размеры составляют менее 50 нм, а плавучая плотность менее 1.006 г/л.

Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – тип липопротеинов, вырабатываемых печенью [115]. ЛПОНП – это одна из основных групп липопротеинов, которые позволяют жирам и холестерину перемещаться в кровотоке в виде раствора на водной основе. ЛПОНП образуются в печени из триглицеридов, холестерина и аполипопротеидов. В крови ЛПОНП преобразуются в липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) и липопротеиды промежуточной плотности (ЛППП). Частицы ЛПОНП имеют диаметр 30-80 нм и плавучую плотность 1.006 г/мл [110]. ЛПОНП транспортируют эндогенные продукты, в то время как хиломикроны транспортируют экзогенные продукты. В начале 2010-х годов были очень подробно охарактеризованы как липидный состав [116], так и белковый состав [117] этого липопротеина.

Биогенез ЛПОНП начинается с синтеза аполипопротеина В (ApoB). ApoB100 один из крупнейших белков человека (4536 аминокислот, молекулярная масса 514 кДа), ApoB48 содержит первые 48% аминокислот, входящих в состав ApoB100.[118]. ApoB100 – это основной белок непрерывно вырабатывается и насыщается липидами в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Затем он транспортируется в комплекс Гольджи, где попадают специальные транспортные везикулы (VTV) ЛПОНП. После прохождения через комплекс Гольджи ЛПОНП секретируются в кровоток. Печень играет важную роль в усвоении остатков ЛПОНП или ЛПНП, образующиеся в результате липолиза в периферических тканях. Когда нарушается надлежащее сворачивание ApoB или когда липидизация недостаточна, ApoB подвергается убиквитинилированию с последующей протеасомальной деградацией, чему способствуют белки ассоциированной деградации (ERAD), локализованные в ER. Кроме того, многие белки участвуют в поставке дополнительных липидов, которые могут образовываться как в результате использования липидных капель, так и в результате липогенеза de novo в мембране ER. Необходимые условия для того, чтобы ЛПОНП покидали ER для последующей транспортировки в систему Гольджи, включают обогащение ER фосфолипидами, обеспечивающее образование везикул, а также привлечение транспортных белков для формирования транспортных везикул ЛПОНП (VTV). После стыковки VTV с Cis-Golgi (медиальными цистернами, расположенными ближе всего к эндоплазматическому ретикулуму), ЛПОНП подвергается сортировке, гликозилированию и дополнительному/окончательному липидированию. Известно, что SORTILIN1 регулирует секрецию ЛПОНП, перенаправляя некоторые частицы на аутолизосомальную деградацию [118].

Для канонической транспортировки грузов из ER в комплекс Гольджи клетки используют VTV покровного белкового комплекса II (COPII), размер которых, по оценкам, составляет около 50 нм у клеток [119]. Для

транспортировки более крупных белковых грузов, таких как проколлаген I (300–400 нм) [120], требуются более крупные везикулы. ЛПОНП обычно имеют диаметр от 30 до 70 нм, но могут иметь диаметр до 120 нм [121].

Липопротеины промежуточной плотности (ЛППП) относятся к семейству липопротеиновых частиц и образуются в результате распада липопротеинов очень низкой плотности. ЛППП – это одна из пяти основных групп липопротеидов (хиломикроны, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП), которые позволяют жирам и холестерину перемещаться в кровотоке в виде раствора на водной основе. Каждая нативная частица IDL состоит из аполипопротеина ApoB100, который окружают различные липиды, позволяя этим липидам, как водорастворимым частицам, перемещаться в водной среде крови как части системы транспортировки жира в организме. Их размер, как правило, составляет от 25 до 35 нм в диаметре, и плавучей плотностью 1,006 – 1,019 г/мл [110]. Они содержат в основном ряд триглицеридов и сложных эфиров холестерина. Они выводятся из плазмы крови в печень путем рецептор-опосредованного эндоцитоза или расщепляются печеночной липазой с образованием частиц ЛПНП.

В целом, ЛППП, в чем-то похожи на липопротеины низкой плотности (ЛПНП). Они, подобно ЛПНП, транспортируют различные триглицериды и холестерин. Триглицериды, содержащиеся в ЛПОНП, удаляются из капилляров ферментом липопротеинлипазой (LPL), а затем ЛПОНП возвращаются в кровоток в виде частиц меньшего размера с новым названием – липопротеины промежуточной плотности (ЛППП). Частицы ЛППП теряют большую часть своих триглицеридов, но сохраняют сложные эфиры холестерина. Некоторые частицы ЛППП быстро усваиваются печенью; другие остаются в крови, где подвергаются дальнейшему гидролизу триглицеридов печеночной липазой и превращаются в ЛПНП. Отличительной особенностью частиц ЛППП является то, что они содержат множество копий рецепторного лиганда ApoE в дополнение к единственной копии ApoB-100. Множественные копии ApoE позволяют ЛППП связываться с рецептором ЛПНП с очень высокой аффинностью. Когда ЛППП преобразуется в ЛПНП, ApoE покидает частицу и остается только ApoB-100. После этого сродство к рецептору ЛПНП значительно снижается [122].

Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) Частицы ЛПНП образуются, когда триглицериды удаляются из ЛПОНП ферментом липопротеинлипазой (LPL), и они становятся меньше и плотнее. Частицы имеют размер от 18 нм до 25 нм и плавучую плотность от 1.019 до 1.063 г/мл [108]. Частица ЛПНП состоит из монослоя фосфолипидов, незэтерифицированный холестерин образует поверхностную мембрану, а сложные эфиры жирных кислот холестерина образуют гидрофобное ядро. Одна макромолекула гидрофобного белка Apo-B100 встроена в мембрану, опосредуя связывание частиц ЛПНП со специфическими рецепторами на клеточной поверхности. [123].

Липопротеины высокой плотности. Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) – это небольшие, плотные, богатые белком липопротеины со средним размером 5–12 нм и плотностью 1,063–1,21 г/мл [124]. Частицы ЛПВП представляют собой многомoleкулярные, квазисферические или дисковидные псевдомиецеллярные комплексы, состоящие преимущественно из полярных липидов, солюбилизованных аполипопротеидами. Основной мажорный липопротеин в составе ЛПВП – аполипопротеин А (ApoA). Кроме ApoA в составе ЛПВП могут содержаться ApoC и ApoE [125]. ЛПВП также содержат множество других белков, включая ферменты и белки острой фазы, и могут содержать небольшое количество неполярных липидов. Кроме того, ЛПВП часто присутствуют в нескольких изоформах. Изоформы были впервые описаны в начале 1950-х годов [126]. Были выделены два подкласса ЛПВП: менее плотная (1,063–1,125 г/мл), относительно богатая липидами форма, была классифицирована как ЛПВП2, и более плотная (1,125–1,21 г/мл), относительно богатая белком форма ЛПВП3. ЛПВП2 и ЛПВП3 могут быть дополнительно разделены на отдельные подклассы [127]. Были идентифицированы два подкласса ЛПВП2 и три подкласса ЛПВП3, размер частиц: ЛПВП3с, диаметр 7,2–7,8 нм; ЛПВП3b, 7,8–8,2 нм; ЛПВП3а, 8,2–8,8 нм; ЛПВП2а, 8,8 нм – 9,7 нм; и ЛПВПb – 9,7–12,0 нм.

Липопротеины высокой плотности вырабатываются энтероцитами стенок тонкого кишечника. На начальном этапе биогенеза аполипопротеин ApoA-I связывается на поверхности мембраны с дополнительным белком(ами) а затем с АТФ-связывающим кассетным транспортером (ABCA1), который обеспечивает сборку и экстракцию частиц ЛПВП. Если липиды и ApoA-I малодоступны, то в межклеточное пространство высвобождается прото ЛПВП с низким содержанием липидов диаметром менее 6 нм. Если к полученной частице прото ЛПВП на мембране добавить второй ApoA-I, то вновь образованный комплекс 2-ApoA-I/ABCA1 может содержать небольшое количество липидов. Этот комплекс либо высвобождается в виде ЛПВП диаметром 7,5 нм, либо к нему добавляется третья молекула ApoA-I. На этом этапе он может связывать больше липидов для высвобождения полноценной ЛПВП частицы диаметром от 9 до 11 нм [128].

NVEPs, вырабатываемые клетками в процессе жизнедеятельности.

Неизвестный тип биогенеза.

Экзомы. Экзомы представляют собой экстраклеточные частицы диаметром менее 50 нм. Впервые они были выявлены методом асимметричного фракционирования в поле потока (AF4). Средний размер частиц составлял $26 \pm 9,7$ нм. [4]. Плавучая плотность частиц составляла 1,21 г/мл [129]. Методом просвечивающей электронной микроскопии было показано, что у данного типа частиц отсутствует бислоевая мембрана. Экзомы сильно обогащены белками, липидами и нуклеиновыми кислотами [4]. Кроме того, авторам удалось доказать, что при культивировании клеток на питательной среде экзомы выводятся в среду и, следовательно, являются продуктом жизнедеятельности клеток. Молекулярные механизмы биогенеза экзосом до сих пор неизвестны [36].

Таблица 7. Классификационные признаки липопротеинов

Наименование	Хиломикроны	Осколки хиломикронов	ЛПОНП
Категория	NEVP, Крупные липопротеины	NEVP, Крупные липопротеины	NEVP, липопротеины
Размер	80-500 нм	> 500 нм	30 -80 нм
Плотность	<0,95 г/мл	0,95 – 1,006 г/мл	<1,006 г/мл
Мембрана	Липидный монослой	Липидный монослой	Липидный монослой
Биогенез	Сборка в комплексе Гольджи в энтероцитах путем липидизации ApoB48	Делипидизация хиломикронов	Делипидизация осколков хиломикронов
Маркеры	ApoA-I, Apo A-II, ApoA-IV, Apo B48, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE	ApoB48, Apo E	ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE
МикроРНК	Неизвестно	Неизвестно	Неизвестно
Наименование	ЛПВП	ЛПНП	ЛПВП
Категория	NEVP, липопротеины	NEVP, липопротеины	NEVP, липопротеины
Размер	25-35 нм	18-28 нм	5-12 нм
Плотность	1,006 – 1,019 г/мл	1,019 – 1,063 г/мл	1,063 – 1,21 г/мл
Мембрана	Липидный монослой	Липидный монослой	Липидный монослой
Биогенез	Делипидизация ЛПОНП	Делипидизация ЛПВП	Сборка в энтероцитах с помощью транспортера ABCA1
Маркеры	ApoB100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE	ApoB100	ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, Apo C-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoD
МикроРНК	Неизвестно	Неизвестно	miR-22, miR-105 и miR-106a

В зависимости от клеточной культуры – продуцента в экзосомах было идентифицировано от 165 до 483 белков, из них от 28 до 107 уникальных. [4], что позволяет предположить, что экзосомы являются уникальными образованиями, высвобождаемыми клеткой, а не обломки или фрагменты экзосом. В отличие от экзосом, в экзосомах содержалось существенно меньше мембранно-связанных белков. Экзосомы были значительно обогащены белками, участвующие в метаболизме, и ключевыми белками, контролирующими процессинг гликанов. Среди стандартных экзосомных маркеров, включая CD9, CD63, CD81, Alix1, Tsg101, HSC70 (HSPA8) в экзосомах обнаружены CD9, CD63, CD81. Белок HSP90AB1 был преимущественно связан с экзосомами, в то время как представители HSP70 (HSPA8, HSPA2 и HSPA5) были более распространены в экзосомах [4]. В экзосомах отсутствуют белки характерные для липопротеинов. Более того, анализ данных ПЭМ показал, что морфология/структура липопротеинов четко отличается от экзосом. Эти данные исключают возможность того, что экзосомы были просто липопротеиновыми загрязнителями. В целом сравнительный протеомный анализ показал, что белки экзосом в основном ассоциируются с метаболизмом, а экзосом-ассоциированные белки с многочисленными путями передачи сигналов и белки комплекса ESCRT, связанные с биогенезом экзосом.

Липидный состав экзосом оказался существенно (в среднем в 5 раз) беднее чем экзосом. В экзосомах преобладают диacyлиды и триacyлиды. Кроме того, в экзосомах более распространены простой гликофинголипид CerG2 и специфичный для митохондрий кардиолипид (CL), фосфатидилглицерин (PG) и лизофосфатидилхолин. (LPC) [4]. Наши исследования показали, что экзосомы в основном содержат неэстерифицированный холестерин, тогда как в экзосомах преобладают эфиры холестерина. Было показано, что экскреция экзосом в кондиционированную среду с добавлением ингибитора всасывания холестерина – эзетимиба после культивирования в ней клеток A172 уменьшается, а в среде с добавлением инсулина – активатора синтеза предшественника холестерина – мевалоната, увеличивается. Кроме того, была установлена корреляция между концентрацией холестерина в плазме крови у людей и относительной концентрацией экзосом в тех же образцах. Причем, тангенс угла наклона кривой регрессии имеет перегиб в области значений концентрации холестерина 5.5 –5.9 мМ/л. Эти данные свидетельствуют о том, что экзосомы могут принимать участие в процессе выведения из клеток излишков холестерина.

В экзосомах присутствуют и нуклеиновые кислоты. В незначительных количествах в них обнаруживаются фрагменты ДНК размером от 100 п. о. до 10000 п. о., Рибосомальная РНК (18S и 28S РНК) полностью отсутствовала в экзосомах. Что касается микроРНК то в экзосомах была обнаружена miRNA размером 400–500 нуклеотидов [4].

Таблица 8. Классификационные признаки экзосом

Название	Экзосомы
Категория	NVEP
Размер	28-50 нм
Плотность	1.21 г/мл
Мембрана	Нет
Биогенез	Неизвестен
Маркеры	FASN, ACLY HSP90
МикроРНК	small exRNAs, miRNAs?

Супермеры. Самым новым представителем семейства NVEPs являются супермеры. Супермеры получили свое название, так как были обнаружены в надосадочной жидкости, оставшейся после выделения осадка экзосомы [5-7]. Однако экзосомы осаждаются путем центрифугирования при 100 000g, их последующему фракционированию методом AF4 [4] или прямым центрифугированием при 167 000g [130,131], тогда как супермеры были выделены центрифугированием при 367 000g [5]; таким образом, на данном этапе нельзя исключать, что экзосомы и супермеры были выделены из большей перекрывающейся популяции внеклеточных частиц. Образцы NVEPs разделяются с использованием центрифугирования на различных скоростях.

Как экзосомы, так и супермеры, по-видимому, широко экскретируются многими типами клеток человека и мыши и были обнаружены у человека в плазме крови [4,5,132]. Супермеры содержат много белков, ранее регистрируемых в экзосомах, иных видах EVs и экзосом. Это следует из нескольких недавних публикаций, в которых утверждается, что многие из белков, которые, как предполагалось, содержатся в экзосомах, вместо этого связаны с иными EVs или секретируются в составе NVEPs, и что экзосомы содержат множество белков ранее связываемых с EVs [1,130,133,134].

Таким образом, у нас остается, по крайней мере, две возможности: либо клетки могут секретировать специфические белки с помощью различных типов EVs и NVEPs одновременно, либо методами выделения, которые использовались до последнего времени невозможно эффективно разделить несопоставимые типы EVs и NVEPs. Однако эти две возможности не являются взаимоисключающими.

Хотя полноценные трансмембранные белки в супермерах обнаружены не были, поразительным открытием стало присутствие продуктов расщепления эктодоменов APP, глипикана 1, MET, амфирегулина и EGFR [5]. Учитывая, что супермеры не содержат мембран, отсутствие встроенных полноразмерных мембранных белков неудивительно. Интересно, что в супермерах присутствуют полноценные версии некоторых GPI-связанных белков отвызанных от мембран, включая glypican 1 и CEACAM5, в то время как другие GPI-связанные белки, включая дипептидазу 1 (DPEP1) и эктонуклеотидазу CD73, по-видимому, присутствуют в EVs в заякоренной форме [5].

Удивительно, но супермеры могут быть более важным источником малых РНК, чем EVs, и экзосомы [5]. И наоборот, пока неизвестно, являются ли супермеры источником больших РНК. Супермеры также содержат большое количество YRNA и малых ядерных РНК (snRNA), и, подобно экзосомам, большинство малых exRNA являются микроРНК [5]. Возможно, неудивительно, что супермеры обогащены РНК-связывающими белками, которые несут микроРНК, включая AGO1, AGO2, hnRNPA2B1 и экспортин 5 [5]. Было показано, что эти РНК-связывающие белки находятся в экзосомах и других NVEP. [1,5,135].

В настоящее время биогенез супермеров (или экзосом) неизвестен. Образуются ли они внутри клетки или они самостоятельно собираются после выхода из клетки? Маловероятно, что они образуются в результате гибели клеток, поскольку супермеры обнаруживаются в кондиционированной среде после культивирования в ней клеток с жизнеспособностью более 95%. Если бы супермеры образовывались из поврежденных EVs, то можно было бы ожидать, что они будут содержать полноразмерные трансмембранные белки, характерные для EVs, но это не так. Если супермеры представляют собой содержимое внутренней полости поврежденных EVs, то в них должна присутствовать фрагментированная мембрана EVs, а в отдельных образцах должны присутствовать фрагменты, содержащие полноразмерные белки, но тоже это не так. Маловероятно также, что супермеры образуются в результате агрегации при очистке на основе ультрацентрифугирования. Разделение по размерам с помощью быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) кондиционированной среды, не подвергавшейся ультрацентрифугированию, привело к появлению пиков, идентичные тем, которые наблюдались, когда супермеры, были получены с помощью ультрацентрифугирования, с последующим разделением с помощью FPLC [K. Vickers, unpublished]. Компоненты и характеристики супермеров могут служить ключом к разгадке их биогенеза. Предполагается, что супермеры могут возникать в результате реакции на стресс, которая является адаптивной и активирована в раковых клетках и/или в качестве механизма выживания нормальных клеток. Данные о сходстве состава супермеров [5,7] и экзосом [5,130,133], приведенные выше, позволяет предположить, что любые процессы, вызывающие их образование, являются общими и предсказуемыми.

Таблица 9. Классификационные признаки супермеров

Наименование	Супермеры
Категория	NVEP
Размер	19-22 нм
Плотность	1.21 г/мл
Мембрана	Нет
Биогенез	Неизвестен
Маркеры	TGFBI, HSPA13, ENO2
МикроРНК	miR-126, miR-1246

Ваулт-частицы. Открытие ваулт-частиц (Vault) в 1986 году было случайным событием, поскольку эти структуры яйцевидной формы были впервые обнаружены как примеси везикул, покрытых клатрином, извлеченных из печени крысы. Везикулы были изучены методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) [38]. Полагая, что они могут быть связаны с везикулами, покрытыми оболочкой, частицы были очищены до однородности и проанализированы более подробно [136]. Эти исследования привели к открытию уникального рибонуклеопротеина – самого крупного из известных РНП частиц эукариотической клетки. Название ваулт было выбрано для описания характерной множественной арочной морфологии частиц, напоминающей сводчатые потолки готических соборов (Vault – с англ. свод).

Ваулт-частица представляет собой эукариотический рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из 78 отдельных белков «основного сводчатого белка» (MVP) с молекулярной массой 97 кДа, которые образуют веретенообразную структуру. Линейный размер веретена составляет 72,5 нм, диаметр 41 нм. «Веретено» имеет внутреннюю полость, в которой содержится поли(АДФ-рибозная) полимеразы (vPARP) [137], ассоциированный с теломеразой белок-1 (TERP1) [138] и несколько небольших нетранслируемых РНК [139,140].

Оболочка образована двумя симметричными чашеобразными половинками, состоящими из 39 копий MVP, каждая половинка которых имеет выпуклую верхушку и образует расширяющийся поясок там, где они соприкасаются друг с другом. N-образный и С-образный концы MVP расположены на талии и крышках соответственно [141], причем первый находится внутри полости свода, а второй обращен наружу. От N-конца до С-конца каждый мономер MVP представляет собой: основную область, содержащую девять антипараллельных доменов-повторов (R1–R9); плечевую область, состоящую из одного домена, образованного четырьмя спиралями и -листами; домен типа "колпачок-спираль" из 155 остатков; домен типа "колпачок-кольцо" [142,143]. В целом молекулярная масса наночастицы составляет около 13 МДа,

Основная особенность ваулт-частицы – это способ ее сборки, поскольку было показано, что биосинтез и сборка субъединиц MVP происходят последовательно на уровне полирибосом, которые, следовательно, действуют подобно трехмерному нанопринтеру [144]. Также стоит упомянуть о динамической природе ваулт-частиц, поскольку они могут обмениваться отдельными субъединицами MVP *in vivo*, а также разделяться на части и собираться заново, восстанавливая частицу целиком. Так они могут доставлять молекулы, хранящиеся у них внутри, или поглощать молекулы из среды, что может иметь отношение к их физиологическим функциям [145].

Теломеразы – это белки, состоящие из нескольких субъединиц, которые также содержат молекулы РНК, используемые в качестве матрицы для поддержания длины теломер за счет их обратной транскриптазной активности. TERP1 – это белок массой 240 кДа, В ваулт-частицах TERP1 связывается со специфическими молекулами РНК, ассоциированными с ваулт-ассоциированной РНК (vtRNAs) [146]. С помощью крио-ЭМ было подтверждено, что TERP1, также как и vtRNA, связывают внутреннюю часть ваулт-частиц на уровне их крышек. Предположительно TERP1 связывает, более одной молекулы MVP [147]. С каждой Ваулт-частицей связывается 2-4 копии TERP1 [148].

Подобно второстепенным vault-белкам, vtRNA в значительной степени не связаны с ваулт-частицами, связанная фракция составляет около 5% от общей массы ваулт-частиц, что позволяет предположить, что основная масса vtRNA в клетке участвует в различных клеточных взаимодействиях [139].

Большое количество работ посвящено роли Ваулт-частиц во внутриклеточных процессах. Однако, этот вопрос требует отдельного описания и лежит вне поля нашего обзора. Здесь укажем только, что ваулт-частицы накапливались в цитоплазматических везикулах, которые затем удалялись из клеток. рака молочной железы [149]. Предполагается, что внеклеточная секреция везикул может представлять собой путь выведения лекарств, опосредованный ваулт-частицами. Кроме того, было высказано предположение, этот процесс также может быть осуществлен путем передачи лекарств от ваулт-частиц к АВС-транспортерам [150, 151] (специальных транспортных систем клеток, использующих энергию связывания и гидролиза АТФ для переноса различных субстратов через клеточные мембраны), что обеспечивает устойчивость клеток к фармпрепаратам.

Таблица 10. Классификационные признаки ваулт-частиц

Наименование	Ваулт-частицы
Категория	NVEP
Размер	72 nm x 41 nm x 41 nm
Плотность	Неизвестно
Мембрана	Нет. Белковый капсид
Биогенез	Неизвестен. Внутриклеточный синтез?
Маркеры	MVP, vPARP, TEP1
МикроРНК	Специализированные vtRNA

Супрамолекулярные атакующие частицы (SMAP). Специализированные клетки могут выделять определенные типы внеклеточных NVEPs, как в случае с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), которые выделяют супрамолекулярные атакующие частицы (SMAP) для уничтожения клеток-мишеней [38]. SMAP представляют собой частицы размером 120 нм, имеющие ядро из цитотоксических белков, включая перфорин 1 (Prf1) и гранзим В (Gzmb), окруженное оболочкой из тромбоспондина 1 (TSP-1) [39]. Prf1 образует поры в плазматической мембране клеток-мишеней, которые опосредуют проникновение гранзимов, таких как гранзим В (Gzmb), в цитоплазму клеток-мишеней. Gzmb инициирует множество путей, ведущих к гибели клеток-мишеней [152]. В CTL Gzmb и Prf1 хранятся внутри секреторных лизосом (SLs) в конденсатах с серглицином (Srgn) [153]. Имеются сообщения о том, что Prf1 и Gzmb могут выделяться в виде частиц [154]. Было показано, что SMAP находятся в многоядерных гранулах и выводятся во второй волне целенаправленного уничтожения клеток, которая следует за высвобождением цитотоксических белков упакованных в одноядерные гранулы [155]. После высвобождения из ЦТЛ SMAP стабильны и могут самостоятельно уничтожать клетки [39].

Методом масс-спектрометрии, было идентифицировано более 285 белков, которые постоянно присутствовали в SMAP. Из них 18 были уникальными для SMAP. Среди них были идентифицированы Prf1 и Gzmb, TSP-1, LFA-1 и ряд белков, участвующих в передаче сигналов клетками (цитокины и хемокины). Было доказано, что SMAP были предварительно сформированы и сохранены в SLs. Методом прямой стохастической оптической восстановительной микроскопии (dSTORM) было показано, SMAP имеет сферическую оболочку из гликопротеинов [156] со средним диаметром 120 ± 43 нм, которая включает TSP-1 Prf1- и Gzmb также частично локализованы в оболочке. В полости обнаруживается основная масса Prf1- и Gzmb и Srgn [39].

Предполагается, SMAPs действуют как автономные смертоносные объекты с прицеливанием с помощью TSP-1 и, возможно, других компонентов оболочки. Способность SMAP самостоятельно уничтожать клетки-мишени может стать важной в ситуациях кратковременных и множественных взаимодействий, но тогда доставка может быть менее точной. SMAP могут обладать другими механизмами действия, включая химиоаттракцию с помощью CCL5 и иммунную модуляцию с помощью IFN γ . С-конец TSP-1 содержит сайт связывания с вездесущим сигналом “не ешь меня” CD47 [157]. Таким образом, SMAPs могут взаимодействовать с миелоидными клетками, гарантируя, что любая клетка, которая не может быть уничтожена SMAPs, будет уничтожена фагоцитозом [158].

EVs, вырабатываемые клетками в процессе программируемой гибели.

Фрагментация клеток, Эктосомный тип биогенеза.

Апоптотические тела и Апоптотические везикулы. Образование апоптотических частиц (APs) является важным процессом, происходящим в процессе программируемой гибели клеток, которое считается признаком апоптоза. Впервые апоптотические тела были описаны 1998 г.в [159]. Авторы показали, что в заключительной фазе апоптотической гибели клетка делится на различное количество APs.

ABs имеют размер от 1000 до 5000 нм. Апоптотические везикулы (AVs) можно разделить на крупные апоптотические везикулы – lAVs (~500-1000 нм) и малые апоптотические везикулы – sAVs (<500 нм) [1,160-162]. Плавающая плотность APs колеблется в диапазоне от 1.12 до 1.23 г/мл, что, по-видимому, обусловлено различной природой ABs и AEVs [163]. Апоптотические тела APs заметно мельче, чем интактные клетки, что облегчает их поглощение и удаление фагоцитами.

Таблица 11. Классификационные признаки SMAP

Имя	SMAP
Категория	NVEP
Размер	120 нм
Плотность	Неизвестно
Мембрана	Нет Оболочка монослой из гликопротеинов
Биогенез	Неизвестен. Секреторные гранулы?
Маркеры	Gzmb, Prf1 и Srgn
МикроРНК	Неизвестно

Различие между ABs и IAEVs основанное на размере, несколько условно. Характеристическими признаками ABs является наличие внутри митохондрий, нуклеосом, гистонов, ДНК и ядерных белков и фрагментов эндоплазматического ретикулума [162,164,165].

Высвобождаемые AVs значительно отличаются друг от друга. Кроме того, отмечается, что молекулярное содержимое IAVs и sAVs различается в зависимости от размера [164,166]. Протеомный анализ образцов APs позволил идентифицировать 4365 различных белков. Из них 1474 оказались уникальными для AVs. Функциональный анализ путей KEGG показал, что повышенная регуляция белков связана с процессами транспорта, катаболизма, и роста и гибели клеток. Эти результаты свидетельствуют о том, что APs были обогащены многочисленными функциональными белками, связанными с поведением клеток, клеточным метаболизмом и клеточным транспортом. Примечательно, что у APs значительно повышена активность множества жизненно важных апоптотических белков, и они были отмечены как маркеры апоптоза, подтверждающие идентичность APs. Молекулы CD, семейства интегринов и синтаксинов были обнаружены в категории трансмембранных или GPI-заякоренных белков связанные с плазматической мембраной и/или эндосомы; семейства белков Rab, Rho и семейства кавеолинов были обнаружены в категории цитозольных белков, регистрируемых в EVs; несколько белков были обнаружены в категории рибосомальных белков; ядерный белок (ламин B1), митохондриальные белки (семейство VDAC) и белки эндоплазматического ретикулума (ER) (калнексин и калретикулин) были обнаружены в категории трансмембранных, связанных с липидами и растворимых белков, связанных с внутриклеточными компартментами, отличными от эндосом. Кроме того, Fas, Sod1 и семейство каспаз присутствовали в качестве маркеров апоптоза. Полученные результаты позволили выделить 13 кандидатов на роль маркеров апоптоза для AVs: CD44, Integrin-alpha 5, Syntaxin-4, RhoA, Calvin 1, Calviolin 1, Fas, Rab-5C, Calnexin, Calveticulin, RPS 25, Lamin B1 и VDAC 2, причем первые 7 являются мембранно-связанными белками, а остальные локализованы в полости везикулы [163].

Как отмечалось выше ABs несут в себе большое количество клеточных фрагментов, содержащих нуклеиновые кислоты. Микротрубочки обеспечивают сокращение ядер во время апоптоза [167], а опосредованное каспазой расщепление ядерных ламин позволяет активировать актомиозин, что приводит к ядерному распаду и перемещению фрагментов ядра и ДНК в апоптотические везикулы, некоторые из которых становятся ABs [168]. ABs содержат также межнуклеосомные гистоны, рибосомы, фрагменты эндоплазматического ретикулума, ядерные РНК и агрегаты рибонуклеопротеидов [162,167,169.] Кроме ядерной и рибосомальной РНК в APs отмечено наличие некоторого количества микроРНК размером от 50 до 500 нуклеотидов [170]. Данные о составе этих микроРНК авторы не приводят.

Апоптотические тела (ABs) высвобождаются в виде фрагментов клеток, подвергающихся апоптозу. Считается, что они участвуют в иммунной регуляции, воспалении и в микроокружении опухоли [160,171,172]. ABs, содержащие вещества из умирающих клеток, ранее рассматривались исключительно как пакеты для мусора, пока не было обнаружено, что они способны доставлять полезные вещества в здоровые клетки-реципиенты (например, аутоантигены) [173].

Биогенез AVs осуществляется по эктосомному типу – путем отпочкования AVs от апоптотической клетки. Важным компонентом клеточной мембраны является фосфатидилсерин (PS) – фосфолипидный компонент плазматической мембраны, который в нормальных условиях содержится во внутреннем слое плазматической мембраны. При индукции апоптоза PS перемещается во внешний слой, где служит сигналом для фагоцитов "съешь меня". Аннексин V связывается PS на внешнем слое и обычно используется для обнаружения апоптотических клеток и APs [164,165,174]. Как IAVs, так и sAVs, позитивные по аннексину V, имеют очень низкие или неопределяемые уровни CD63, CD81, CD9, ALIX и TSG101 [1,175], что свидетельствует об отличии от экзосом пути биогенеза APs.

Неапоптотная гибель клеток, такая как некроз, некроптоз и ферроптоз, также может вызывать высвобождение AEVs различных размеров [176, 177]. Особенности некроптозных AEVs, аналогичными апоптотическим AEVs, являются экстернализация PS на внешней поверхности мембран и позитивность по аннексину V [178].

Таблица 12. Классификационные признаки апоптотических частиц

Наименование	Апоптотические тела	Апоптотические везикулы
Категория	ABs	sEVs, IEVs,
Размер	1000 –5000 нм – ABs	<500 нм – sEVs, 500 –1000 нм – IEVs,
Плотность	1.12 до 1.23 г/мл	1.12 до 1.23 г/мл
Мембрана	Липидный бислой	Липидный бислой
Биогенез	ABs – распад апоптотической клетки,	EVs – отпочковывание по эктосомеому пути
Маркеры	Phosphatidylserine, Annexin V, Клеточные органеллы, фрагменты органелл, фрагменты ядра, нуклеосомы	CD44, Integrin-alpha 5, Syntaxin-4, RhoA, Calvin 1, Calviolin 1, Fas, Rab-5C, Calnexin, Calveticulin, RPS 25, Lamin B1 и VDAC 2
МикроРНК	Короткие РНК от 50 до 500 нуклеотидов. Состав не известен	Короткие РНК от 50 до 500 нуклеотидов. Состав не известен

Эндосомный тип биогенеза.

Апоптотические экзосомоподобные везикулы (AEVs). Апоптотические экзосомоподобные везикулы (AEVs) впервые были выделены в 2018 г. Парком с сотрудниками из кондиционированной среды с добавлением индуктора апоптоза – тауростатина после культивации в ней культуры клеток HeLa [179]. Было показано, что EVs из клеток HeLa имеют диаметр $129,6 \pm 52,2$ нм и высвобождаются в значительно более высоких концентрациях, чем из необработанных контрольных клеток. Они несут экзосомный маркер CD63 и лизосомальный маркер LAMP1, но демонстрируют меньшую экспрессию митохондриального маркера Porin, маркеров эндоплазматического ретикулума (ER) и центра Гольджи – кальретикулин и ERp57 соответственно. Методом просвечивающей электронной микроскопии (TEM) было обнаружено, что EV имеют мембранную структуру, состоящую из липидного бислоя, и окрашиваются антителами анти-CD63, несущими флюоресцентную метку. Максимальный выход CD63+ EVs наблюдался через 36 ч после добавления в среду тауростатина. Плавающая плотность EVs составляла 1,15–1,18 г/мл. Таким образом, EVs, высвобождающиеся во время апоптотической гибели клеток, демонстрируют характеристики экзосом в отношении их размера, структуры, и белков, включая CD63, и LAMP1. Следовательно, EV, высвобождаемые из апоптотических клеток, далее именуются апоптотическими экзосомоподобными везикулами – AEVs.

В отличие от биогенеза экзосом, который протекает по ESCRT- зависимому пути [96,180] биогенез AEVs протекает по ESCRT-независимому пути [181,182]. На ранней фазе апоптоза сфингокиназа 2 (SPHK2) локализуется вблизи плазматической мембраны, где он катализирует фосфорилирование сфингозина до сфингозин 1 фосфата (S1P). Затем S1P транслокализуется за пределы мембраны, где они связываются с рецептором S1P – S1PR1 или S1PR3, что приводит к активации рецепторов. Активированные рецепторы передают сигналы через субъединицы G $\beta\gamma$ нижестоящих G-белков и провоцируют полимеризацию актина, опосредованную GTPases семейства Rho, с образованием тонких веретенообразных структур, где ко-локализованы S1PR1 и S1PR3, а также CD63, и начинается созревание эндосом. Интересно, что эти веретенообразные структуры очень напоминают PANX1-ингибируемые апоптоподы, которые, как известно, состоят из нитевидных актина и способствовать высвобождению апоптотических телец [183]. Если веретена плазматической мембраны и апоптоподии являются близко аналогичными структурами, это может свидетельствовать о том, что активация S1P/S1PRs и последующая полимеризация актина тесно связаны с образованием апоптоподий в дополнение к биогенезу AEVs.

Далее, модулированный актиновый цитоскелет усиливает образование эндосом, которые созревают одновременно с образованием MVEs и ILV, содержащих как S1PRs и CD63 с возможным взаимодействием G $\beta\gamma$ - и G1A-опосредованным У экзосом во время созревания эндосом, происходит сортировка экзосомального груза [184,185]. Хотя сигнальные системы S1P-S1PR зависимое созревание ILV у экзосом и AVEs, вероятно, будет весьма сходным, при формировании AEV наблюдаются отличия. Во-первых, созревание AEV по S1P/S1PR пути начинается с образования эндосом на плазматической мембране уже в ранней фазе апоптоза, так что везикулам изначально суждено стать AEV на стадии формирования эндосом. Во-вторых, сигналы S1P/S1PR регулируют не только конкретный тип EVs, но и общее количество высвобождаемых AEVs. Таким образом, общее количество AEVs может быть изменено путем модуляции SPHK2–S1P–S1PRs зависимого пути. Наконец, S1PR1 и S1PR3 являются специфическими маркерами AEVs [179].

Высвобождение AEVs осуществляется путем модуляции F-актина. MVE сливается с плазматической мембраной и высвобождает AEVs. Высвобождение AEVs также зависит от каспаз 3 и 9 [179]. Однако следует отметить, что биогенез AEVs был инициирован из тонких веретенообразных структур плазматической мембраны до появления и активации каспаз 3 и 9. Таким образом, предполагается, что каспазы играют определенную роль в относительно поздней фазе биогенеза AEV. Ода из возможных гипотеза о роли каспаз заключается в том, что порообразующий белок DFNA5, расщепляемый каспазой 3 [186, 187], способствует высвобождению AEVs из MVEs. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы прояснить эту возможность.

Номенклатура и классификация EPs. Единого мнения о номенклатуре ЭВ нет, в основном потому, что они неоднородны по своей природе. Широко используются такие общие термины, как “экзосомы” и “микровезикулы”, с различными определениями в зависимости от контекста исследования. Например, такие определители, как толеросомы, простасомы, эпидидимосомы и т. д., использовались для обозначения происхождения, ткани или специфической функции EPs [188]. Мы будем придерживаться, насколько это возможно, традиционной номенклатуры внеклеточных везикул: микрочастицы (MPs) (или микровезикулы,

Таблица 13. Классификационные признаки апоптотических экзосомоподобных везикул AEVs

Наименование	Апоптотические экзосомоподобные везикулы
Категория	AEVs
Размер	110 –130 нм
Плотность	1.17 г/мл
Мембрана	Липидный бислой
Биогенез	SPHK2–S1P–S1PRs зависимый путь
Маркеры	CD63, SP1R1, SP1R3
МикроРНК	Неизвестно

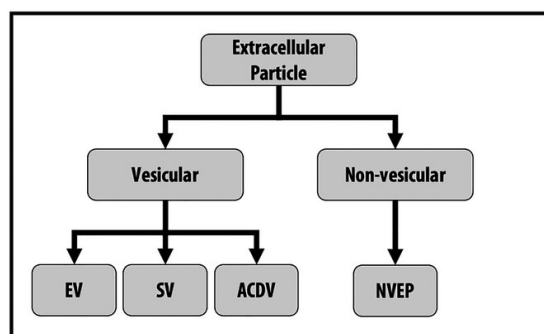


Рисунок. 3. Классификация EPs. Внеклеточные частицы включают везикулярные (EVs) и невезикулярные частицы (NVEPs). Сокращения: **EV** – внеклеточная везикула; **SV** – синтетическая везикула; **ACDV** – везикула, полученная из искусственных клеток; **NVEP** – невезикулярная внеклеточная частица. По [37]

(MVs) и экзосомы. EPs лучше всего определять на основе их физической природы, размера и биогенетического происхождения.

Первоначально, из-за множества типов EVs, и неопределенность во многих случаях их биогенеза, международным обществом исследования внеклеточных везикул (ISEV), был выбран прагматичный подход классификации EVs на «большие EVs» (>150 нм) и «малые EVs» (<150 нм) [189].

По типу механизмов биогенеза EVs классифицируются либо как эндосомальные, либо как эктосомальные. Эндосома как органелла состоит из внутренних мембран клетки млекопитающего, которые образуют мультивезикулярные тельца (MVB). Внутри MVB находятся везикулы, которые называются внутрипросветными пузырьками (ILV), когда они присутствуют в клетке, или экзосомами, когда высвобождаются во внеклеточную среду. Эндосомальные везикулы имеют диаметр от 40 до 100 нм. Экзосомы образуются непосредственно из плазматической мембраны с помощью механизмов почкования. Размер эктосом варьирует от 100 нм до 10 мкм. Эктосомы также называют микровезикулами (MVs), микрочастицами (MPs), онкосомами, и пр. Терминология EV иногда отражает содержание EVs. «Онкосомы» – это размером 100 – 400 нм, несущие аномальные и трансформирующие макромолекулы, такие как онкогенные белки. Известны также крупные онкосомы (LO), обычно имеют размер 1– 10 мкм. LO могут быть получены из опухолевых тканей. Однако название EVs в соответствии с их происхождением из ткани вызывает путаницу, поскольку как злокачественные, так и незлокачественные клетки могут продуцировать EVs. Действительно, тенденция называть EVs просто по биологической жидкости, из которой они были выделены, привела к появлению несколько запутанного набора описательных терминов, таких как в виде эпидидимосом, промининосом, вексосом, дексосом, кардиосом, тексосом и т.д. Важно понимать, что эти термины не имеют никакого отношения к биогенезу или функциям EVs.

После открытия экзомов и супермеров и появления класса невезикулярных EPs (NVEPs) ISEV предложила новую систему классификации EPs [38]. (рис. 3).

Нам кажется правомочным разделить EPs, продуцируемые клетками в процессе жизнедеятельности (нормальной или при патологии) и EPs, образующиеся в процессе программируемой гибели клеток (рис. 4). К данному типу относятся апоптотические тела, апоптотические везикулы а экзосомоподобные апоптотические везикулы. Причем, как нам кажется, этот идентификационный признак должен иметь высший «таксонометрический вес», так как апоптотические везикулы образуются при помощи эктосомного биогенеза, а AEVs при помощи одного из вариантов эндосомного биогенеза. Апоптотические тела образуются путем фрагментации апоптотических клеток, а такого механизма биогенеза EPs у нормальных клеток нет. Если же признать нуклеосомы, образующиеся в процессе апоптоза NVEPs, как предлагают некоторые авторы, то получается, что сведи апоптотических частиц присутствуют как EVs, так и NVEPs. Но тогда, тип строения EPs имеет меньший «таксонометрический вес», чем признак генеза EPs.

В качестве идентификационных маркеров происхождения EPs путем программируемой гибели клеток могут служить наличие фосфатидилсерина (PS) и аннексина V на наружной поверхности EVs, как маркеров апоптоза. EVs от NVEPs отличаются по результатам просвечивающей электронной микроскопии (TEM), а маркером эктосомного типа может служить например наличие АДФ-рибозилирующего фактора 6 (ARF6) инициирующего цепь реакций, которая приводит к сокращению актин-миозиновой цепи, позволяя эктосомам отделяться от плазматической мембраны.

Принадлежность к таксону, собственно видовой принадлежности конкретной EPs, определяется по совокупности размера, плавучая плотность и характерных биомаркеров. Так частицы размером 80–120 нм, с плавучей плотностью 1,12 г/мл и несущие тетраспаниновые белки CD9, CD63 и CD81, могут быть отнесены к экзосомам, а частицы размером 100 – 130 нм, с плавучей плотностью 1.18 г/мл несущие биомаркеры CD63, S1PR1 и S1PR3 (Рецепторы 1 и 3 сфингозин 1 фосфата) относятся в апоптотическим экзосомоподобным везикулам. Наличие в NVEP аполипопротеина ApoE является характеристическим признаком семейства липопротеинов, а Липопротеин ApoA в совокупности с соотношением размеров от 6 до 12 нм и плавучей плотности от 1,063 до 1,19 г/мл и наличием аполипопротеина ApoA, свидетельствует о том, что данная частица является ЛПВП.

Довольно существенную трудность в этом плане представляет отсутствие данных о молекулярных

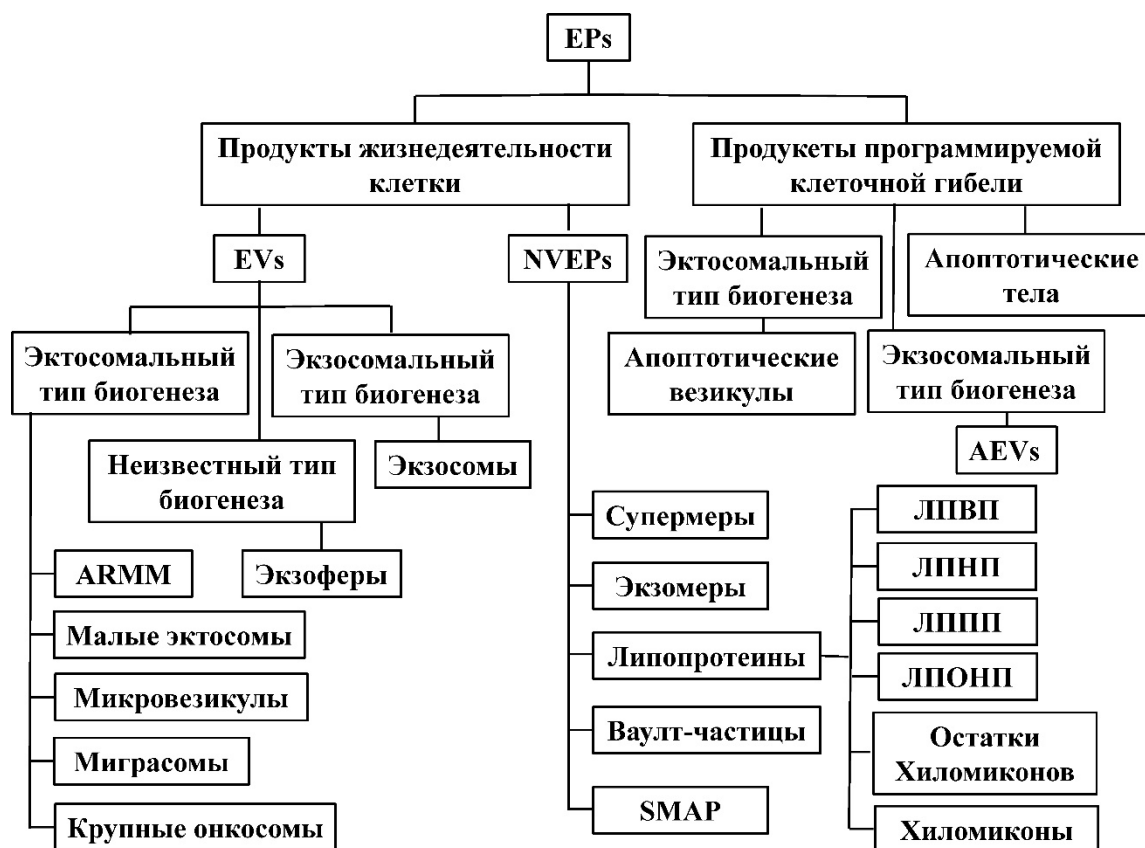


Рисунок 4. Классификация экстраклеточных частиц. Сокращения: EPs – Экстраклеточные частицы; EVs – Экстраклеточные везикулы; NVEPs – Невезикулярные экстраклеточные частицы; AEVs – Апоптотические экзосомоаодобные везикулы; ARMMs – Белок, содержащий домен аррестина 1 (ARRDC1) опосредованные микровезикулы; SMAP – супрамолекулярные атакующие частицы; ЛПВП – Липопротейны высокой плотности; ЛПНП – Липопротейны низкой плотности; ЛППП – Липопротейны промежуточной плотности; ЛПОНП – Липопротейны очень низкой плотности

механизмах биогенеза всех NVEPs, за исключением липопротейнов. Трудность состоит в том, что определить какой-либо белок в качестве биомаркера можно лишь условно, и этот выбор будет зависеть от желания экспериментатора. Так в качестве биомаркера Ваулт-частиц авторы [190] предложили использовать основной белок капсида Ваулт-частицы (MVP). Н наш взгляд с этим предложением можно согласиться, но это является нашим оценочным суждением.

Вот почему исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе синтеза и сборки EPs является фундаментальной задачей в области изучения экстраклеточных частиц.

Нерешенные вопросы:

- Каков биогенез основных видов NVEPs и, в частности, экзомеров и супермаркетов?
- Происходят ли экзомеры и супермаркеты из более обширной популяции внеклеточных NVEPs?
- Можно ли определить структуру экзомеров и супермаркетов с помощью криоэлектронной микроскопии?
- Каков молекулярный механизм биогенеза экзоферов?
- Выполняют ли разные классы EVs и NVEPs различные функции в межклеточной коммуникации?
- Какова степень специфичности содержимого в различных классах EVs и NVEPs?
- Является ли состав белков и РНК в EVs и NVEPs избирательным или случайным?
- Различаются ли функциональные последствия от введения некоего компонента содержимого EPs, если он доставляется клеткам-реципиентам разными доставщиками?
- В какой степени EVs и NVEPs усваиваются клетками, и в какой степени они функционально изменяют клетки-реципиенты?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижения последних нескольких лет значительно повысили нашу осведомленность о том, что клетки выделяют множество EVs и NVEPs. Существует общее мнение о том, что EVs представляют собой разнообразную категорию везикул, в которой экзосомы, и EVs, происходящие из эндосом, составляют лишь малую часть. Многие типы больших и малых эктосом образуются в результате прямого отпочковывания от плазматической мембраны, и эти EVs несут в себе многие из белков, которые, как предполагалось ранее, в основном секретируются экзосомами. В настоящее время приходится сталкиваться с осознанием того, что

NVEPs, включая супермеры, экзомеры, ваулт-частицы, липопротеины и другие частицы, включая рибосомы, могут быть ответственны за большую часть внеклеточного транспорта РНК.

Как отмечалось выше, биогенез почти всех типов NVEPs, включая супермеры и экзомеры неизвестен, и также в значительной степени не изучены механизмы, которые определяют, как и почему данный тип «груза» упаковывается для экспорта в EVs или NVEPs. Также неясно, могут ли некоторые компоненты экзомеров и супермеров быть отнесены к другим отдельным NVEPs, таким как рибосомы или рибонуклеопротеиновые комплексы. Вопросы, будут находиться в центре интенсивных исследований в течение многих последующих лет. В течение последних лет произошла революция в нашем осознании разнообразия EPs, которые потенциально могут способствовать межклеточному взаимодействию. Прогресс в этой области знаний в значительной степени зависит от разработки новых методов и техник, используемых для их выделения и описания исследуемых частиц. Эта тенденция, вероятно, сохранится. Технические разработки в области изучения EVs и NVEPs продолжают оставаться основным направлением исследований и коммерческой деятельности. Еще одной важной задачей будет углубление нашего понимания разнообразия EVs и NVEPs, которыми располагает конкретная клетка. Только в этом случае мы получим адекватное представление о том, как осуществляется межтканевая коммуникация в целостном организме.

Список литературы / References:

1. Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N. et al. Reassessment of Exosome Composition *Cell*, 2019, vol. 177, no. 2, pp. 428-445, doi: 10.1016/j.cell.2019.02.029.
2. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G., Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2018, vol. 19, no. 4, pp. 213-228, doi: 10.1038/nrm.2017.125.
3. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Thery C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.*, 2019, vol. 21, no. 1, pp. 9-17, doi: 10.1038/s41556-018-0250-9.
4. Zhang H., Freitas D., Kim H. S., Fabijanic K. et al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol.*, 2018, vol. 20, no. 3, pp. 332-343, doi: 10.1038/s41556-018-0040-4.
5. Zhang Q., Jeppesen D.K., Higginbotham J.N., Graves-Deal R. et al. Supermeres are functional extracellular nanoparticles replete with disease biomarkers and therapeutic targets. *Nat Cell Biol.*, 2021, vol. 23, no. 12, pp. 1240-1254, doi: 10.1038/s41556-021-00805-8.
6. Clancy J.W., Boomgarden A.C., D'Souza-Schorey C. Profiling and promise of supermeres. *Nat. Cell. Biol.*, 2021, vol. 23, no. 12, pp. 1217-1219, doi: 10.1038/s41556-021-00808-5.
7. Jeppesen D.K., Zhang Q., Franklin J.L., Coffey R.J. Are supermeres a distinct nanoparticle? *J. Extracell. Biol.*, 2022, vol. 1, no. 6, e44, doi: 10.1002/jex2.44.
8. Kerviel A., Zhang M., Altan-Bonnet N. A new infectious unit: extracellular vesicles carrying virus populations. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2021, vol. 37, pp. 171-197, doi: 10.1146/annurev-cellbio-040621-032416.
9. Raab-Traub N., Dittmer D.P. Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 15, no. 9, pp. 559-572, doi: 10.1038/nrmicro.2017.60.
10. Chen Y.-H., Du W.L., Hagemeijer M.C., Takvorian P.M. Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell*, 2015, vol. 160, no. 4, pp. 619-630, doi: 10.1016/j.cell.2015.01.032.
11. Santiana M., Ghosh S., Ho B.A., Rajasekaran V. et al. Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission. *Cell Host Microbe*, 2018, vol. 24, no. 2, pp. 208-220, doi: 10.1016/j.chom.2018.07.006.
12. Nolte-t Hoen E., Cremer T., Gallo R.C., Margolis L.B. Extracellular vesicles and viruses: are they close relatives? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, vol. 113, no. 33, pp. 9155-9161, doi: 10.1073/pnas.1605146113.
13. Macheboeuf M., Rebeyrotte P. Studies on lipo-protein cenapses of horse serum. *Discussions of the Faraday Society*, 1949, vol. 6, pp. 62-68, doi:10.1039/df9490600062.
14. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.*, 1967, vol. 13, pp. 269-288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
15. Anderson H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell. Biol.*, 1969, no. 41, pp. 59-72, doi: 10.1083/jcb.41.1.59.
16. De Broe M., Wieme R., Roels F. Letter: membrane fragments with koinozymic properties released from villous adenoma of the rectum. *Lancet*, 1975, vol. 2, no. 1214, p. 5, doi: 10.1016/s0140-6736(75)92709-9.
17. Benz E.W. Jr., Moses H.L. Small virus-like particles detected in bovine sera by electron microscopy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1974, vol. 52, no. 6, pp. 1931-1934, doi: 10.1093/jnci/52.6.1931.
18. Dalton A.J. Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1975, vol. 54, no. 5, pp. 1137-1148, doi: 10.1093/jnci/54.5.1137.
19. Stegmayr B., Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol. Res.*, 1982, vol. 10, no. 5, pp. 253-257, doi: 10.1007/BF00255932.
20. Ronquist G., Brody I., Gottfries A., Stegmayr B. An Mg²⁺ and Ca²⁺-stimulated adenosine triphosphatase in human prostatic fluid: part I. *Andrologia*, 1978, vol. 10, no. 4, pp. 261-272, doi: 10.1111/j.1439-0272.1978.tb03030.x.
21. Harding C., Heuser J., Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur. J. Cell. Biol.*, 1984, vol. 35, no. 25663.

22. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 1983, vol. 33, no. 3, pp. 967-978, doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
23. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, no. 19, pp. 9412-9420.
24. Kedersha N.L., Rome L.H. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J. Cell. Biol.*, 1986, vol. 103, no. 3, pp. 699-709, doi: 10.1083/jcb.103.3.699.
25. Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*, 2004, vol. 101, no. 36, pp. 13368-13373, doi: 10.1073/pnas.0403453101.
26. Lasser C., Eldh M., Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J. Vis. Exp.*, 2012, e3037, doi: 10.3791/3037.
27. Keller S., Ridinger J., Rupp A.K., Janssen J.W., Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J. Transl. Med.*, 2011, vol. 9, no. 86, doi: 10.1186/1479-5876-9-86.
28. Caby M.P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.*, 2005, vol. 17, no. 7, pp. 879-887, doi: 10.1093/intimm/dxh267.
29. Poliakov A., Spilman M., Dokland T., Amling C.L., Mobley J.A. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate*, 2009, vol. 69, no. 2, pp. 159-167, doi: 10.1002/pros.20860.
30. Lasser C., O'Neil S.E., Ekerljung L., Ekstrom K., Sjostrand M., Lotvall J. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2011, vol. 25, no. 2, pp. 89-93, doi: 10.2500/ajra.2011.25.3573.
31. Al-Nedawi K., Meehan B., Micallef J. et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell. Biol.*, 2008, vol. 10, no. 5, pp. 619-624, doi: 10.1038/ncb1725.
32. Di Vizio D., Kim J., Hager M.H., Morello M. et al. Oncosome formation in prostate Cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.*, 2009, vol. 69, no. 13, pp. 5601-5609, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3860.
33. Minciaccchi V.R., Spinelli C., Reis-Sobreiro M., Cavallini L. et al. MYC mediates large Oncosome-induced fibroblast reprogramming in prostate. *Cancer. Cancer Res.*, 2017, vol. 77, no. 9, pp. 2306-2317, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2942.
34. Ma L., Li Y., Peng J., Wu D. et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell. Res.*, 2015, vol. 25, no. 1, pp. 24-38, doi: 10.1038/cr.2014.135.
35. Kalra H., Drummen G.P.C., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci.*, 2016, vol. 17, no. 2, p. 170, doi: 10.3390/ijms17020170.
36. Jeppesen D.K., Zhang Q., Franklin J.L., Coffey R.J. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends in Cell Biology*, 2023, vol. 33, no. 8 pp. 667-681, doi: 10.1016/j.tcb.2023.01.002.
37. Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., Buzas E.I. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J. Extracell. Vesicles*, 2024, vol. 13, no. 2, e12404, doi: 10.1002/jev2.12404.
38. Kedersha N.L., Rome L.H. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J. Cell. Biol.*, 1986, vol. 103, no. 3, pp. 699-709, doi: 10.1083/jcb.103.3.699.
39. Balint S., Muller S., Fischer R., Kessler M.B. et al. Supramolecular attack particles are autonomous killing entities released from cytotoxic T cells. *Science*, 2020, vol. 368, no. 6493, pp. 897-901, doi: 10.1126/science.aay9207.
40. Nabhan J.F., Hu R., Oh R.S., Cohen S.N., Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2012, vol. 109, no. 11, pp. 4146-4151, doi: 10.1073/pnas.1200448109.
41. Wang Q., Lu Q. Plasma membrane-derived extracellular microvesicles mediate non-canonical intercellular NOTCH signaling. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, no. 1, p. 709, doi: 10.1038/s41467-017-00767-2.
42. Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J. NONCH signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, vol. 284, pp. 770-776, doi: 10.1126/science.284.5415.770.
43. Koch U., Lehal R., Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development*, 2013, vol. 140, pp. 689-704, doi: 10.1242/dev.080614.
44. Kopan R., Ilagan M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 2009, vol. 137, pp. 216-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
45. Palmer W.H., Deng W.M. Ligand-independent mechanisms of notch activity. *Trends Cell. Biol.*, 2015, vol. 25, pp. 697-707, doi: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
46. Wang Q., Yu J., Kadungure T., Beyene J.H. et al. ARMMs as a versatile platform for intracellular delivery of macromolecules. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1, p. 960, doi: 10.1038/s41467-018-03390-x.
47. Keerthikumar Sh., Gangoda L., Liem M., Fonseka P. et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes *Oncotarget.*, 2015, vol. 6, no. 17, pp. 15375-15396, doi: 10.18632/oncotarget.3801.
48. Crescitelli R., Lasser C., Szabo T.G., Kittel A. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, vol. 2, no. 1, p. 20677, doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.

49. Tosar J.P., Gambaro F., Sanguinetti J., Bonilla B. et al. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, no. 11, pp. 5601-5616, doi: 10.1093/nar/gkv432.
50. Hagiwara K., Katsuda T., Gailhouste L., Kosaka N., Ochiya T. Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles. *FEBS Lett.*, 2015, vol. 589, pp. 4071-4078, doi: 10.1016/j.febslet.2015.11.036.
51. Oram J.F., Vaughan A.M. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol.*, 2000, vol. 11, no. 3, pp. 253-260, doi: 10.1097/00041433-200006000-00005.
52. Albrecht C., McVey J.H., Elliott J.I., Sardini A. et al. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood*, 2005, vol. 106, no. 2, pp. 542-549, doi: 10.1182/blood-2004-05-2056.
53. Hankins H.M., Baldrige R.D., Xu P., Graham T.R. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 35-47, doi: 10.1111/tra.12233.
54. Bevers E.M., Williamson P.L. Getting to the outer leaflet: physiology of Phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol Rev.*, 2016, vol. 96, no. 2, pp. 605-645, doi: 10.1152/physrev.00020.2015.
55. Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M. et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, vol. 19, no. 22, pp. 1875-1885, doi: 10.1016/j.cub.2009.09.059.
56. Taylor A.C., Robbins E. Observations on microextensions from the surface of isolated vertebrate cells. *Dev Biol.*, 1963, vol. 6, pp. 660-673, doi: 10.1016/0012-1606(63)90150-7.
57. Porter K.R., Claude A., Fullam E.F. A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *J Exp Med.*, 1945, vol. 81, no. 3, pp. 233-246, doi: 10.1084/jem.81.3.233.
58. Svitkina T. The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2018, vol. 10, no. 1, a018267, doi: 10.1101/cshperspect.a018267.
59. da Rocha-Azevedo B., Schmid S.L. Migrasomes: a new organelle of migrating cells. *Cell Res.*, 2015, vol. 25, no. 1, pp. 1-2, doi: 10.1038/cr.2014.146.
60. Piper R.C., Katzmann D.J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2007, vol. 23, pp. 519-547.
61. Huang Y., Zucker B., Zhang S., Elias S. et al. Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains. *Nat Cell Biol.*, 2019, vol. 21, no. 8, pp. 991-1002, doi: 10.1038/s41556-019-0367-5.
62. Zhao X., Lei Y., Zheng J., Peng J. et al. Identification of markers for migrasome detection. *Cell Discov.*, 2019, vol. 5, p. 27, doi: 10.1038/s41421-019-0093-y.
63. Zacks M.A., Garg N. Recent developments in the molecular, biochemical and functional characterization of GPI8 and the GPI-anchoring mechanism [review]. *Mol Membr Biol.*, 2006, vol. 23, no. 3, pp. 209-225, doi: 10.1080/09687860600601494.
64. Zhao X., Lei Y., Zheng J., Peng J., Li Y., Yu L., Chen Y. Identification of markers for migrasome detection. *Cell Discov.*, 2019, vol. 5, p. 27, doi: 10.1038/s41421-019-0093-y.
65. Liu Y., Li S., Rong W., Zeng C., Zhu X., Chen Q., Li L., Liu Z.-H., Zen K. Podocyte-Released Migrasomes in Urine Serve as an Indicator for Early Podocyte Injury Kidney Dis (Basel). 2020, vol. 6, no. 6, pp. 422-433, doi: 10.1159/000511504.
66. Lee T.H., D'Asti E., Magnus N., Al-Nedawi K. et al. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer: the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol.*, 2011, vol. 33, no. 5, pp. 455-467, doi: 10.1007/s00281-011-0250-3.
67. Di Vizio D., Kim J., Hager M.H., Morello M. et al. Oncosome formation in prostate Cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.*, 2009, vol. 69, no. 13, pp. 5601-5609, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3860.
68. Di Vizio D., Morello M., Dudley A.C., Schow P.W. et al. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol.*, 2012, vol. 181, no. 5, pp. 1573-1584, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.030.
69. Kim J., Morley S., Le M., Bedoret D. et al. Enhanced shedding of extracellular vesicles from amoeboid prostate cancer cells: potential effects on the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.*, 2014, vol. 15, no. 4, pp. 409-418, doi: 10.4161/cbt.27627.
70. Minciacchi V.R., You S., Spinelli C., Morley S. et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget.*, 2015, vol. 6, no. 13, pp. 11327-11341, doi: 10.18632/oncotarget.3598.
71. Morello M., Minciacchi V.R., de Candia P., Yang J. et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 22, pp. 3526-3536, doi: 10.4161/cc.26539.
72. Morello M., Minciacchi V.R., de Candia P., Yang J. et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 22, pp. 3526-3536, doi: 10.4161/cc.26539.
73. Collier H.A. Is cancer a metabolic disease? *Am J Pathol*, 2014, vol. 184, no. 1, pp. 4-17, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.05.02.
74. Li Z., Wang Y., Wu H., Zhang L., Yang P., Li Z. GRP78 enhances the glutamine metabolism to support cell survival from glucose deficiency by modulating the β -catenin signaling. *Oncotarget.*, 2014, vol. 5, no. 14, pp. 5369-5380, doi: 10.18632/oncotarget.2105.

75. Oppel F., Muller N., Schackert G., Hendruschk S. et al. SOX2- RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells. *Mol Cancer*, 2011, vol. 10, no. 137, doi: 10.1186/1476-4598-10-137.
76. Minciocchi V.R., Freeman M.R., Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol.*, 2015, vol. 40, pp. 41-51, doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
77. Minciocchi V.R., Spinelli C., Reis-Sobreiro M., Cavallini L. et al. MYC mediates large Oncosome-induced fibroblast reprogramming in prostate Cancer. *Cancer Res.*, 2017, vol. 77, no. 9, pp. 2306-2317, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2942.
78. Livshits M.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lazarev V.N., et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*, 2015, vol. 5, no. 17319, doi: 10.1038/srep17319.
79. Mitchell P., Petfalski E., Shevchenko A., Mann M., Tollervey D. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, vol. 91, no. 4, pp. 457-466, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80432-8.
80. Sotelo J.R., Porter K.R. An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol.*, 1959, vol. 5, no. 2, pp. 327-342, doi: 10.1083/jcb.5.2.327.
81. Hurley J.H., Emr S.D. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 2006, vol. 35, pp. 277-298, doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.102126.
82. Slagsvold T., Pattni K., Malerod L., Stenmark H. Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.*, 2006, vol. 16, no. 6, pp. 317-326, doi: 10.1016/j.tcb.2006.04.004.
83. Pols M., Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res.*, 2009, vol. 315, no. 9, pp. 1584-1592, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.
84. Hemler M.E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2005, vol. 6, no. 10, pp. 801-11, doi: 10.1038/nrml736.
85. Jansen F.H., Krijgsveld J., van Rijswijk A., van den Bemd G. et al. Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2009, vol. 8, no. 6, pp. 1192-1205, doi: 10.1074/mcp.M800443-MCP200.
86. Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F. et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.*, 2010, vol. 285, no. 23, pp. 17442-17452. doi: 10.1074/jbc.M110.107821.
87. Wollert T., Hurley J.H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7290, pp. 864-869, doi: 10.1038/nature08849.
88. Babst M., Katzmman D.J., Estepa-Sabal E.J., Meerloo T., Emr S.D. ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, 2002, vol. 3, no. 2, pp. 271-282, doi: 10.1016/s1534-5807(02)00220-4.
89. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol.*, 2011, vol. 23, no. 4, pp. 452-457, doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.008.
90. Baietti M.F., Zhang Z., Mortier E., Melchior A. et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.*, 2012, vol. 14, no. 7, pp. 677-685, doi: 10.1038/ncb2502.
91. Jae N., McEwan D.G., Manavski Y., Boon R.A., Dimmeler S. Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles. *FEBS Lett.*, 2015, vol. 589, pp. 3182-3188, doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.040.
92. Savina A., Fader C.M., Damiani M.T., Colombo M.I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*, 2005, vol. 6, no. 2, pp. 131-143, doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x131-143.
93. Fruhbeis C., Frohlich D., Kuo W.P., Amphornrat J. et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.*, 2013, vol. 11, no. 7, e1001604, doi: 10.1371/journal.pbio.1001604.
94. Ostenfeld M.S., Jeppesen D.K., Laurberg J.R., Boysen A.T. et al. Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res.*, 2014, vol. 74, no. 20, pp. 5758-5771, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3512.
95. Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S., Fanget I. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.*, 2010, vol. 12, no. 1, pp. 19-30, doi: 10.1038/ncb2000.
96. Hsu Ch., Morohashi Y., Yoshimura Sh.-I., Manrique-Hoyos N., Jung S., Lauterbach M.A., Bakhti M., Grønborg M., Mobius W., Rhee J., Barr F.A., Simons M. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol.*, 2010, vol. 189, no. 2, pp. 223-232, doi: 10.1083/jcb.200911018.
97. Raiborg C., Wenzel E.M., Pedersen N.M., Olsvik H. et al. Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature*, 2015, vol. 520, no. 7546, pp. 234-238, doi: 10.1038/nature14359.
98. Barman B., Sung B.H., Krystofiak E., Ping J. et al. VAP-A and its binding partner CERT drive biogenesis of RNA-containing extracellular vesicles at ER membrane contact sites. *Cell Res.*, 2021, vol. 31, no. 2, pp. 157-177, doi: 10.1038/s41422-020-00409-1.
99. Melentijevic I., Toth M.L., Arnold M.L., Guasp R.J. et al. C. elegans neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature*, 2017, vol. 542, no. 7641, pp. 367-371, doi: 10.1038/nature21362.

100. Turek M., Banasiak K., Piechota M., Shanmugam N. et al. Muscle-derived exophers promote reproductive fitness. *EMBO Rep.*, 2021, vol. 22, no. 8, e52071, doi: 10.15252/embr.202052071.
101. Nicolas-Avila J.A., Lechuga-Vieco A.V., Esteban-Martinez L., Sanchez-Diaz M. et al. Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 1, pp. 94-109, doi: 10.1016/j.cell.2020.08.031.
102. Meehan B., Rak J., Di Vizio D. Oncosomes - large and small: what are they, where they came from? *J Extracell Vesicles*, 2016, vol. 5, no. 33109, doi: 10.3402/jev.v5.33109.
103. Cooper J.F., Guasp R.J., Arnold M.L., Grant B.D., Driscoll M. Stress increases in exopher-mediated neuronal extrusion require lipid biosynthesis, FGF, and EGF RAS/MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, vol. 118, no. 36, e2101410118, doi: 10.1073/pnas.2101410118.
104. Duvezin-Caubet S., Jagasia R., Wagener J., Hofmann S. et al. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem.*, 2006, vol. 281, no. 49, pp. 37972-37979, doi: 10.1074/jbc.M606059200.
105. Costanzo M., Abounit S., Marzo L., Danckaert A. et al. Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J Cell Sci.*, 2013, vol. 126, pt. 16, pp. 3678-3685, doi: 10.1242/jcs.126086.
106. Costanzo M., Abounit S., Marzo L., Danckaert A. et al. Wiring through tunneling nanotubes-from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci.*, 2012, vol. 125, pt. 5, pp. 1089-1098, doi: 10.1242/jcs.083279.
107. Gousset K., Schiff E., Langevin Ch., Marijanovic Z. et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat. Cell Biol.*, 2009, vol. 11, pp. 328-336, doi: 10.1038/ncb1841.
108. Ginsberg H.N. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 1998, vol. 27, pp. 503-519, doi: 10.1016/s0889-8529(05)70023-2.
109. Schwenk R.W., Holloway G.P., Luiken J.J.F.P., Bonen A., Glatz J.F.C. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2010, vol. 82, no. 4-6, pp. 149-154, doi: 10.1016/j.plefa.2010.02.029.
110. Reza K., Dyslipidemia, in: Practical Cardiology Evaluation and Treatment of Common Cardiovascular Disorders Baliga R.R., Eagle K.A. eds. *Springer Cham*, pp. 303-309, doi: 10.1016/b978-0-323-51149-0.00018-3.
111. SAR1B gene: MedlinePlus Genetics. *medlineplus.gov*. Retrieved 2022-12-06.
112. Giammanco A., Cefalu A.B., Noto D., Averna M.R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front Physiol.*, 2015, vol. 6, no. 61, doi: 10.3389/fphys.2015.00061.
113. Bodewes F.A.J.A., Wouthuyzen-Bakker M., Verkade H.J., Persistent Fat Malabsorption in Cystic Fibrosis. *Diet and Exercise in Cystic Fibrosis*, 2015, pp. 373-381, doi: 10.1016/C2013-0-08350-8.
114. Gropper S.S., Smith J.L., Carr T.P. *Advanced nutrition and human metabolism (6th ed.)*. Belmont, CA: Wadsworth/Cengage Learning, 2013, 623 p.
115. Gibbons G.F., Wiggins D., Brown A.-M., Hebbachi A.-M. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans.*, 2004, vol. 32, pt. 1, pp. 59-64, doi: 10.1042/bst0320059.
116. Dashti M., Kulik W., Hoek F., Veerman E.C. et al. A phospholipidomic analysis of all defined human plasma lipoproteins. *Sci Rep.*, 2011, vol. 1, no. 139, doi: 10.1038/srep00139.
117. Dashti M., Motazacker M.M., Levels J., de Vries M. et al. Proteome of human plasma very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein exhibits a link with coagulation and lipid metabolism. *Thromb Haemost.*, 2014, vol. 111, no. 3, pp. 518-530, doi: 10.1160/TH13-02-0178.
118. van Zwol W., van de Sluis B., Ginsberg H.N., Kuivenhoven J.A. VLDL Biogenesis and Secretion. *It Takes a Village Circ Res.*, 2024, vol. 134, no. 2, pp. 226-244, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.323284.
119. Zeuschner D., Geerts W.J.C., van Donselaar E., Humbel B.M. et al. Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nat Cell Biol.*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 377-383, doi: 10.1038/ncb1371.
120. Jin L., Pahuja K.B., Wickliffe K.E., Gorur A. et al. Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature*, 2012, vol. 482, no. 7386, pp. 495-500, doi: 10.1038/nature10822.
121. Siddiqi S.A. VLDL exits from the endoplasmic reticulum in a specialized vesicle, the VLDL transport vesicle, in rat primary hepatocytes. *Biochem J.*, 2008, vol. 413, no. 2, pp. 333-342, doi: 10.1042/BJ20K071469.
122. Brown M.S., Goldstein J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, vol. 232, no. 4746, pp. 34-47, doi: 10.1126/science.3513311.
123. Feingold K.R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. *MDText.com*, Inc.; South Dartmouth (MA), 2024, doi: 10.1016/j.ecl.2022.02.008.
124. Kontush A., Chapman J. *High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function and Therapeutics. First Edition*. John Wiley & Sons, Inc. 2012, 648 p., doi: 10.1002/9781118158678.ch13.
125. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C. Jr., Weisgraber K.H. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research*, 1985, vol. 25, no. 12, pp. 1277-1294, doi: 10.1016/S0022-2275(20)34443-6.
126. De Lalla O.F., Gofman J.W. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods Biochem Anal*, 1954, vol. 1, pp. 459-478, doi: 10.1002/9780470110171.ch16.
127. Nichols A.V., Krauss R.M., Musliner T.A. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, 1986, vol. 128, pp. 417-431, doi: 10.1016/0076-6879(86)28084-2.
128. Sorci-Thomas M.G., Thomas M.J. High Density Lipoprotein Biogenesis, Cholesterol Efflux, and Immune Cell Function *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012, vol. 32, no. 11, pp. 2561-2565, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300135.

129. Onodi Z., Pelyhe C., Nagy C. Brenner G. et al. Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma. *Frontiers in Physiology*, 2018, vol. 9, no. 1479, doi: 10.3389/fphys.2018.01479.
130. Zhang Q., Higginbotham J.N., Jeppesen D.K., Yang Yu-P. et al. Transfer of functional cargo in exomeres. *Cell Rep.*, 2019, vol. 27, 3, pp. 940-954, doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.009.
131. Zhang Q., Jeppesen D.K., Higginbotham J.N., Franklin J.L. et al. Angiotensin-converting enzyme 2-containing small extracellular vesicles and exomeres bind thesevere acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein. *Gastroenterology*, 2021, vol. 160, no. 3, pp. 958-961, doi: 10.1053/j.gastro.2020.09.042.
132. Hoshino A., Kim H.S., Bojmar L., Gyan K.E. et al. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell*, 2020, vol. 182, no. 4, pp. 1044-1061, doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009.
133. Zhang H., Lyden D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nat Protoc.*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 1027-1053, doi: 10.1038/s41596-019-0126-x.
134. Tosar J.P., Witwer K., Cayota A. Revisiting extracellular RNA release, processing, and function. *Trends Biochem Sci.*, 2021, vol. 46, no. 6, pp. 438-445, doi: 10.1016/j.tibs.2020.12.008.
135. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M., Ruf I.K. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci US A*, 2011, vol. 108, no. 12, pp. 5003-5008, doi: 10.1073/pnas.1019055108.
136. Kedersha N.L., Heuser J.E., Chugani D.C., Rome L.H. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol.*, 1991, vol. 112, no. 2, pp. 225-235, doi: 10.1083/jcb.112.2.225.
137. Kickhoefer V.A., Siva A.C., Kedersha N.L., Inman E.M. et al. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol.*, 1999, vol. 146, no. 5, pp. 917-928, doi: 10.1083/jcb.146.5.917.
138. Kickhoefer V.A., Stephen A.G., Harrington L., Robinson M.O., Rome L.H. Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem.*, 1999, vol. 274, no. 46, pp. 32712-32817, doi: 10.1074/jbc.274.46.32712.
139. Kickhoefer V.A., Searles R.P., Kedersha N.L., Garber M.E., Johnson D.L., Rome L.H. Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNAt that is transcribed by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 11, pp. 7868-7873.
140. van Zon A., Mossink M.H., Schoester M., Scheffer G.L. et al. Multiple human vault RNAs. Expression and association with the vault complex. *J Biol Chem.*, 2001, vol. 276, no. 40, pp. 37715-37721, doi: 10.1074/jbc.M106055200.
141. Han M., Kickhoefer V.A., Nemerow G.R., Rome L.H. Targeted vault nanoparticles engineered with an endosomolytic peptide deliver biomolecules to the cytoplasm. *ACS Nano*, 2011, vol. 5, no. 8, pp. 6128-6137, doi: 10.1021/nn2014613.
142. Tanaka H., Kato K., Yamashita E., Sumizawa T. et al. The structure of rat liver vault at 3.5 Angstrom resolution. *Science*, 2009, vol. 323, no. 5912, pp. 384-388, doi: 10.1126/science.1164975.
143. Ding K., Zhang X., Mrazek J., Kickhoefer V.A. et al. Solution Structures of Engineered Vault Particles. *Structure*, 2018, vol. 26, no. 4, pp. 619-626, doi: 10.1016/j.str.2018.02.014.
144. Mrazek J., Toso D., Ryazantsev S., Zhang X. et al. Polyribosomes are molecular 3D nanoprinters that orchestrate the assembly of vault particles. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, pp. 11552-11559, doi: 10.1021/nn504778h.
145. Yang J., Kickhoefer V.A., Ng B.C., Gopal A. et al. Vaults are dynamically unconstrained cytoplasmic nanoparticles capable of half vault exchange. *ACS Nano*, 2010, vol. 4, no. 12, pp. 7229-7240, doi: 10.1021/nn102051r.
146. Poderycki M.J., Rome L.H., Harrington L., Kickhoefer V.A. The p80 homology region of TEP1 is sufficient for its association with the telomerase and vault RNAs, and the vault particle. *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, no. 3, pp. 893-902, doi: 10.1093/nar/gki234.
147. Mikyas Y., Makabi M., Raval-Fernandes S., Harrington L. et al. Cryoelectron microscopy imaging of recombinant and tissue derived vaults: Localization of the MVP N termini and VPARP. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 344, pp. 91-105, doi: 10.1016/j.jmb.2004.09.021.
148. Berger W., Steiner E., Grusch M., Elbling L., Micksche M. Vaults and the major vault protein: Novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci.*, 2009, vol. 66, no. 1, pp. 43-61, doi: 10.1007/s00018-008-8364-z.
149. Lehuède C., Li X., Dauvillier S., Vaysse C. et al. Adipocytes promote breast cancer resistance to chemotherapy, a process amplified by obesity: Role of the major vault protein (MVP). *Breast Cancer Res.*, 2019, vol. 21, no. 1, p. 7, doi: 10.1186/s13058-018-1088-6.
150. Tang S., Bai C., Yang P., Chen X. 14-3-3" boosts bleomycin-induced DNA damage response by inhibiting the drug-resistant activity of MVP. *J Proteome Res.*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 2511-2524, doi: 10.1021/pr301085c.
151. Mossink M.H., van Zon A., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A. Vaults: A ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 47, pp. 7458-7467, doi: 10.1038/sj.onc.1206947.
152. Law R.H.P., Lukoyanova N., Voskoboinik I., Caradoc-Davies T.T. et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*, 2010, vol. 468, no. 7322, pp. 447-451, doi: 10.1038/nature09518.
153. Martina J.A., Wu X.S., Catalfamo M., Sakamoto T. et al. Imaging of lytic granule exocytosis in CD8+ cytotoxic T lymphocytes reveals a modified form of full fusion. *Cell Immunol.*, 2011, vol. 271, no. 2, pp. 267-279, doi: 10.1016/j.cellimm.2011.07.004.

154. Lugini L., Cecchetti S., Huber V., Luciani F. et al. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol.*, 2012, vol. 189, pp. 2833-2842, doi: 10.4049/jimmunol.1101988.
155. Chang H.-F., Schirra C., Ninov M., Hahn U. et al. Identification of distinct cytotoxic granules as the origin of supramolecular attack particles in T lymphocytes. *Nat Commun.*, 2022, vol. 13, no. 1, p. 1029, doi: 10.1038/s41467-022-28596-y.
156. Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.*, 1985, vol. 54, pp. 631-664, doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215.
157. Mateo V., Lagneaux L., Bron D., Biron G. et al. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.*, 1999, vol. 5, no. 11, pp. 1277-1284, doi: 10.1038/15233.
158. Oldenborg P.A., Gresham H.D., Lindberg F.P. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med.*, 2001, vol. 193, no. 7, pp. 855-862, doi: 10.1084/jem.193.7.855.
159. Ihara T., Yamamoto T., Sugamata M., Okumura H., Ueno Y. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch.*, 1998, vol. 433, no. 5, pp. 443-447, doi: 10.1007/s004280050272.
160. Buzas E.I. et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2014, vol. 10, no. 6, pp. 356-364, doi: 10.1038/nrrheum.2014.19.
161. Hristov M., Erl W., Linder S., Weber P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 9, pp. 2761-2766, doi: 10.1182/blood-2003-10-3614.
162. Schiller M., Bekeredjian-Ding I., Heyder P., Blank N. et al. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2008, vol. 15, no. 1, pp. 183-191, doi: 10.1038/sj.cdd.4402239.
163. Zhang X., Tang J., Kou X., Huang W. et al. Proteomic analysis of MSC-derived apoptotic vesicles identifies Fas inheritance to ameliorate haemophilia a via activating platelet functions. *J. Extracell. Vesicles*, 2022, vol. 11, no. 7, e12240, doi: 10.1002/jev2.12240.
164. Dieude M., Bell C., Turgeon J., Beillevaire D. et al. The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci. Transl. Med.*, 2015, vol. 7, no. 318, doi: 10.1126/scitranslmed.aac9816.
165. Sisirak V., Sally B., D'Agati V. et al. Digestion of chromatin in apoptotic cell microparticles prevents autoimmunity. *Cell*, 2016, vol. 166, no. 1, pp. 88-101, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.034.
166. Tucher C., Bode K., Schiller P., Claben L. et al. Extracellular vesicle subtypes released from activated or apoptotic T-lymphocytes carry a specific and stimulus-dependent protein cargo. *Front Immunol.*, 2018, vol. 9, p. 534, doi: 10.3389/fimmu.2018.00534.
167. Zirngibl M., Furnrohr B.G., Janko C., Munoz L.E. et al. Loading of nuclear autoantigens prototypically recognized by systemic lupus erythematosus sera into late apoptotic vesicles requires intact microtubules and myosin light chain kinase activity. *Clin Exp Immunol.*, 2015, vol. 179, no. 1, pp. 39-49, doi: 10.1111/cei.12342.
168. Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosch M., Dewar A., Olson M.F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, vol. 3, no. 4, pp. 339-345, doi: 10.1038/35070009.
169. Biggiogera M., Bottone M.G., Martin T.E., Pellicciari T.U. Still immunodetectable nuclear RNPs are extruded from the cytoplasm of spontaneously apoptotic thymocytes. *Exp. Cell. Res.*, 1997, vol. 234, no. 2, pp. 512-520, doi: 10.1006/excr.1997.3657.
170. Crescitelli R., Lasser C., Szabo T.G., Kittel A. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles*, 2013, vol. 2, doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.
171. Roefs M.T., Sluijter J.P.G., Vader P. Extracellular vesicle-associated proteins in tissue repair. *Trends Cell Biol.*, 2020, vol. 30, no. 12, pp. 990-1013, doi: 10.1016/j.tcb.2020.09.009.
172. Gregory C.D., Paterson M. An apoptosis-driven onco-regenerative niche: roles of tumour-associated macrophages and extracellular vesicles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2018, vol. 373, no. 1737, 20170003, doi: 10.1098/rstb.2017.0003.
173. Akers J.C., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.*, 2013, vol. 113, no. 1, pp. 1-11, doi: 10.1007/s11060-013-1084-8.
174. Hristov M., Erl W., Linder S., Weber P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 9, pp. 2761-2766, doi: 10.1182/blood-2003-10-3614.
175. Lai R.C., Tan S.S., Yeo R.W.Y., Choo A.B.H. et al. MSC secretes at least 3 EV types each with a unique permutation of membrane lipid, protein and RNA. *J. Extracell. Vesicles*, 2016, vol. 5, p. 29828, doi: 10.3402/jev.v5.29828.
176. Baxter A.A., Phan T.K., Hanssen E., Liem M. et al. Analysis of extracellular vesicles generated from monocytes under conditions of lytic cell death. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1, p. 7538, doi: 10.1038/s41598-019-44021-9.
177. Ito F., Kato K., Yanatori I., Murohara T., Toyokuni S. Ferroptosis-dependent extracellular vesicles from macrophage contribute to asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through loading ferritin. *Redox Biol.*, 2021, vol. 47, no. 102174, doi: 10.1016/j.redox.2021.102174.

178. Zargarian S., Shlomovitz I., Erlich Z., Hourizadeh A. et al. Phosphatidylserine externalization, 'necroptotic bodies' release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biol.*, 2017, vol. 15, no. 6, e2002711, doi: 10.1371/journal.pbio.2002711.
179. Park S.J., Kim J.M., Kim V., Hur J., Park S., Kim K., Shin H.-J., Chwae Y.-J. Molecular mechanisms of biogenesis of apoptotic exosome-like vesicles and their roles as damage-associated molecular patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2018, vol. 115, no. 50, pp. E11721-E11730.
180. Colombo M., Raposo G., Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2014, vol. 30, pp. 255-289, doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
181. Kajimoto T., Okada T., Miya S., Zhang L., Nakamura S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat. Commun.*, 2013, vol. 4, p. 2712, doi: 10.1038/ncomms3712.
182. Trajkovic K., Hsu Ch., Chiantia S., Rajendran L. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 2008, vol. 319, no. 5867, pp. 1244-1247, doi: 10.1126/science.1153124.
183. Atkin-Smith G.K., Tixeira R., Paone S., Mathivanan S., Collins Ch. et al. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat Commun.*, 2015, vol. 6, no. 7439, doi: 10.1038/ncomms8439.
184. Kajimoto T., Okada T., Miya S., Zhang L., Nakamura Sh. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun.*, 2013, vol. 4, p. 2712, doi: 10.1038/ncomms3712.
185. Kajimoto T., Nabil N., Mohamed I., Badawy S.M.M. et al. Involvement of G $\beta\gamma$ subunits of Gi protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes. *J. Biol. Chem.*, 2018, vol. 293, no. 1, pp. 245-253, doi: 10.1074/jbc.M117.808733.
186. Rogers C., Fernandes-Alnemri T., Mayes L., Alnemri D. et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature Communications*, 2017, vol. 8, art. no. 14128, doi: 10.1038/ncomms14128.
187. Wang Y., Gao W., Shi X., Ding J. et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 2017, vol. 547, no. 7661, pp. 99-103, doi: 10.1038/nature22393.
188. Gould S.J., Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*, 2013, vol. 2, doi: 10.3402/jev.v2i0.20389.
189. Lotval J., Hill A.F., Hochberg F., Buzas E.I. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles*, 2014, vol. 3, doi: 10.3402/jev.v3.26913.
190. Rome L.H., Kickhoefer V.A. Development of the vault particle as a platform technology. *ACS Nano*, 2013, vol. 7, no. 2, pp. 889-902, doi: 10.1021/nn3052082.

EXTRACELLULAR PARTICLES (EPs). CLASSIFICATION, PROPERTIES, BIOGENESIS (REVIEW)

Landa S.B.¹, Verlov N.A.¹, Emanuel V.L.²

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute»
Orlova rosha St., 1, Gatchina, 188300 Russia. e-mail: sergey.landa@gmail.com

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
Lva Tolstogo str., 8, St. Petersburg, 197022, Russia

Received 08.08.2024

Abstract. Extracellular particle (EPs) research is expanding rapidly as recent discoveries showed much greater complexity and variety of EPs types than was thought just a few years ago. New types of EPs have been described in recent years. Cells interact with each other by releasing signaling molecules, including proteins, lipids, and nucleic acids. Cells can pack these signaling molecules into EPs in order, among other things, to avoid rapid degradation and escape from immune surveillance, which leads to local and long-range intercellular communication. Extracellular Vesicles (EVs) are the bubbles enclosed in a lipid bilayer membrane. These bubbles are released by all cell types studied so far both normal and pathological and are found in all tissues and body fluids. Recent advances in isolation and analytical research methods led to the identification of an increasing number of types of EVs. It is becoming increasingly obvious that non-vesicular extracellular particles (NVEPs) devoid of a lipid bilayer membrane, are present in the extracellular space and body fluids and often there are a lot of them. NVEPS include not only well-known objects such as lipoproteins, nucleosomes and so-called vaults, but also recently discovered exomeres and supermeres. Thus, our understanding of cell biology and the intercellular communications facilitated by the release of EVs and NVEPs is constantly changing. In the report, we tried to describe various types of EP, highlight the latest advances in EP research and point out the main unresolved issues.

Key words: Extracellular particles, EVs, NVEPs, classification, biogenesis, biomarkers, apoptosis.

ПАТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ ПРИЁМА БИГУАНИДА

Бутенко Е.В.

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького»
пр. Ильича, 16, г. Донецк, 283003, ДНР, РФ; e-mail: 32000023@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.2024

Аннотация. Активно исследуется целесообразность использования метформина неoadъювантно для повышения эффективности химиотерапии рака молочной железы (РМЖ). Известны его эффекты, способствующие подавлению роста опухоли *in vitro*. Неоднозначны результаты клинических экспериментальных исследований *in vivo*. В нашем исследовании наряду с изучением его местных эффектов на метаболизм карцином РМЖ, также изучены его системные эффекты, в частности влияние на метаболизм циркулирующих в системном кровотоке эритроцитов. Выявлены его эффекты на катаболизм аденозина – сигнальной молекулы, участвующей в канцерогенезе. В опухолях определили взаимосвязь приёма метформина с повышением активности аденозиндезаминазы и катаболизма обмена аденозина. При этом регистрировали снижение активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГПО) и нарастание уровней малонового диальдегида, что прогностически неблагоприятно поскольку может способствовать формированию агрессивного фенотипа опухоли. В эритроцитах также наблюдали усиление прооксидантных процессов, что может способствовать развитию гемической гипоксии, анемии. Согласно критерию множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H) и медианного теста (χ^2) выявили, что активности АДА и ГПО специфичны, а их активность значимо связана с эффектами метформина: $H = 10,1$ ($p = 0,003$), $\chi^2 = 9,55$ ($p = 0,002$). Учитывая полученные результаты, целесообразность использования метформина в комплексной терапии РМЖ выглядит сомнительной.

Ключевые слова: рак молочной железы, метформин, пурины, глутатионпероксидаза, малоновый диальдегид

ВВЕДЕНИЕ

Среди возможных механизмов повышения эффективности химиотерапии рака молочной железы (РМЖ) исследуются метаболические эффекты бигуанида метформина [1]. Так, перспективным может быть его применение при метрономной химиотерапии РМЖ. Метрономная химиотерапия – особый дробный режим введения препарата, предполагающий снижение риска развития побочных эффектов [2]. Он наиболее удобен для пероральных препаратов, например, фторпиримидинового антиметаболита капецитабина, используемого при лечении РМЖ [3].

В доклинических исследованиях было показано, что метформин – сахароснижающий препарат, который непосредственно ингибирует рост опухолевых клеток и способствует клеточному апоптозу, однако результаты клинических исследований неоднозначны [4].

Так, есть мнение, что у пациенток с сахарным диабетом (СД) приём метформина снижает риск развития РМЖ [5]. Воздействуя на ряд сигнальных путей, вовлечённых в канцерогенез, этот бигуанид имеет многочисленные противоопухолевые эффекты *in vitro*, например, способен подавлять ангиогенез, стромальные сигналы, генерируемые опухоль-ассоциированными фибробластами, макрофагами [4].

В тоже время крайне мало клинических исследований влияния метформина при РМЖ без СД, среди них также имеются противоречия [4]. Это же относится и к трактовке авторами результатов исследований. Так, по данным Т.У. Semiglazova и соавт., добавление метформина при гормонотерапии РМЖ без СД к неoadъювантной гормонотерапии торемифеном на протяжении 4 мес значимо подавляло пролиферативную активность опухоли, согласно 4-х кратному снижению экспрессии её маркера (Ki-67) в группе комбинированной терапии метформином и торемифеном по сравнению только с гормонотерапией торемифеном [1]. Однако известно, что низкая пролиферативная активность эпителиальной опухоли зачастую свидетельствует о формировании агрессивного, резистентного к химиотерапии фенотипа. Это одна из характеристик, так называемого, эпителиально-мезенхимального перехода или трансформации карциномы (ЭМП), характеризующегося инвазией, метастазированием, низкой выживаемостью [6].

Для метформина характерна стимуляция антиоксидантной системы, однако, её механизм не указан. Хотя, безусловно, универсальным фактором канцерогенеза является дисбаланс и усиление прооксидантных процессов на фоне дисфункции антиоксидантной системы, что сопровождается ростом уровня активных метаболитов кислорода (АМК) и свободных радикалов, реализацией их эффектов [7].

Среди эффектов метформина – противовоспалительное действие - на фоне приёма препарата снижаются уровни циркулирующих цитокинов, однако он же при этом имеет иммуносупрессивное действие, что крайне нежелательно при опухолевом процессе. Таким образом, клинические исследования эффективности метформина при химиотерапии РМЖ малочисленны, оставляют целый ряд вопросов. В то время как его метаболитные эффекты в организме пациента практически не исследуются. В Республиканском онкологическом центре имени

акад. Бондаря Г.В., г. Донецк были проведены исследования эффектов метформина на патохимические особенности опухолевого роста как в опухолевых тканях, так и в эритроцитах пациенток, страдающих РМЖ. Дизайн исследования обусловлен вовлеченностью в канцерогенез пуринов. Параллельно определяли активность ключевого фермента антиоксидантной системы – глутатионпероксидазы (ГПО), уровни малонового диальдегида (МДА).

Цель исследования: определить особенности катаболизма аденозина и антиоксидантной системы в эпителиальных опухолях молочной железы на фоне приёма метформина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биохимическое исследование выполнено в 30 образцах аденокарцином молочной железы, по уровню инвазии опухоли соответствовали $T_2N_{0-3}M_0$ и $T_3N_{0-3}M_0$ стадиям. Особенности метаболизма опухоли в каждом случае исследовали в сопоставлении с индивидуальным контролем - визуально нетрансформированными тканями края резекции. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Донецкого государственного медицинского университета им. М. Горького. Наряду с комплексным лечением в соответствии со стандартными протоколами для 15 женщин дополнительно к циклической неоадьювантной полихимиотерапии в течение 2–3 месяцев был добавлен метформин в дозе 1000 мг в день.

Образцы ткани из послеоперационного материала замораживали и хранили при -70°C до использования. Гомогенизацию тканей проводили на льду в фосфатном буфере (35 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH} = 7,0$). Концентрации аденозина, инозина и гипоксантина в гомогенатах определяли методом обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для элюирования использовали 20 мМ раствор аммония хлорида с 2% ацетонитрилом, скорость потока элюента – 1 мл/мин. Для определения активности АДА к 200 мкл гомогената опухоли добавляли 2 мл 10 мМ раствора, инкубировали при 37°C . Реакцию останавливали путем осаждения всех белков ацетонитрилом на 30-й минуте. Ацетонитрил удаляли хлороформом путем экстракции.

Расчет активности АДА производили по степени прироста в реакционной смеси инозина при λ 265 нм. Концентрацию белка в гомогенатах определяли по методу Лоури. Активность ГПО оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя спектрофотометрическим методом его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензойатом [6]. Фотометрически определяли содержание МДА, регистрируя его окрашенные триметиловые комплексы с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при λ 532 нм.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием специализированной для биологических исследований программы «MedStat» (Альфа) и программы «Statistica 5.5» (StatSoft). Различия между тремя и более группами устанавливали с помощью критерия множественных сравнений Краскела-Уоллиса. Корреляционную взаимосвязь между признаками анализировали, рассчитывая ранговый коэффициент корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди пуриновых нуклеозидов аденозин, пожалуй, является основной регуляторной молекулой для целого ряда программ, реализуемых растущей опухолью. В частности, он влияет на активность «запасных путей» синтеза нуклеотидов, подавляя процессы пролиферации опухоли. В тоже время, его избыточные концентрации токсичны для иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы. Вызывая их дисфункцию, аденозин «уводит» опухолевые клетки от иммунного надзора». Также описаны его антиапоптозные эффекты этого нуклеозида, он стимулирует синтез белков антиоксидантной системы [7]. Аденозиндезаминаза (АДА) контролирует клеточные уровни аденозина, запуская его деградацию до мочевиной кислоты.

Методом кластерного анализа выявили неоднородность активности АДА в опухоли, статистически сформированы 2 кластера. В первом оказались образцы опухолей РМЖ пациенток, не получавших метформин. В этом кластере выявлено повышение опухолевой активности АДА до $42,7 \pm 18,1$ нмоль/мин·мг, что в 2,5 раза выше её активности в контроле - $14,6 \pm 5,9$ нмоль/мин·мг ($p < 0,01$). Наши данные хорошо согласуются с исследованиями особенностей активности АДА в карциномах других локализаций [6]. Однако в кластер с максимальной активностью АДА составили образцы тканей опухоли пациенток, принимавших неоадьювантно метформин ($108,3 \pm 36,2$ нмоль/мин·мг, что превышает активность в первом кластере в 2,5 раза, в 7 раз выше контроля).

Аналогично особенностям активности АДА было установлено, что концентрация субстрата аденозиндезаминазной реакции – аденозина в опухолевой ткани у больных с РМЖ, которые принимали метформин, также имела тенденцию к повышению, однако не выявлено статистически достоверных различий с кластером, который составили образцы тканей опухоли пациенток, не принимавших неоадьювантно метформин ($p = 0,71$) (данные приведены в таблице 1). Во всех образцах опухолей уровни аденозина выше, чем в нетрансформированных тканях края резекции ($p = 0,03$).

Данные по содержанию катаболитов пуриновой группы в образцах опухолевой ткани в зависимости от приёма метформина также приведены в таблице 1. Нами установлено достоверное повышение уровней инозина и гипоксантина в образцах тканей РМЖ, составивших 2-й кластер по особенностям активности АДА. В этом кластере нами выявлено повышение концентрации инозина в 2,9 раза по сравнению с опухолями, вошедшими в 1-й кластер. Это хорошо согласуется с выявленными особенностями активности АДА, согласно ранговому

Таблица 1. Содержание катаболитов группы аденозина в аденокарциномах РМЖ, мкмоль/л

Пурин	Аденозин		Инозин		Гипоксантин	
	контроль	опухоль	контроль	опухоль	контроль	опухоль
1-й кластер (n = 15)	50,2 ± 18,7	186,2 ± 56,4	172,6 ± 40,5	42,6 ± 15,6 *	172,6 ± 40,5	711,5 ± 269,5 *
2-й кластер (n = 15)	67,1 ± 20,3	226,8 ± 68,5	172,6 ± 40,5	121,8 ± 41,5	199,3 ± 49,8	2450,2 ± 428,5

Примечание: 1-й кластер – без метформина; 2-й кластер – с метформином;

* - $p < 0,01$; ** - $p < 0,001$ по сравнению с между кластерами

корреляционному анализу Спирмена между активностью АДА и уровнями катаболитов группы аденозина установлена прямая сильная связь (коэффициент Спирмена $\rho = 0,73$ и $\rho = 0,77$, соответственно; $p < 0,05$). Причём, для гипоксантина характерно максимальное нарастание его уровней (в 3,4 раза) в группе с метформином. Вероятно, это может быть связано с особенностями активности ксантиноксидазы в этих образцах РМЖ, поскольку известно, что процессы свободно-радикального окисления угнетают её активность.

В исследуемых образцах опухолей установлено снижение активности ГПО - фермента антиоксидантной системы. Данные представлены в таблице 2. Также проведено исследование содержания ТБК-активного продукта, который не только свидетельствует об интенсивности процессов окисления липидов, но и сам является прооксидантом дикарбонилем, способным повреждать белковые молекулы, вызывать их стойкую дисфункцию.

В образцах, составивших 2-й кластер, установлена минимальная активность ГПО, соответственно $1,92 \pm 0,45$ нмоль/мин·мг, однако не выявлено достоверных различий с контролем этого кластера. Оба показателя ниже, чем нетрансформированные ткани, составлявшие контрольную группу в 1-м кластере (соответственно, $p = 0,002$ и $p = 0,031$). Это указывает на снижение активности ГПО не только в опухолевой, но и в здоровых смежных тканях в группе, получавших метформин. Закономерно были выявлены особенности для уровней МДА в этих тканях (см. табл.2). При этом было выявлено повышение содержания МДА в 1,9 раза даже в контроле 2-го кластера по сравнению с контролем 1-го кластера ($p = 0,004$). Это указывает на интенсификацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и в здоровых тканях на фоне приёма метформина. Одним из механизмов могут быть ингибирующие эффекты препарата на убиквитинредуктазу, чья активность связана с дыхательной цепью митохондрий [9]. Это неизбежно приведёт к повышению продукции активных метаболитов кислорода, активации ПОЛ и к окислительной модификации белков, к которой, например, чувствительна ГПО. Также об усилении прооксидантных процессов в тканях образцов опухоли свидетельствует отрицательная корреляция ГПО и МДА (коэффициент Спирмена $\rho = -0,51$).

Согласно критерию множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H) и медианного теста (χ^2) выявили, что активности АДА и ГПО специфичны, а их активность связана с эффектами метформина: $H = 10,1$ ($p = 0,003$), $\chi^2 = 9,55$ ($p = 0,002$).

Выявленные метаболические особенности было интересно сопоставить с активностью АДА и ГПО непосредственно в клетках, в частности, в безъядерных клетках крови, не имеющих митохондрий, т.е в эритроцитах. Установили, что и активность АДА, и активность ГПО были ниже в группе пациенток, получавших метформин. Соответственно для АДА регистрировали снижение до $4,32 \pm 1,38$ нмоль/мин·мг по сравнению с группой пациенток, не получавших его ($6,32 \pm 0,88$ нмоль/мин·мг; $p < 0,05$). Для ГПО, в этих же подгруппах: $2,58 \pm 0,99$ нмоль/мин·мг и $5,27 \pm 1,02$ нмоль/мин·мг ($p < 0,05$). Данные особенности активности определяли на фоне повышения уровней МДА в группе принимавших метформин в 1,5 раза до $6,11 \pm 0,78$ мкмоль/л по сравнению с его уровнями в группе, не принимавшей данный бигуанид (соответственно, $4,07 \pm 0,55$ мкмоль/л; $p < 0,05$).

Таким образом, в образцах эпителиального рака молочной железы выявлена их метаболическая неоднородность по активности АДА и уровням катаболитов аденозина, обусловленная приёмом метформина. Данные изменения происходят на фоне усиления прооксидантных процессов, в частности при снижении активности ГПО и нарастании уровней МДА. Причём непосредственно в клетках (согласно особенностям их активности в эритроцитах крови) приём метформина может сопровождаться усилением процессов свободно-радикального окисления и окислительной модификацией белков, в том числе ферментов, таких как АДА и ГПО. Для эритроцита это может быть сопряжено с нарушениями обмена гемоглобина и его газотранспортной функции,

Таблица 2. Показатели свободно-радикального окисления в опухолях РМЖ

Фермент	ГПО		МДА	
	контроль	опухоль	контроль	опухоль
1-й кластер	3,88 ± 1,03	2,16 ± 0,52	1,45 ± 0,94	4,38 ± 0,94**
2-й кластер	2,35 ± 0,98	1,92 ± 0,45	2,80 ± 1,16	4,21 ± 1,38 *

Примечание: 1-й кластер – без метформина; 2-й кластер – с метформином;

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ по сравнению с контролем

со снижением времени активной циркуляции эритроцитов. Это ведёт к развитию гемической гипоксии, может способствовать развитию анемического синдрома, что резко ухудшает прогноз по основному заболеванию.

Проведенное впервые одновременное исследование как регионарных эффектов метформина при комплексном лечении РМЖ, так и его системного влияния, в частности на метаболизм эритроцитов, показало, что несмотря на неоднозначные эффекты на метаболизм опухоли, крайне нежелательны его эффекты на обмен эритроцитов. Действительно, прооксидантные процессы играют ключевую роль в злокачественной трансформации тканей, следовательно, их медикаментозное стимулирование может быть крайне неблагоприятным.

Список литературы / References:

1. Semiglazova T.Y., Osipov M., Krivorotko P. Neoadjuvant endocrine therapy in combination with melatonin and metformin in locally advanced breast cancer. *Ann Oncol.*, 2019, no. 30, suppl. 5, pp. 99-103, doi: 10.1093/annonc/mdz241.002.
2. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a b16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes. *Research Results in Pharmacology*, 2022, vol. 8, no. 1, pp. 85-93, doi: 10.3897/rtrpharmacology.8.76363.
3. Алхусейн-Кулягинова М.С., Котиева Е.М., Котиева В.М., Абоу Алоу М.Ш., Додохова М.А., Котиева И.М. Патогенетические аспекты введения соединений с предполагаемым противоопухолевым действием в метрономном режиме (обзор). *Журн. мед.-биол. исследований*, 2023, т. 11, № 3, с. 341-350 [Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Kotieva E.M., Kotieva V.M., Abou Alou M.S., Dodokhova M.A., Kotieva I.M. Pathogenetic Aspects of Metronomic Administration of Compounds with an Alleged Antitumour Effect (Review). *Journal of Medical and Biological Research*, 2023, vol. 11, no. 3, pp. 341-350, doi: 10.37482/2687-1491-Z151 (In Russ.)].
4. Kuznetsov K.O., Safina E.R., Gaimakova D.V., Frolova Y.S., Oganessian I.Y., Sadertdinova A.G., Nazmieva K.A., Islamgulov A.H., Karimova A.R., Galimova A.M., Rizvanova E.V. Metformin and malignant neoplasms: a possible mechanism of antitumor action and prospects for use in practice. *Problems of Endocrinology*, 2022, vol. 68, no. 5, pp. 45-55, doi: 10.14341/probl13097.
5. Chen H., Cook L.S., Tang M.C. Relationship between Diabetes and Diabetes Medications and Risk of Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2019, vol. 28, no. 11, pp. 1802-1808, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0291.
6. Бакурова Е.М. Особенности эпителиальной опухоли при её мезенхимальном переходе. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 4, с. 604-607 [Bakurova E.M. The epithelial tumor metabolism features during its mesenchymal transition. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 4, pp. 604-607 (In Russ.)].
7. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E. R. Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma. *Research Results in Pharmacology*, 2021, vol. 7, no. 4, pp. 81-88, doi: 10.3897/rtrpharmacology.7.71455.
8. Зуйков С.А., Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д., Хомутов Е.В. Повышение активности ферментов катаболизма пуринов как один из факторов патогенеза злокачественных новообразований. *«Новообразование» (Neoplasm)*, 2021, т. 13, № 2 (33), с. 86-90 [Zuikov S.A., Bakurova E.M., Tursunova Y.D., Khomutov E.V. Increasing the activity of purine catabolism enzymes as one of the pathogenesis factors of malignant neoplasms. *Neoplasm*, 2021, vol. 13, no. 2 (33), pp. 86-90 (In Russ.)].
9. Mahmood S.A., Akhtar J., Ahmad U., Badruddeen, B., Khan, M.I. Mechanisms of Action of Metformin. In: *Metformin – Pharmacology and Drug Interactions*. London: IntechOpen, 2021, doi: 10.5772/intechopen.99189.

PATHOCHEMICAL FEATURES OF BREAST CANCER AGAINST THE BACKGROUND OF BIGUANIDE INTAKE

Butenko E.V.

Maksim Gorky Donetsk State Medical University

Il'icha ave., 16, Donetsk, 283003, DPR, Russia; e-mail: 32023@mail.ru

Received 12.08.2024

Abstract. The possibility of metformin using to improve the effectiveness of chemotherapy for breast cancer (BC) is being actively investigated. Its effects for tumor growth suppression in vitro are known, but the results of clinical experimental studies in vivo are equivocal. In our study, along with the its local effects on the metabolism of breast cancer carcinomas investigating, we also studied its systemic effects, in particular its effects on the metabolism of blood flow circulating erythrocytes. Its effects on the catabolism of adenosine, a signaling molecule involved in carcinogenesis, have been investigated. In tumors we determined the relationship of metformin administration with adenosine deaminase increased activity and catabolites of adenosine metabolism levels. At the same time, a decrease in the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPO) and an increase in the levels of malonic dialdehyde were registered, which is prognostically unfavorable because it may contribute to the formation of an aggressive tumor phenotype. In erythrocytes we also observed an increase in pro-oxidant processes, which may contribute to the development of hemic hypoxia and anemia. According to the Kraskell-Wallis multiple comparisons criterion (H) and median test (χ^2) revealed that ADA and GPO activities were specific, and their activity was associated with the effects of metformin: $H = 10.1$ ($p = 0.003$), $\chi^2 = 9.55$ ($p = 0.002$). Taking into account these results, the feasibility of using metformin in the complex therapy of breast cancer looks doubtful.

Key words: breast cancer, metformin, purines, glutathione peroxidase, malonic dialdehyde.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА.

Ботин А.С.^{1,2,3}, Пулин А.М.¹, Каминская Л.А.³, Макарова А.О.³, Кордова А.В.¹

¹ Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН),
Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ

³ ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ) Пушкинский филиал
просп. Науки, 3, г. Пушкино, Московская область, РФ

Поступила в редакцию 01.09.2024

Аннотация. Актуальность проблемы. Туберкулез (ТБ), который вызывается микобактерией туберкулеза (*M. tuberculosis*), является, среди всего многообразия микрофлоры, одной из самых опасных и высококонтагиозных инфекционных патологий, и большим проблемным вопросом всего мирового здравоохранения. При анализе среднестатистических данных годового отчета ВОЗ по заболеваемости туберкулезом в мире, установлено, что каждый год диагностируется более 9 миллионов вновь выявленных случаев заболевания активным туберкулезом, в результате которого ежегодно умирает около 2-х миллионов человек. Этому способствует появление видоизмененных мутирующих штаммов туберкулеза, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), в том числе, подвергшихся внутриклеточной мутации, форм возбудителей туберкулеза, обладающих широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ). Данный факт неопровержимо говорит об острой необходимости совершенствования новых методов профилактики и лечения этого очень серьезного заболевания. Микобактериофаги представляют собой вирусы, которые поражают бактерии, например, такие, как *Mycobacterium* spp., содержащие комплекс *M. tuberculosis*. Фаги и белки, которые получают из фагов, действуют как перспективные антимикробные агенты. Кроме того, фаговые коктейли расширяют спектр лизирующей активности в отношении микобактерий туберкулеза. Научные разработки в плане профилактики и лечения данной патологии доказали положительный эффект при использовании комбинации антибиотиков и фагов для поражения микобактерий туберкулеза. Несмотря на это, имеются ограничения в применении фаготерапии. Современные фундаментальная и прикладная науки, а также практическая медицина проводят ряд клинических исследований для того, чтобы получить ответы на многие вопросы, главным из которых является вопрос о безопасности применения микобактериофагов. Важнейшими ответами на вопросы о широкомасштабном применении микобактериофагов являются следующие: 1) устойчивость возбудителей туберкулеза к микобактериофагам; 2) перенос генов резистентности к антибиотикам; 3) иммунный ответ человека на лечение и профилактику с помощью бактериофагов и т.д. В данной статье рассматриваются преимущества микобактериофагов, по сравнению с альтернативными методами, а также ограничения в их применении с использованием в качестве терапевтических агентов для лечения и профилактики туберкулеза.

Ключевые слова: вирусы, бактериофаги, фаготерапия, микобактериофаги, микобактерии туберкулеза.

ВВЕДЕНИЕ

Важность и глобальность данной проблемы заключается в том, что туберкулез, несмотря на значительный прогресс и серьезные достижения в области фтизиатрии на текущий момент, тем не менее, обоснованно считается, что это заболевание до сих пор остается одной из опаснейших патологий в мире. По одним статистическим данным, в 2022 году туберкулез являлся вторым по смертности инфекционным заболеванием, на первом месте тогда был COVID-19. Согласно данным ВОЗ, всего в мире в 2022 году было диагностировано около 7,5 миллионов новых случаев возникновения очагов этой инфекционной болезни.

Причем, по данным «доковидного» периода в 2018 году туберкулез (ТБ) был и тогда сложнейшей проблемой здравоохранения, когда в тот год было зарегистрировано около 10 миллионов случаев заболевания, из которых 1,5 миллиона завершились скорым летальным исходом. Безусловно, необходимо учитывать тот факт, что многие пациенты болели одновременно и туберкулезом, и «ковидом», что привело к изменениям в статистике, так как основную причину летального исхода относили к одному («доминирующему») заболеванию, а сопутствующее («побочное») заболевание считалось второстепенным, хотя существенно усиливало и ускоряло развитие негативных процессов. Во всяком случае, понятен масштаб проблемы.

Заражение микобактериями туберкулеза происходит различными путями: при чихании больного человека при разговоре, сопровождавшемся кашлем, при попадании в организм здорового человека частиц мокроты больного вместе с пылью, через продукты питания от больного скота, через кожный путь заражения, если кожные покровы повреждены, а также внутриутробно (при поражении туберкулезом материнской плаценты).

Микобактерии туберкулёза сохраняют чрезвычайную устойчивость к факторам внешней среды. Так, например, в домашней пыли, воде, почве, в молочных продуктах (сыр, масло, молоко), данный вид возбудителя может оставаться жизнеспособным примерно год, в захороненных трупах – несколько месяцев, в уличной пыли – 8-12 дней. Микобактерии туберкулеза проявляют устойчивость даже к спиртам, а также щелочам и кислотам. Зато прямые ультрафиолетовые и солнечные лучи убивают этого страшного возбудителя всего за несколько минут, нагревание до 70 градусов – уничтожают микобактерии туберкулеза за 30 мин., кипячение – в течение 5 минут.

Большинство людей, инфицированных *M. tuberculosis*, переносят латентный ТБ. Передача туберкулёза от человека к человеку происходит через аэрозоли инфекционных бацилл. По оценкам, 50 миллионов случаев заражения в год поддерживают пул из ~ 2 миллиардов латентно инфицированных людей. В некоторых случаях инфекция напрямую переходит в активный ТБ. Вместе с реактивацией и повторным инфицированием это приводит к, примерно, в среднем, 9 миллионам новых случаев туберкулёза ежегодно [1].

При латентной инфекции микобактерии находятся в так называемом дормантном состоянии, которое характеризуется пониженной метаболической активностью, неспособностью к росту на плотных питательных средах и резистентностью к антибиотикам. Нередко (до 23% случаев), при латентной инфекции происходит реактивация, т.е. переход возбудителя в активное состояние, обусловленный различными факторами, в том числе активностью Rpf-факторов (resuscitation promoting factor) [2].

Белок RpfB предположительно вносит наибольший вклад в реактивацию, что представляет интерес для создания более эффективных терапевтических вакцин, направленных как на активный, так и на латентный ТБ [3]. Применение Rpf-факторов возможно для разработки новых диагностических тестов и лечения латентного туберкулёза [4,5].

Характеристика *Mycobacterium tuberculosis*. Бактерия *M. tuberculosis* является возбудителем туберкулёза (ТБ), для которого характерно 10 миллионов случаев заболевания в год, из которых 1,5 миллиона с летальным исходом (по данным 2018 года) [6,7]. Среди представителей рода *Mycobacterium* можно выделить несколько других облигатных патогенов, прежде всего *Mycobacterium leprae* (возбудитель проказы), *Mycobacterium africanum* (вызывает симптомы, подобные ТБ, характеризуется более низкой патогенностью) и *Mycobacterium bovis* (возбудитель ТБ крупного рогатого скота) [8].

M. tuberculosis является грамположительным факультативным анаэробом, не способным к образованию спор. При оптимальных условиях ($T=37^{\circ}\text{C}$, доступ кислорода и питательных веществ) время генерации

M. tuberculosis составляет 18–24 ч., образование колоний на твердой питательной среде происходит в течении 3-4 недель. Данный патоген окружен непроницаемой и толстой клеточной стенкой/капсулой, которая состоит из пептидогликана (ПГ), полисахаридов, необычных гликолипидов и липидов. Липиды и гликолипиды представлены в основном длинными цепями жирных кислот, такими как миколовая кислота (МК) [9].

Строение клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis*. Клеточная стенка кислотоустойчивых микроорганизмов, к которым относятся микобактерии, состоит из слоя ПГ, МК и арабиногалактана. Клеточная стенка кислотоустойчивых микроорганизмов имеет сходство с клеточной стенкой как грамположительных (Gr^+), так и грамотрицательных бактерий (Gr^-). По толщине слоя ПГ микобактерий сходен с Gr^+ , однако внешний восковой слой подобен наружной мембране Gr^- (рис. 1) [10].

Клеточная стенка играет ключевую роль во врожденной устойчивости к антибиотикам и вирулентности микобактерий [11]. Данная структура предположительно эволюционировала путем последовательного горизонтального переноса генов [12]. Ядро клеточной стенки *M. tuberculosis* состоит из слоя ПГ, ковалентно связанного с арабиногалактаном, к которому прикреплены уникальные миколовые кислоты (рис. 1). Внутри ядра и за его пределами находятся свободные липиды, фосфатидилинозитол маннозиды, липоманнаны и липоарабиноманнаны.

ПГ *M. tuberculosis* представляет собой довольно динамическую структуру, которая играет ключевую роль для роста клеток, межклеточной коммуникации и инициации иммунного ответа хозяина [10]. Нарушение синтеза

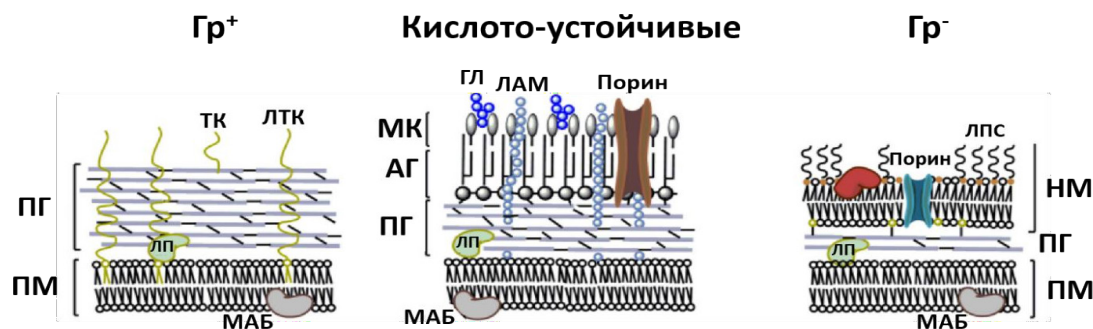


Рисунок 1. Различия в архитектуре клеточной оболочки грамположительных (Gr^+), кислотоустойчивых и грамотрицательных (Gr^-) бактерий [10]. АГ – арабиногалактан; ГЛ – гликолипид; ЛАМ – липоарабиноманнан; ЛП – липопrotein; ЛПС – липополисахарид; ЛТК – липотейхоевая кислота; МК – миколовая кислота; МАН – мембранно-ассоциированный белок; НМ – наружная мембрана; ПГ – пептидогликан; ПМ – плазматическая мембрана; ТК – тейхоевая кислота

ПГ или его расщепление приводит к образованию L-форм, которые могут быть различными у микобактерий. ПГ состоит из гликановых нитей, которые чередуются остатками N-ацетилглюкозамина (НАГ) и N-ацетилмурамовой кислоты (НАМ), связанных друг с другом β -(1 $\rightarrow$ 4)- гликозидными связями.

ПГ микобактерий подвергается некоторым модификациям. ПГ *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* содержит как НАМ, так и N- гликолилмурамовую кислоту, тогда как большинство других бактерий, включая *M. leprae*, содержат исключительно НАМ. Присутствие N-гликолилмурамовой кислоты повышает резистентность ПГ микобактерий к лизоциму [13]. Пептидные цепочки ПГ подвергаются амидированию карбоксильных групп D-изоглутамата (D-iGlu) и остатков мезо-диаминопимелиновой кислоты (мДАП) [13]. Эти модификации ПГ уменьшают отрицательный заряд клеточной стенки, что понижает эффективность антимикробных препаратов (лизоцим; антимикробные пептиды; антибиотики, действующие на клеточную стенку) [10].

ПГ *M. tuberculosis* содержит особенно высокий процент (70-80%) сшитых пептидов, по сравнению с *E. coli* (40-50%). Одна треть пептидных поперечных связей - это DD-(или 4 $\rightarrow$ 3) связи между D-Ala и мДАП, и около две трети составляют LD-(или 3 $\rightarrow$ 3) связи, связывающие два остатка мДАП [14]. LD-связи относительно редко встречаются у других видов бактерий, однако на их долю приходится 80% пептидных сшивок в ПГ dormantных клеток *M. tuberculosis* [15,16].

Введение. Представления о бактериофагах и методах их применения. Бактериофаги (фаги) (от древнегреческого φῑω – «пожирать») – вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Чаще всего бактериофаги размножаются внутри бактерий и вызывают их лизис. Как правило, бактериофаг состоит из белковой оболочки и генетического материала одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или, реже, РНК). Размер частиц приблизительно от 20 до 200 нм [17].

Роль бактериофагов в биосфере. Бактериофаги представляют собой наиболее многочисленную, широко распространенную в биосфере и, предположительно, наиболее эволюционно древнюю группу вирусов. Приблизительный минимальный размер популяции фагов составляет более 1000 фаговых частиц.

В природных условиях фаги встречаются в тех местах, где есть чувствительные к ним бактерии. Чем богаче тот или иной субстрат (почва, выделения человека и животных, вода и т. д.) микроорганизмами, тем в большем количестве в нём встречаются соответствующие фаги. Так, фаги, лизирующие клетки всех видов почвенных микроорганизмов, находятся в почвах. Особенно богаты фагами черноземы и почвы, в которые вносились органические удобрения [18,19].

Бактериофаги выполняют важную роль в контроле численности микробных популяций, в автолизе стареющих клеток, в переносе бактериальных генов, выступая в качестве векторных «систем».

Действительно, бактериофаги представляют собой один из основных подвижных генетических элементов. Посредством трансдукции они приносят в бактериальный геном новые гены. Было подсчитано, что за 1 секунду могут быть инфицированы около 1000 бактерий. Это означает, что постоянный перенос генетического материала распределяется между бактериями, обитающими в сходных условиях.

Высокий уровень специализации, долгосрочное существование, способность быстро репродуцироваться в соответствующем хозяине способствует их сохранению в динамичном балансе среди широкого разнообразия видов бактерий в любой природной экосистеме. Когда подходящий хозяин отсутствует, многие фаги могут сохранять способность к инфицированию на протяжении десятилетий, если не будут уничтожены экстремальными веществами либо условиями внешней среды.

Строение бактериофагов. Бактериофаги различаются по химической структуре, типу нуклеиновой кислоты, морфологии и характеру взаимодействия с бактериями. По размеру бактериальные вирусы в сотни и тысячи раз меньше микробных клеток (рис. 2).

Типичная фаговая частица (вирион) состоит из головки и хвоста. Длина хвоста обычно в 2–4 раза больше диаметра головки. В головке содержится генетический материал – одноцепочечная или двуцепочечная РНК или ДНК с ферментом транскриптазой в неактивном состоянии, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой – капсидом, сохраняющим геном вне клетки.

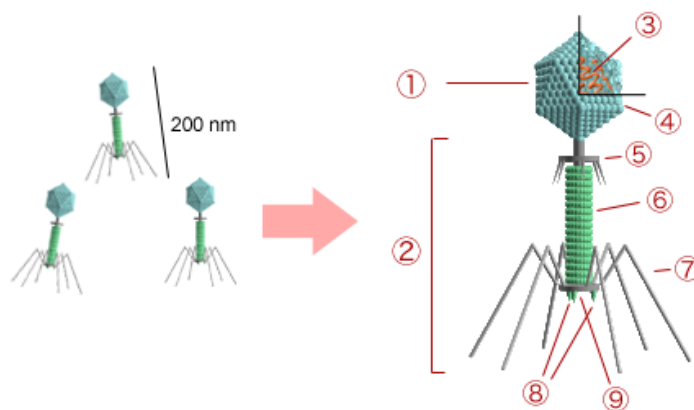


Рисунок 2. Строение бактериофагов [20]. 1 – головка, 2 – хвост, 3 – нуклеиновая кислота, 4 – капсид, 5 – «воротничок», 6 – белковый чехол хвоста, 7 – фибрилла хвоста, 8 – шипы, 9 – базальная пластинка

Нуклеиновая кислота и капсид вместе составляют нуклеокапсид. Бактериофаги могут иметь икосаэдральный капсид, собранный из множества копий одного или двух специфичных белков. Обычно углы состоят из пентамеров белка, а опора каждой стороны из гексамеров того же или сходного белка. Более того, фаги по форме могут быть сферические, лимонovidные или плеоморфные. Хвост представляет собой белковую трубку – продолжение белковой оболочки головки, в основании хвоста имеется АТФ-аза, которая регенерирует энергию для инъекции генетического материала. Существуют также бактериофаги с коротким отростком, не имеющие отростка и нитевидные[21,22].

Фаги, как и все вирусы, являются абсолютными внутриклеточными паразитами. Хотя они переносят всю информацию для запуска собственной репродукции в соответствующем хозяине, у них отсутствуют механизмы для выработки энергии и рибосомы для синтеза белка. У некоторых фагов в геноме содержится несколько тысяч оснований, тогда как фаг G, самый крупный из секвенированных фагов, содержит 480 000 пар оснований – вдвое больше среднего значения для бактерий, хотя всё же недостаточного количества генов для важнейшего бактериального органоида как рибосомы.

Взаимодействие бактериофага с бактериальными клетками. По характеру взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой различают вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги могут только увеличиваться в количестве посредством литического цикла. Процесс взаимодействия вирулентного бактериофага с клеткой складывается из нескольких стадий: адсорбции бактериофага на клетке, проникновения в клетку, биосинтеза компонентов фага и их сборки, выхода бактериофагов из клетки.

Первоначально бактериофаги прикрепляются к фагоспецифическим рецепторам на поверхности бактериальной клетки (рис. 3). Хвост фага с помощью ферментов, находящихся на его конце (в основном лизоцима), локально растворяет оболочку клетки, сокращается и содержащаяся в головке ДНК инъецируется в клетку, при этом белковая оболочка бактериофага остается снаружи. Инъецированная ДНК вызывает полную перестройку метаболизма клетки: прекращается синтез бактериальной ДНК, РНК и белков. ДНК бактериофага начинает транскрибироваться с помощью собственного фермента транскриптазы, который после попадания в бактериальную клетку активируется. Синтезируются сначала ранние, а затем поздние РНК, которые поступают на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются ранние (ДНК-полимеразы, нуклеазы) и поздние (белки капсида и хвостового отростка, ферменты лизоцим, АТФ-аза и транскриптаза) белки бактериофага [23].

Репликация ДНК бактериофага происходит по полуконсервативному механизму и осуществляется с участием собственных ДНК-полимераз.

После синтеза поздних белков и завершения репликации ДНК наступает заключительный процесс – созревание фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц.

Продолжительность этого процесса может составлять от нескольких минут до нескольких часов. Затем происходит лизис клетки, и освобождаются новые зрелые бактериофаги. Иногда фаг инициирует лизирующий цикл, что приводит к лизису клетки и освобождению новых фагов. В качестве альтернативы фаг может инициировать лизогенный цикл, при котором он вместо репликации обратимо взаимодействует с генетической системой клетки-хозяина, интегрируясь в хромосому или сохраняясь в виде плазмиды [24,25].

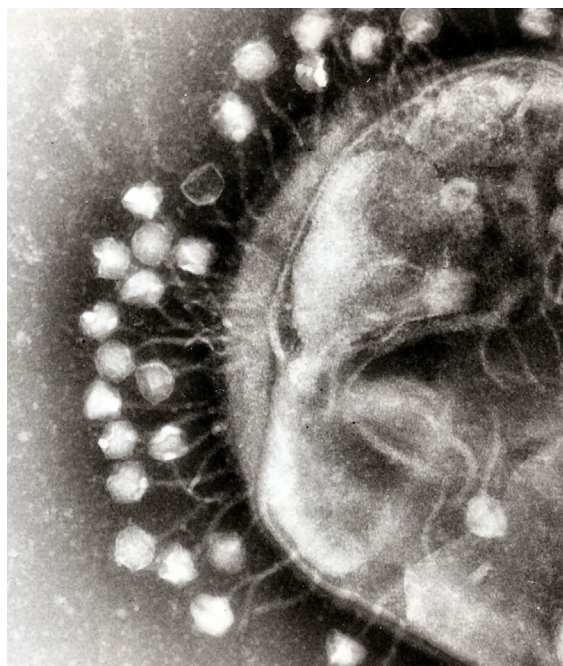


Рисунок 3. Адсорбция бактериофагов на поверхности бактериальной клетки [23]

Таким образом, вирусный геном реплицируется синхронно с ДНК хозяина и делением клетки, а подобное состояние фага называется профагом. Бактерия, содержащая профаг, становится лизогенной до тех пор, пока при определенных условиях или спонтанно профаг не будет стимулирован на осуществление лизирующего цикла репликации. Переход от лизогении к лизису называется лизогенной индукцией или индукцией профага. На индукцию фага оказывает сильное воздействие состояние клетки хозяина, предшествующее индукции, также как наличие питательных веществ и другие условия, имеющие место быть в момент индукции. Скудные условия для роста способствуют лизогенному пути, тогда как хорошие условия способствуют лизирующей реакции.

Очень важным свойством бактериофагов является их специфичность: бактериофаги лизируют культуры определенного вида, более того, существуют так называемые типовые бактериофаги, лизирующие варианты внутри вида, хотя встречаются поливалентные бактериофаги, которые паразитируют в бактериях разных видов.

Жизненный цикл фагов. Умеренные и вирулентные бактериофаги на начальных этапах взаимодействия с бактериальной клеткой имеют одинаковый цикл [26]:

- адсорбция бактериофага на фagosпецифических рецепторах клетки.
- инъекция фаговой нуклеиновой кислоты в клетку хозяина.
- совместная репликация фаговой и бактериальной нуклеиновой кислоты.
- деление клетки.
- далее бактериофаг может развиваться по двум моделям: лизогенный либо литический путь.

Умеренные бактериофаги после деления клетки находятся в состоянии профага (Лизогенный путь) [27].

Вирулентные бактериофаги развиваются по литической модели:

- Нуклеиновая кислота фага направляет синтез ферментов фага, используя для этого белоксинтезирующий аппарат бактерии. Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК и РНК бактерии-хозяина, а ферменты фага совсем расщепляют её; РНК фага «подчиняет» себе клеточный аппарат синтеза белка.

- Нуклеиновая кислота фага реплицируется, и направляет синтез новых белков оболочки. Образуются новые частицы фага в результате спонтанной самосборки белковой оболочки (капсид) вокруг фаговой нуклеиновой кислоты; под контролем РНК фага синтезируется лизозим.

- Лизис клетки: клетка лопается под воздействием лизозима; высвобождается около 200–1000 новых фагов; фаги инфицируют другие бактерии.

Применение фагов в медицине. Одной из областей использования бактериофагов является антибактериальная терапия, альтернативная приёму антибиотиков. Например, применяются бактериофаги: стрептококковый, стафилококковый, клебсиеллёзный, дизентерийный поливалентный, пиобактериофаг, коли, протейный и колипротейный и другие.

Благодаря фагам можно не только вылечить, но и обеспечить надежную профилактику инфекций. Однако многие доктора предпочитают назначать антибиотики, когда можно прекрасно обойтись без них. Зачем же назначать такие сильно действующие средства, когда пациент еще не настолько болен, чтобы применять их? Дело в том, что антибиотики уничтожают всю популяцию бактерий, но вместе с тем убивают полезную микрофлору, вызывая дисбактериоз и другие заболевания [28].

Преимущества фагов перед антибиотиками:

- бактериофаги помогают уничтожить микробы, малочувствительные к антибиотикам, причем они действуют целенаправленно;

- фаги постоянно эволюционируют;
- не вызывают привыкания и побочных эффектов;
- не подавляют и не нарушают действия человеческого организма;
- не оказывают негативного воздействия на иммунитет;
- не вызывают привыкания патогенных бактерий;
- их можно сочетать со всеми лекарственными препаратами;
- можно использовать в качестве профилактики бактериальных инфекций;
- они оказывают положительное влияние на становление иммунитета.

Многие современные инфекционисты уверены, что фаготерапия в скором будущем совершит революцию в борьбе с различными заболеваниями. Кроме того, фаги можно использовать в качестве профилактики бактериальных инфекций. На сегодняшний день можно приобрести различные лекарственные средства, которые содержат живые бактериофаги. Фаги вводят в гели, где они сохраняют свою жизнеспособность, в том числе различные гели-спреи. Они уничтожают стрептококковые, стафилококковые бактерии, а также микроорганизмы из рода Эшерихий, Протей, Клебсиелл, Псевдомонад [29].

Интерес к бактериофагам возрос в связи с возможностью их применения против широко распространенных лекарственно-устойчивых форм патогенных и условно-патогенных бактерий. Имеются препараты Б (Бактериофаги) для лечения и профилактики заболеваний, вызванных некоторыми кокками, энтеробактериями и псевдомонадами, Эффективным является лечение Б (Бактериофагами) в сочетании с антибиотиками. Препараты Б (Бактериофагов) выпускают в виде таблеток с кислотоустойчивой оболочкой, мазей, аэрозолей, свечей, в жидком виде. Употребляют их для орошения, смазывания раневых поверхностей, вводят перорально, иногда внутривенно и т.д. [30,31].

Лабораторная диагностика с использованием фагов. Фаготипирование (фаго- + типирование) – определение принадлежности выделенного бактериального штамма к тому или иному фаготипу; применяется, как правило, в интересах эпидемиологического анализа.

Фагодиагностика (фаго- + диагностика) – диагностика инфекционных болезней, основанная на применении стандартных препаратов бактериофагов для идентификации видовой принадлежности бактерий, выделенных из организма больного.

Выявить бактериофаги можно при нанесении содержащего их материала на плотные питательные среды, засеянные чувствительной бактериальной культурой, на которой появляются зоны лизиса бактерий – бляшки (стерильные пятна, негативные колонии). Число этих бляшек соответствует количеству Б. в материале – титру Б. Титровать Б. можно на жидких (по Аппельману) и твердых (по Грациа) [45] питательных средах. Важным свойством фагов, на котором основана фагодиагностика, является их специфичность: они лизируют культуры определенного вида, более того, существуют так называемые типовые бактериофаги, лизирующие варианты вида бактерий [32,33].

Одним из методов внутривидовой идентификации бактерий, имеющих значение для выявления эпидемической цепочки заболевания, является фаготипирование. На чашку с питательной средой, засеянную чистой культурой возбудителя, наносят по капле различные диагностические Б. Если бактерии чувствительны к данному Б., наблюдается образование бляшек. Возбудитель может быть чувствительным к одному или нескольким фагам, в последнем случае определяют его фагограмму. Спектр чувствительности возбудителя к фагам называют фаготипом, или фаговаром. Определяют фаготип выделенной из исследуемого материала культуры возбудителя при брюшном тифе, паратифе В, стафилококковой инфекции с помощью специальных диагностических наборов. При брюшном тифе используют Vi-брюшнотифозные бактериофаги, лизирующие сальмонеллы, содержащие Vi-антиген. С целью дифференциации биотипов (биоваров) холерного вибриона (*cholerae* фагового и *eltor*) наряду с другими признаками изучают их отношение к фагам С и *eltor* [34].

Бактериофаги применяются также в генной инженерии в качестве векторов, переносящих участки ДНК, возможна также естественная передача генов между бактериями посредством некоторых фагов (трансдукция).

Фаговые векторы обычно создают на базе умеренного бактериофага λ , содержащего двухцепочечную линейную молекулу системы ДНК. Левое и правое плечи фага имеют все гены, необходимые для литического цикла (репликации, размножения). Средняя часть генома бактериофага λ (содержит гены, контролирующие лизогению, то есть его интеграцию в ДНК бактериальной клетки) не существенна для его размножения и составляет примерно 25 тысяч пар нуклеотидов. Данная часть может быть заменена на чужеродный фрагмент ДНК. Такие модифицированные фаги проходят литический цикл, но лизогения не происходит. Векторы на основе бактериофага λ используют для клонирования фрагментов ДНК эукариот (то есть большее число крупных генов) размером до 23 т.п.н. Причем, фаги без вставок, – менее 38 т.п.н или, напротив, со слишком большими вставками – более 52 т.п.н не размножаются и не поражают бактерии [35,36].

Бактериофаги в биологии. Бактериофаги M13, фаг T4, T7 и фаг λ используют для изучения белок-белковых, белок-пептидных временной и ДНК-белковых взаимодействий методом фагового дисплея [36].

Поскольку размножение бактериофага возможно только в живых клетках, бактериофаги могут быть использованы для определения жизнеспособности бактерий. Данное направление имеет большие перспективы, поскольку, одним из основных вопросов при разных биотехнологических процессах является определение жизнеспособности используемых культур. С помощью метода электрооптического анализа клеточных суспензий была показана возможность изучения этапов взаимодействия фаг - микробная клетка.

При экспертном сравнении нескольких современных, исследуемых экспериментальных подходов, можно утверждать, что фаготерапия является весьма перспективным направлением с огромным потенциалом эффективного массового применения.

Как видно, в данной работе изложены современные представления о фундаментальной биологии бактериофагов, на этой основе будет проведено исследование современных подходов в области производства бактериофагов. Выполнена концепция прототипа принципиальной схемы производства бактериофагов, включая и микобактериофаги.

Применение бактериофагов к возбудителям туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*.

Поскольку, микобактериальные инфекции являются очень серьезной проблемой в современной медицине, поэтому особенно актуальна задача борьбы с возбудителями туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* – мультирезистентными штаммами (MDR) и штаммами с широкой лекарственной устойчивостью (XDR). В современном мире проводится интенсивный поиск принципиально других, альтернативных антибиотикам, средств лечения туберкулеза, вот почему бактериофаги рассматриваются как весьма перспективное направление, хорошо зарекомендовавшее себя на других возбудителях бактериальной природы.

Уникальное свойство бактериофагов уничтожать микобактерии *in vitro* изучено неплохо, но данных о фаготерапии для людей с микобактериальными инфекциями вообще, и конкретно с туберкулезом в частности представлено мало.

Важнейшей фактом, является то, что микобактерии по сути есть внутриклеточные паразиты, которые живут внутри клеток хозяина. Поэтому, на них не действует большинство антибиотиков, и до них значительно труднее добраться бактериофагам. Таким образом, внедрение фаготерапии микобактериальных инфекций требует решения проблемы доставки бактериофагов внутрь клетки-хозяина. Здесь анализируются способы доставки бактериофагов к мишеням - микобактериям.

В частности, весьма перспективный метод доставки фагов в клетки человека – использование самых микобактерий, но невирулентного быстрорастущего вида *Mycobacterium smegmatis*, который не вызывает заболевания даже у людей с подавленным иммунитетом. Применение фаготерапии с *M. smegmatis* может решать ряд задач: 1) служить носителем, для доставки бактериофагов внутри себя в клетки хозяина, где фаги высвобождаются и заражают вирулентные микобактерии; 2) быть бактерией-мишенью и обеспечивать быстрое увеличение численности бактериофагов; 3) повышать скорость заражения патогенов бактериофагами и т.д. [37].

Другой возможный метод доставки фагов патогенных микобактерий-мишеней заключается в использовании липосом.

Профилактика туберкулеза и лечение путем сочетания воздействия лекарственных препаратов и бактериофагов, может быть первичной, когда проводится у здоровых лиц, не инфицированных микобактериями туберкулеза, но которые находятся в контакте с больными туберкулезом, и вторичной – у пациентов, инфицированных или переболевших туберкулезом в прошлом. Профилактика туберкулеза и лечение путем первичной химиопрофилактики в сочетании с бактериофагами снижает не только саму заболеваемость, но и инфицированность, подавляя туберкулез в самом начальном инкубационном периоде, вторичная профилактика такого типа – предупреждает проявление экзогенной суперинфекции и активизацию эндогенной инфекции туберкулеза.

Особенности производства бактериофагов. Биотехнология производства препаратов бактериофагов основана на использовании бактериальных клеток, в которых бактериофаги размножаются. Для заражения бактериальных клеток к растущей в жидкой среде, культуре чувствительных бактерий, в небольшом количестве добавляют частицы вирулентного бактериофага. Длительность периода, от начала заражения клеток бактерий до их лизиса, зависит от природы бактериофага, бактерий и условий культивирования. Развитие вирулентного бактериофага в восприимчивой бактериальной клетке проходит несколько стадий: от прикрепления бактериофага к клетке бактерии, проникновения ДНК бактериофага внутрь клетки микроорганизма, синтеза белковых оболочек новых вирусных частиц до высвобождения новых частиц бактериофагов при лизисе бактериальной клетки, которые заражают другие клетки бактерий. Препараты бактериофагов получают лабораторными и промышленными способами [38,39].

Культивирование вирусов бактерий (бактериофагов) отличается простотой, коротким периодом генерации, высоким выходом новых частиц, возможностью точного количественного учета, что способствует изучению структуры вирусных частиц и механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой [39].

Бактериофаги получают в жидком и сухом виде, лабораторным и промышленным способом. Технологический процесс производства жидких бактериофагов состоит из пяти этапов:

- 1) подбора штаммов для производства данного вида бактериофага;
- 2) получение маточных бактериофагов;
- 3) приготовление серии жидкого бактериофага;
- 4) контроль готового препарата на стерильность, безвредность, литическую активность;
- 5) этикетирование, упаковка препарата.

В лабораторных условиях бактериофаги получают путем фильтрации лизированных бульонных культур бактерий через мелкопористые бактериальные фильтры.

Для выделения бактериофага исследуемый материал (воду, гной, продукты экскреции, почву и др.) засевают в жидкую питательную среду, наиболее благоприятную для развития тех микроорганизмов, против которых действует бактериофаг. Среду оставляют в термостате на несколько часов. Иногда производят предварительное обогащение питательной среды чистой культурой соответствующего микроба, не выделяющего бактериофаг. Помутневшую питательную среду пропускают через бумажный и бактериальный фильтр, асбестовые пластины, керамические свечи. Полученный фильтрат проверяют на присутствие бактериофага путем засева совместно с соответствующей микробной культурой на плотные (методом стекающей капли – проба Отто) [40,41] или жидкие питательные среды. После стадии инкубации в течение восемнадцати часов при наличии бактериофага на поверхности агар-агара появляется налет культуры, а на месте растекающейся капли, в зависимости от содержания частиц бактериофага в фильтрате, бактериальный рост полностью отсутствует или наблюдаются округлые стерильные пятна – колонии бактериофага.

На жидкой питательной среде присутствие бактериофага обуславливает просветление культуры. Для выделения чистой культуры бактериофага материал из отдельного стерильного пятна переносят бактериологической иглой в суспензию молодой микробной культуры, повторяя операцию выделения пять-десять раз для гарантии чистоты бактериофага. Материал из последнего стерильного пятна засевают вместе с чувствительными микробами на жидкую питательную среду. После инкубации в течение 6-18 часов культуру фильтруют, проводят несколько пассажей для увеличения количества корпускул бактериофагов и получают чистую культуру бактериофага. Выделенный из внешней среды, бактериофаг, культивируемый в лабораторных условиях на соответствующей культуре бактерий, называется маточным штаммом соответствующего бактериофага.

Промышленная технология получения бактериофагов включает следующие этапы:

- 1) выделение бактериофагов из лизогенных культур бактерий (из внешней среды, от людей и животных);
- 2) приготовление суспензии бактериофагов путем смыва их частиц с поверхности негативной колонии, образовавшейся после лизиса бактерий на плотной питательной среде;
- 3) титрование бактериофагов методом агаровых слоев или методом Аппельмана;

- 4) внесение суспензии бактериофага в молодую культуру бактерий для получения биопрепарата;
- 5) очистка биопрепарата от питательной среды с использованием центрифугирования, капельного диализа, фильтрации в агар-агар;
- 6) приготовление концентрированных суспензий бактериофагов;
- 7) расфасовка, упаковка, маркировка;
- 8) контроль качества готовых препаратов [42].

В производственных условиях для изготовления препарата бактериофага применяются апробированные штаммы бактериофагов и культуры соответствующих микробов, обладающих типичными морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Штаммы бактериофагов (музейные, рабочие) на производстве называют маточными бактериофагами. Музейные производственные штаммы бактериофагов ежегодно обновляются путем выделения новых или пассажами имеющихся штаммов бактериофага через организм больного, а также адаптацией к свежeweделенным, резистентным к данному бактериофагу культурам. Маточный бактериофаг размножается и пассируется только на соответствующей культуре в жидкой питательной среде, например, брюшнотифозный бактериофаг пассируется на культуре брюшнотифозной палочки в бульоне Мартена. Рабочий маточный бактериофаг готовится из очередной серии музейного штамма бактериофага, отдельно на каждом из производственных штаммов микробов [42]. Препарат бактериофага представляет собой фильтрат бульонной культуры соответствующих лизированных микробов. Он содержит большое количество размножившихся бактериофагов, обладающих специфическими лизирующими свойствами. Промышленное производство бактериофагов осуществляется в реакторах, емкостью от 250 до 1000 литров, с применением аэрации, стимулирующей развитие микроорганизмов. Для производства бактериофага используется рабочая маточная раса и соответствующие культуры микробов. В биореакторе, например, для изготовления брюшнотифозного и дизентерийного бактериофага используется жидкая питательная среда Мартена или Хоттингера, рН 7,4-7,6, стерилизуемая при температуре 110°C в течение 40 минут. После стерилизации среда охлаждается до 39°C и засеивается соответствующей микробной культурой и маточным бактериофагом. Для засева используют агаровые культуры, которые прибавляются из расчета 50 млн. микробных тел на 1 мл среды. Бактериофаг добавляется в количестве не более 0,3 % по отношению к объему питательной среды. Среда с засеянными в ней культурой и бактериофагом оставляют при температуре 37°C на 6-18 часов. Бактериофаги активно размножаются внутри бактериальных клеток, увеличиваясь в количестве и вызывая их лизис, что внешне проявляется полным просветлением среды. К полученному раствору лизата добавляют консервант (фенол 0,25 % или хинозол 0,01 %), примерно через два часа содержимое реактора фильтруется через бактериальные фильтры для удаления оставшихся микробных клеток. Полученный препарат представляет собой прозрачную жидкость желтого цвета большей или меньшей интенсивности окраски.

Контроль бактериофаговых препаратов проводят на чистоту, активность, специфичность, стерильность, безвредность, литическую активность (вирулентность).

Стерильность проверяют высевом на питательные среды, культивированием в термостате при температуре 37°C для выявления бактериальной микрофлоры и при 24°C – для выявления грибковой флоры. Препарат считается годным, если через восемь суток в средах не обнаруживается рост микроорганизмов. При выявлении роста бактерий или грибов в одной из пробирок проводят повторный контроль из удвоенного количества образцов. При повторном проросте сред препарат бракуют [43,44].

Активность и специфичность бактериофагов устанавливают на жидких и твердых питательных средах титрованием с соответствующим видом бактерий.

Если результаты проверки не соответствуют требованиям инструкции по изготовлению и контролю, такой препарат не подлежит выпуску. Безвредность препарата проверяют путем введения лабораторным животным, например, брюшнотифозный и дизентерийный бактериофаги вводят подкожно трем мышам по 1 мл, или кролику внутривенно 5 мл. Наблюдение за животными ведется в течение трех-четырех суток; если препарат безвреден, животные остаются здоровыми и бодрыми.

Литическая активность бактериофага (вирулентность) определяется методом титрования на жидкой и плотной питательной среде. Определение вирулентности бактериофагов методом Аппельмана проводится на жидких питательных средах путем установления максимального разведения, вызывающего полный лизис бульонной культуры бактерий. Титр бактериофага выражается максимальным разведением, при котором произошел полный лизис соответствующей культуры, например, титр бактериофага, давшего лизис в первых семи пробирках ряда, равен 10^{-7} . Определение вирулентности на плотной питательной среде методом Отто (стекающей капли) или капельный метод заключается во внесении капли исследуемого бактериофага определенного разведения на засеянный сплошным газоном соответствующей культуры с последующим термостатированием (табл. 1). Результат учитывается по степени лизиса и обозначается плюсами.

Степень лизиса.

Метод Аппельмана на жидкой питательной среде

Метод Отто на плотной питательной среде.

++++ абсолютная прозрачность среды, равная стерильному бульону полный лизис, на месте закапывания бактериофага культура не растет;

+++ почти полная прозрачность, лишь незначительно отличающаяся от стерильного бульона, лизис с наличием единичных колоний культуры;

Таблица 1. Определение вирулентности (литической активности) бактериофагов разными методами [45]

Активность Бактериофагов	Штамм бактериофага									
	A-1	CS-1	CS-2	ЮН-1	ЮН-2	SPZ-1	SPZ-2	SPZ-3	C-1	G-1
По методу Апель-мана	10^{-10}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-9}
По методу Грация (БОЕ/см ³)	$2,0 \times 10^{11}$	$5,2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{10}$

++ муть, значительная по сравнению со стерильным бульоном, но незначительная по сравнению с контролем, лизис в виде сливных участков с островками роста культуры;

+ явная муть, но более слабая, чем в контроле лизис в виде отдельных стерильных пятен на сплошном газоне культуры - муть, как в контроле сплошной рост культуры, не обнаруживается ни одного стерильного пятна.

За титр бактериофага при определении методом Апельмана принимают то наибольшее разведение его, которое вызывает полное растворение соответствующих микробов. Бактериофаги выпускают с определенными титрами, не ниже установленных по инструкции. Производственные штаммы, содержащие Vi-антиген, должны лизироваться маточным бактериофагом в титре не менее 10^{-8} по методу Апельмана; содержащие 0-антиген, не менее 10^{-6} . Например, титр брюшнотифозного бактериофага со всеми штаммами, входящими в титрование, должен быть не ниже 10^{-7} для штаммов, находящихся в Vi-форме, не ниже 10^{-6} для штаммов, находящихся в 0-форме.

После проведения контроля бактериофаг разливается во флаконы нейтрального стекла (по 25, 50 и 100 мл) с резиновой пробкой соответствующего размера, залитые смолкой. Срок годности брюшнотифозного, стафилококкового и стрептококкового бактериофагов – один год, некоторых – два года [46].

Технологический процесс производства сухих бактериофагов включает:

- 1) работу с производственными штаммами бактерий;
- 2) получение маточных бактериофагов;
- 3) приготовление серии жидкого бактериофага;
- 4) получение серии сухого бактериофага;
- 5) контроля качества готового препарата;
- 6) этикетирование, упаковка препарата.

Для получения сухих препаратов бактериофагов, жидкий фаголизат осаждается серноокислым аммонием. Выпавший осадок отделяется от жидкой части, к сырой массе добавляется в качестве стабилизатора глюконат кальция (9 %), смесь тщательно растирается, замораживается при температуре минус 30°C и высушивается под вакуумом. Выпускается сухой бактериофаг в таблетках, которые содержат стабилизированную субстанцию фаголизата, таблеточную смесь (глюкозу, глюконат кальция, тальк, стеарин) и покрыты защитной кислотоустойчивой оболочкой из ацетилцеллюлозы. Одна таблетка сухого бактериофага соответствует 20-25 мл жидкого. К сухим бактериофагам предъявляются в отношении стерильности и безвредности те же требования, что и к жидким. Титр сухих бактериофагов устанавливается в соответствии с их лизирующей активностью, по отношению к разным видам и типам микробов. Срок годности сухих бактериофагов 1 год.

Выявление фаговых частиц и определение их количества. Число бактериофагов или зараженных бактериальных клеток в суспензии определяют внесением разведенной суспензии на чашку Петри с агар-агаром, поверхность которого покрыта разбавленной суспензией чувствительных бактерий. После инкубации поверхность чашки будет покрыта сплошным слоем бактерий, за исключением мест, где были внесены частицы бактериофага или зараженные клетки бактерий. Вокруг таких точек пленка бактерий разрушается, образуются прозрачные зоны лизиса – бляшки. Для определения числа частиц бактериофагов, содержащихся в суспензии, избирательно убивающие присутствующие в ней зараженные клетки хлороформом, к которому бактериофаги устойчивы [47,48].

Выделение и очистка бактериофагов. Для выделения бактериофагов, которые способны развиваться в определенных видах или штаммах бактерий используют метод подсчета числа бляшек. Для этого пробу материала из природного местообитания бактерии встряхивают с водой, освобождают суспензию от бактерий, пропуская ее через мембранный фильтр или обрабатывая хлороформом; аликвоты смешивают с суспензией бактерий и высеваяют на чашки с агар-агаром. Бляшка, которая выявляется на чашках, соответствует присутствующему в природном материале бактериофагу.

Бактериофаг из отдельной бляшки выделяют прикосновением к ней стерильной иглой и суспензируют прилипший к игле материал в небольшом объеме стерильного раствора. В суспензии количество бактериофагов будет содержаться от 10^4 до 10^6 частиц бактериофагов. Очистку бактериофагов осуществляют последовательным выделением из отдельной бляшки.

Для получения больших количеств бактериофага для химического или физического исследования заражают бактериофагом растущую в жидкой среде в экспоненциальной фазе культуру бактерий. В результате нескольких циклов развития бактериофага большинство или все клетки культуры бактерий лизируются. Оставшиеся в культуре клетки и их обломки удаляют низкоскоростным центрифугированием, получившуюся

жидкость стерилизуют фильтрованием или хлороформом. Стерильный лизат содержит от 10^9 до 10^{12} частиц бактериофагов в 1 мл, растворимый материал, фракцию частиц, которые освобождаются из клеток при лизисе. Ультрацентрифугирование используют для окончательной очистки бактериофагов, предварительно вирусные частицы осаждают сульфатом аммония или другими веществами [49,50].

Высокая специфичность некоторых штаммов бактериофагов позволяет использовать их для диагностики инфекционных заболеваний, индикации патогенных микроорганизмов в медицине, ветеринарии, фитопатологии. С помощью фагоиндикации устанавливают природу возбудителя инфекции, когда другие методы, например, серологические, оказываются неэффективными. Бактериофаги применяются в борьбе с бактериальными вредителями технических брожений, в производстве ферментов, для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний. Бактериофаги используются в научных исследованиях, как экспериментальная модель в генной инженерии, например, для создания библиотек генов, молекулярной биологии, биохимии, биофизике.

Заключение иммунологов: Иммунологи считают, что использование бактериофагов позволит добиться положительных результатов в тех областях, в которых бессильна иммунотерапия.

Заключение аналитиков: Согласно результатам аналитических исследований, в течение следующих нескольких лет производство бактериофагов будет одной из самых перспективных отраслей в фармакологии.

Бактериофаги являются естественными средствами борьбы с бактериями.

Специфика внедрения бактериофагов. Фармацевтическая индустрия проявляет интерес к фаготерапии: наблюдается большое число научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по разработке препаратов для лечения различных заболеваний и разных областей применения.

Это связано с ростом потребности в инновационных препаратах для лечения инфекционных заболеваний из-за повышения резистентности к антибиотикам. Число использования противoinфекционных препаратов выросло за последнее десятилетие, что привело к росту бактериорезистентности. Фармацевтические компании исчерпали свои ресурсы из-за непрерывного запуска новых антибактериальных препаратов с более сильными дозировками.

Этот фактор приводит к увеличению получения новых видов устойчивых к антибиотикам штаммов вирусов. В настоящее время антибиотики в конвейере разработки фармацевтических продуктов в основном являются вариациями уже существующих лекарств. Эти препараты быстро устаревают в связи с постоянными мутациями существующих заболеваний, что ведет к повышению спроса на бактериофаги [51].

Заключение.

Терапии фагами и антибиотиками. Преимущества и недостатки. Проблемы и решения в использовании микобактериофагов при лечении туберкулеза.

Микобактериофаги в основном имеют ограниченный спектр хозяина (узкий), который может быть решен за счет наличия богатой базы данных по фагам, а также за счет использования методов биоинженерии. Из-за внутриклеточной природы строения *M. tuberculosis* доступ фагов к бактерии затруднен. Однако при использовании носителей, таких как *M. smegmatis*, и фаговой инкапсуляции, фаг может транспортироваться и достигать бактерий.

Были предложены некоторые стратегии ингибирования устойчивости бактерий к фагам, включая использование так называемых фаговых коктейлей, вместо монотерапии, и применение фаговой инженерии, которая выходит за рамки простой фаговой монотерапии для предотвращения устойчивости, такие как комплексные мультифаговые коктейли, фаговая инженерия и последующее комбинирование фагов с антибиотиками.

Микобактериофаги продемонстрировали синергизм с противомикробными средствами, например, рифампицином и изониазидом. Наконец, было определено, что микобактериофаги эффективны в ингибировании *M. tuberculosis* одинаково в фазе *lag* и *log* в течение нескольких недель. Эти результаты оказывают значительное влияние на разработанную фаготерапию микобактерий.

Терапевтическое использование микобактериофагов. Опубликованы результаты лечения 20 случаев инфекции, вызванных высокорезистентными штаммами *M. abscessus*. Как минимум в 11 случаях были отмечены благоприятные клинические или микробиологические результаты фаговой терапии, в 5 случаях – неполное излечение и в 4 случаях – незначительные изменения эффекта терапии [52].

Еще один случай успешной микобактериофаговой терапии описан при лечении в течение года инфекции *M. Abscessus* у пациента с муковисцидозом в 2022 г. У пациента была достигнута эрадикация патогена, он был повторно включен в список для двусторонней трансплантации легких [53].

В этом же 2022 году был опубликован случай успешной фаговой терапии при внутривенном введении микобактериофага на фоне антибиотикотерапии пациенту с высокорезистентной кожной инфекцией *Mycobacterium chelonae* [54].

Сообщений об успешном применении микобактериофагов в качестве терапевтических препаратов пока не опубликовано. Трудности данного типа терапии заключаются в том, что клетки *M. tuberculosis* способны выживать внутри фагосом макрофагов, возможность доставки микобактериофагов в которые остается дискуссионной. На данный момент предложено два способа доставки фагов внутрь макрофагов: использование

Таблица 2. Сравнительная характеристика терапии фагами и антибиотиками

Бактериофаги	Антибиотики
Фаги бактерицидны и высокоэффективны по отношению к микробам – мишеням.	Многие антибиотики бактериостатичны, то есть блокируют рост бактерий в большей степени, чем уничтожают их.
Специфичность фага требует идентификации возбудителя для выбора терапевтически активного фага. Возможно назначение поликомпонентного препарата для определения фагочувствительности.	Антибиотики необходимо назначать после определения резистентности возбудителя к препаратам.
Фаги размножаются в бактериях – мишенях, после чего выводятся из организма.	Метаболизируются в организме, после чего выводятся. Абсолютной концентрации в микробах нет.
Фармакокинетика фагов оригинальна: инициальная доза при наличии бактерий – мишеней увеличивается экспоненциально до тех пор, пока существуют бактерии – мишени. При их наличии нет необходимости в дополнительном введении специфических бактериофагов.	Для лечения заболевания требуется повторное введение антибиотиков.
Высокая специфичность бактериофагов позволяет им воздействовать на патоген – мишень, не изменяя другую флору и не колонизируя макроорганизм.	Антибиотики оказывают бактерицидный или бактериостатический эффект на любую флору в организме, в т.ч. и на аутохтонную, что чревато нежелательными эффектами.
Специфичность фагов не позволяет формировать устойчивость к фагам у других возбудителей.	Широкий спектр антимикробной активности антибиотика может быть причиной устойчивости многих патогенов.
Человек контактирует с фагами на протяжении всей жизни, но побочных эффектов не описано.	При контакте с антибиотиками описаны аллергия, желудочно – кишечные расстройства, вторичные грибковые инфекции.
Распространенность фагов – причина того, что селекция новых фагов, специфичных к ранее устойчивой флоре, занимает недели – дни.	Создание новых антибиотиков против резистентной флоры занимает годы.
Фаги можно рассматривать как альтернативу антибиотикам при сенсibilизации пациента.	Аллергия на антибиотик существенно затрудняет подбор препарата.

липосомированных препаратов микобактериофагов и авирулентных микобактерий для реализации стратегии «Троянский конь» [55, 56].

Глобальное распространение во всем мире штаммов *M. tuberculosis*, обладающих широкой лекарственной устойчивостью, и рост заболеваемости туберкулезом, вызванным подобными штаммами, указывает на необходимость поиска новых терапевтических препаратов, в т.ч. микобактериофагов или их компонентов, в комбинации с уже известными противотуберкулезными препаратами. [57]

Таким образом, бактериофаги являются принципиально иной возможностью при соревновании с противомикробными препаратами, поскольку фаги обладают уникальными преимуществами, такими как очень высокая специфичность к бактерии-мишени, способность к длительному воздействию, бактериофаги активны в отношении делящихся или не делящихся бактериальных клеток.

Список литературы / References:

1. Sable S.B., Posey J.E., Scriba T.J. Tuberculosis Vaccine Development: Progress in Clinical Evaluation. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, vol. 33, pp. 1-30.
2. Nikitushkin V.D., Demina G.R., Kaprelyants A.S. Rpf proteins are the factors of reactivation of the dormant forms of actinobacteria. *Biochemistry* (Moscow), 2016, vol. 81, pp. 1719-1734.
3. Dusthacker A. et al. Differential culturability of Mycobacterium tuberculosis in culture-negative sputum of patients with pulmonary tuberculosis and in a simulated model of dormancy. *Frontiers in Microbiology*, 2019, vol. 10, pp. 1-9.
4. Ivanyi J. et al. Advancing Immunotherapeutic Vaccine Strategies Against Pulmonary Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11, pp. 1-10.
5. Raivio T. et al. Resuscitation of Dormant «Non-culturable» Mycobacterium tuberculosis Is Characterized by Immediate Transcriptional Burst. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, vol. 1, p. 272.
6. Allue-Guardia A., Garcia J.I., Torrelles J.B. Evolution of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Frontiers in Microbiology*, 2021, vol. 12, pp. 1-21.
7. Sia J.K., Rengarajan J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis Infections. *ASM Press.*, 2019, vol. 12, pp. 1056-1086.

8. Mangtani P. et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Infectious Diseases*, 2014, vol. 58, pp. 470-480.
9. Gengenbacher M.S., Kaufmann H.E. Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, vol. 36, pp. 514-532.
10. Maitra A. et al. Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, vol. 43, pp. 548-575.
11. Becker K., Sander P. Mycobacterium tuberculosis lipoproteins in virulence and immunity – fighting with a double-edged sword. *FEBS Letters*, 2016, vol. 21, pp. 3800-3819.
12. Vincent A.T. et al. The mycobacterial cell envelope: A relict from the past or the result of recent evolution? *Microbiology*, 2018, vol. 9, pp. 1-9.
13. Mahapatra S. et al. Unique structural features of the peptidoglycan of Mycobacterium leprae. *Journal of Bacteriology*, 2008, no. 2 (190), pp. 655-661.
14. Hett E.V., Rubin E.J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, vol. 72, pp. 126-156.
15. Lavollay M. et al. The peptidoglycan of stationary-phase Mycobacterium tuberculosis predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *Journal of Bacteriology*, 2008, vol. 190, pp. 4360-4366.
16. Ruggiero A. et al. Crystal Structure of the Resuscitation-Promoting Factor Δ DUFRpfb from M. tuberculosis. *Journal of Molecular Biology*, 2009, vol. 385, pp. 153-162.
17. Домарадский И.В., Хохоев Т.Х., Кондракова О.А. и др. *Российский химический журнал*, 2002, № 46, с.80-89 [Domaradsky I.V., Khokhlov T.X., Kondrakova O.A. et al. *Russian Chemical Journal*, 2002, no. 46, pp. 80-89 (In Russ.)].
18. Тараканов Б.В. Бактериофаги в содержимом рубца крупного рогатого скота. *Микробиология*, 1971, т. 40, с. 544-550 [Tarakanov B.V. Bacteriophages in bovine rumen contents. *Microbiology*, 1971, vol. 40, pp. 544-550 (In Russ.)].
19. Токарев М.В., Давидов М.И., Функнер Е.В. Лечение острого пиелонефрита бактериофагами. Актуальные вопросы клинической медицины. *Сборник научных трудов, посвященный 130-летию Пермской ГКБ № 6*, Пермь, 2005 [Tokarev M.V., Davidov M.I., Funkner E.V. Treatment of acute pyelonephritis with bacteriophages. Actual questions of clinical medicine. *Collection of scientific papers dedicated to the 130th anniversary of Perm State Clinical Hospital no. 6*, Perm, 2005 (In Russ.)].
20. Bamford D. Do viruses form lineages across different domains of life? *Res. in Microbiol*, 2003, no. 154, pp. 231-236.
21. Brokhurst M.A., Bukcling A., Rainey P.B. The effect of the bacteriophages on diversification of the opportunistic bacterial pathogen, Pseudomonas aeruginosa. *Proc. R Soc.*, 2005, vol. B, no. 272, pp. 1385-1391.
22. Brown S.P., Le Chat L., De Paepe M., Taddei F. Ecology of microbial invasions: amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare. // *Curr. Biol*. 2006. 16. P. 2048-2052.
23. Chibani-Chenoufi S., Sidoti J., Bruttin A. et al. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: implications for phage therapy. *Antimicrob. Agents. Chemotherapy*, 2004, vol. 48, pp. 2558-2569.
24. Dabrowska K., Zembala M., Boratynski J. et al. Hoc protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals. *Arch. Microbiol.*, 2007, vol. 187, pp. 489-498.
25. d'Herelle F. *La bacteriophage. Son role dans l'immunité*. Cited after Russian edition. Moscow-Leningrad: State Editor, 1926.
26. Dhillon E.K.S., Dhillon T.S., Lam Y.Y., Tsang A.H.C. Temperate coliphages: classification and correlation with habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1980, vol. 39, pp. 1046-1053.
27. Durmaz E., Klaenhammer T.R. Abortive phage resistance mechanism AbiZ speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected Lactococcus lactis. *J. Bacteriol.*, 2007, vol. 189, pp. 1417-1425.
28. Fraser J.S., Maxwell K.L., Davidson A.R. Immunoglobulin-like domains on bacteriophage: weapons of modest damage? *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, vol. 10, pp. 382-387.
29. Gorski A., Miedzybrodzki R., Borysowski J. et al. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2009, vol. 10, pp. 766-774.
30. Hale C.R., Zhao P., Olson S. et al. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*, 2009, vol. 139, pp. 945-956.
31. Hintz H.F., Cymbaluk N.F. Nutrition of the Horse. *Annu Rev. Nutr.*, 1994, vol. 14, pp. 243-267.
32. Hitch G., Pratten J., Taylor P.W. Isolation of bacteriophages from the oral cavity. *Lett in Applied Microbiol.*, 2004, vol. 39, pp. 215-219.
33. Holmfeldt K., Middelboe M., Nybroe O., Riemann L. Large variability in host strain susceptibility and phage host-range govern interactions between lytic marine phages and their Flavobacterium host'. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, pp. 6730-6739.
34. Hoskisson P., Smith M.C.M. Hypervariation and phase variation in the bacteriophage 'resistome'. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, vol. 10, pp. 396-400.
35. Mateu M.G. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2011, vol. 24 no. 1-2 pp. 53-63, doi: 10.1093/protein/gzq069.
36. Kasman L., Kasman A., Westwater C., Dolan J., Schmidt M.G., Norris J.S. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, pp. 5557-5564.

37. Azimi T., Mosadegh M., Nasiri M.J. et al. Phage therapy as a renewed therapeutic approach to mycobacterial infections: a comprehensive review. *Infection and Drug Resistance*, 2019, vol. 12, pp. 2943-2959, doi: 10.2147/IDR.S218638.
38. Kilic A.O., Pavlova S. I., Alpay S., Kili S.S., Tao L. Comparative study of vaginal Lactobacillus phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence, morphology, host range, and DNA homology. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, vol. 8, pp. 31-39.
39. Адамс М. Бактериофаги. М.: Изд-во иностр. лит., 1961, 527 с. [Adams M. *Bacteriophages*. М.: Izd-wo foreign. lit., 1961, 527 p. (In Russ.)].
40. LeClerc J.E., Li B., Payne W.L., Cebula T.A. High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens. *Science*, 1996, vol. 274, pp. 1208-1211.
41. Lepage P., Colombet J., Marteau P. et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 57, 2008, pp. 424-425.
42. Боговазова Г.Г., Ворошилова Н.Н., Бондаренко В.М. Эффективность бактериофага *Klebsiella pneumoniae* в терапии экспериментальной клебсиеллезной инфекции. *Журн. микробиол. эпидеми-ол. иммунобиол.*, 1991, № 4, с. 5-8 [Bogovazova G.G., Voroshilova N.N., Bondarenko V.M. Efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. *Zhurn. microbiol. epidemi-ol. immunobiol.*, 1991, no. 4, pp. 5-8 (In Russ.)].
43. Letarov A., Manival X., Desplats C., Krisch H.M. gpwac of the T4-type bacteriophages: structure, function, and evolution of a segmented coiled-coil protein that controls viral infectivity. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, pp. 1055-1066.
44. Livermore D.M. Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob Chemother*, 2009, vol. 64, suppl. 1, pp. 29-36.
45. Martin R., Sobery N., Escobedo S., Suarez J. Bacteriophage induction versus vaginal homeostasis: role of H202 in the selection of Lactobacillus defective prophages. *Int. Microbiol.*, 2009, vol. 12, pp. 131-136.
46. Miller R.V., Day M. Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In S.T. Abedon (ed): *Bacteriophage Ecology*. Cambridge U. Press, Cambridge, 2008, pp. 114-143.
47. Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Dus D., Weber-Dabrowska B. et al. Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC-based vaccine against murine transplantable colon carcinoma. *Immunol. Let.*, 2008, vol. 116, pp. 24-32.
48. Pal C., Macia M., Oliver A., Schachar I., Buckling A. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 2009, vol. 450, pp. 1079-1081.
49. Poullain V., Gandon S., Brokhurst M.A., Buckling A., Hochberg M.E. The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. *Evolution*, 2008, vol. 62, no. 1, pp. 1-11.
50. Przerwa A., Zimecki M., Switala-Jelen K. et al. Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2006, vol. 195, pp. 143-150.
51. Schmid E.N., von Recklinghausen G., Ansorg R. Bacteriophages in Helicobacter (Campylobacter) pylori. *J. Med. Microbiol.*, 1990, vol. 32, pp. 101-104.
52. Dedrick R.M., Smith B.E., Cristinziano M., Freeman K.G., Jacobs-Sera D., Belessis Y. et al. Phage Therapy of Mycobacterium Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients with Drug-Resistant Mycobacterial Disease. *Clin Infect Dis.*, 2023, vol. 76, no. 1, pp. 103-112, doi: 10.1093/cid/ciac453.
53. Nick J.A., Dedrick R.M., Gray A.L., Vladar E.K., Smith B.E., Freeman K.G. et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against Mycobacterium abscessus lung infection. *Cell*, 2022, vol. 185, no. 11, pp. 1860-1874, e12, doi: 10.1016/j.cell.2022.04.024.
54. Little J.S., Dedrick R.M., Freeman K.G., Cristinziano M., Smith B.E., Benson C.A. et al. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous Mycobacterium chelonae infection. *Nat Commun.*, 2022, vol. 13, no. 1, p. 2313, doi: 10.1038/s41467-022-29689-4.
55. Broxmeyer L., Sosnowska D., Miltner E., Chacon O., Wagner D., McGarvey J. et al. Killing of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis.*, 2002, vol. 186, no. 8, pp. 1155-1160, doi: 10.1086/343812.
56. Foley-Thomas E.M., Whipple D.L., Bermudez L.E., Barletta R.G. Phage infection, transfection and transformation of Mycobacterium avium complex and Mycobacterium paratuberculosis. *Microbiology (Reading)*, 1995, vol. 141, pt. 5, pp. 1173-1181, doi: 10.1099/13500872-141-5-1173.
57. Фурсов М.В. Микобактериофаги – вирусы микобактерий. *Бактериология*, 2023, т. 8, № 4, с. 76-79 [Fursov M.V. Mycobacteriophages - viruses of mycobacteria. *Bacteriology*, 2023, vol. 8, no. 4, pp. 76-79 (In Russ.)].

ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF PRODUCTION AND USE OF BACTERIOPHAGES
IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF TUBERCULOSISBotin A.S.^{1,2,3}, Pulin A.M.¹, Kaminskaya L.A.³, Makarova A.O.³, Cordova A.V.¹¹ Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology,
Peoples' Friendship University of Russia n.a. P. Lumumba (RUDN)
*Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, 117198, Russia*² N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine
*Bolshaya Sukharevskaya Sq., 3, Moscow, 129090, Russia*³ Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH) Pushchino branch
Ave. of Science 3, Pushchino, Serpukhov, Moscow region, 142290, Russia

Received 01.09.2024

Abstract. The relevance of the problem. Tuberculosis (TB), which is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), is, among all the diversity of microflora, one of the most dangerous and highly contagious infectious pathologies, and a big problem issue of the entire world health care. When analyzing the average statistical data of the WHO annual report on the incidence of tuberculosis in the world, it was found that every year more than 9 million newly diagnosed cases of active tuberculosis are diagnosed, as a result of which about 2 million people die annually. This is facilitated by the appearance of modified mutating strains of tuberculosis that are multidrug-resistant (MDR-TB), including those that have undergone intracellular mutation, forms of tuberculosis pathogens with broad drug resistance (BDR-TB). This fact irrefutably indicates the urgent need to improve new methods of prevention and treatment of this very serious disease. Mycobacteriophages are viruses that infect bacteria, such as *Mycobacterium* spp., containing the *M. tuberculosis* complex. Phages and proteins that are derived from phages act as promising antimicrobial agents. In addition, phage cocktails expand the spectrum of lysing activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Scientific developments in the prevention and treatment of this pathology have proven a positive effect when using a combination of antibiotics and phages to defeat mycobacterium tuberculosis. Despite this, there are limitations in the use of phage therapy. Modern fundamental and applied sciences, as well as practical medicine, conduct a number of clinical studies in order to get answers to many questions, the main of which is the question of the safety of the use of mycobacteriophages. The most important answers to questions about the widespread use of mycobacteriophages are the following: 1) resistance of tuberculosis pathogens to mycobacteriophages; 2) transfer of antibiotic resistance genes; 3) human immune response to treatment and prevention using bacteriophages, etc. This article discusses the advantages of mycobacteriophages compared with alternative methods, as well as limitations in their use as therapeutic agents for the treatment and prevention of tuberculosis.

Key words: viruses, bacteriophages, phage therapy, mycobacteriophages, *Mycobacterium tuberculosis*

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГРАФЕНСОДЕРЖАЩИХ ПЕРЕВЯЗОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Ботин А.С.^{1,2,3}, Ризк М.Г.Х.¹, Логвиненко И.С.¹, Кордова А.В.¹

¹ Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН),
Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ

³ ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ) Пушкинский филиал
просп. Науки, 3, г. Пушкино, г.о. Серпухов, Московская область, РФ

Поступила в редакцию 11.09.2024

Аннотация. Концепция лечения ран направлена на минимизацию потенциальных осложнений, вызванных как самой раной, так и улучшением надлежащей регенерации мягких тканей организма. Травмированные пациенты в бытовых или полевых условиях, как правило, при аварийных ситуациях или во время стихийных бедствий, подвергаются риску заражения различной патогенной микрофлорой бактериальной, вирусной и иной природы, что может привести к инфекционным заражениям. Учитывая предыдущие многочисленные физико-химические исследования, есть все основания считать, что графен и его производные могут играть важную роль в улучшении характеристик и повышении качества медицинских перевязочных материалов, которые в данном случае обладают потенциалом преимуществ по сравнению с традиционными аналогами. Для снижения стоимости конечной продукции в виде графенсодержащих композитных материалов, получена новая форма расслоенного графита, которая после многократной химической модификации и термоактивации приводится к получению материала, структура которого состоит из раздвинутых стопок углеродных слоев с кратностью от нескольких единиц до десятков, в том числе содержащая и одиночные листы графена. Установлено, что данный материал относится к виду графенсодержащих и графеноподобных форм углерода. В работе приводится анализ стратегий и разработок зарубежных и отечественных исследователей, направленных на создание интеллектуальных и функциональных тканевых конструкций с улучшенными возможностями для доставки лекарств через кожу и антисептических повязок на раны с применением графенсодержащих компонентов. Дальнейшее развитие биомедицинских приложений предполагает использование графеноподобных форм углерода и композитов на их основе, включающих возможности для создания и испытаний широкого ассортимента готовых форм перевязочных материалов нового поколения с использованием полиграфена в том числе и для неотложной медицины катастроф, служб Министерства по чрезвычайным ситуациям, а также для эффективного лечения раневых повреждений различной природы.

Ключевые слова: графен, производные графена, биосовместимость, заживление ран.

Введение. В последние два десятилетия очень активно развиваются исследования в области создания нанокompозитов. Их важность для нанотехнологий будет возрастать по мере того, как миниатюризация устройств и компонент, например, для сенсоров, для биомедицины и других областей будет становиться всё весомее. Развитие этих дисциплин сильно зависит от возможности создавать нанокompозиты с различной комбинацией компонент, их формы и размера, сложности структуры, а также возможности применять их в комплексе друг с другом. Многие перспективы современной нанотехнологии связаны с углеродными нанокompозитами.

Углерод, который является широко распространенным элементом земной коры, проявляет уникальное свойство полиморфизма, создавая колоссальное разнообразие структур с необычными физическими свойствами. Его кристаллические фазы, такие как алмаз и графит, были известны очень давно, а стремительное развитие науки о наноматериалах привело к открытию новых наноструктур, основными из которых являются фуллерены, углеродные нанотрубки и графен. Они обладают уникальными свойствами по сравнению с традиционными композитами. Широкие перспективы применения углеродных нанокompозитов в нанoeлектронике, биологии, медицине и т.д. определяют необходимость глубокого изучения их природы и свойств.

Несмотря на то, что бум исследований, посвященных углеродным наноструктурам, в основном связан в последние десятилетия с графеном и углеродными нанотрубками, другие формы углеродных нанокompозитов также привлекают внимание исследователей.

Изучением методов получения, возможностей применения и, конечно же, свойств различных полиморфов углерода и нанокompозитов на их основе активно занимается большое количество специалистов, как в России, так и за рубежом. Например, в последние годы синтезировано и предсказано огромное разнообразие новых наноформ углерода, объемных углеродных материалов и так называемых углерод-углеродных нанокompозитов. Лидирующее место в мировой исследовательской практике последних лет занимают каркасные графитоподобные структуры, фуллерены и нанотрубки, а также их многочисленные производные и полиграфен.

К настоящему времени хорошо изучены и атомное строение, и физико-химические свойства многих углеродных нанокompозитов, предложен и частично реализован ряд перспективных проектов их

технологического применения для создания нанoeлектронных и наномеханических устройств. Однако, несмотря на большое количество проводимых исследований, остается много открытых вопросов, связанных с синтезом и применением таких наноконкомпозитов как для биомедицины, так и для других целей, фундаментального и прикладного характера, имеющих отношение к наукам о жизни.

В данной работе приводится анализ некоторых стратегий и разработок зарубежных и отечественных исследователей, направленных на создание интеллектуальных и функциональных тканевых конструкций с высокой возможностью пролиферации фибробластов и многообещающими терапевтическими характеристиками для доставки лекарств на поверхность кожи и через кожу для создания антисептических повязок на раны с применением графеносодержащих компонентов.

В частности, в этой публикации проводится оценка перспектив применения графеносодержащих перевязочных материалов для заживления ран различной природы.

Углеродные наноконкомпозиты: получение, структура, физические свойства. Аллотропные формы углерода. До середины прошлого века считалось, что углерод может образовывать только две кристаллические структуры – алмаз и графит. В алмазе – каждый атом углерода расположен в центре тетраэдра, вершинами которого служат четыре ближайших атома. Все соседние атомы связаны между собой одинаковыми ковалентными связями (sp^3 – гибридизация). Длина связи углерод–углерод в алмазе равна 0,142 нм. В графите – атомы углерода связаны между собой прочными ковалентными связями (sp^2 – гибридизация) и формируют шестиугольники, образующие, в свою очередь, прочную и стабильную сетку, похожую на пчелиные соты. Сетки располагаются друг над другом слоями. Расстояние между атомами, расположенными в вершинах правильных шестиугольников, равно 0,140 нм (химическая связь в графите сильнее, нежели чем в алмазе), в то время, как сами плоскости находятся друг от друга на существенно большем расстоянии – 0,335 нм. и связаны слабыми ван-дерваальсовыми связями. Такая структура – прочные слои углерода, слабо связанные между собой, определяет специфические свойства графита: низкую твердость и способность легко расслаиваться на мельчайшие чешуйки. Необходимо отметить, что графит в природе образует не бесконечные плоскости из шестиугольников, а существует в виде плоских чешуек с типичными линейными размерами около 20 нм. Атомы углерода в соседних плоскостях располагаются таким образом, что они находятся над центрами шестиугольников из соседних слоев. Третью форму элементарного углерода – карбин, открыли в 60-годах. В карбине – кристаллическая форма карбина состоит из параллельно ориентированных цепочек углеродных атомов с sp -гибридизацией валентных электронов в виде прямолинейных макромолекул полиинового ($-C\equiv C-C\equiv C\cdots$) или кумуленового ($=C=C=C=...$) типов. Углеродные волокна, сверхпрочный конструкционный материал последних лет состоит из поликристаллического карбина. Углеродные волокна получают термической обработкой полимерных волокон в среде благородных газов. Это сверхпрочные нити, обладающие тепло- и электропроводящими свойствами. Из них изготавливают пуленепробиваемые жилеты, конструкционные элементы самолетов, ракет, сами ракетные двигатели, костюмы, обогреваемые электричеством и многое другое [1].

Графен. Графен – это двумерный материал, представляющий собой монослой атомов углерода и обладающий уникальными свойствами. Графен был известен еще с 17-го века, однако только сейчас мы получили возможность детально исследовать его свойства благодаря развитию экспериментальной и научно-технической базы. За несколько лет, прошедших с первой публикации о получении и исследовании индивидуальных чешуек графена, было разработано так много разных подходов к синтезу этого материала, что приходится удивляться тому, что графен не был обнаружен на много десятилетий раньше. В качестве объяснения этой загадки можно отметить, что при получении графена наиболее трудной стадией является не столько синтез образцов, сколько идентификация и установление их основных параметров (размеры, число слоев). Выделяют два высокосимметричных направления, это кресло и зигзаг (рис. 1а, 1б), вдоль которых свойства графена могут сильно отличаться. Отметим, что при рассмотрении атомной структуры графена его решетка подразделяется на две треугольные подрешетки (рис. 1в). Часто на практике получают не только монослои графена, но также и двуслойный графен, который по своим характеристикам сильно отличается от однослойного графена и для некоторых применений демонстрирует лучшие свойства. Два слоя графена, сложенные вместе, не стремятся расположиться точно один над другим так, чтобы каждый атом углерода имел партнера в соседнем слое. Вместо этого двуслойный графен в основном оказывается в состоянии так называемой берналовской укладки А–В в виде плотной упаковки: часть атомов верхнего слоя проецируются прямо в центры гексагонов нижнего слоя. Точно так же листы графена уложены в графите. Квантовые перескоки электронов между взаимодействующими атомами разных слоев формируют пару высокоэнергетических электронных подзон. Их отклонение от нулевой энергии (положение уровня Ферми в недопированном двуслойном графене) в точности равно интегралам перескока (300 мэВ), поэтому эти подзоны не дают вклада в электронный транспорт до тех пор, пока не достигаются очень высокие уровни допирования [2].

Невзаимодействующие атомы разных слоев дают начало низкоэнергетическим зонам, все еще пересекающимся при нулевой энергии (как и в однослойном графене), но имеющим параболическую форму. Симметрия между слоями является здесь аналогом симметрии подрешеток в однослойном графене и обеспечивает симметрию между дырками и электронами. Таким образом, мы получаем квазичастицы нового типа в графене – массивные киральные (хиральные) фермионы, не имеющие аналогов в квантовой электродинамике. Киральная симметрия однослойного и двуслойного графена обеспечивается симметрией

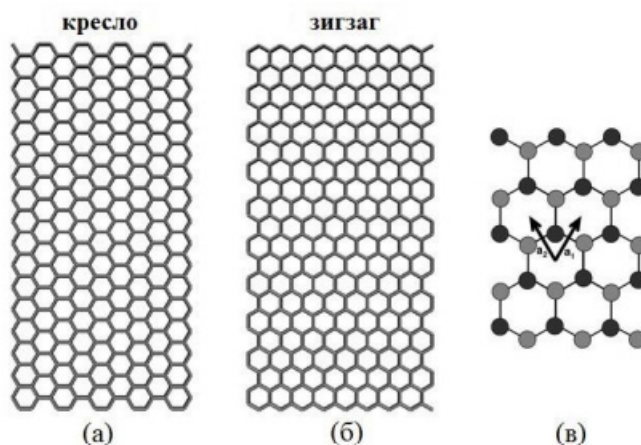


Рисунок 1. Две высокосимметричные ориентации графена: (а) кресло и (б) зигзаг. (в) Две подрешетки графена показаны соответственно темным и серым цветом [2]

между подрешетками. В случае однослойного графена нарушить такую симметрию весьма трудно – для этого нужно прикладывать какой-либо потенциал к атомам одной подрешетки, прикладывая в то же время к другой подрешетке другой потенциал. Но это можно сделать в двухслойном графене. Прикладывая затворное напряжение или химически легируя графен только с одной стороны, можно нарушить симметрию между слоями и, следовательно, между подрешетками (нарушив симметрию по отношению к пространственной инверсии). Это приводит к снятию киральной симметрии и открытию щели в спектре. Оба способа реализованы в экспериментах и дают замечательный результат: можно открыть щель до 0,5 эВ. Двухслойный графен, таким образом, представляет собой редкий пример материала, в котором запрещенной зоной можно управлять посредством электрического поля, приложенного поперек слоев (причем, ширина запрещенной зоны прямо пропорциональна величине поля). Также для двухслойного графена ожидаются такие эффекты, как топологические переходы при низкой электронной плотности, экситонные эффекты и топологические одномерные состояния [3].

Структура графена ответственна за его высокую удельную площадь поверхности ~ 2630 м²/г и хорошую электрическую проводимость. Электроны и дырки в зоне проводимости и валентной зоне связаны зарядовым сопряжением. Посредством эффекта электрического поля тип носителей может быть изменен с электронного на дырочный. В электрических полях, ограниченных пробоем диэлектрика, можно достигать концентраций носителей n до 10^{13} см⁻². При этом во всем интервале концентраций сохраняется высокая подвижность носителей (до 20000 см²/В•с), слабо зависящая от температуры [4]. Как следствие, баллистический транспорт субмикронного масштаба реализуется даже при комнатной температуре. Подвижность носителей в графеновых пленках при комнатной температуре, обусловленная рассеянием на примесях или нановолнистостью кристалла, имеет огромный потенциал для роста и по экспериментальным оценкам ограничена величиной 200000 см²/В•с, обусловленной фононным рассеянием [5]. Модуль Юнга или модуль упругости монослойных графеновых мембран равен 340 ± 50 Н/м или $E = 1,0 \pm 0,1$ ТПа и прочность на разрыв бездефектного графена определена как $\sigma \sim 42$ Н/м. Несмотря на невероятную прочность, графен обладает гибкостью и может подвергаться 20%-й деформации без нарушения кристаллической решетки. Для подвешенной монослойной графеновой «частицы», полученной с использованием механического расслоения значение теплопроводности составило около 5000 1/Вт•К [6].

Применение графена. Получение графена, двумерного кристалла, состоящего из одиночного слоя атомов углерода, собранных в гексагональную решётку, привлекло внимание ученых и инженеров в различных областях науки и техники. Этот материал обладает удивительными кристаллическими и электронными свойствами. Удивительные свойства графена возникают благодаря уникальной природе его носителей заряда – они ведут себя подобно релятивистским частицам [7]. Графен обладает уникальной структурой и исключительными физическим и химическими свойствами, из которых следует множество возможностей для его применения. Среди различных применений графена – биомедицинские, которые вызывают постоянно растущий интерес.

Медицинское оборудование – это широкий спектр приборов, аппаратов и инструментов, используемых в различных целях. Несмотря на частные методы работы, применение техники имеет общую цель – восстановление и поддержание здоровья человека. Приоритетными направлениями модернизации медицинского оборудования являются развитие технологической составляющей оказания медицинских услуг, внедрение актуального программного обеспечения, приведение используемых технических инструментов в соответствие с новыми стандартами [8].

Графен также рассматривается как важная составляющая в некоторых композитных материалах, которые применяются для модернизации современного медицинского оборудования. Уже разработаны на основе графена прототипы различных электронных и оптоэлектронных устройств: газовые сенсоры с экстремальной чувствительностью, графеновый одноэлектронный транзистор, жидкокристаллические дисплеи и солнечные батареи (в качестве прозрачного проводящего электрода), спиновый транзистор, графеновые полевые транзисторы, графеновые выпрямители и умножители частоты, и высокочувствительные фотодетекторы.

Биомедицинское применение графена относительно новая область со значительным потенциалом. Была проведена большая работы по изучению возможностей использования графена, включая поставки лекарств/генов, биологическое обнаружение и визуализацию, антибактериальные материалы, как биосовместимого каркаса для клеточной культуры. Интенсивное исследование биоприменения графена и материалов на его основе обусловлено увлекательными свойствами данного материала, такими как: исключительная электронная проводимость (подвижность носителей заряда $200000 \text{ см}^2/\text{В}\cdot\text{с}$), теплопроводность [$\sim 5000 \text{ Вт}/(\text{м}\cdot\text{К})$], механическая прочность (модуль Юнга $\sim 1100 \text{ ГПа}$) [9].

Одним из методов использования графена является диагностика раковых заболеваний. Уникальные электрические и оптические свойства графена предоставляют возможность создания новых оптических, электрохимических биосенсоров для обнаружения биомаркеров (индикаторов раковых заболеваний на ранних стадиях). При использовании графена в работе авторы резко повысили чувствительность оптического биосенсора. Сенсоры данного типа также были разработаны на основе оксида графена. Использование графена позволяет значительно повысить эффективность электрохимических иммуносенсоров. Создаваемые на базе графена электрохимические устройства способны как детектировать биомаркеры, так и изучать процессы образования активных форм кислорода в живых клетках. В настоящее время растет интерес к сенсорам на основе графеновых полевых транзисторов [10].

Для детектирования раковых клеток также применяются графен и наноматериалы на его основе. Еще одной областью применения графена является система адресной доставки диагностических и лекарственных средств. Для получения изображения живых клеток авторы работы описывают успешное использования графена, оксида графена с магнитными наночастицами, выступающими в качестве носителей противораковых препаратов, нуклеотидов/пептидов, флуоресцентных агентов.

Применение графена в фототермической терапии является новым перспективным направлением. Этот вид лечения использует генерацию тепла в результате поглощения света фоточувствительными агентами в больных клетках. Чтобы избежать повреждения здоровых клеток, поглощение должно быть в ближнем ИК-диапазоне (700–1100 нм). Графен проявляет заметный фототермический эффект благодаря сильному оптическому поглощению в этой области спектра [11]. Также графен может использоваться в неврологии. Используя электрохимические и оптические свойства графена, можно разработать высокоэффективные и одновременно миниатюрные биосенсоры для мониторинга неврологического статуса у пациентов после инсульта или травмы мозга. Также на основе графена можно будет создавать каркас для заживления повреждений нервной ткани.

В последнее время большой интерес возникает вокруг биодатчиков на основе графена [12]. В работе рассказывается об образованном на оксиде графена сенсоре, который выборочно обнаруживает ДНК в растворах. Также было обнаружено, что графен может доставить олигонуклеотиды в живые клетки для обнаружения биомолекул. Графен или композиционные материалы на его основе были использованы для модификации электродов в электрохимическом распознавании различных биомолекул, в том числе глюкозы, ДНК и белков, с высокой чувствительностью. Кроме того, графен может также использоваться в объединении с другими наноматериалами для построения различных биосенсоров.

К другому виду использования графена в медицине можно отнести графеновую бумагу, которая обладает выраженным антибактериальным действием. Исследование антибактериального эффекта графеновых нанолayers, показало, как оксид графена может применяться в качестве материала для покрытия поверхности для имплантата [13].

Как и во многих других областях, исследования биомедицинских применений графена расширяется, но в основном находится на начальной стадии. Успехи в этой области до сих пор являются захватывающими и обнадеживающими, но существует ряд задач, с которыми сталкиваются исследователи и которые должны быть преодолены. Одной из таких задач является тщательное и глубокое понимание взаимодействия графена – ткань, особенно механизма клеточного поглощения. Такое знание способствует развитию эффективной доставки лекарств, биодатчиков и других применений. Токсичность графена и оксида графена является еще одной из основных проблем. Предварительные результаты показывают, что физико-химические свойства тесно связаны с цитотоксичностью. Также графен и оксид графена способны ускорить рост, дифференцировку и пролиферацию стволовых клеток, и, следовательно, весьма перспективны в тканевой инженерии, регенеративной медицине, и других биомедицинских областях. Систематическое изучение очень желательно для решения проблем безопасности перед практическим применением графена в биомедицине [14].

Особенности строения и свойства полиграфена – графенсодержащего сорбента. Многослойный графен (полиграфен) – двумерный материал, который может существовать как в подвешенном состоянии, так и в виде пленки на подложке. Он состоит из от двух до нескольких десятков отдельных слоев, связанных между собой вдоль протяженной плоскости. Связь между слоями может быть либо типа АВА (как в α -графите), либо по типу упаковки Бернала, либо как слабая связь между хаотически повернутыми друг относительно друга слоями.

Несмотря на то, что многослойный графен содержит более одного слоя, он все еще обладает уникальными свойствами, характерными для однослойного графена. Однако вопрос о том, как соотносятся упакованные слои друг относительно друга (как они повернуты) в двух- и трехслойных графенах, остается открытым. Бислойный графен, например, отличается зонной структурой и электронными свойствами от однослойного графена.

Многослойная пленка графена, выращенная на С грани SiC, обладает всеми транспортными свойствами подвешенного однослойного графена. Подвижность носителей в трехслойном графене, оказавшимся

полуметаллом, составляет $\mu \approx 103 \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$, что примерно на порядок меньше, чем в однослойном, причем μ монотонно уменьшается с ростом числа слоев n от 1 до 3 [15].

Отмечается, что взаимодействие золота, осажденного термическим способом на n -слойные графены, различается в зависимости от числа слоев n , что указывает на разнообразные свойства поверхности графенов при увеличении числа слоев. Согласно исследованию [16], кинетика окисления графена существенно зависит от числа слоев в образце. Уже трехслойный образец обладает стойкостью к кислородной коррозии, сравнимой с макрообразцом натурального графита, в то время как однослойный графен реагирует намного быстрее. Однослойный графен интенсивно адсорбирует кислород и может десорбировать его под воздействием УФ-излучения в аргоновой среде, тогда как трехслойный графен ведет себя как графит [17].

Таким образом, каждый последующий объект – одно-, двух- и многослойный графен – обладает уникальным комплексом свойств, свойственных только этому веществу. Важно научиться разделять эти свойства, надежно идентифицировать каждый объект и использовать его уникальный набор свойств.

Модификация углеродных структур биологически активными веществами. Графен и графеноксид (GO) могут быть связаны с различными молекулами, такими как пептиды, ферменты, белки и антитела, через ковалентное или нековалентное присоединение. Карбоксильные, гидроксильные, эпоксидные и карбонильные группы на поверхности GO могут реагировать с различными функциональными группами этих молекул, образуя амидные связи или связи через гидрофобные, электростатические или π - π взаимодействия [18].

Некоторые исследования показали, что GO может быть ковалентно конъюгирован с бифункциональным PEG и антителами, а затем использован в создании сенсоров для обнаружения молекул-антигенов. Ковалентная функционализация GO также была использована для связывания полиэтиленгликолем для доставки генов и для создания материала для биовизуализации благодаря выраженным фотолуминесцентным свойствам [19].

В других исследованиях GO был ковалентно функционализирован серосодержащими аминокислотами, такими как L-метионин и L-цистеин, и продемонстрирована высокая биосовместимость этих материалов.

Авторы работ изучали ковалентную и нековалентную конъюгацию графена с биомолекулами, такими как ДНК, пептиды, белки, ферменты, углеводы и другие, с целью использования полученных материалов в различных областях, включая доставку лекарств, лечение онкологических заболеваний, тканевую инженерию, биовизуализацию, а также разработку биосенсоров для обнаружения биомолекул в сверхнизких концентрациях, таких как антитела, нуклеиновые кислоты, ферменты или белки. Это направление исследований имеет большую актуальность для ранней диагностики различных заболеваний. Wang и его коллеги продемонстрировали, что графен, модифицированный ковалентной связью с антителами, может использоваться для создания сенсоров, способных обнаруживать маркеры различных заболеваний (гормоны, ферменты, белки, углеводы, пептиды и гены) на ранних стадиях развития. Zhang и соавторы [18] показали, что графен оксид, ковалентно и нековалентно связанный с белками (BSA и трипсин), ферментами и пептидами, может использоваться в качестве платформы для дальнейшей иммобилизации наночастиц золота. Полученные конъюгаты могут использоваться для создания биосенсоров, а также в качестве прекурсоров для дальнейшей функционализации. Lu и соавторы [20] провели ковалентную функционализацию графена оксида молекулами ДНК, содержащими концевые аминокислотные группы, используя реакцию амидирования и сшивающий агент EDC. Полученные наноматериалы могут использоваться для обнаружения ионов тяжелых металлов.

Использование углеродных нанотрубок для создания биосенсоров представляет существенный научный и технологический прорыв в области биомедицинских исследований. Углеродные нанотрубки имеют высокую чувствительность к иммуогенам и катализируемым ферментами, что позволяет использовать их в качестве материалов для создания биосенсоров. Эксперименты, проведенные L. Nano (2003), показали возможность иммобилизации глюкозооксидазы на одностенной нанотрубке, которая являлась полупроводниковым материалом, сформированным на кремниевой пластине.

Преимуществом использования углеродных нанотрубок в качестве носителей для адсорбционной иммобилизации является их состав, который состоит исключительно из атомов углерода. Такой материал обладает высокой функциональной физиологической активностью и не вызывает токсических эффектов. Белки могут быть иммобилизованы как в глубине, так и снаружи нанотрубок, что делает углеродные нанотрубки перспективными материалами для создания биосенсоров и носителей для адсорбционной иммобилизации.

Таким образом, использование углеродных нанотрубок для создания биосенсоров и носителей для адсорбционной иммобилизации белков представляет существенный научный и технологический прорыв в области биомедицинских исследований, который может иметь большое будущее.

Электронная микроскопия полиграфена. Методы электронной микроскопии обладают множеством преимуществ по сравнению с оптической микроскопией. Они отличаются высочайшей разрешающей способностью и универсальностью. Сканирующий электронный микроскоп TESCAN MIRA представляет собой современное устройство IV поколения с катодом Шоттки, разработанное в Чехии, которое использует этот метод.

Он включает в себя электронно-оптическую колонну, блок электроники и управляющий компьютер (колонна и блок электроники объединены могут быть объединены). Изображения микроскопа сохраняются в цифровом формате, а анализ элементного состава выполняется в режиме реального времени с использованием программного обеспечения TESCAN Essence™

Программное обеспечение предлагает множество инструментов для ускорения аналитических процессов, включая функцию быстрого поиска, возможность отмены действий и предустановленные настройки. TESCAN

Essence™ позволяет пользователям настраивать рабочие процессы в соответствии с их уровнем опыта и требованиями конкретного приложения.

Такое решение облегчает получение данных о морфологии поверхности образца и его локальном элементном составе. Сканирующий электронный микроскоп TESCAN MIRA представляет собой незаменимый инструмент для контроля качества материалов, а также проведения анализа отказов и лабораторных исследований.

TESCAN MIRA предлагает дополнительные встроенные детекторы SE и BSE в колонках, а также применяет технологию замедления луча, что значительно расширяет возможности при анализе характеристик в субмикронном пространстве.

Дополнительные детекторы SE и BSE в колонках позволяют одновременно регистрировать до 4 сигналов, дифференцированных по контрасту. Например, SE в камере, BSE в камере, SE в колонке и BSE в столбце. Это позволяет получить максимальный контраст из образца и получить дополнительную информацию.

Технология замедления луча улучшает качество изображения, особенно при низких напряжениях ускорения, обеспечивая высокое разрешение. Это позволяет получить полную топографическую характеристику образца, используя камеру SE, In-Beam SE и детекторы In-Beam SE (BDM).

С помощью этих функций TESCAN MIRA обеспечивает богатый набор инструментов для анализа и определения характеристик образца в субмикронном пространстве.

TESCAN MIRA с автоэмиссионным эмиттером электронов высокой яркости идеально подходит для лабораторий контроля качества SEM в металлообработке. Он обеспечивает высокое разрешение даже при пониженных энергиях ускоряющего пучка, что необходимо для анализа топографических металлических образцов.

Источник полевой эмиссии MIRA высокой яркости обеспечивает высокое соотношение контрастности и шума, что особенно полезно при наблюдении за образцами в субмикронном масштабе. Это позволяет анализировать материалы для аддитивного производства, твердых покрытий, металлических композитов, микровключений и других образцов, которые требуют высокого топографического контраста, достигаемого только при низких энергиях ускорения луча.

TESCAN MIRA FE использует технологию Field Emission, что позволяет получать высокое отношение сигнал/шум даже при пониженной энергии ускорения. Для анализа топографии образцов используются камеры SE и детекторы SE в колонке, а для элементарного контраста – камера BSE и низкоэнергетические высокочувствительные детекторы BSE в колонке. Детекторы в колонке предпочтительны в случаях, когда высокое разрешение для оценки процесса и принятия решений является важным фактором [21].

Для анализа материалов микро– или наноразмеров, таких как порошки, микрозагрязнители, наночастицы и другие, необходимо уменьшить ускоряющую энергию луча. TESCAN MIRA с эмиттером электронов FE высокой яркости позволяет получать детальное топографическое изображение с использованием детектора SE в камере даже при энергии ниже 5 кэВ. Технология In-Flight Beam Tracing™ и Intermediate Lens позволяют быстро изменять условия луча без необходимости механической регулировки апертур в колонке. Дополнительный детектор In-Beam SE используется на более коротких рабочих расстояниях для обеспечения высокого разрешения при низкой энергии пучка.

Технология замедления луча (BDT) дополнительно повышает разрешение при самых низких энергиях ускорения, позволяя детально изучать особенности поверхности образцов. TESCAN MIRA обладает всеми этими функциями, что делает его универсальным инструментом для характеристики различных материалов в области SEM. [22].

Получение изображений полиграфена. Анализ структур. Образцы полиграфена представляют собой специально полученные варианты расширенного графита после многостадийной физико-химической модификации, включая термоактивацию. В ходе данной модификации получается материал, состоящий из раздвинутых стопок углеродных слоев, имеющих кратность от нескольких единиц до нескольких десятков, содержащий и одиночные листы графена. Этот материал представляет собой вид графеноподобных и графенсодержащих форм углерода. Вид использованного в работе полиграфена, полученного из терморасщепленного графита (рис. 2).

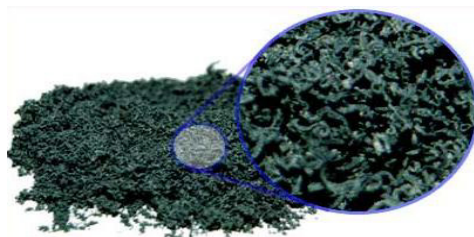


Рисунок 2. Полиграфен (общий вид)

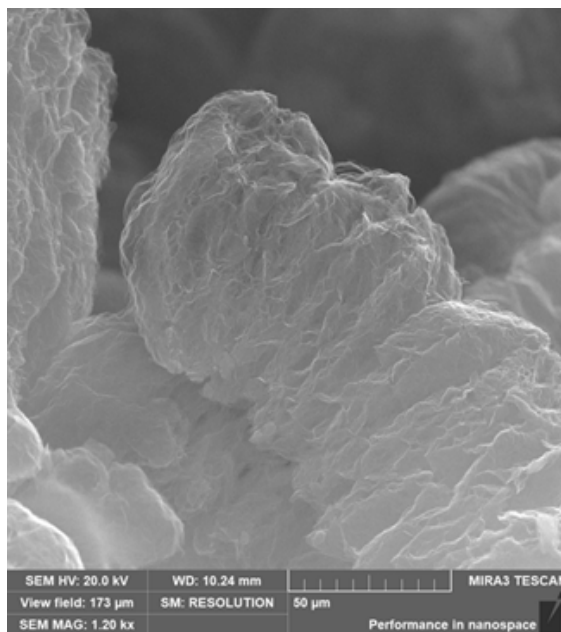


Рисунок 3. Изображение PG–Nat при большом увеличении

В ходе работы с помощью сканирующего электронного микроскопа при различных увеличениях были получены снимки образцов полиграфена:

- PG–Nat SEM MIRA – ПолиГрафен натуральный (рис. 3, 4)

Исходя из полученных изображений, можно отметить:

- Высокую плотность углеродных структур;

• При малом увеличении для образца PG–Nat видна разорванная структура графита, а при большом видны одиночные «листочки». Почти полное отсутствие разнородных включений на изображении с большим увеличением.

Установлено, что данный материал относится к виду графенсодержащих и графеноподобных форм углерода. Учитывая, что общее число полученных углеродных моно- и поли-слоёв при расширении каждого домена кристаллического графита варьируется от сотен до десятков тысяч, введена новая классификация данного типа материалов, которые могут рассматриваться в качестве полиграфенов (ПГ). Результаты исследований и испытаний полиграфенов дают все основания для их массового (широкомасштабного) применения в разных сферах медицины и биотехнологии, в частности, в качестве действующей основы для создания композитных перевязочных материалов нового поколения для ускоренного заживления механических, термических и гнойных ран.

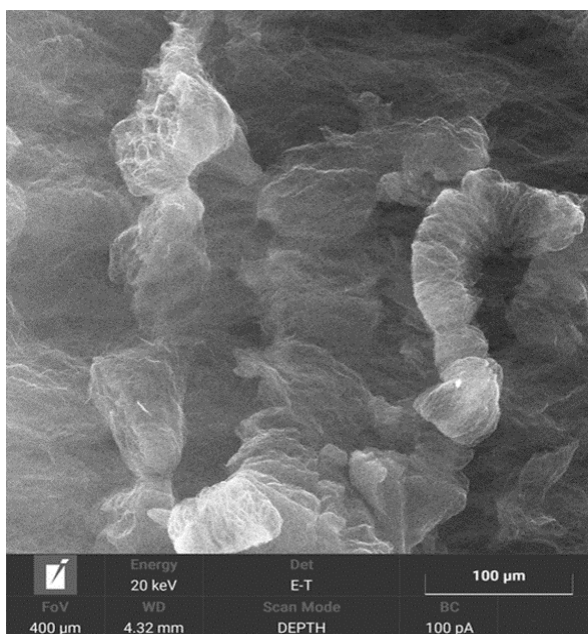


Рисунок 4. Изображение PG–Nat при малом увеличении

Новые формы графеносодержащих покрытий ран и общее обсуждение. При лечении ран биосовместимость является ключевым параметром, обеспечивающим эффективное заживление ран. К этой категории относятся гемосовместимость, гистосовместимость и цитосовместимость. Гидрогели с графеносодержащими компонентами должны обладать хорошей биосовместимостью не должны содержать токсинов, иметь низкую скорость гемолиза, вызывать минимальное воспаление или иммунные реакции и представлять минимальный риск заражения или инициировать онкологические процессы. Оценка этих характеристик необходима для лечения кровоточащих ран и может быть выполнена с помощью метаболических анализов или имплантации *in vivo* [23]. В их исследовании [24] было изучено синергетическое взаимодействие между фототермической активностью и пролиферацией клеток, опосредованной наноматериалами.

Также изучены различные материалы на основе графена (GBM) для использования при разработке фотоактивных биопленок и пластырей для заживления ран и регенеративной медицины. Три различных GBM, а именно оксид графена (GO), восстановленный оксид графена (rGO) и графеновые пластинки (GP), были подробно охарактеризованы для выяснения их фототермических свойств. Исследование показало, что rGO проявляет высочайшую фототермическую эффективность и антибактериальные свойства при облучении даже в такой низкой концентрации, как 0,05 мг/мл, без ущерба для жизнеспособности клеток фибробластов человека.

Учитывая технологичность жидких форм, содержащих графеноподобные компоненты, предложено применять биопринтеры на основе альгината и фибробласты человека, которые были использованы для биопечати с использованием rGO. Каркас не влиял на выживаемость фибробластов в течение 3 дней после биопечати, поскольку он не влиял на жизнеспособность клеток. Более того, присутствие rGO в готовых каркасах продолжало обеспечивать преимущества фототермической антимикробной терапии, не оказывая негативного влияния на рост фибробластов. Результаты подчеркивают потенциал гидрогелей, усиленных rGO, в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Эта стратегия направлена на создание интеллектуальных и функциональных тканевых конструкций с высокой пролиферацией фибробластов и многообещающими терапевтическими возможностями для доставки лекарств через кожу и антисептических повязок на раны. Гидрогели представляют собой трехмерные сетки из полимеров и подразделяются на натуральные и синтетические в зависимости от их происхождения, в то время как "умные" клеи получают синтетическим путем для лечения ран [25]. Умные гидрогели с восстановленным оксидом графена (rGO) демонстрируют некоторые необычные изменения в своей сетчатой структуре, механических свойствах и поведении при набухании в ответ на различные раздражители, такие как pH, температура, ионная сила, а также электрическое и магнитное поле окружающей среды [26]. Асгар Хан и др. [27] разработали новый класс электроактивных гидрогелей на основе функционализированных тиолом наночастиц оксида серебра и графена.

Интересно, что эксперименты *in vivo* показали, что электроактивные гидрогели могут значительно ускорить заживление искусственных ран у крыс, а гистологический анализ показывает увеличение толщины грануляционной ткани, отложение коллагена, волосных фолликулов, кожных сосочков, кератиноцитов и заметное увеличение ($P < 0,05$) содержания гидроксипролина в месте раны в течение 15 дней заживления от поврежденных ран. Гидрогель с восстановленным оксидом графена (rGO) продемонстрировал предпочтительные характеристики, такие как превосходная прочность на растяжение, регулируемые реологические свойства ($G' \approx 1$ кПа), подходящее время гелеобразования (30–56 с), адгезивность и взаимосвязанную пористую структуру (после сублимационной сушки). Кроме того, гидрогель также обладает высокой степенью набухания (от 72,4 до 93,5%), отличной способностью поглощать экссудат (10,4–0,2 г/г), длительной антибактериальной активностью в отношении изолятов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), многообещающей антиоксидантной эффективностью (поглощение радикалов), сохраняет рану увлажненной, обладает выраженным гемостатическим действием, эффективностью и способностью к быстрому самовосстановлению при деформации.

На основании результатов исследований *vivo* и *vitro* сделан вывод, что многофункциональные свойства, приписываемые электроактивному гидрогелю с восстановленным оксидом графена (rGO), могут служить подходящей основой для лечения хронических ран и регенерации кожи.

Заключение. С помощью сканирующей электронной микроскопии была определена структура полиграфена; охарактеризована сложная поверхность графеносодержащего сорбента. Частицы полиграфена выглядят как смятые пленочные структуры или деформированные стопки из десятков углеродных слоев, толщина каждой стопки варьируется от десятков до сотен нм, причем несколько стопок могут быть соединены последовательно.

В ходе анализа результатов работ, показано, что использование композиции углеродных волокон различной природы и графеносодержащего сорбента полиграфен с иммобилизованными биологически активными веществами является для экстренной медицины перспективным перевязочным материалом улучшенного качества и способствует повышению эффективности заживления ран различного вида, а также представляет собой новый материал для медицины катастроф.

Перспективы развития. Универсальность технологий производства полиграфенов позволит производить широкий спектр готовых медицинских форм композитных перевязочных материалов нового поколения на основе полиграфена удовлетворяющих практически любые потребности в перевязочных материалах для современной медицины особенно в комбинации с лекарственными веществами, как низкомолекулярными, так и высокомолекулярными.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению углеродных наноматериалов, которые по их химическому составу можно выделить в особый класс наноматериалов. Исследователи, которые на протяжении ряда лет независимо друг от друга занимались изучением графена, углеродных нанотрубок, фуллеренов и других углеродных структур, начинают активно взаимодействовать, поскольку существующее в настоящее время положение дел требует усилий для изучения всех этих родственных материалов на наноуровне с единых позиций.

Среди важных решаемых задач можно выделить изучение свойств различных углеродных структур, взаимодействия между ними, условий, при которых они могут трансформироваться из одного вида в другие, и возможностей комбинирования их в новые структуры, в том числе и с участием других химических элементов. Несмотря на то, что активные исследования по возможностям синтеза углеродных наноматериалов в промышленных масштабах ведутся уже на протяжении десятилетий, и число таких работ постоянно растет, все еще остается много нерешенных вопросов, относящихся как к свойствам, так и к возможностям лучшего применения нанополиморфов углерода.

Расширение возможностей использования таких материалов, в свою очередь, зависит от стоимости их производства, которая в настоящее время является достаточно высокой. Тем не менее, совершенствование методов синтеза и сочетание уникальных свойств углеродных наноматериалов позволяют надеяться на их рентабельное применение.

Показано, что уникальные свойства углеродных наноматериалов, включая электрические, тепловые, механические и оптические, делают их перспективными для использования в различных областях науки, техники и медицины.

Список литературы / References:

1. Харрис П. *Углеродные нанотрубки и родственные структуры*. М. Техносфера, 2003, 612 с. [Harris P. *Carbon nanotubes and related structures*. М. Technosphere, 2003, 612 p. (In Russ.)].
2. Hass J., de Heer W.A., Conrad E.H. The growth and morphology of epitaxial multilayer graphene. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2008, vol. 20, pp. 1-27.
3. Stoller M.D., Park S., Zhu Y., An J., Ruoff R.S. Graphene-Based Ultracapacitors. *Nano letters*, 2008, vol 8, pp. 3498-3502.
4. Morozov S.V., Novoselov K.S., Katsnelson M.I., Schedin F., Elias D.C., Jaszczak J.A., Geim A.K. Giant Intrinsic Carrier Mobilities in Graphene and Its Bilayer. *Physical review letters*, 2008, vol 10, pp. 1-4.
5. Lee C., Wei X.D., Kysar J.W., Hone J. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science*, 2008, vol 321, pp. 385-388.
6. Balandin A.A., Ghosh S., Bao W.Z., Calizo I., Teweldebrhan D., Miao F., Lau C.N. Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene. *Nano Letters*, 2008, vol 8, pp. 902-907.
7. Teweldebrhan D., Goyal V., Balandin A.A. Exfoliation and Characterization of Bismuth Telluride Atomic Quintuples and Quasi-Two-Dimensional Crystals. *Nano Lett.*, 2010, vol. 10, p. 1209.
8. Wang H., Taychatanapat T., Hsu A., Watanabe K., Taniguchi T., Jarillo-Herrero P., Palacios T. BN/Graphene/BN Transistors for RF Applications. *IEEE Electron Device Letters*, 2011, vol. 32, pp. 1209-1211.
9. Britnell L., Ribeiro R.M., Eckmann A., Jalil R., Belle B.D., Mishchenko A., Kim Y.-J., Gorbachev R.V., Georgiou T., Morozov S.V., Grigorenko A.N., Geim A.K., Casiraghi C., Castro Neto A.H., Novoselov K.S. Strong Light-Matter Interactions in Heterostructures of Atomically Thin Films. *Science*, 2013, vol. 340, pp. 1311-1314.
10. Kang J., Tongay S., Zhou J., Li J., Wu J. Band offsets and heterostructures of two-dimensional semiconductors. *Applied Physics Letters*, 2013, vol. 102, p. 111.
11. Nebogatikova N.A., Antonova I.V., Volodin V.A., Prinz V.Y. Functionalization of graphene and few-layer graphene with aqueous solution of hydrofluoric acid. *Physica. E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2013, vol. 52, pp. 106-111.
12. Nebogatikova N.A., Antonova I.V., Prinz V.Ya., Timofeev V.B., Smagulova S.A. Graphene quantum dots in fluorographene matrix formed by means of chemical functionalization. *Carbon*, 2014, vol. 77, pp. 1095-1103.
13. Wallace P.R. The band theory of graphite. *Physical Review*, 1947, vol. 71, pp. 622-634.
14. Boehm H.P., Clauss A., Fischer G.O. and Hofmann U. The Adsorption Behavior of Very Thin Carbon Films. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 1962, vol. 316, pp. 119-127.
15. Zhou H., Qiu C., Liu Zh., Yang H., Hu L., Liu J., Yang H., Gu Ch., Sun L. Thickness-Dependent Morphologies of Gold on N-Layer Graphenes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, vol. 132, pp. 944-946.
16. Yakes M.K., Gunlycke D., Tedesco J.L., Campbell P.M., Myers-Ward R.L., Eddy C.R., Gaskill D.K., Sheehan P.E., Laracuente A.R. Conductance Anisotropy in Epitaxial Graphene Sheets Generated by Substrate Interactions. *Nano Lett.*, 2010, vol. 32, pp. 1559-1562.
17. Robinson J., Weng X., Trumbull K., Cavalero R., Wetherington M., Frantz E., LaBella M., Hughes Z., Fanton M., Snyder D. Nucleation of Epitaxial Graphene on SiC(0001). *ACS Nano*, 2010, vol. 1, pp. 153-158.
18. Zhang Y., Wu C., Zhang J. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. *Nanotechnol.*, 2013, vol. 2, pp. 27-45.
19. Jokar S., Pourjavadi A., Adeli M. Albumin-graphene oxide conjugates. *Carriers for anticancer drugs*, 2014, vol. 4, pp. 33001-33006.
20. Lu C., Jimmy Huang P.J., Ying Y., Liu J. Covalent linking DNA to graphene oxide and its comparison with physisorbed probes for Hg²⁺ detection. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, vol. 79, pp. 244-250.

21. Yu Q., Cho J., Shivapooja P., Ista L.K., Lopez G.P. Nanopatterned smart polymer surfaces. for controlled attachment, killing, and release of bacteria. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2013, vol. 5, pp. 9295-9304.
22. Yu Q., Ista L.K., Lopez G.P. Nanopatterned antimicrobial enzymatic surfaces combining. biocidal and fouling release properties. *Nanoscale*, 2014, vol. 6, pp. 4750-4757.
23. Najihah A.Z., Hassan M.Z., Ismail Z. Current trend on preparation, characterization and biomedical applications of natural polysaccharide-based nanomaterial reinforcement hydrogels: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, vol. 271, p. 132411.
24. Ferreras A. et al. Light-Responsive and Antibacterial Graphenic Materials as a Holistic Approach to Tissue Engineering. *ACS Nanoscience Au.*, 2024.
25. Shi Z. et al. Electroconductive natural polymer-based hydrogels. *Biomaterials*, 2016, vol. 111, pp. 40-54.
26. Kost J., Langer R. Responsive polymeric delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, vol. 64, pp. 327-341.
27. Khan A. et al. Development of Novel Multifunctional Electroactive, Self-Healing, and Tissue Adhesive Scaffold To Accelerate Cutaneous Wound Healing and Hemostatic Materials. *ACS Omega*, 2023, no. 42 (8), pp. 39110-39134.

PROSPECTS FOR THE USE OF GRAPHENE-CONTAINING DRESSINGS FOR WOUND HEALING OF VARIOUS NATURE

Botin A.S.^{1,2,3}, Rizk M.G.H.¹, Logvinenko I.S.¹, Cordova A.V.¹

¹ Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology,
Peoples' Friendship University of Russia n.a. P. Lumumba (RUDN)
Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: botin-as@rudn.ru

² N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russia
Bolshaya Sukharevskaya Sq., 3, Moscow, 129090, Russia

³ Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH) Pushchino branch, Moscow region, Russia
Ave. of Science 3, Pushchino, Serpukhov, Moscow region, 142290, Russia

Received 11.09.2024

Abstract. The concept of wound treatment is aimed at minimizing potential complications caused by both the wound itself and improving proper regeneration of the body's soft tissues. Injured patients in domestic or field conditions, as a rule, in emergency situations or during natural disasters, are at risk of infection with various pathogenic microflora of bacterial, viral and other nature, which can lead to infectious infections. Given the numerous previous physico-chemical studies, there is every reason to believe that graphene and its derivatives can play an important role in improving the characteristics and quality of medical dressings, which in this case have the potential advantages over traditional analogues. To reduce the cost of the final product in the form of graphene-containing composite materials, a new form of layered graphite has been obtained, which, after repeated chemical modification and thermal activation, is led to obtain a material whose structure consists of extended stacks of carbon layers with a multiplicity from several units to dozens, including containing single sheets of graphene. It has been established that this material belongs to the type of graphene-containing and graphene-like forms of carbon. The paper provides an analysis of strategies and developments of foreign and domestic researchers aimed at creating intelligent and functional tissue structures with improved capabilities for drug delivery through the skin and antiseptic wound dressings using graphene-containing components. Further development of biomedical applications involves the use of graphene-like forms of carbon and composites based on them, including opportunities for creating and testing a wide range of ready-made forms of new generation bandages using polygraphen, including for emergency disaster medicine, services of the Ministry of Emergency Situations, as well as for effective treatment of wound injuries of various nature.

Key words: *graphene, graphene derivatives, biocompatibility, wound healing.*

КОМБИНАЦИЯ БИОФИЗИЧЕСКОЙ МИКРОПОЛЯРИЗАЦИИ С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ В КОМПЛЕКСНОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. БАЗОВЫЕ И НОВЫЕ ВАРИАНТЫ

Куулар Мангалтепе А.Р.¹, Ботин А.С.^{1,2,3}

¹ ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ) Пушкинский филиал
просп. Науки, 3, г. Пушкино, г.о. Серпухов, Московская область, РФ

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru

³ Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН),
Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы,
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ

Поступила в редакцию 12.09.2024

Аннотация. В настоящее время, в связи с грандиозным прогрессом в области нейронаук, возникает потребность по-новому рассмотреть возможности уже апробированных методов коррекции нейродегенеративных отклонений. В пекущий период, по данным ВОЗ, соотношение детей с задержками психоречевого развития составляет 1:100 в общемировой популяции. Причем, согласно данным ВОЗ, отмечена нарастающая динамика с ежегодным приростом на 13% количества детей с задержками психоречевого развития. Кроме того отмечается, что в мире ежегодно фиксируется более 6 миллионов инсультов (около 450.000 из них в Российской Федерации), что подтверждает острейшую необходимость во внедрении и применении инновационных методик реабилитации неврологических больных. В данной работе в качестве такой инновационной методики реабилитации неврологических больных предлагается для внедрения, модернизации и массового применения, обновленный биофизический метод микрополяризации в комплексной реабилитации неврологических больных, изначально разработанный и апробированный в Институте мозга человека им. Н. П. Бехтерева РАН. Объект исследования. В качестве объектов исследования были выбраны группы пациентов с задержками психоречевого, речевого развития, а также больные с поражениями спинного мозга. Предмет исследования. Изучение применения микрополяризации в комплексной реабилитации пациентов с задержками психоречевого, речевого развития, с патологиями спинного мозга. Основной задачей данного исследования является раскрытие возможностей такой неинвазивной высокотехнологичной терапии с целью подтверждения, что биофизическая микрополяризация является одним из самых эффективных методов лечения при комплексной реабилитации неврологических заболеваний. Методы исследования. Применение транскраниальной и трансвертебральной микрополяризации в комплексной реабилитации пациентов с задержками психоречевого, речевого развития, с патологиями спинного мозга. В данной работе приведены клинические результаты успешного применения микрополяризации в комплексной реабилитации пациентов с задержками психоречевого, речевого развития, а также пациентов с патологиями спинного мозга. Практическая значимость биофизической микрополяризации. Метод микрополяризации может быть модернизирован и применён в неврологии, реабилитологии, гериатрии и в военной медицине. Ввиду высокой клинической эффективности биофизической микрополяризации в терапии неврологических заболеваний есть необходимость повсеместного широкого внедрения данного метода.

Ключевые слова: микрополяризация головного и спинного мозга, биофизическая терапия, мозговая дисфункция, реабилитация неврологических заболеваний.

Введение. Важность и значимость проблемы. По многочисленным результатам исследований доказано, что мозг человека является очень гибкой, пластичной системой. При возникновении мозговых катастроф (таких как, например, нарушения в умственном и физическом развитии, инсульт, черепно-мозговая травма, последствия перенесенных инфекционных заболеваний и т.д.) мозг может компенсировать свои потери - создать новую группу клеток, которые возьмут на себя функции погибших. Для этого мозгу необходима соответствующая помощь, которую может предоставить метод микрополяризации. [1]

Суть метода в следующем: специально подбирается абсолютно индивидуальный курс процедур, когда при помощи очень слабого электрического тока, происходит стимуляция здоровых клеток головного мозга к тому, что они берут на себя функции погибших или поврежденных клеток. То есть происходит процесс замещения старых связей между нейронами на новые функциональные связи в головном мозге.

В случаях «мозговых катастроф» нервная ткань вокруг очага поражения находится в «оцепеневшем», «полуживом» состоянии. Микрополяризация возвращает нервной ткани утраченные свойства, помогает ей выйти из «оцепенения» и возвращает, таким образом, двигательную активность, слух, зрение, улучшает память и т.д. Очень неплохие результаты дает этот метод при таких серьезных заболеваниях, как ДЦП и эпилепсия, тяжелые невротические расстройства. Отставание пациента в речевом и психическом развитии, мышечная фригидность, повышенная нервная возбудимость, агрессивность – большинство этих проблем можно устранить при помощи

микрополяризации. [2]. Кроме того, весьма эффективно применение транскраниальной микрополяризации при синдроме Дауна у детей. [3]

Важно отметить особую эффективность микрополяризации в работе с детьми. Организм взрослого человека сначала нужно «раскачать», разбудить его внутренние резервы, заставить их включиться в работу. Для ребенка часто достаточно одного толчка, то есть 5-10 сеансов.

Ученые Санкт-Петербургского научно-исследовательского института им. В.М. Бехтерева публикуют данные о том, что после курса микрополяризации, например, клиническое улучшение наступило у 77% детей с синдромом дефицита внимания. У таких детей после сеансов отмечено значительное повышение внимания, снижение гиперактивности. При нарушении развития речи после проведения курса микрополяризации отмечается значительное расширение активного словаря, дети стремятся использовать более сложные предложения. У отстающих в развитии детей происходит улучшение познавательного интереса, активного внимания, занятия с педагогами становятся более эффективными. [4, 5]

Усредненная эффективность данного метода составляет 70-75%. Это, конечно, не 100% излечиваемости, но абсолютной панацеи от любой болезни не существует. А 70%, - очень хороший результат!

Но нужно отметить, что довольно часто в начале лечения отмечается усиление симптомов. Это нормально и связано с перестройкой работы мозга. Как правило, через какое-то время это проходит, и наступает улучшение. Это так называемое «улучшение через ухудшение».

Нервная система человека – это совокупность связанных в сеть нейронов, взаимодействующих между собой при помощи очень слабых токов. Поэтому, микрополяризация – это стимулирование при помощи воздействия специального прибора на определенные участки мозга очень слабыми, то есть естественными для организма человека, электрическими токами. Сила подаваемого при микрополяризации тока в десятки раз меньше тока, применяемого при электрофорезе, гидрофорезе, во время электросна и равна тому электрическому сигналу, с помощью которого взаимодействуют нейроны в теле человека. Ток такой силы не может навредить, так как, по сути, он моделирует работу человеческого мозга.

Не может быть и речи также о болезненности процедуры, что чрезвычайно важно в случае, если пациентом является ребенок. Кстати, микрополяризация практически не имеет ограничений по возрасту.

Задача данной работы состоит в проведении анализа научных публикаций, посвященных актуальным вопросам использования методик микрополяризации головного и спинного мозга в восстановительном лечении детей раннего возраста с темповой задержкой нервно-психического развития, церебральной дисфункцией и различными нарушениями моторики.

Механизмы процессов. Практический опыт. Известно, что в современной физиологии понятие «поляризация» включает в себя, прежде всего, поляризацию клеточных мембран, вызванную эндо- или экзогенными факторами. В качестве экзогенных факторов, на которые нейрон и глиальные клетки способны реагировать временным изменением поляризации мембраны, могут выступать различные воздействия, в том числе и постоянный ток. Причем, как показано в многочисленных экспериментальных исследованиях, наиболее эффективными в регуляции уровня мембранного потенциала выступают постоянные микротоки, которые, в отличие от действия токов большой величины, приводят к оптимизации морфофункционального состояния нервной ткани.

Таким образом, в основе микрополяризации, применяемой в качестве лечебной процедуры, лежат физиологические механизмы, обеспечивающие изменение уровня поляризации клеточной и синаптической мембраны под воздействием постоянного тока малой силы, что, соответственно, создает новый уровень активности нервного субстрата непосредственно в подэлектродном пространстве и в дистантно расположенных нервных образованиях [1,4].

Аппаратные средства. Могут применяться физиотерапевтические аппараты, предназначенные для проведения процедур гальванизации. Рекомендуется использовать специально разработанный для проведения процедур транскраниальной и трансвертебральной микрополяризации физиотерапевтический прибор – аппарат для микрополяризации, гальванизации и электрофореза (АМГЭ-01) «ПОЛЯРИС» или «РЕАМЕД-Полярис» (рис. 1), разрешенный к клиническому применению МЗ РФ (№ 2227 от 29/6 2002) без редакционной правки

Основными техническими требованиями к проведению процедур ТКМП и ТВМП являются безопасность для пациента, возможность плавно изменять параметры тока в узких границах (желательно, до 10-100 мкА) и стабильность выбранного тока;

Для проведения процедур микрополяризации используются стальные пластинки с гидрофильной прокладкой площадью 400-600 мм².

Параметры действующего постоянного тока могут варьировать при ТКМП от 50 мкА до 700 мкА, при ТВМП от 100 мкА до 1 мА.

Показания. Микрополяризация может использоваться как самостоятельный лечебный метод и как оптимизирующий прием в комплексном лечении различных заболеваний нервной системы, в частности, детей любого возраста:

1. Органическое поражение ЦНС в резидуальной стадии заболевания; в том числе детский церебральный паралич:

- спастические формы различной степени тяжести;
- гиперкинетические формы различной степени тяжести;



Рисунок 1. Комплекс «РЕАМЕД» (неофициальные названия «АМГЭ-01 «Полярис», «РЕАМЕД-Полярис»)

-мозжечковые формы различной степени тяжести;

-смешанные формы различной степени тяжести;

2. Черепно-мозговые травмы (в том числе размозжения мозга) и сосудистые заболевания головного мозга в острый период, начиная с 1-2 дней после мозговой катастрофы, а также их последствия (синдром “вегетативный статус”, гемипарезы, парепарезы, атаксия, афазия, алалия и др.).

3. Последствия нейроинфекционных заболеваний головного и спинного мозга.

4. Последствия травм спинного мозга и позвоночника, в том числе последствия оперативного вмешательства.

5. Задержки нервно-психического развития и проблемы обучения.

6. Расстройства речевого развития у детей.

7. Психоэмоциональные, невротические, психосоматические расстройства.

8. Эписиндром.

9. Нарушения зрительных функций (амблиопия, нистагм, косоглазие).

10. Нарушения слуховых функций (сенсоневральная тугоухость).

Противопоказания:

1. Индивидуальная непереносимость электрического тока;

2. Наличие злокачественных образований;

3. Простудные и инфекционные заболевания;

4. Высокая температура тела;

5. Прививки;

Алгоритм действий при назначении курса микрополяризации.

Темповая задержка развития головного мозга у детей раннего возраста может быть связана, с одной стороны, с нарушением развития наиболее молодых церебральных функциональных систем, с другой, – механизмом негрубого органического церебрального повреждения, нарушением структурных и функциональных зон, необходимых для осуществления высокого уровня развития интеллектуальных процессов [1,6-9]. При назначении курса микрополяризации и определении всех его параметров, включая количество и расположение зон для наложения электродов, рекомендуется следовать определенному алгоритму (рис. 2).

В настоящее время наиболее широко применяемым способом коррекции *минимальных мозговых дисфункций* (ММД) является сочетание медикаментозной терапии и физических факторов с психотерапевтическими, педагогическими и логопедическими практиками. При этом целесообразно использовать простые методы нейропсихологической диагностики и контроля за лечением в поликлинических условиях или в реабилитационных центрах. В данном случае интересным представляется объединение оценки произвольной двигательной активности по методике Т. Г. Горячевой и Ю. В. Кузнецовой [10] с проведением *транскраниальной микрополяризации* (ТКМП) и *трансвертебральной микрополяризации* (ТВМП) [11].

В первые годы жизни, в силу незрелости нервной системы у детей, чаще наблюдаются особенности созревания двигательных и психоречевых функций [7,12]. Причем в раннем детстве можно говорить об общей задержке развития с преобладанием нарушений психоэмоциональной или психоречевой сферы [13,14]. У детей старше 3 лет клиническая картина становится более очевидной. То есть – при клиническом осмотре отмечается запаздывание развития моторики, речи, социального поведения, эмоциональная незрелость. Задержка темпового развития перечисленных выше признаков встречалась у 50,8% детей в возрасте 2-3 лет, из них у трети – речь отсутствовала полностью и у 70,2% прослушивались только отдельные слова. У детей с данными расстройствами достоверно чаще выявлялись тактильные нарушения и проблемы слуховой перцепции, а к 6 годам у большинства из них на первый план выходили нарушения поведения [15].

У детей с темповой задержкой нервно-психического развития отмечается нарушение стволовых механизмов регуляции уровня бодрствования, надсегментарных механизмов вегетативного и гемодинамического обеспечения, корково-подкорковых механизмов регуляции эмоций и поведения, в основе которых может лежать ММД, встречающаяся у 5-20% детей в популяции, при этом грубой органической патологии не выявляется [16]. ММД проявляется эмоционально-поведенческими расстройствами [17], гиперактивным поведением [18]. ММД часто совпадает с периодом предречевого развития в 1-2 года, когда идет развитие корковых речевых зон и начинается становление фразовой речи к 3-м годам, а также совершенствуются память и внимание [19].



Рисунок 2. Алгоритм действий при назначении курса микрополяризации и определении всех его параметров

У детей, особенно раннего возраста, огромную роль в восстановлении и компенсации поврежденных структур играет пластичность центральной нервной системы (ЦНС) на макро- и микроуровне. Макроуровень предполагает связь нейрональной структуры мозга с внутри- и межполушарными связями. Микроуровень обеспечивается молекулярными изменениями в нейронах и синапсах, а функционирование (синаптическая пластичность) обеспечивается различными нейротрансмиттерными системами (глутаматергической, моноаминергической, GABA-рецепторами и пр.) [20].

По данным Т.С. Каменской, синдром задержки психоречевого развития не обладает нозологической самостоятельностью и имеет значительный клинический полиморфизм, где большую часть этой когорты составляют пациенты с отягощенным перинатальным анамнезом. У детей с задержкой психоречевого развития проявляется различная структура нарушений когнитивных функций и эмоциональной сферы, однако всегда в структуре дефицита доминируют нарушения речи, слухоречевой, зрительно-пространственной памяти и произвольного внимания [21].

Выявленные нарушения высшей нервной деятельности зачастую сочетаются с диспраксией, выражающейся в изменении сферы произвольных движений у детей при отсутствии патологии мышечного тонуса, параличей и прочих отклонений (неуклюжий ребенок), при позднем выявлении которых нарушается качество жизни ребенка и его самооценка. Причем у мальчиков она встречается в 4-7 раз чаще, чем у девочек, однако у последних она протекает в более тяжелой форме [22,23]. Дети с двигательными нарушениями, координаторными расстройствами в подростковом возрасте, кроме трудностей с исполнительными функциями, влияющими на их повседневную деятельность [24,25].

При этом в диагностике ММД используются пробы с различным набором заданий для правой и левой руки, что дает возможность убрать влияние «научения». Воздействие на корковые зоны мозга и пробы проводятся в зависимости от возраста ребенка и возможности его воспроизвести тот или иной тест. Особенно интересными являются пробы, выявляющие нарушение праксиса (целенаправленных, координированных и сознательных движений), за развитие которых отвечают специфические нейроны коры головного мозга (корковые центры зрения, слуха, моторные и сенсорные зоны) – это первичные поля, занимающие небольшие площади в коре мозга. Вторичные поля крупнее, их нейроны менее специфичны, поэтому и коррекции они поддаются лучше [23]. При поражении этих полей нет возможности дифференцировать услышанное или увиденное. Третичные поля – большие сенсорные системы, воздействие на которые, если время не упущено, дает возможности для хорошей коррекции и компенсации нарушенных функций.

При этом важно верифицировать форму диспраксии, что позволит топически «точно» воздействовать на соответствующие поля ЦНС. Так, кинестетическая диспраксия возникает при поражении средних участков постцентральной коры, которая в эмбриогенезе закладывается как часть единой сенсомоторной области, проявляется нарушением уклада позы, в том числе артикуляционных функций, и соматогнозиса (восприятие своего тела). В развитие диспраксии кистей вовлечена нижняя теменная область левого полушария. Кинетическая (эфферентная) диспраксия вызывает трудности контроля и выполнения согласованных движений, требующих быстрого темпа, нарушение мелкой моторики пальцев рук с переключением движения. Кинетическая диспраксия связана с поражением нижних отделов премоторной области – 6-го и 8-го полей. Идеомоторная диспраксия протекает с нарушением программы действий и связана по локализации с премоторной областью головного мозга. Важную роль в праксисе играет тактильная чувствительность (постцентральная извилина), которая распознает качество и локализацию внешнего стимула, особенно поступающего с кончиков пальцев рук, где наиболее высока плотность чувствительных рецепторов. Пространственная диспраксия возникает при

поражении теменно-затылочных отделов, особенно левого полушария. В ее основе лежит оптико-пространственная агнозия. Наблюдается диспраксия позы, ухудшается выполнение сложных пространственно-организованных действий, при которых усиление зрительного контроля не помогает.

ТКМП и ТВМП является одним из методов выбора для коррекции нейропсихических и моторных нарушений у взрослых и детей [11,26-28]. При проведении ТКМП выбор корковых зон обусловлен тем, что лобная и теменная кора отвечают за управление высшими когнитивными функциями (зрение, слух, моторные функции и сенсорное восприятие), височная область – за слух и анализ полученных звуков [29]. При воздействии ТКМП на лобные доли за счет кортикофугальных и транссинаптических связей вовлекается в системный эффект таламус, гипоталамус, гипокамп, миндалевидное тело, при этом лимбическая система является ведущей эмоциональной структурой мозга. Воздействие на височные доли улучшает и закрепляет процесс памяти, причем первой зоной, реагирующей на ТКМП, является глия, а затем нейроны и синапсы [30].

При использовании ТКМП применяется постоянный (гальванический) ток (силой до 1 мА) направленного воздействия (с малыми по площади электродами, располагаемыми в топически значимых зонах), который влияет не только на собственно корковые поля, но и на более глубоко расположенные структуры за счет нисходящих корково-фугальных импульсов. В процессе процедуры возникает поляризация клеточной и синаптической мембран – то есть сдвиг мембранного потенциала клеток предваряется запуском биохимических реакций на цитоплазматической мембране нейронов с интенсификацией обмена ионов кальция, с повышением активности протеолитических ферментов, повышением активности «фазических» (обеспечивающих нейродинамические информационные процессы) и «тонических» (обеспечивающих регуляцию межнейронных связей) синапсов, с последующей активацией внутриклеточных метаболических процессов, эффектом «мембранного усиления» и в целом – к оптимизации состояния нервной ткани [31].

Экспериментальные исследования, проведенные японскими авторами А. Morivaki et al. (1991), свидетельствуют о том, что анодная поляризация коры головного мозга изменяет генерацию и аккумуляцию основного посредника действия катехоламинов – циклического аденозинмонофосфата [32]; Y. Takano обнаружил, что после анодной стимуляции фронтального кортекса крыс в нем повышается нейрональная активность, а в связанных с ним регионах среднего мозга – увеличивается концентрация внутриклеточного дофамина [33].

В клинических экспериментах установлено, что ТКМП префронтального кортекса дистанционно вызывает нейрональную активацию в среднем мозге, что непосредственно оказывает положительную коррекцию поведения больного при нервно-психических нарушениях [34]; показано также, что ТКМП модулирует функциональную связь кортико-полосатых и таламо-кортикальных цепей (подчеркивается способность анодной стимуляции изменять активность элементов кортико-стриато-таламо-кортикальной функциональной двигательной цепи) [35, 36].

Таким образом, слабый постоянный электрический ток является активным фактором, стимулирующим функциональную активность ЦНС и рост корковой клеточной архитектуры, что позволяет использовать ТКМП в качестве метода лечебного воздействия при функциональных и органических нарушениях деятельности мозга [27,28].

Обсуждение. Биофизические факторы. Микрополяризация мозга приводит к направленному изменению уровня возбудимости нейронов, активации проводниковых систем, обеспечивает адекватное восприятие нервными клетками экзо- и эндогенной импульсации, что проявляется соответствующими изменениями биоэлектрической активности головного и спинного мозга, параметров соматосенсорных вызванных потенциалов, рефлекторной возбудимости мотонейронов, восстановлением реакций моносинаптического мышечного рефлекса на функциональные пробы, появлением ранее отсутствовавшей произвольной активности мышц, улучшением двигательных, психических, речевых и вегетативных функций.

Перестройка функционального состояния ЦНС, вызванная микрополяризацией корковых и сегментарных проекций, охватывает различные уровни нервной системы, продолжается в течение длительного времени после окончания воздействий, сопровождается улучшением различных функций организма и нормализацией биохимических показателей, что свидетельствует об активации медленной управляющей системы и, соответственно, саморегуляторных механизмов мозга, обеспечивающих восстановление динамического гомеостаза [37-39].

Закключение. Решение проблемы регуляции различных функций организма с применением биофизических неинвазивных методов воздействия физическими факторами, кроме фундаментального значения для общей физиологии нервной системы имеет крайне важное прикладное значение. Эффективная коррекция различных нарушений нервной системы нетравматичными и физиологически обоснованными методами позволяет не только уменьшить инвалидизацию, но и необходимость проведения трудоемких и дорогостоящих инвазивных методов лечения, снизить объем и дозы применяемых лекарственных препаратов, уменьшить их возможные токсические влияния, оптимизировать действие других лечебных процедур, снизить объем и сроки лечения.

Разработка теории на основе обширной практики посвящены актуальным вопросам применения методик микрополяризации головного и спинного мозга. Проанализированы литературные и собственные данные (практика Куулар Мангалтепе А.Р.) использования данной медицинской технологии в восстановительном лечении детей раннего возраста с темповой задержкой нервно-психического развития, мозговой дисфункцией и различными нарушениями праксиса. Раскрыт ряд механизмов лечебного действия методики микрополяризации головного мозга в компенсации поврежденных структур и нейропластичности на макро- и микроуровне.

Приведены сведения о топике зон воздействия по оценки произвольной двигательной активности. Отражены вопросы преимущества использования двухканальных аппаратов с возможностью симметричного расположения электродов.

Таким образом, обобщая вышеизложенные литературные данные отечественных и зарубежных источников, а также собственные исследования, можно сделать следующие выводы:

- коррекцию минимальных мозговых дисфункций и более тяжелых расстройств ЦНС, в том числе с двигательными нарушениями, с использованием ТКМП и ТВМП необходимо проводить в максимально ранние сроки развития/диагностики патологии, что обеспечивает лучший эффект от проводимой терапии;
- в диагностическом паттерне неврологической патологии у данной категории детей целесообразно использовать верификацию формы вида диспраксии, что позволяет топически «точно» воздействовать ТКМП на соответствующие поля ЦНС;
- применение ТКМП и ТВМП у детей с широким спектром психоневрологических заболеваний (от ММД до синдрома Дауна и прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна) позволяет существенно улучшить когнитивные и локомоторные функции ребенка, а также его качество жизни;
- эффективное использование ТКМП и ТВМП у данной категории пациентов во многом зависит от оптимальных параметров тока и расположения электродов, а также применение современных аппаратов, обладающих в комплектации сдвоенных анодов и катодов (по 2 выходам), позволяющих симметрично располагать электроды.

С биофизической точки зрения, микрополяризация мозга, изменяя функциональное состояние нервного субстрата в подэлектродном пространстве, вызывает избирательное вовлечение в системный эффект различных дистантно расположенных мозговых структур, выраженность которого определяется характером горизонтальных и вертикальных морфофункциональных связей. Транскраниальная микрополяризация обеспечивает нормализацию внутри- и межцентральных механизмов деятельности головного мозга, а также стволовых и сегментарных образований. Трансвертебральная микрополяризация, оказывая направленное влияние на спинальные механизмы моторного контроля, приводит к перестройкам в сторону нормы деятельности высших регуляторных отделов ЦНС.

Список литературы / References:

1. Шелякин А.М., Преображенская И.Г. Микрополяризация мозга. Санкт-Петербург 2021 [Shelyakin A.M., Preobrazhenskaya I.G. *Brain micropolarization*. St. Petersburg 2021 (In Russ.)].
2. Шелякин А.М. Микрополяризация. *Физиотерапия. Национальное руководство*, Москва. ГЭОТАР-Медиа, 2009, с. 97-99 [Shelyakin A.M. *Micropolarization. Physiotherapy. National Manual*, Moscow. GEOTAR-Media, 2009, pp. 97-99 (In Russ.)].
3. Колчева Ю.А., Непомнящая С.А., Адрианов А.В. Неврологические нарушения и возможности комплексной абилитации с применением транскраниальной микрополяризации при синдроме Дауна у детей. *Медико-социальная экспертиза и реабилитация*, 2021, т. 24, № 4, с 5-12 [Kolcheva Y.A., Nepomnyaschaya S.A., Adrianov A.V. Neurological disorders and possibilities of complex habilitation with the use of transcranial micropolarization in Down syndrome in children. *Medico-social expertise and rehabilitation*, 2021, vol. 24, no. 4, pp. 5-12, doi: 10.17816/MSER88640 (In Russ.)].
4. Бехтерева Н.П. *Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека*. Санкт-Петербург: Сова, 2008, 464 с. [Bekhtereva N.P. *Therapeutic electrical stimulation of human brain and nerves*. St. Petersburg: Sova, 2008, 464 p. (In Russ.)].
5. Суслова Г.А., Суслов В.М., Царёв Г.П. и др. Транскраниальная микрополяризация в коррекции когнитивных нарушений у пациентов дошкольного возраста. *Медицина: теория и практика*, 2023, т. 8, № 1, с. 41-46 [Suslova G.A., Suslov V.M., Tsarev G.P. et al. Transcranial micropolarization in the correction of cognitive disorders in preschool patients. *Medicine: Theory and Practice*, 2023, vol. 8, no. 1, pp. 41-46, doi: 10.56871/МТР.2023.27.40.005 (In Russ.)].
6. Емелина Д.А. Задержки темпа психического развития у детей (обзор литературных данных). *Обзорение психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева*, 2011, № 3, с. 11-16 [Emelina D.A. Delays in the pace of mental development in children (review of literary data). *Review of Psychiatry and Medical Psychology. V.M. Bekhterev*, 2011, no. 3, pp. 11-16 (In Russ.)].
7. Журба Л.Т. *Нарушение психомоторного развития детей первого года жизни*. М.: Медицина, 1981, 272 с. [Zhurba L.T. *Violation of psychomotor development of children of the first year of life*. Moscow: Medicine, 1981, 272 p. (In Russ.)].
8. Гусева Е.И. *Неврология: национальное руководство: в 2-х т. 2-е изд., перераб. и доп.* Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022, т. 1, 880 с. [Guseva E.I. *Neurology: national guide: in 2 vol. 2nd ed., rev. and supplement*. Moscow: GEOTAR-Media, 2022, vol. 1, 880 p. (In Russ.)].
9. Каминская Т.С. Когнитивный «портрет» детей с задержкой психоречевого развития. *Лечащий Врач*, 2022, № 4 (25), с. 19-26 [Kaminskaya T.S. Cognitive “portrait” of children with delayed psycho- speech development. *Lechashchy Vrach*, 2022, no. 4 (25), pp. 19-26 (In Russ.)].
10. Горячева Т.Г. Методы диагностики произвольной двигательной активности у детей. *Диагностика в медицинской (клинической) психологии: современное состояние и перспективы*. М.: ООО «Сам Полиграфист»,

- 2016, с. 166-176 [Goryacheva T.G. Methods of diagnostics of arbitrary motor activity in children. *Diagnostics in medical (clinical) psychology: current state and prospects*. М.: ООО "Sam Polygraphist", 2016, p. 166-176 (In Russ.)].
11. Шелякин А.М. Микрополяризационная терапия в детской неврологии. Практическое руководство. М: Медкнига, 2018, 120 с. [Shelyakin A.M. *Micropolarization therapy in pediatric neurology*. Practical guide. М: Medkniga, 2018, 120 p. (In Russ.)].
12. Скоромец А.П. Задержка психического развития у детей и принципы их коррекции. *Лечащий врач*, 2011, № 5, с. 53-57 [Skoromets A.P. Delayed mental development in children and the principles of their correction. *Lechachashchy doctor*, 2011, no. 5, pp. 53-57 (In Russ.)].
13. Бобылова М.Ю. Задержка речевого развития у детей: введение в терминологию. *Русский журнал детской неврологии*, 2019, № 12 (1), с. 56-62 [Bobylova M.Y. Delayed speech development in children: an introduction to terminology. *Russian journal of pediatric neurology*, 2019, no. 12 (1), pp. 56-62 (In Russ.)].
14. Чиж Д.И. Избранные вопросы детской неврологии: учеб. Пособие. Пенза: Изд-во ПГУ, 2021, 126 с. [Chizh D.I. *Selected issues of pediatric neurology: textbook*. Penza: Izd-vo PSU, 2021, 126 p. (In Russ.)].
15. Поздняк В.В. Динамика речевых расстройств и нарушений поведения у детей. *Научно-практический журнал*, 2018, № 21 (2), с. 100-106 [Pozdnyak V.V. Dynamics of speech disorders and behavioral disorders in children. *Scientific and Practical Journal*, 2018, no. 21 (2), pp. 100-106 (In Russ.)].
16. Даценко И.Б. ММД и эмоционально-поведенческие расстройства у детей и принципы их дифференциальной коррекции. *Международный медицинский журнал*, 2007, № 1, с. 28-35 [Datsenko I.B. MMD and emotional-behavioral disorders in children and principles of their differential correction. *International Medical Journal*, 2007, no. 1, pp. 28-35 (In Russ.)].
17. Галицкая О.С. Клинический полиморфизм минимальной мозговой дисфункции. *Смоленский медицинский альманах*, 2019, № 3, с. 27-32 [Galitskaya O.S. Clinical polymorphism of minimal cerebral dysfunction. *Smolensk Medical Almonach*, 2019, no. 3, pp. 27-32 (In Russ.)].
18. Морозова Е.А. Синдром дефицита внимания и гиперактивности: новое в понимании и подходах к лечению. *Русский журнал детской неврологии*, 2019, № 14 (1), с. 14-25 [Morozova E.A. Attention deficit hyperactivity disorder: new in understanding and approaches to treatment. *Russian Journal of Pediatric Neurology*, 2019, no. 14 (1), pp. 14-25 (In Russ.)].
19. Заваденко Н.Н. Задержки развития речи у детей: причины, диагностика и лечение. *РМЖ*, 2016, № 6, с. 362-366 [Zavadenko N.N. Delayed speech development in children: causes, diagnosis and treatment. *RMZh*, 2016, no. 6, pp. 362-366 (In Russ.)].
20. Баранов А.А. Роль пластичности головного мозга в функциональной адаптации организма при детском церебральном параличе с поражением рук. *Педиатрическая фармакология*, 2012, № 9 (6), с. 24-32 [Baranov A.A. Role of brain plasticity in functional adaptation of the organism in infantile cerebral palsy with hand lesions. *Pediatric Pharmacology*, 2012, no. 9 (6), pp. 24-32 (In Russ.)].
21. Каминская Т.С. Когнитивный «портрет» детей с задержкой психоречевого развития. *Лечащий врач*, 2022, 4, с. 19-26 [Kaminskaya T.S. Cognitive "portrait" of children with delayed psycho speech development. *Treating physician*, 2022, 4, pp. 19-26 (In Russ.)].
22. Садовская Ю.Е. Проблема постановки диагноза «диспраксия развития» в детском возрасте. *Лечебное дело*, 2021, № 2, с. 79-86 [Sadovskaya Y.E. Problem of making the diagnosis of "developmental dyspraxia" in childhood. *Medical Business*, 2021, no. 2, pp. 79-86 (In Russ.)].
23. Усольцева Е.В. Артикуляционная диспраксия. *Инновационная наука*, 2020, № 12, с. 104-106 [Usoltseva E.V. Articulation dyspraxia. *Innovatsionnaya nauka*, 2020, no. 12, pp. 104-106 (In Russ.)].
24. Lachambre C. Attentional and executive functions in children and adolescents with developmental coordination disorder and the influence of comorbid disorders: A systematic review of the literature. *PLoS One*, 2021, 231 p.
25. Marialivia B. Executive functions in children with developmental coordination disorder: a 2-year follow-up study. *Dev. Med. Child Neurol.*, 2018, vol. 60, no. 3, pp. 306-313.
26. Кожушко Н.Ю. Использование локальных воздействий на мозг у детей с нарушением психического развития. *Вопросы психического здоровья детей и подростков*, 2017, № 17 (3), с. 42-51 [Kozhushko N.Y. Use of localized influences on the brain in children with mental developmental disorders. *Issues of mental health of children and adolescents*, 2017, no. 17 (3), pp. 42-51 (In Russ.)].
27. Разумова А.Н., Стародубова В.И., Пономаренко Г.Н. Санаторно-курортное лечение: национальное руководство. М.: GEOTAR-Медиа, 2021, 752 с. [Razumova A.N., Starodubova V.I., Ponomarenko G.N. *Sanatorium-resort treatment: national guide*. Moscow: GEOTAR-Media, 2021, 752 p. (In Russ.)].
28. Пономаренко Г.Н. Физиотерапия: национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, 2013, 864 с. [Ponomarenko G.N. *Physiotherapy: national guide*. GEOTAR-Media, 2013, 864 p. (In Russ.)].
29. Лурия А.Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга. М: Изд-во Московского университета, 1962, 432 с. [Luria A.R. *Higher cortical functions of man and their disorders in local brain lesions*. Moscow: Moscow University Press, 1962, 432 p. (In Russ.)].
30. Вартанян Г.А. Организация и модуляция процессов памяти. Л.: Медицина, Ленинградское отделение, 1981, 208 с. [Vartanyan G.A. *Organization and modulation of memory processes*. L.: Medicine, Leningrad Branch, 1981, 208 p. (In Russ.)].
31. Шелякин А.М., Преображенская И.Г. Микрополяризация мозга. Вчера. Сегодня. Завтра: монография. СПб: Страта, 2021, 377 с. [Shelyakin A.M., Preobrazhenskaya I.G. *Brain micropolarization. Yesterday. Today. Tomorrow: monograph*. SPb: Strata, 2021, 377 p. (In Russ.)].
32. Morivaki A. Polarizing currents increase noradrenaline – elicited accumulation of cyclic AMF in rat cerebral cortex. *Brain Research*, 1991, no. 544, pp. 248-252.

33. Takano Y. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci. Lett.*, 2011, vol. 491, no. 1, pp. 40-43.
34. Chib V.S. Noninvasive remote activation of the ventral midbrain by transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex. *Transl. Psychiatry*, 2013, vol. 3, no. 6, p. 268.
35. Polania R. Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation. *Hum. Brain Mapp.*, 2012, vol. 33, no. 10, pp. 2499-2508.
36. Долгих Г.Б., Гуляев В.Ю., Федоров А.А., Телегина Е.В., Хаитов Р.Р., Ситников А.В., Заяц Л.В., Ладыгин Д.А. Основы применения микрополяризации головного и спинного мозга у детей дошкольного возраста с определением топических зон воздействия (информационный материал). *Журнал Курортная медицина*, 2024, т. 1, с. 41-50 [Dolgikh G.B., Gulyaev V.Yu., Fedorov A.A., Telegina E.V., Khaitov R.R., Sitnikov A.V., Zayats L.V., Ladygin D.A. Fundamentals of application of micropolarization of the brain and spinal cord in preschool children with determination of topical zones of influence (information material). *Journal of Spa Medicine*, 2024, vol. 1, pp. 41-50 (In Russ.)].
37. Шелякин А.М. *Микрополяризация мозга: Эффективность, физиологический анализ*. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, 2003 [Shelyakin A.M. *Brain micropolarization: Efficiency, physiological analysis*. Dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences, 2003 (In Russ.)].
38. Лебедев В.П., Ильинский О.Б., Савченко А.Б. и др. Неинвазивная транскраниальная электростимуляция эндорфинных структур мозга как активатор репарации: экспериментально-клинические параллели. *Электростимуляция*, 2002, с. 15-23 [Lebedev V.P., Ilyinsky O.B., Savchenko A.B. et al. Noninvasive transcranial electrical stimulation of brain endorphin structures as an activator of repair: experimental and clinical parallels. *Electrostimulation*, 2002, pp. 15-23 (In Russ.)].
39. Пономаренко Г.Н., Турковский И.И. *Биофизические основы физиотерапии*. Санкт-Петербург, 2003, 152 с. [Ponomarenko G.N., Turkovsky I.I. *Biophysical bases of physiotherapy*. St. Petersburg, 2003, 152 p. (In Russ.)].

COMBINATION OF BIOPHYSICAL MICROPOLARIZATION WITH OTHER METHODS IN THE COMPLEX REHABILITATION OF NEUROLOGICAL DISEASES. BASIC AND NEW OPTIONS.

Kuular Mangaltepe A.R.¹, Botin A.S.^{1,2,3}

¹ Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH) Pushchino branch, Moscow region, Russia
Ave. of Science 3, Pushchino, Serpukhov, Moscow region, 142290, Russia

² N.V. Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russia
Bolshaya Sukharevskaya Sq., 3, Moscow, 129090, Russia; e-mail: BotinAS@sklif.mos.ru

³ Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology,
Peoples' Friendship University of Russia n.a. P. Lumumba (RUDN)
Miklukho-Maklaya St., 6, Moscow, 117198, Russia; e-mail: botin-as@rudn.ru

Received 12.09.2024

Abstract. Currently, due to the tremendous progress in the field of neuroscience, there is a need to re-examine the possibilities of already proven methods for correcting neurodegenerative disorders. During the baking period, according to the WHO, the ratio of children with speech and mental retardation is 1:100 in the global population. Moreover, according to WHO data, there has been a terrifying trend with an annual increase of 13% in the number of children with developmental delays. In addition, it is noted that more than 6 million strokes are recorded annually in the world (about 450,000 of them in the Russian Federation), which confirms the urgent need for the introduction and application of innovative methods for the rehabilitation of neurological pathologies. In this paper, as such an innovative method of rehabilitation of neurological pathologies, an updated biophysical micropolarization method in the complex rehabilitation of neurological diseases, originally developed and tested at the N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, is proposed for implementation, modernization and mass application. The object of the study. Groups of patients with delayed speech and speech development, as well as patients with spinal cord lesions, were selected as the objects of the study. The subject of the study. The study of the use of micropolarization in the complex rehabilitation of patients with delays in speech and speech development, with spinal cord pathologies. The main objective of this study is to uncover the possibilities of such noninvasive high-tech therapy in order to confirm that biophysical micropolarization is one of the most effective methods of treatment for complex rehabilitation of neurological diseases. Research methods. The use of transcranial and transvertebral micropolarization in the complex rehabilitation of patients with delays in speech and speech development, with spinal cord pathologies. This paper presents the clinical results of the successful application of micropolarization in the complex rehabilitation of patients with delays in speech and speech development, as well as patients with spinal cord pathologies. The practical significance of biophysical micropolarization. The micropolarization method can be modernized and applied in neurology, rehabilitation, geriatrics and military medicine. Due to the high clinical effectiveness of biophysical micropolarization in the treatment of neurological diseases, there is a need for widespread implementation of this method.

Key words: micropolarization of the brain and spinal cord, biophysical therapy, brain dysfunction, rehabilitation of neurological diseases.

АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННЫХ, БИОХИМИЧЕСКИХ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* (PALLAS, 1814) ИЗ ДВУХ РАЙОНОВ АЗОВСКОГО МОРЯ

Сигачева Т.Б., Скуратовская Е.Н., Чекмарева Т.М.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: chekmareva@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 12.08.2024

Аннотация. Проведен анализ популяционных (длины и массы рыб, индекса печени (ИП) и гонадосоматического индекса (ГСИ)), биохимических (активности супероксиддисмутазы (СОД) и содержания продуктов окислительной модификации белков (ОМБ)) и токсикологических (содержания химических элементов) показателей бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) из двух районов Азовского моря (Темрюкского (ТЗ) и Ясенского заливов (ЯЗ)). Установлено смещение прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону процессов ОМБ у рыб из ТЗ, где средние значения длины и массы тела, а также ГСИ были достоверно ниже, а ИП – достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями бычков из ЯЗ. Результаты токсикологического анализа печени рыб из двух локаций позволили характеризовать их как близкие по уровню загрязнения тиоловыми ядами – Hg, Pb, As, за исключением Cd. Концентрация последнего была достоверно выше в печени рыб из ТЗ. При этом содержание Cu, Zn и других биогенных элементов (Se, Ca, K, P) было достоверно выше в печени рыб из ЯЗ. Результаты популяционных и биохимических исследований свидетельствуют о реорганизации метаболических процессов в ущерб соматическому и генеративному росту рыб из ТЗ и согласуются с данными элементарного анализа.

Ключевые слова: бычок-кругляк, печень, химические элементы, биомаркеры, Азовское море.

ВВЕДЕНИЕ

К числу приоритетных загрязнителей большинства водоемов относят химические элементы (ХЭ), характеризующиеся высокой аккумуляционной способностью и токсичностью для живых организмов [1]. В морской среде ХЭ включаются в глобальный биогеохимический цикл, постоянно перераспределяясь по отдельным компонентам экосистемы: минерализуются, распространяются по акваториям в результате гидрофизических процессов, аккумулируются гидробионтами, многократно передаются по трофическим цепям и депонируются в донных осадках [2]. В экологически неблагоприятных районах содержание ХЭ в рыбах значительно превышает ПДК, что может представлять опасность для употребления их в пищу человеком. Таким образом, анализ содержания ХЭ в тканях промысловых видов рыб является важным этапом оценки качества рыбной продукции, а в тканях биоиндикаторных видов – отражает уровень загрязнения морских акваторий [1,3]. При этом оценка риска загрязнения окружающей среды, основанная только на химическом анализе грунтов/ воды или тканей гидробионтов, не дает четкого представления о токсическом воздействии загрязнителей на живые организмы [4]. В связи с этим, только совместное изучение токсикологических и биологических показателей в тканях рыб характеризует состояние рыбных популяций и качество среды их обитания.

Оптимальным объектом для проведения подобных исследований является бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814). Этот вид относится к промысловым рыбам Азовского моря и широко применяется при проведении биоиндикационных исследований, как в водоемах его естественного обитания, так и за его пределами [5–7].

Таким образом, цель работы – изучение популяционных, биохимических и токсикологических показателей печени бычка-кругляка из районов Азовского моря с разным уровнем загрязнения ХЭ.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический материал – бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814), был получен из двух районов Азовского моря в октябре 2019 г. После поднятия на палубу рыбу подвергали стандартному биологическому анализу (33 экз.). Определяли общую (Тl) и стандартную длину (Sl), вес тела (W), вес тела без внутренностей ($W_{\text{туш}}$), а также вес печени ($W_{\text{печ}}$), гонад ($W_{\text{гон}}$), пол и стадию зрелости. Возраст рыб оценивали по отолитам. Индекс печени (ИП, %) и гонадосоматический индекс (ГСИ, %) рассчитывали согласно стандартным методикам [8]:

$$\text{ИП} = \frac{W_{\text{печ}}}{W_{\text{туш}}} * 100, \quad (1)$$

где $W_{\text{печ}}$ – вес печени, $W_{\text{туш}}$ – вес тушки;

$$\text{ГСИ} = \frac{W_{\text{гон}}}{W_{\text{туш}}} * 100, \quad (2)$$

где $W_{\text{гон}}$ – вес гонад, $W_{\text{туш}}$ – вес тушки.

Определение тяжелых металлов и биохимических показателей проводили в печени самцов бычка-кругляка доминантной в улове возрастной группы (0+), со стадией зрелости гонад 2–3.

Район 1 (N 45°27'8"; E 37°06'8") расположен в северо-западной части Темрюкского залива (ТЗ). Основными источниками загрязнения этой локации являются сток р. Кубань, сточные воды промышленных предприятий, смывы удобрений и пестицидов с сельскохозяйственных угодий, судоходство.

Район 2 (N 46°07'6"; E 38°04'0") находится в юго-западной части Ясенского залива (ЯЗ). Основными источниками загрязнения являются смывы пестицидов и удобрений с сельскохозяйственных угодий и судоходство.

Химические элементы (ХЭ) – ртуть (Hg), свинец (Pb), кадмий (Cd), мышьяк (As), железо (Fe), медь (Cu), цинк (Zn), селен (Se), марганец (Mn), кальций (Ca), калий (K) и фосфор (P) определяли в печени бычка-кругляка на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой PlasmaQuant MS Elite (Analytik Jena AG, Германия) на базе научно-образовательного центра коллективного пользования «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ.

Материалом для биохимических исследований служила печень 12 и 15 экз. рыб из ТЗ и ЯЗ соответственно. Печень несколько раз промывали холодным 0.85% физиологическим раствором после чего гомогенизировали в калий-фосфатном буфере (50 мМ, pH 7.2) с добавлением 1 мМ ЭДТА. Для получения супернатантов гомогенаты центрифугировали 15 мин при 10000 g и температуре 0–4°C в рефрижераторной центрифуге MPW-352R (MPW Med. Instruments, Польша). Все биохимические показатели определяли в супернатантах.

Уровень ОМБ анализировали на основе реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином [9]. Оптическую плотность образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов регистрировали при следующих длинах волн (λ): при 356 и 370 нм альдегидные (С356) и кетонные (С370) продукты нейтрального характера, при 430 и 530 нм – альдегидные (С430) и кетонные (С530) продукты основного характера.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) анализировали в системе нитросинийтетразолиевый – феназинметасульфат – никотинамиддинуклеотид ($\lambda = 560$ нм) [10].

Биохимические показатели пересчитывали на белок, концентрацию которого определяли биуретовым методом ($\lambda = 540$ нм) с использованием стандартного набора реагентов “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия).

Результаты обрабатывали статистически, вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку средней. Достоверность различий между выборками оценивали с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ Past 3 и Microsoft Office Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Популяционные характеристики самцов бычка-кругляка из двух районов Азовского моря представлены на рисунке 1. Средние значения ГСИ ($p \leq 0,05$), длины ($p \leq 0,05$) и массы тела ($p \leq 0,05$) были достоверно выше, а ИП – достоверно ниже ($p \leq 0,05$) у рыб из ЯЗ по сравнению с аналогичными показателями особей из ТЗ.

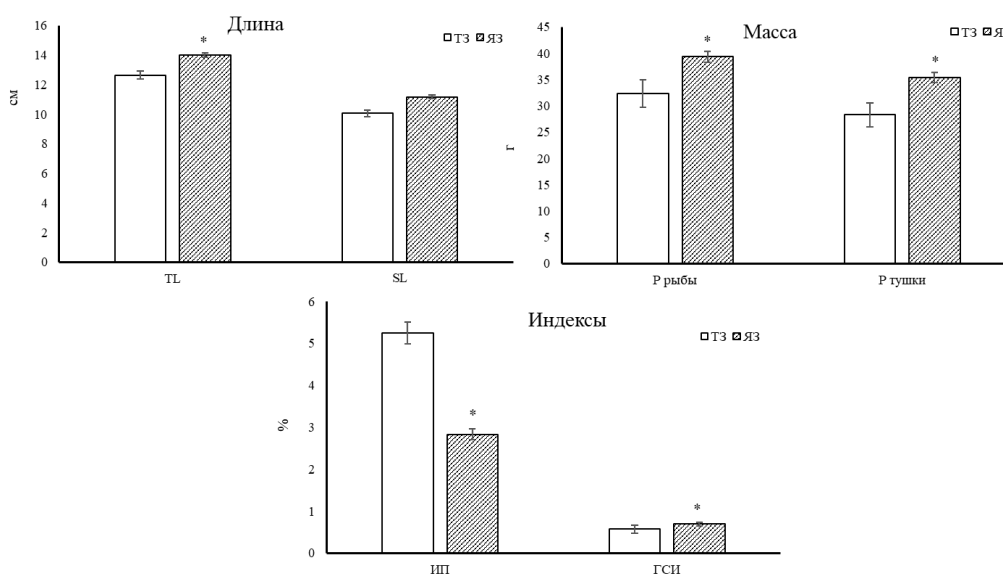


Рисунок 1. Размерно-массовые и морфофизиологические параметры ($M \pm m$) бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* из двух районов Азовского моря. TL – общая длина; SL – стандартная длина; ИП – индекс печени; ГСИ – гонадосоматический индекс; ТЗ – Темрюкский залив; ЯЗ – Ясенский залив; * различия достоверны ($p \leq 0,05$)

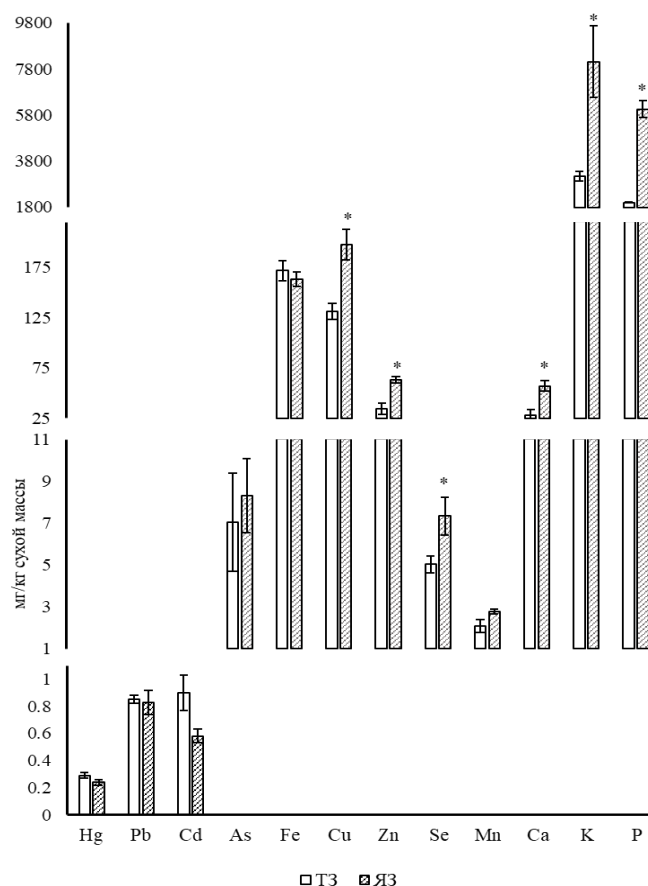


Рисунок 2. Содержание ХЭ ($M \pm m$) (мг/кг сухой массы) в печени бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* из двух районов Азовского моря. ТЗ – Темрюкский залив; ЯЗ – Ясенский залив; * различия достоверны ($p \leq 0,05$)

Результаты токсикологического анализа печени рыб из двух локаций позволили характеризовать их как близкие по уровню загрязнения тиоловыми ядами – Hg, Pb, As, за исключением Cd. Концентрация последнего была достоверно выше ($p \leq 0,05$) в печени рыб из ТЗ (рис. 2). Анализ эссенциальных условно токсичных элементов показал, что уровень Cu и Zn был достоверно выше ($p \leq 0,05$) в печени рыб из ЯЗ. Содержание Fe не отличалось в печени рыб из двух локаций. Концентрация других биогенных элементов (Se, Ca, K, P) была достоверно выше ($p \leq 0,05$) в печени рыб из ЯЗ, за исключением Mn (рис. 2).

Уровень ОМБ был достоверно выше в печени рыб из ТЗ по сравнению с аналогичными показателями бычков из ЯЗ (С 356, $p \leq 0,05$; С 370, $p \leq 0,05$; С 430, $p \leq 0,05$) (рис. 3). Исключение составили кетопроизводные основного характера (С 530), содержание которых не отличалось у рыб из ТЗ и ЯЗ. Активность СОД была достоверно ниже ($p \leq 0,05$) в печени бычков из ТЗ по сравнению с аналогичными показателями рыб из ЯЗ.

Оценить характер ответной реакции организма на комплекс неблагоприятных факторов среды, включая загрязнение ХЭ, позволяет анализ соотношения процессов окислительного повреждения биомолекул с буферной емкостью АО системы. В наших исследованиях содержание продуктов ОМБ было достоверно выше, а активность СОД – достоверно ниже в печени рыб из ТЗ по сравнению с аналогичными показателями рыб из ЯЗ (рис. 3). Результаты содержания токсичных элементов (Hg, Pb, Cd, As) в печени бычка-кругляка из двух локаций позволили характеризовать их как близкие по уровню загрязнения Hg, Pb и As, за исключением более высокого содержания Cd в печени рыб из ТЗ (рис. 2).

Cd является антагонистом многих эссенциальных элементов (Zn, Se и др.), а также сильнейшим тиоловым ядом. Механизм токсического действия этого элемента реализуется через ингибирование активности цинк и селенсодержащих ферментов, включая Cu,Zn-СОД и глутатионпероксидазу (ГП), а также блокирование сульфгидрильных групп белковых структур [11]. Снижение активности СОД, КАТ на фоне увеличения общей АО активности и снижения содержания малонового диальдегида (МДА) было установлено в печени сеголеток карпа (*Cyprinus Carpio* L.) на 15-й день эксперимента по воздействию $CdCl_2$ (1 мг/л). Снижение общей АО активности и увеличение уровня МДА по сравнению с контрольной группой рыб было отмечено на 30-й и 40-й день эксперимента [12]. Другой возможной причиной ингибирования активности СОД называют дефицит низкомолекулярных АО, обеспечивающих «улавливание» гидроксильного радикала [12] и/или передачу меди апоформе СОД [13]. Согласно литературным данным, изоформа Cu,Zn-СОД является бифункциональной молекулой, которая не только обезвреживает супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), но и является буфером для меди. Апоформа СОД получает ионы Cu от металлотионеинов (МТ) более эффективно, чем от церулоплазмينا.

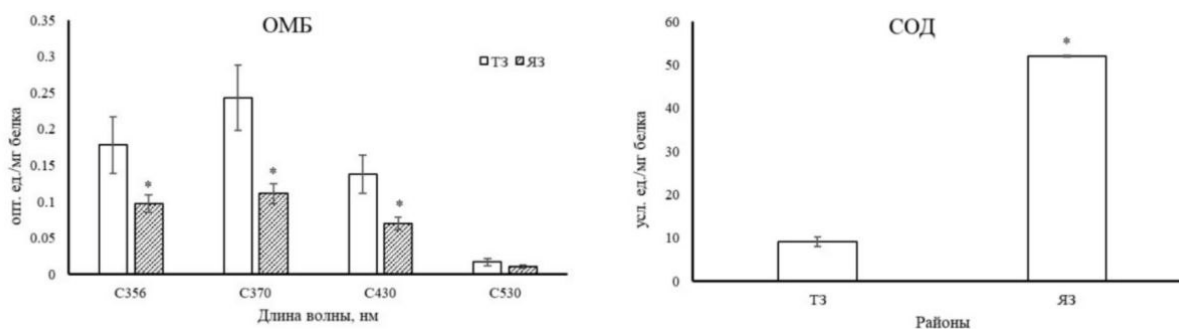


Рисунок 3. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы ($M \pm m$) в печени бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* из двух районов Азовского моря. Альдегидные (C356) и кетонные (C370) продукты нейтрального характера; альдегидные (C430) и кетонные (C530) продукты основного характера; ОМБ – окислительная модификация белков; СОД – супероксиддисмутаза; ТЗ – Темрюкский залив; ЯЗ – Ясенский залив; * различия достоверны ($p \leq 0,05$)

Поэтому снижение активности СОД авторы предложили рассматривать как показатель дефицита медь-МТ [11]. Таким образом, выявленные различия свидетельствуют об ингибировании активности СОД и смещении прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону процессов ОМБ в печени рыб из ТЗ.

В то же время более низкий уровень ОМБ в печени рыб из ЯЗ, свидетельствует о преобладании АО реакций над прооксидантными в печени рыб из этой локации несмотря на близкий уровень токсичных элементов (Hg, Pb, As) в печени рыб из обоих районов. Это говорит о наличии факторов, обеспечивающих большую эффективность АО системы печени рыб из ЯЗ, например, кормовая база. С кормом в организм рыб попадают низкомолекулярные АО и витамины, а также биологически значимые эссенциальные элементы [14], в том числе входящие в состав активных центров АО ферментов [15,16]. В случае дефицита вышеперечисленных компонентов в пище, у рыб происходит нарушение соотношения процессов окислительного повреждения биомолекул с буферной емкостью АО системы [14–16]. Данное предположение подтверждают более высокие значения линейных размеров и массы рыб у самцов из ЯЗ (рис. 1), что согласуется с данными элементарного анализа (рис. 2). Концентрация всех эссенциальных элементов, включая Zn и Ca, была достоверно выше в печени рыб из ЯЗ. Выраженные протекторные свойства этих элементов (Zn, Ca) были установлены в эксперименте по воздействию Cd на показатели АО системы тканей тилапии *Oreochromis mossambicus* [11]. Последовательное снижение активности СОД и КАТ было отмечено в печени тилапии на 7-й и 15-й день воздействия Cd. При этом добавление в систему Zn и Ca, по отдельности или совместно, на 15-й день эксперимента, приводило к восстановлению активности АО ферментов [11]. Значительная отрицательная корреляционная зависимость между содержанием продуктов ОМБ в сыворотке бычка-кругляка ($r = -0,65$) и концентрацией Zn в его тканях была также показана нами ранее [17].

В то же время для рыб, обитающих в неблагоприятных условиях, характерно замедление темпов соматического роста, в результате увеличения энергетических затрат для обезвреживания ксенобиотиков [18]. В наших исследованиях рыбы из ЯЗ превосходят особей из ТЗ по длине и массе тела, а также по величине ГСИ. При этом более высокие значения ИП у рыб из ТЗ, вероятно, являются компенсаторной неспецифической реакцией организма на действие высокого содержания Cd/ уровня комплексного загрязнения в этом районе. Увеличение ИП было показано у рыб при действии сточных вод [19], фенола [20] и смеси пестицидов [21]. Выявленные особенности свидетельствуют о более благоприятных экологических условиях для жизни и размножения бычка-кругляка в ЯЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследований позволили установить ингибирование активности СОД и смещение прооксидантно-антиоксидантных реакций в сторону ОМБ, а также компенсаторное увеличение ИП у рыб из ТЗ. Выявленные особенности, на фоне низких значений ГСИ и размерно-массовых характеристик рыб из ТЗ, свидетельствуют о реорганизации метаболических процессов в ущерб соматическому и генеративному росту рыб из этой локации и согласуются с данными элементарного анализа.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения» (№ гос. Регистрации 124022400148-4).

Список литературы / References:

1. Terra B.F., Araujo F.G., Calza C.F., Lopes R.T., Teixeira T.P. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2008, vol. 187, no. 1, pp. 275-284, doi: 10.1007/s11270-007-9515-9.
2. Матишов Г.Г., Буфетова М.В., Егоров В.Н. Нормирование потоков поступления тяжелых металлов в Азовское море по оценкам интенсивности седиментационного самоочищения вод. *Наука Юга России*, 2017,

- т. 13, № 1, с. 44-58 [Matishov G.G., Bufetova M.V., Egorov V.N. The regulation of heavy metals into the Sea of Azov according to the intensity of sedimentation of water self-purification. *Nauka Yuga Rossii*, 2017, vol. 13, no. 1, pp. 44-58 (In Russ.)].
3. Adams S.M. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. American Fisheries Society, Bethesda, 2002, 644 p.
4. Livingstone D.R. Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, vol. 42, pp. 656-666, doi: 10.1016/s0025-326x(01)00060-1.
5. Kovyrshina T.B., Rudneva I.I. The effects of coastal water pollution of the Black Sea on the blood biomarkers of the round goby *Neogobius melanostomus* Pallas, 1811 (Perciformes: Gobiidae). *Russian Journal of Marine Biology*, 2016, vol. 42, iss. 1, pp. 58-64.
6. Kovyrshina T.B., Rudneva I.I. The Response of Blood Biomarkers of the Round Goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) (Perciformes: Gobiidae) to Chronic Coastal Pollution in the Sea of Azov. *Russian Journal of Marine Biology*, 2018, vol. 44, no. 4, pp. 328-333.
7. Минеев А.К. Некоторые гематологические параметры бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1814) Саратовского водохранилища. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2013, т. 15, № 3, с. 222-228 [Mineev A.K. Rejections in haematological parameters of *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) of Saratov reservoir. *Izvestia Samarskogo nauchnogo centra Rossioskoi Akademii Nauk*, 2013, vol. 15, no. 3, pp. 222-228 (In Russ.)].
8. Правдин И.Ф. *Руководство по изучению рыб*. М.: Пищевая промышленность, 1966, 376 с. [Pravdin I.F. *Guide to the fish study*. M: Pischevaya promishlennost, 1966, 376 p. (In Russ.)].
9. Дубинина Е.Е., Бурмистов С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения. *Вопросы медицинской химии*, 1995, № 1, с. 24-26 [Dubinina E.E., Burmistov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it. *Voprosy Medicinskoi Khimii*, 1995, no. 1, pp. 24-26 (In Russ.)].
10. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1972, vol. 46, no. 2, pp. 849-854, doi: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3.
11. Jamakala O., Rani U.A. Protective role of trace elements against cadmium induced alterations in the selected oxidative stress enzymes in liver and kidney of fresh water teleost, *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, vol. 4, suppl. 5, pp. 303-310.
12. Мусаев Б.С., Мурадова Г.Р., Рабаданова А.И. Влияние ионов кадмия и свинца на некоторые показатели липидного обмена и систему антиоксидантной защиты сеголеток карпа (*Cyprinus carpio* L.). *Юг России: экология, развитие*, 2009, № 1, с. 44-54 [Musaev B.S., Muradova G.R., Rabadanova A.I. The influence of cadmium and lead ions on some indices of lipid metabolism and the antioxidant defense system of yearling carp (*Cyprinus carpio* L.). *Yug Rossii: ekologiya, razvitie*, 2009, no. 1, pp. 44-54 (In Russ.)].
13. Suzuki K.T., Kuroda T. Direct transfer of copper from metallothionein to superoxide dismutase: a possible mechanism for differential supply of Cu to SOD and ceruloplasmin in LEC rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 1994, vol. 86, no. 1, pp. 15-23.
14. Gasco L., Gai F., Maricchiolo G., Genovese L., Ragonese S., Bottari T., Caruso G. Supplementation of Vitamins, Minerals, Enzymes and Antioxidants in Fish Feeds. In book: *Feeds for the Aquaculture Sector*, 2018, pp. 63-103.
15. Bell J.G., Cowey C.B. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 1989, vol. 81, iss. 5, pp. 61-68.
16. Powell S.R. The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition*, 2000, vol. 130, no. 5, pp. 1447-1454.
17. Ковыршина Т.Б. Применение биомаркеров бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814)) для оценки экологического состояния прибрежных вод Черного и Азовского морей. *Автореф. дис. ... канд. биол. наук*. Севастополь: ФГБУН ИМБИ, 2017, 22 с. [Kovyrshina T.B. The Application of Biomarkers of a Round Goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) for the ecological assessment of coastal waters of the Black Sea and Sea of Azov. *Candidate Diss.*, 2017, 22 p. (In Russ.)].
18. Микодина Е.В., Шатуновский М.И. Физиолого-биохимические исследования функционального гомеостаза рыб. *Вопросы ихтиологии*, 2013, т. 53, № 1, с. 113-118 [Mikodina E.V., Shatunovsky M.I. Physiological and biochemical studies of functional homeostasis of fish. *Voprosy ichthyologii*, 2013, vol. 53, no. 1, pp. 113-118 (In Russ.)].
19. Al-Ghais S.M. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, vol. 74, pp. 183-186.
20. Abdel-Hameid N.-A.H. Physiological and Histopathological Alterations Induced by Phenol Exposure in *Oreochromis aureus* Juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2007, vol. 7, pp. 131-138.
21. Bacchetta C., Rossi A., Ale A., Campana M., Parma M.J., Cazenave J. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators*, 2014, vol. 36, pp. 532-538.

ANALYSIS OF POPULATION, BIOCHEMICAL AND TOXICOLOGICAL PARAMETERS OF ROUND GOBY *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* (PALLAS, 1814) FROM TWO AREAS OF THE SEA OF AZOV**Sigacheva T.B., Skuratovskaya E.N., Chekmareva T.M.**

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

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

Received 12.08.2024

Abstract. Population (length and weight of fish, hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI)), biochemical (superoxide dismutase (SOD) activity and level of oxidized proteins) and toxicological (content of chemical elements) parameters of round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) from two areas of the Sea of Azov (Temryuk (TB) and Yasensky bays (YB)) were analyzed. A shift in prooxidant-antioxidant reactions towards processes of protein oxidation in fish from TB was established, where the average values of body length and weight, as well as GSI were significantly lower, and HSI was considerably higher compared to similar parameters of fish from YB. The results of the toxicological analysis in the liver of gobies from two locations made it possible to characterize these areas as similar in the level of pollution with thiol poisons – Hg, Pb, As, with the exception of Cd. The concentration of Cd was significantly higher in the liver of fish from TB. At the same time, concentrations of Cu, Zn and other biogenic elements (Se, Ca, K, P) were significantly higher in the liver of fish from YB. The results of population and biochemical studies indicate a reorganization of metabolic processes to the detriment of somatic and generative growth of fish from TB and are in agreement with the data of elemental analysis.

Key words: round goby, liver, chemical elements, biomarkers, Sea of Azov.

БАКТЕРИОБЕНТОС И ЕГО РОЛЬ В ИНДИКАЦИИ ЗАГРЯЗНЕНИЙ (НА ПРИМЕРЕ СТРЕЛЕЦКОЙ БУХТЫ, СЕВАСТОПОЛЬ, ЧЁРНОЕ МОРЕ)

Дорошенко Ю.В.

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: doroshenko_yuv@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 18.08.2024

Аннотация. В настоящее время исследование прибрежных участков моря, как наиболее динамичных зон, вызывает бесспорный интерес. Обитающие здесь организмы нередко испытывают неблагоприятные воздействия природных и антропогенных факторов. Нефть и её производные остаются основными загрязнителями прибрежных акваторий. Поступающие в морскую среду загрязняющие вещества служат пищей микроорганизмам, которые реагируют на них увеличением своей численности. В работе представлены результаты микробиологических исследований донных отложений кутовой части бухты Стрелецкой (Севастополь, Чёрное море). Показана годовая динамика численности гетеротрофной и углеводородокисляющей групп бактерий в донных отложениях в 2013-2014 гг. Установлено, что численность гетеротрофных бактерий варьировала от $9,5 \cdot 10^3$ до $1,5 \cdot 10^6$ кл./г. Численность углеводородокисляющих бактерий, индикаторов нефтяного загрязнения, не превышала 1000 клеток в 1 грамме сырого грунта. Низкая концентрация углеводородокисляющих бактерий свидетельствует об отсутствии свежего загрязнения акватории нефтью и нефтепродуктами. Значимых корреляционных связей между наблюдаемыми группами микроорганизмов и значением температуры морской воды выявлено не было. Определены количественные характеристики бактерий, трансформирующих основные классы органических соединений (белки, жиры, углеводы), включая углеводороды нефти (нефть и дизельное топливо) в донных отложениях летом 2021 г. Показано, что более трети гетеротрофных обладали широкой биохимической активностью, что свидетельствует о поступлении в акваторию бухты загрязняющих веществ.

Ключевые слова: гетеротрофные бактерии, углеводородокисляющие бактерии, загрязнение, донные отложения, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия возрос интерес к исследованию прибрежных участков моря. Это связано с тем, что они относятся к наиболее динамичным зонам, поэтому обитающие здесь организмы нередко испытывают неблагоприятные воздействия природных и антропогенных факторов [1].

Нефть и её производные остаются основными загрязнителями прибрежных акваторий. Сырая нефть была частью морской среды в течение миллионов лет, и микроорганизмы, которые используют её как источник энергии и углерода, встречаются в морской воде, донных отложениях и береговых линиях от тропиков до полярных регионов. Большая часть углеводородов в диспергированной нефти разлагается в аэробных морских водах с периодом полураспада от нескольких дней до нескольких месяцев при оптимальном термическом и газовом обеспечении при участии бактериальной микрофлоры. Напротив, нефть, которая достигает береговой линии, имеет гораздо более длительное время пребывания в окружающей среде [2]. Под воздействием различных факторов более тяжёлые фракции нефтяных углеводородов со временем попадают на дно и накапливаются в донных отложениях [3].

Многие исследования [2, 4, 5] показали, что в акваториях с хроническим нефтяным загрязнением существует большое количество бактерий, разлагающих углеводороды, а их распространённость и количество тесно связаны с типами нефтяных углеводородов и многочисленными факторами окружающей среды.

По химическим и биологическим показателям б. Стрелецкая является одной из наиболее загрязнённой бухт севастопольского региона [6-8]. Если ранее [9] основная антропогенная нагрузка была связана с базированием в бухте кораблей Черноморского флота, лодочной пристанью и функционированием судоремонтного завода, то в последнее десятилетие происходит интенсивная застройка берегов и смена источников загрязнения данной акватории [7, 10]. Всё это не могло не сказаться на экологическом состоянии б. Стрелецкая. Данные по микробиологической составляющей донных отложений в указанной бухте немногочисленны и носят мозаичный характер.

Цель работы – определить динамику численности бактерий, трансформирующих основные классы органических соединений, как индикаторов загрязнений в донных отложениях б. Стрелецкой (Севастополь, Чёрное море).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили пробы донных отложений, отобранные в кутовой части Стрелецкой бухты (Севастополь, Чёрное море) (рис. 1). Образцы отбирали дночерпателем Петерсона с глубин

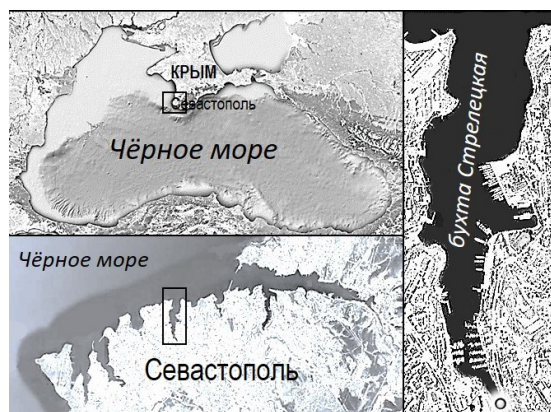


Рисунок 1. Место отбора проб в б. Стрелецкая в 2013-2014 и в 2021 гг

0,5–1,5 м ежемесячно с апреля 2013 г. по март 2014 г., а также в июле 2021 г. в рамках многолетнего мониторинга севастопольских бухт отдела морской санитарной гидробиологии ФИЦ ИнБЮМ.

В исследуемых образцах определяли численность гетеротрофных бактерий, способных трансформировать основные классы органических соединений, включая нефтяные углеводороды. В качестве органического субстрата использовали липиды (рыбий жир, оливковое масло), углеводы (глюкоза, крахмал), нефтепродукты (нефть, дизельное топливо) и в качестве белкового субстрата – пептон. Определение численности бактерий проводили методом предельных десятикратных разведений [11] с использованием жидких питательных сред. Для гетеротрофных бактерий (ГБ) использовали среду с пептоном [12], сахаролитическую группу бактерий (СЛБ) выращивали согласно [13], для амилолитических бактерий (АЛБ) применяли среду Калабиной [13]. Учёт численности углеводородокисляющих (УОБ) и липолитических бактерий (ЛЛБ) вели на среде Ворошиловой–Диановой [12]. В качестве единственного источника углерода и энергии, в зависимости от поставленных задач, в каждую пробирку (1% от объёма среды) вносили стерильные нефть, дизельное топливо, оливковое масло или рыбий жир. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объёма рассчитывали по таблице Мак-Креди (в трёх повторностях), основанной на методе вариационной статистики [11]. Пробы обрабатывали не позднее двух часов с момента отбора. Температуру морской воды на станции отбора измеряли термометром, опуская с кормы на верёвке в поверхностную толщу воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микробиологические исследования, проводимые в 2013-2014 гг. показали, что численность гетеротрофных бактерий варьировала от $9,5 \cdot 10^3$ до $1,5 \cdot 10^6$ кл./г (рис. 2а). Максимальные значения отмечены в августе и октябре 2013 г., а минимальное – в январе 2014 г. Численность углеводородокисляющих бактерий, индикаторов нефтяного загрязнения, не превышала 1000 клеток в 1 грамме сырого грунта (рис. 2б). Минимальное значение зафиксировали в декабре 2013 г. (45 кл./г). Через месяц отмечали увеличение численности УОБ на порядок, а максимальное значение, за весь годичный цикл наблюдений, в феврале 2014 г. (950 кл./г). Такие результаты свидетельствуют о "свежем" поступлении в зимний период в донные осадки б. Стрелецкой загрязняющих веществ, в частности, нефтяных углеводородов. Это подтверждается данными [7]. Авторы указывают на высокие концентрации хлороформ-экстрагируемых веществ (ХЭВ) и нефтяных углеводородов (НУ) в б. Стрелецкая в феврале 2014 г., причём максимальные значения ХЭВ (2300 мг/100 г возд.-сух. д. о.) и НУ (881 мг/100 г возд.-сух. д. о.) определены в кутовой части бухты.

Температура воды в течение года изменялась в следующем диапазоне: от 8 до 27 °С. По результатам наших исследований, выявлены незначительные положительные корреляционные связи между численностью наблюдаемых микроорганизмов и значениями температура морской воды. Для ГБ коэффициент корреляции $r = 0,4$ ($\alpha < 0,05$), а для УОБ составил 0,3. Как известно [2], судьба нефти в морских экосистемах зависит от ряда физических, химических и биологических факторов, работающих независимо или в сочетании друг с другом. Температура, в нашем случае, не являлась определяющим фактором.

Проводимые ранее исследования [14] показали, что в 2008 г. численность ГБ в донных отложениях кутовой части б. Стрелецкой составляла от $7,5 \cdot 10^3$ до $2,5 \cdot 10^6$ кл./г, а численность УОБ – $2,5 \cdot 10^2$ – $9,5 \cdot 10^4$ кл./г. Следует отметить, что по сравнению с данными 2008 г., численность УОБ в 2013-2014 гг. снизилась на 1-2 порядка, при этом численность ГБ оставалась стабильной. Падение численности УОБ в донных отложениях было отмечено ранее и для Севастопольской бухты [3]. Кроме того, сделано предположение, что в нефтяных углеводородах были окислены наиболее лёгкие нефтяные фракции, а адаптации к трансформации более тяжёлых фракций у бактерий не произошло или они переключились на более доступное органическое вещество. На наш взгляд немаловажную роль играет гранулометрический состав донных отложений и их физико-химические характеристики. Донные отложения в вершинной части Стрелецкой бухты представлены тёмно-серыми илами с большим количеством гниющей органики, с запахом сероводорода и незначительной примесью песка, натуральная влажность

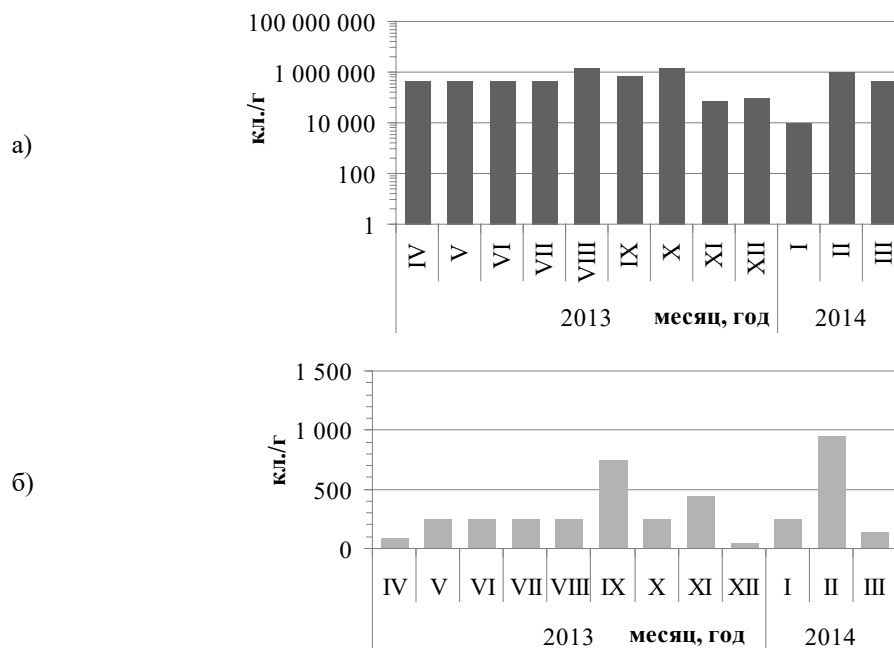


Рисунок 2. Динамика численности (к.л./г) (а) общего количества гетеротрофных бактерий (б) углеводородокисляющих бактерий в донных отложениях в 2013-2014 гг

составляла 68,2 %. Отмечается, что в этой части бухты сформировались резко восстановительные условия, благоприятные для анаэробных микробиальных процессов, но препятствующие разложению органического вещества [7,10,12]. Согласно [12], большинство илов содержит значительное количество ХЭВ, превышая эти значения в песчаных морских осадках на 2-3 порядка.

Если в 2008 г. численность УОБ составляла от 0,2 до 60 % от общей численности гетеротрофов, то через пять лет это соотношение не превышало 2,6 %. Следовательно, несмотря на некоторое снижение процессов самоочищения, низкая концентрация углеводородокисляющих бактерий в донных отложениях свидетельствует об отсутствии свежего загрязнения акватории нефтью и нефтепродуктами.

По результатам исследований, представленных в [7], в 2015 г. отмечается снижение НУ в донных отложениях б. Стрелецкой, которое авторы связывают с сокращением функционирования военно-морской базы. Однако за последние годы произошло накопление органической составляющей. Среднее содержание органического углерода в поверхностном слое донных отложений составило 5,13 %. Происходит активное заиление бухты из-за интенсивного поступления органического вещества с канализационными и ливневыми стоками, ростом и дальнейшим отмиранием травяной растительности, а также слабым водообменном, особенно в кутовой части [10]. Кроме того, в бухте продолжает базироваться маломерный флот. Подобные изменения не могли не сказаться на микробиологической составляющей донных осадков. Поэтому в июле 2021 г. мы определяли численность гетеротрофных бактерий, способных трансформировать основные классы органических соединений, используя различные источники липидов, углеводов, а также нефтепродуктов.

Численность ГБ, использующих в качестве белкового субстрата пептон, составила $2,5 \cdot 10^4$ к.л./г, что на порядок ниже, чем летом 2013 г., но сопоставимо с данными 2008 г. (рис. 3).

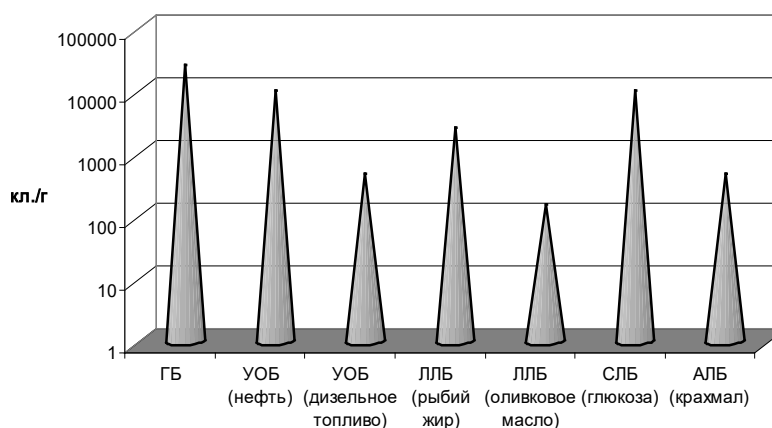


Рисунок 3. Численность (к.л./г) общего количества гетеротрофных (ГБ), углеводородокисляющих (УОБ), липолитических (ЛЛБ), сахаролитических (СЛБ), амилолитических (АЛБ) бактерий в донных отложениях в июле 2021 г

Более трети ГБ обладали широкой биохимической активностью. Так трансформировать глюкозу могли 38 % ГБ, но способность к распаду более сложных углеводов (крахмала) наблюдали только у 1,8 % бактерий. Липолитическая активность отмечена у 10 % ГБ. Однако численность ЛЛБ, использующих в качестве единственного источника углерода и энергии рыбий жир, составила $2,5 \cdot 10^3$ кл./г, а растущих на оливковом масле менее 1 % (150 кл./г). Микроорганизмы донных отложений также проявили избирательную активность в отношении различных источников нефтяных углеводородов. На нефти выросло $9,5 \cdot 10^3$ кл./г УОБ, а на дизельном топливе на порядок ниже – 450 кл./г. Ранее [12], аналогичные закономерности по физиолого-биохимической активности бактериобентоса были отмечены для Севастопольской бухты. В то же время, микробиологические исследования донных отложений проводимые у побережья Кавказа показали, что акватории этих районов отличаются не только разнообразием видов, но и биохимической активностью. Таким образом, микроорганизмы адаптируются к имеющимся различным источникам загрязнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты микробиологических исследований, проведённых в 2013-2014 и 2021 гг., позволили изучить количественные характеристики бактерий, способных окислять белки, жиры и углеводы, включая нефтяные углеводороды в донных отложениях бухты Стрелецкой. Так в 2013-2014 гг. численность гетеротрофных бактерий варьировала от $9,5 \cdot 10^3$ до $1,5 \cdot 10^6$ кл./г, а углеводородокисляющих – от 45 до 950 кл./г. Низкая концентрация углеводородокисляющих бактерий свидетельствует об отсутствии свежего загрязнения акватории нефтью и нефтепродуктами. Значимых корреляционных связей между наблюдаемыми группами микроорганизмов и значением температуры морской воды выявлено не было.

В последние несколько лет происходит перераспределение антропогенной нагрузки на акваторию, о чём свидетельствует повышение численности бактериобентоса и изменение его биохимической активности. В июле 2021 г. наблюдали повышение численности гетеротрофных бактерий, способных трансформировать основные классы органических соединений, включая нефтепродукты.

Активно изменяющаяся в настоящее время в результате хозяйственной деятельности человека береговая полоса может влиять на состояние акватории б. Стрелецкой, поэтому необходимо проводить регулярные комплексные мониторинговые наблюдения в краткосрочной и долгосрочной перспективе, обеспечивающие контроль за состоянием прилегающих акваторий.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме “Изучение биогеохимических закономерностей радиоэкологических и хемозоологических процессов в экосистемах водоёмов 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. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века. Под ред.: О.Г. Миронова, С.В. Алёмова. Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН. Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018, 276 с. [Sanitary and biological studies of the south-western Crimea coastal waters at the beginning of XXI century. Eds: O.G. Mironov, S.V. Alyomov. Simferopol.: Arial, 2018, 276 p. (In Russ.)].
2. Hazen T.C., Prince R.C., Mahmoudi N. Marine oil biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, 2016, vol. 50, pp. 2121-2129, doi: 10.1021/acs.est.5b03333.
3. Миронов О.Г. Потоки нефтяных углеводородов через морские организмы. *Морск. экол. журн.*, 2006, т. 5, № 2, с. 5-14 [Mironov O.G. Oil hydrocarbons flows through the marine organisms. *Marine Ecological Journal*, 2006, vol. 5, no. 2, pp. 5-14 (In Russ.)].
4. Kleindienst S., Seidel M., Ziervogel K., Grim S., Loftis K., Harrison S. Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2015, vol. 112, pp. 14900-14905, doi: 10.1073/pnas.1507380112.
5. Yang Y., Wang J., Liao J., Xie S., Huang Y. Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 99, pp. 1935-1946, doi: 10.1007/s00253-014-6074-z.
6. Малахова Л.В., Скуратовская Е.Н., Малахова Т.В., Болтачев А.Р., Лобко В.В. Хлорорганические соединения в ерше *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в акватории Севастополя (Чёрное море): пространственное распределение и биологический отклик на уровень накопления загрязнителей. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 4, с. 51-63 [Malakhova L.V., Skuratovskaya E.N., Malakhova T.V., Boltachev A.R., Lobko V.V. Organochlorine compounds in scorpion fish *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 in the Sevastopol marine area (The Black sea): spatial distribution and biological response. *Marine Biological Journal*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 51-63, doi: 10.21072/mbj.2018.03.4.06 (In Russ.)].
7. Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Волков Н.Г. Характеристика загрязнения донных отложений прибрежной акватории Севастополя на примере Стрелецкой бухты (Чёрное море). *Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря*, 2018, № 1, с. 74-80 [Tikhonova E.A., Kotelyanets E.A., Volkov N.V.

Characteristic of pollution of the bottom deposits in the coastal area of Sevastopol on the example of the Streletskaia bay (The Black sea). *Ecological safety of coastal and shelf zones of sea*, 2018, no. 1, pp. 74-80, doi: 10.22449/2413-5577-2018-1-74-80 (In Russ.).

8. Skuratovskaya E., Doroshenko Yu. Complex application of Microbiological Characteristics in Bottom Sediments and Biochemical parameters of Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) for Assessing the Ecological state of Marine Coastal Areas. *Pollution*, 2022, vol. 8, iss. 3, pp. 1038-1048, doi: 10.22059/poll.2022.337948.1341.

9. Осадчая Т.С. Нефтяные углеводороды в донных осадках прибрежных акваторий г. Севастополя (Чёрное море). *Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development 2013*. [Osadchaya T.S. Oil hydrocarbons in bottom sediments of Sevastopol coastal areas (the Black Sea). *Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development 2013*. (In Russ.)].

10. Tikhonova E.A., Soloveva O.V., Gurov K.I. Features of Distribution of Hydrocarbons in Bottom Sediments of the Streletskaia Bay (Black Sea). *Physical Oceanography*, 2023, vol. 30, iss. 5, pp. 632-651.

11. Нетрусов А.И. *Практикум по микробиологии: учеб. пособие*. М.: Академия, 2005, 603 с. [Netrusov A.I. *Workshop on microbiology*. М.: Academia Press, 2005, 603 p. (In Russ.)].

12. Миронов О.Г., Кирюхина Л.Н., Кучеренко М.И., Тархова Э.П. *Самоочищение в прибрежной акватории Чёрного моря*. К.: Наукова думка, 1975, 144 с. [Mironov O.G., Kiryukhina L.N., Kucherenko M.I., Tarhova E.P. *Self-purification in the coastal waters of the Black Sea*. К.: Naukova Dumka, 1975, 144 p. (In Russ.)].

13. Егорова Н.С. *Практикум по микробиологии*. Москва: Изд-во Моск. Ун-та, 1982, 307 с. [Egorov N.S. *Workshop on microbiology*. М.: Moscow University, 1982, 307 p. (In Russ.)].

14. Тихонова Е.А. Роль микроорганизмов в передаче нефтяных углеводородов по цепи: донные осадки - *Abra Segmentum*. *Экология моря*, 2009, вып. 79, с. 85-89 [Tikhonova E.A. The role of microorganisms in the transfer of petroleum hydrocarbons along the chain: bottom sediments - *Abra Segmentum*. *Ecology of the sea*, 2009, vol. 79, pp. 85-89 (In Russ.)].

BACTERIOBENTHOS AND ITS ROLE IN POLLUTION INDICATION (ON THE STRELETSKAYA BAY EXAMPLE, SEVASTOPOL, BLACK SEA)

Doroshenko Yu.V.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nakhimov ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: doroshenko_yuv@ibss-ras.ru
Received 18.08.2024

Abstract. At present, the study of coastal areas of the sea, as the most dynamic zones, is of undeniable interest. Organisms living here often experience adverse effects of natural and anthropogenic factors. Oil and its derivatives remain the main pollutants of coastal waters. Pollutants are entering the marine environment serve as food for microorganisms, which respond to them by increasing their numbers. The paper presents the results of microbiological studies of bottom sediments in the apex of Streletskaia Bay (Sevastopol, Black Sea). The annual dynamics of heterotrophic and hydrocarbon-oxidizing bacterial groups in bottom sediments in 2013-2014 is shown. It was found that the number of heterotrophic bacteria varied from $9.5 \cdot 10^3$ to $1.5 \cdot 10^6$ cells/g. The number of hydrocarbon-oxidizing bacteria, which are the indicators of oil pollution, did not exceed 1000 cells in 1 gram of crude soil. Low concentration of hydrocarbon-oxidizing bacteria indicates the absence of fresh contamination of the water area with oil and its products. No significant correlation between the observed groups of microorganisms and the value of seawater temperature was revealed. Quantitative characteristics of bacteria transforming the main classes of organic compounds (proteins, fats, carbohydrates) including petroleum hydrocarbons (oil and diesel fuel) in bottom sediments in summer 2021 were determined. It was shown that more than one third of heterotrophic ones had a broad biochemical activity, which indicates input of pollutants into the bay water area.

Key words: heterotrophic bacteria, hydrocarbon-oxidizing bacteria, pollution, bottom sediments, Black Sea.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗЕЛЕННЫХ НИТЧАТЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *CLADOPHORA* В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Шадрин Н.В.¹, Празукин А.В.¹, Гассиев Д.Д.^{1,2}, Ануфриева Е.В.¹

¹ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
просп. Нахимова, 2, 299011, г. Севастополь, РФ

² Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: 536619@gmail.com

Поступила в редакцию 23.08.2024

Аннотация. В настоящее время актуальной задачей является интенсификация использования непищевых водных биоресурсов, нитчатой зеленой водоросли *Cladophora* для кормовых целей для перехода животноводства к устойчивому развитию. Сделан краткий обзор продукционного потенциала кладофоры и результатов ее использования в качестве кормовой добавки в рацион ряда сельскохозяйственных животных. Показано наличие положительных эффектов во всех рассмотренных случаях. В частности, найдено увеличение прироста, повышение уровня белка, незаменимых аминокислот, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в мышцах кроликов. Разнообразные вещества, получаемые из ее биомассы, могут способствовать нормальному развитию молоди выращиваемых животных, формированию у них хорошего иммунитета, а также их лечению.

Ключевые слова: *Cladophora*, биоресурсы, кормовые добавки.

ВВЕДЕНИЕ

Население планеты продолжает увеличиваться, и, как прогнозируется, достигнет 10,3 млрд. человек к 2080 г. [1]. Дефицит пресной воды и полноценной пищи – основные проблемы растущего человечества, они взаимосвязаны. На сельское хозяйство приходится около 70 % общего потребления пресной воды людьми, из которых на животноводство приходится 30 % воды и около 75 % сельскохозяйственных земель [2]. Нехватка животных белков в рационах людей – наиболее острая проблема в обеспечении человечества полноценным питанием. Увеличение производства, в частности, связано с устранением дефицита полноценных кормов и кормовых добавок, нехватка которых в разных странах составляет от 10 до 25 % [3]. В настоящее время в используемых кормах на зерновые культуры приходится не менее 95 %. Если они и дальше будут составлять столько же, то для их производства потребуются расширение пашен, с разрушением природных экосистем, и ростом использования пресной воды, дефицит которой будет увеличиваться. Следовательно, необходимо искать другой путь решения проблемы дефицита кормов.

Более рациональный путь решения этой проблемы – интенсификация использования для кормовых целей непищевых водных биоресурсов. Биомассу гидробионтов, включая зеленые водоросли, можно использовать разными путями. В частности, разнообразные вещества, получаемые из биомассы, могут способствовать нормальному развитию молоди выращиваемых животных, формированию у них хорошего иммунитета и их лечению [2]. Более широкое использования биоресурсов соленых и гиперсоленых вод, не усугубляющее дефицит пресной воды, – эффективный подход к решению проблемы [4]. Зеленые нитчатые водоросли рода *Cladophora* обладают большим потенциалом для этого [4,1]. Они широко распространены в водоемах разного типа, от пресных до гиперсоленых, обладают гигантской продуктивностью, создавая в природе большие скопления [2]. Цель краткого обзора, суммируя собственные и литературные данные, доказать это и показать возможные пути использования этого потенциала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили как собственные результаты многолетних исследований, так и литературные данные. Для поиска статей использовали поисковую систему Google Scholar <https://scholar.google.com> и базы данных Researchgate и eLibrary.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кладофора как ресурс. Род *Cladophora* является одним из крупнейших родов нитчатых зеленых водорослей (Phylum Chlorophyta, Class Ulvophyceae, Order Cladophorales), включая 218 валидных видов и подвидов [5]. Географически *Cladophora* spp. распространены от тропических до полярных вод [6], обитая в водах с различной соленостью, от пресных до гиперсоленых [7,5]. Различные виды *Cladophora* обладают высокой скоростью роста в природе и могут производить при оптимальных условиях огромную биомассу, например, 102–983 г (сухой вес) м⁻² в течение недели [6]. В гиперсоленых водах (соленость до 160–180 г л⁻¹) *Cladophora* может достигать большой биомассы, до 1–2 кг (сухой массы) м⁻², и занимать большие площади, например в Крыму [5,6]. Нити кладофоры часто образуют плотные плавающие и донные маты в крымских гиперсоленых



Рисунок 1. Плавающие маты *Cladophora* в гиперсоленом заливе Сиваш. Фото: Н.В. Шадрин

водах (рис. 1). Биомасса в этих матах может достигать высоких значений, до 5 кг (сырой массы) м^{-2} [5]. Предварительный расчет показал, что общая годовая продукция кладофоры в крымских озерах и лагунах может достигать более 20 млн. тонн. Концентрация биомассы кладофоры высока в гиперсоленых водоемах, что делает сбор ее биомассы дешевым, намного дешевле, чем собирать фитопланктонные водоросли. К тому же кладофору (рис. 1) можно эффективно культивировать.

Кладофора как кормовая добавка. Перспективы использования кладофоры в сельском хозяйстве рассмотрены в обзоре [2]. Исследования по использованию добавок кладофоры в корма ведутся в разных странах, есть положительные результаты, которые суммированы в таблице 1.

Даже эти небольшие результаты свидетельствуют о перспективности использования кладофоры как кормовой добавки в рацион различных культивируемых животных (рис. 2).

Несколько исследований были посвящены потенциалу кладофоры для ее использования в качестве пищевой добавки при разведении кроликов [21,22]. Такие добавки показали положительный эффект: повышение уровня белка, незаменимых аминокислот, мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в мышцах кроликов. Важным обстоятельством является то, что среди функциональных пищевых компонент, эссенциальные элементы (йод, селен, цинк и другие, играют важную роль в жизни человека и животных, поэтому их дефицит считается серьезной проблемой питания в современном мире [23-25]. Одним из решений этой проблемы является использование макроводорослей, собранных в соленых водоемах, в качестве минеральной кормовой добавки. Среди зеленых водорослей, используемых в качестве корма для животных, можно использовать *Cladophora* в рекомендуемом количестве от 1 до 10% рациона, благодаря высоким питательным качествам, а также иммуномодулирующим, пребиотическим и антиоксидантным свойствам соединений, содержащихся в биомассе [25,26]. В Институте биологии южных морей созданы и успешно испытаны кормовые гранулы из кладофоры (рис. 2), получен патент (Патент РФ 2823595). Есть и еще одно направление использования кладофоры в животноводстве. В биомассе этой водоросли содержится довольно много нанокристаллической целлюлозы, которая перспективна для создания ранозаживляющих гелей и перевязочных материалов, которые можно использовать в ветеринарии [17].

Таблица 1. Эффекты добавки кладофоры в рацион животных, получавших подкормку

Животные, получавшие подкормку	Добавка кладофоры, % от рациона	Эффект использования добавки	Авторы
Куры	15%	улучшился цвет желтка, увеличилась масса яйца и толщина его скорлупы, живая масса цыплят	9, 10
Кролики	От 1 до 10% в рацион	повысились уровни белка, незаменимых аминокислот, ПНЖК, иммунитета, приросты	11, 12, 13, 14
Коровы	16%	снизилось выделение метана	15, 16
Креветки	до 30%	увеличилась скорость роста и стрессоустойчивость	16, 17
Свиньи	15%	увеличилась масса	18
Сом	5%	повысился уровень каротиноидов в мясе	19, 20



Рисунок 2. Кормовые гранулы из кладофоры

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, виды зеленой нитчатой водоросли *Cladophora* могут помочь удовлетворить потребности домашнего скота в белке, эссенциальных элементах и энергии. Дополнительно они содержат биологически активные соединения, которые могут быть использованы в качестве пребиотиков для улучшения продуктивности и здоровья как моногастральных, так и жвачных животных. Пищевая ценность морских водорослей для животных во многом зависит от вида самих водорослей, их химического состава и приспособленности животного к определенной пище. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении, а также внедрение кормовых добавок из кладофоры в практику животноводства.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-66-00001, <https://rscf.ru/project/24-66-00001/>.

Список литературы / References:

1. Growing or shrinking? What the latest trends tell us about the world's population. *UN*, 2024.
2. Prazukin A.V., Anufrieva E.V., Shadrin N.V. Biomass of *Cladophora* (Chlorophyta, Cladophorales) is a promising resource for agriculture with high benefits for economics and the environment. *Aquaculture International*, 2024, vol. 23, iss. 3, pp. 3637-3673, doi: 10.1007/s10499-023-01342-x.
3. Chojnacka K. Using biosorption to enrich the biomass of seaweeds from the Baltic Sea with microelements to produce mineral feed supplement for livestock. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, vol. 39, no. 2, pp. 246-257.
4. Cordeiro M.R.C. et al. Assessing feed security for beef production within livestock-intensive regions. *Agricultural Systems*, 2022, vol. 196, p. 103348.
5. Watzke H.J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends in food science & technology*, 1998, vol. 9, no. 8-9, pp. 320-327.
6. Michalak J., Holz A., Teismann T. Rumination as a predictor of relapse in mindfulness-based cognitive therapy for depression. *Psychology and Psychotherapy: Theory, Research and Practice*, 2011, vol. 84, no. 2, pp. 230-236.
7. Prazukin A.V., Anufrieva E.V., Shadrin N.V. *Cladophora* mats in a Crimean hypersaline lake: structure, dynamics, and inhabiting animals. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, vol. 36, no. 6, pp. 1930-1940.
8. Shadrin N.V. et al. The political decision caused the drastic ecosystem shift of the Sivash Bay (the Sea of Azov). *Quaternary International*, 2018, vol. 475, pp. 4-10.
9. Abu Hafsa S.H. et al. Nutritional potential of marine and freshwater algae as dietary supplements for growing rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 2021, vol. 20, no. 1, pp. 784-793.
10. Nutautaitė M. et al. River-sourced *Cladophora glomerata* macroalgal biomass as a more sustainable and functional feed raw material for growing rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 2024, vol. 23, no. 1, pp. 607-617.
11. Shadrin N. et al. Daily and other short-term changes in the ecosystem components of the world's largest hypersaline lagoon Bay Sivash (Crimea). *Regional Studies in Marine Science*, 2024, vol. 77, p. 103643.
12. Machado P. *Ocean of trade*. Cambridge University Press, 2014.
13. Abu Hafsa S.H. et al. Nutritional potential of marine and freshwater algae as dietary supplements for growing rabbits. *Italian Journal of Animal Science*, 2021, vol. 20, no. 1, pp. 784-793.
14. Chojnacka K. Using biosorption to enrich the biomass of seaweeds from the Baltic Sea with microelements to produce mineral feed supplement for livestock. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, vol. 39, no. 2, pp. 246-257.

15. Promya J., Chitmanat C. The effects of *Spirulina platensis* and *Cladophora* algae on the growth performance, meat quality and immunity stimulating capacity of the African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*), 2011.
16. Nutautaitė M. et al. Sensory evaluation of rabbit meat from individuals fed functional and more sustainable diets enriched with freshwater *Cladophora glomerata* macroalgal biomass. *Animals*, 2023, vol. 13, no. 13, p. 2179.
17. Watzke H.J. Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends in food science & technology*, 1998, vol. 9, no. 8-9, pp. 320-327.
18. Costa M. et al. Current knowledge and future perspectives of the use of seaweeds for livestock production and meat quality: A systematic review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2021, vol. 105, no. 6, pp. 1075-1102.
19. Zhou S. et al. *Cladophora* cellulose: unique biopolymer nanofibrils for emerging energy, environmental, and life science applications. *Accounts of chemical research*, 2019, vol. 52, no. 8, pp. 2232-2243.
20. Шадрин Н.В., Празукин А.В., Ануфриева Е.В., Фирсов Ю.К. Патент РФ 2823595. Способ получения кормовой добавки из водорослей. Заявл. 28.09.2023. Оpubл. 24.07.2024 [Shadrin N.V., Prazukin A.V., Anufrieva E.V., Firsov Yu. Russian Federation patent 2823595. *Method of obtaining a feed additive from algae*. 28.09.2023. Published. 24.07.2024 (In Russ.)].
21. Cordeiro M.R.C. et al. Assessing feed security for beef production within livestock-intensive regions. *Agricultural Systems*, 2022, vol. 196, p. 103348.
22. Liu X. et al. Global agricultural water scarcity assessment incorporating blue and green water availability under future climate change. *Earth's Future*, 2022, vol. 10, no. 4, p. e2021EF002567.
23. Higgins S.N. et al. An ecological review of *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) in the Laurentian Great Lakes 1. *Journal of Phycology*, 2008, vol. 44, no. 4, pp. 839-854.
24. Prazukin A.V., Anufrieva E.V., Shadrin N.V. *Cladophora* mats in a Crimean hypersaline lake: structure, dynamics, and inhabiting animals. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, vol. 36, no. 6, pp. 1930-1940.
25. Shadrin N.V. et al. The political decision caused the drastic ecosystem shift of the Sivash Bay (the Sea of Azov). *Quaternary International*, 2018, vol. 475, pp. 4-10.
26. Guiry M.D. *AlgaeBase. World-wide electronic publication*, National university of Ireland, Galway, 2010.
27. Higgins S.N. et al. An ecological review of *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) in the Laurentian Great Lakes 1. *Journal of Phycology*, 2008, vol. 44, no. 4, pp. 839-854.
28. Dodds W.K., Gudder D.A. The ecology of *Cladophora*. *Journal of Phycology*, 1992, vol. 28, no. 4, pp. 415-427.

PROSPECTS FOR THE USE OF GREEN FILAMENTOUS ALGAE *CLADOPHORA* IN ANIMAL HUSBANDRY

Shadrin N.V.¹, Prazukin A.V.¹, Gassiev D.D.^{1,2}, Anufrieva E.V.¹

¹A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas of RAS

Nakhimova ave., 2, Sevastopol, 299011, Russia

² Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: 536619@gmail.com

Received 23.08.2024

Abstract. Currently, an urgent task is to intensify the use of non-food aquatic biological resources, the filamentous green algae *Cladophora* for forage purposes for the transition of animal husbandry to sustainable development. A brief overview of the productive potential of *Cladophora* and the results of its use as a feed additive in the diet of a number of farm animals is made. The presence of positive effects in all considered cases is shown. In particular, an increase in growth, an increase in the level of protein, essential amino acids, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in rabbit muscles was found. A variety of substances obtained from its biomass can contribute to the normal development of juveniles of farmed animals, the formation of good immunity in them, as well as their treatment.

Key words: *Cladophora*, bioresources, feed supplements.

ИЗМЕНЕНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ЭКОСИСТЕМАХ ИСКУССТВЕННЫХ ОЗЕР ПУСТЫННОЙ ДЕПРЕССИИ ВАДИ-ЭЛЬ-РАЙАН (ЕГИПЕТ) В ПЕРИОД С 1984 ПО 2022 ГГ

Ануфриева Е.В.¹, Гохер М.Е.², Григорьев М.Н.^{1,3}, Шадрин Н.В.¹

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

просп. Нахимова, 2, 299011, г. Севастополь, РФ

² Национальный институт океанографии и рыболовства

ул. Абен Махассен, 3, г. Каир, Египет

³ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: misha79788961008@gmail.com

Поступила в редакцию 24.08.2024

Аннотация. Количество искусственных водоемов в мире растет, особенно важную роль они играют в аридных зонах. В аридном климате практически сразу в них начинаются изменения, закономерности которых еще плохо изучены. Чтобы в какой-то степени восполнить этот пробел, авторы проанализировали ход изменений 6 абиотических параметров в двух искусственных озерах в пустынном регионе Египта, которые были получены египетским коллегами в период с 1984 по 2022 гг. Соленость экспоненциально росла в обоих озерах, в первом (верхнем, проточном) существенно медленнее, чем во втором (нижнем, терминальном) озере. Среднегодовая температура в водоемах колебалась, в верхнем озере не отмечен какой-либо долговременный тренд, а в нижнем – отмечен тренд увеличения среднегодовой температуры. Среднегодовая концентрация растворенного кислорода в озерах достоверно снижалась со временем. Прозрачность колебалась, в верхнем озере отмечен достоверный тренд увеличения, в нижнем озере о закономерном тренде говорить сложно. Среднегодовое содержание общих фосфора и азота в озерах колебалось с четко выделяющимся максимумом в середине периода наблюдений. Рост солености в озерах аридных зон является общей закономерностью, но на ее проявление влияет степень проточности водоема. Соленость влияет на другие параметры среды, например, температуру и содержание кислорода. Между изменчивостью различных параметров существуют сложные взаимосвязи, которые поразному реализовывались в двух озерах. Каждое озеро в определенной степени уникально в тенденциях временной изменчивости, эта индивидуальность должна учитываться при их моделировании и прогнозировании дальнейших изменений.

Ключевые слова: искусственные озера, аридные зоны, долговременные изменения, соленость, температура, кислород, азот, фосфор.

ВВЕДЕНИЕ

Искусственные водоемы люди начали создавать еще в античное время [1,2]. Их количество на планете в последние годы быстро растет, как и их значение для удовлетворения потребностей людей. Особенно важную роль они играют в аридных зонах, например в Крыму и Египте. Они, в частности, используются для различных видов аквакультуры [1,3]. Как правило, такие водоемы создаются как пресноводные, но в аридном климате практически сразу в них начинается рост солености и вызванные этим изменения других параметров среды [1]. Подобное отмечается во многих работах, однако количественные закономерности этих изменений изучены очень слабо. Знание последних необходимо для долговременного устойчивого использования этих водоемов, в том числе для продуцирования биологических ресурсов. Чтобы в какой-то степени восполнить этот пробел, авторы проанализировали ход изменений 6 абиотических параметров за более чем тридцатилетний период в двух озерах в пустынном регионе Египта, данные были получены египетским коллегами. Актуальность работы определяется тем, что озера, включая искусственные, являются важными элементами структуры и функционирования ландшафтов, участвуют в удовлетворении различных потребностей местного населения. Цели данной работы – выявление долговременных трендов изменения параметров среды в двух связанных искусственных озерах зоны и установление взаимосвязи в изменчивости различных параметров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельными были два связанных между собой искусственных озера, которые располагаются в Фаюмской пустынной впадине Вади Эль-Райан (Wadi El-Rayan) (рис. 1). Вади Эль-Райан (1759 км², 29°170 с.ш., 30°230 в.д.) – естественная пустынная впадина в оазисе Фаюм, находящаяся на 42–60 м ниже уровня моря [3]. Озера были созданы в 1973 г. для сброса дренажных вод с орошаемых полей [1]. Первое озеро занимает площадь около 53 км², ежегодно получая около 200 миллионов м³ сельскохозяйственных дренажных вод [4]. Из этого озера избыток воды через мелководный соединительный канал попадает во второе озеро. Оно больше и занимает площадь до 110 км² с максимальной глубиной 33 м. Район Вади-эль-Райан был объявлен охраняемой территорией в 1989 г. для защиты биологического, геологического и культурного разнообразия. Два искусственных озера,



Рисунок 1. Расположение на карте исследуемых озер и их внешний вид

соединенных болотистым каналом, были объявлены Рамсарскими водно-болотными угодьями в 2012 г. Сейчас сабхи, песчаные отмели, дюны, водно-болотные угодья и искусственные озера являются основными типами местообитаний в котловине. В отличие от большинства пустынных районов, котловина отличается высоким биологическим разнообразием, и именно искусственные озера способствовали формированию этого. Регион развивается благодаря им: со строительством деревень, сельским хозяйством, рыболовством и аквакультурой [3,5].

Пробы отбирали в период с 1984 по 2022 гг. на 5 станциях в каждом озере в феврале, мае, августе и ноябре. Первичные данные будут рассмотрены в других работах, здесь будут проанализированы лишь тренды изменения среднегодовых показателей.

Для анализа использованы стандартные статистические подходы и методы. Определяли средние показатели, стандартные отклонения, коэффициенты корреляции (R) и параметры регрессионных уравнений, расчеты проводили в Excel. Достоверность различий средних оценивали с использованием t -критерия Стьюдента, а уровень значимости коэффициентов корреляции (p) по [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соленость экспоненциально росла в озерах (рис. 2), в проточном медленнее ($R = 0,838$, $p = 0,0001$):

$$S_1 = 1,344e^{0,008t} \quad (1)$$

а в терминальном - быстрее ($R = 0,994$, $p = 0,0001$):

$$S_2 = 2,259e^{0,069t} \quad (2)$$

где S_1 и S_2 соленость (г/л) в первом и втором озерах в момент времени t , год со дня создания озера.

Различия параметров уравнений достоверно различаются ($p = 0,0001$). Это обусловлено тем, что накопление солей в проточных озерах протекает медленнее [7].

Среднегодовая температура в озерах колебалась (рис. 3), в верхнем озере не отмечен какой-либо долговременный тренд, а в нижнем – отмечен тренд увеличения среднегодовой температуры от увеличения солености. ($R = 0,820$, $p = 0,0005$). Зависимость может быть аппроксимирована уравнением:

$$T_2 = 0,10S_2 + 19,30 \quad (3)$$

где T_2 – среднегодовая температура в нижнем озере, °C.

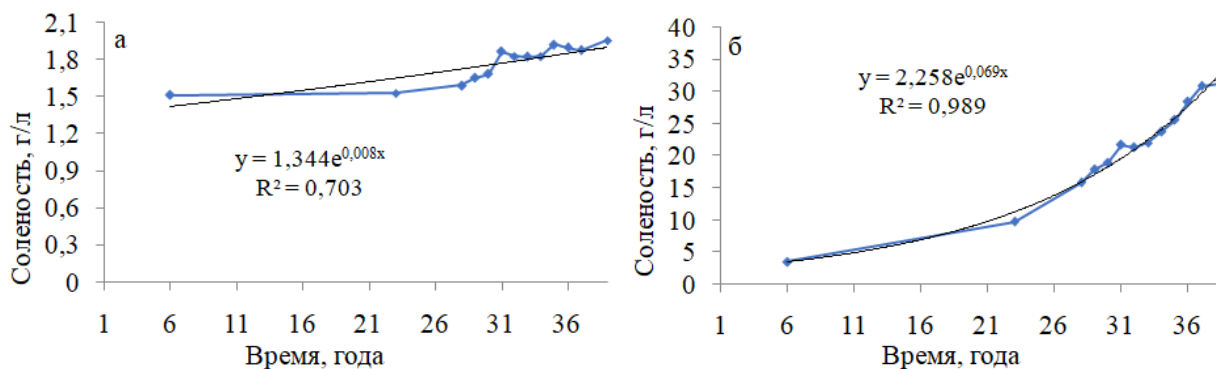


Рисунок 2. Изменение среднегодовой солености в первом (а) и втором (б) озерах за период наблюдений

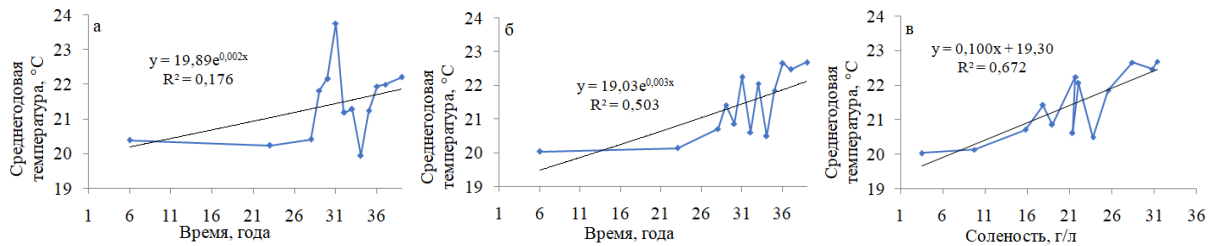


Рисунок 3. Изменение Среднегодовая температура в первом (а) и втором (б) озерах и зависимость температуры от солёности во втором озере (в) за период наблюдений

Такую зависимость легко объяснить, т.к. теплоемкость раствора уменьшается с ростом солёности [8].

Среднегодовая концентрация растворенного кислорода в озерах достоверно снижалась со временем (рис. 4). В первом озере ($R=0,840$, $p=0,0001$):

$$DO_1 = -0,189t + 14,52 \quad (4),$$

во втором озере ($R=0,756$, $p=0,001$):

$$DO_2 = -0,173t + 13,32 \quad (5),$$

где DO_1 и DO_2 – среднегодовая дневная концентрация кислорода, мг/л, в верхнем и нижнем озере, соответственно.

Долговременный тренд падения концентрации растворенного кислорода в озерах авторы объяснить пока не могут. Между концентрацией кислорода и солёностью выявлена достоверная негативная корреляция: ($R=0,818$, $p=0,0005$) в проточном ($R=0,856$, $p=0,0001$) и в терминальном (рис. 5). Это можно объяснить уменьшением растворимости кислорода с ростом солёности [8].

Прозрачность в озерах колебалась (рис. 6), в верхнем озере отмечен достоверный тренд увеличения ($R=0,875$, $p=0,0001$). В нижнем озере о наличии закономерного тренда говорить сложно.

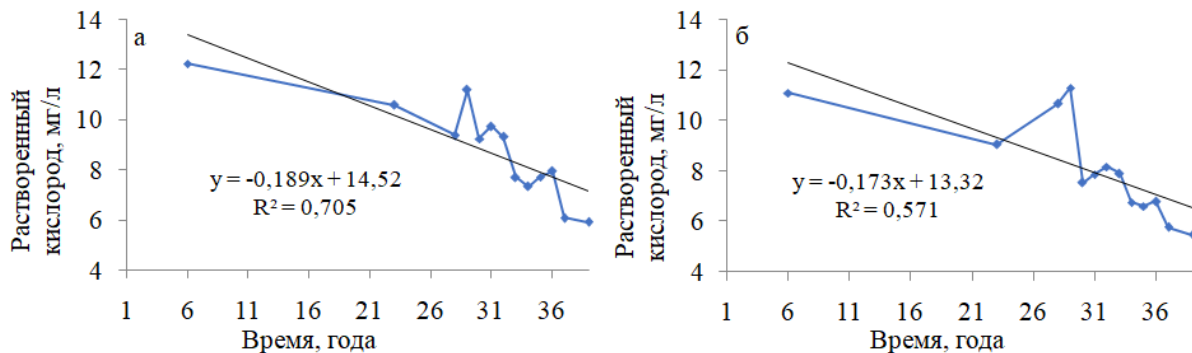


Рисунок 4. Изменение среднегодовой концентрации растворенного кислорода в первом (а) и втором (б) озерах за период наблюдений

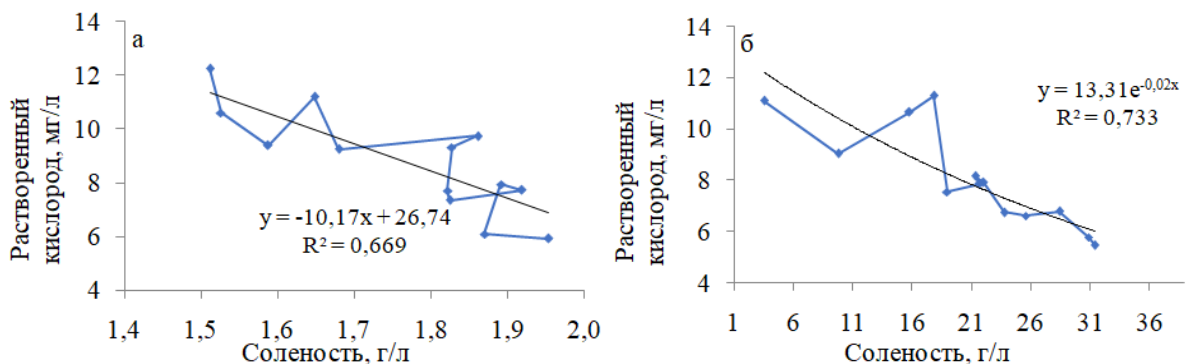


Рисунок 5. Изменение среднегодовой концентрации растворенного кислорода в первом (а) и втором (б) озерах в зависимости от солёности за период наблюдений

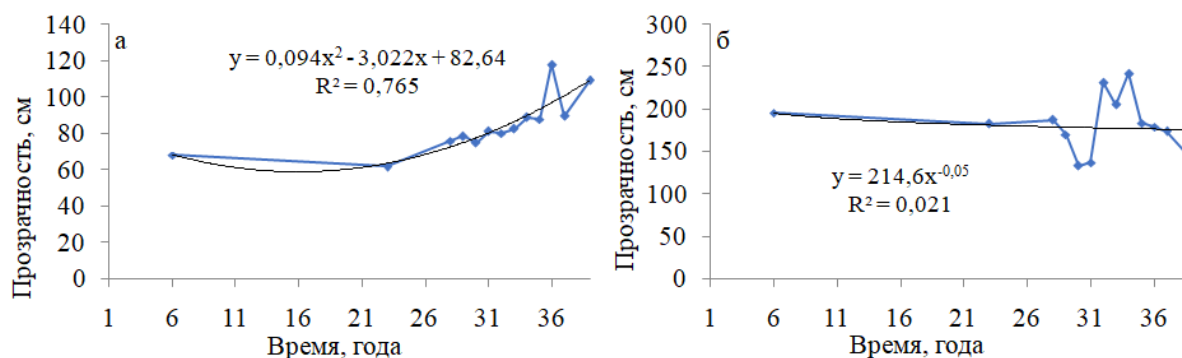


Рисунок 6. Изменение среднегодовой прозрачности в первом (а) и втором (б) озерах за период наблюдений

Среднегодовое содержание общего азота в озерах колебалось с четко выделяющимся максимумом (рис. 7, 8).

В верхнем озере по 29-й год существования шло монотонное достоверное увеличение среднегодовой концентрации общего азота ($R=0,795$, $p=0,001$):

$$TN_1 = 1,414e^{0,017t} \quad (6),$$

А затем шло монотонное достоверное снижение концентрации ($R=0,976$ $p=0,0001$)

$$TN_1 = 0,043t^2 - 3,078t + 55,49 \quad (7),$$

В нижнем озере по 30-й год существования шло монотонное достоверное увеличение среднегодовой концентрации общего азота ($R=0,855$, $p=0,0001$):

$$TN_2 = 0,503e^{0,054t} \quad (8),$$

а затем шло монотонное достоверное снижение концентрации ($R=0,977$ $p=0,0001$)

$$TN_2 = 0,073 t^2 - 5,343 t + 97,47 \quad (9),$$

где TN_1 и TN_2 – среднегодовая концентрация общего азота, мкг/л, в верхнем и нижнем озере, соответственно.

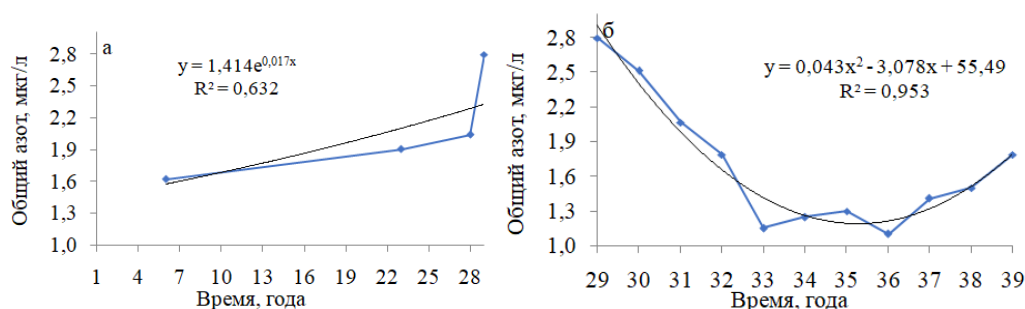


Рисунок 7. Изменение среднегодового содержания общего азота в первом озере до максимума (а) и после (б) за период наблюдений

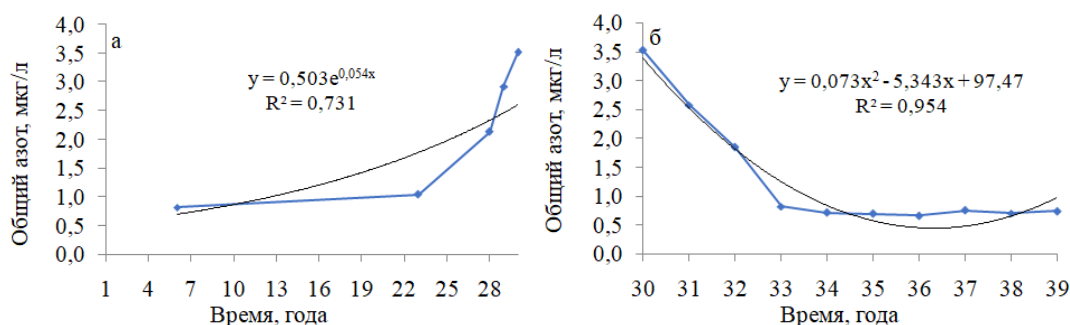


Рисунок 8. Изменение среднегодового содержания общего азота во втором озере до максимума (а) и после (б) за период наблюдений

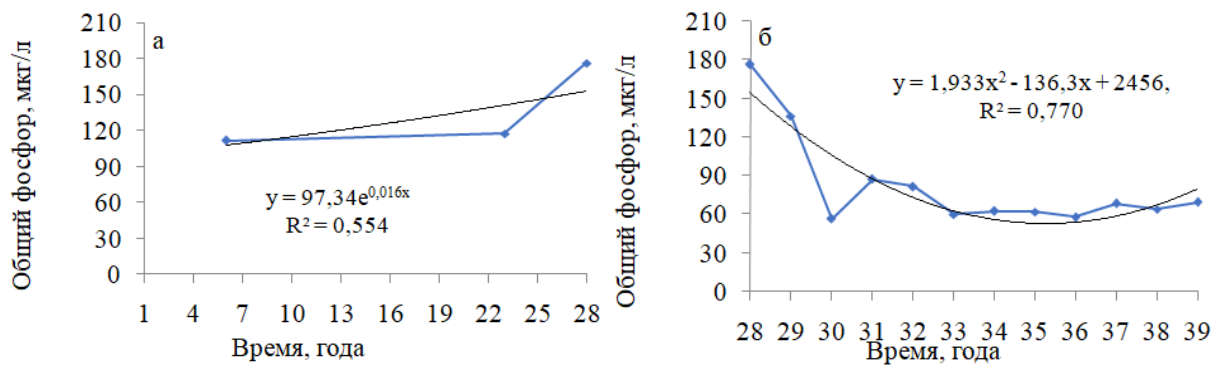


Рисунок 9. Изменение среднегодового содержания общего фосфора в первом озере до максимума (а) и после (б) за период наблюдений

Среднегодовое содержание общего фосфора в озерах колебалось с четко выделяющимся максимумом (рис. 9, 10).

В верхнем озере по 28-й год существования шло монотонное достоверное увеличение среднегодовой концентрации общего фосфора ($R=0,744$, $p=0,001$):

$$TP_1 = 97,34e^{0,016t} \quad (10),$$

А затем шло монотонное достоверное снижение концентрации ($R=0,877$ $p=0,0001$)

$$TP_1 = 1,933t^2 - 136,3t + 2456 \quad (11),$$

В нижнем озере по 28-й год существования шло монотонное достоверное увеличение среднегодовой концентрации общего фосфора ($R=0,743$, $p=0,001$):

$$TP_2 = 55,93e^{0,024t} \quad (12),$$

А затем шло монотонное достоверное снижение концентрации ($R=0,912$ $p=0,0001$)

$$TP_2 = 1,749t^2 - 124,3t + 2238 \quad (13).$$

где TP_1 и TP_2 – среднегодовая концентрация общего фосфора, мкг/л, в верхнем и нижнем озере, соответственно.

Анализ уравнений (6–13) позволяет предположить, что в озерах в первый период шла интенсивная эвтрофикация, а потом тенденция поменялась на противоположную. Причина этого пока авторам непонятна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост солености в озерах аридных зон является общей закономерностью, но на ее проявление влияет степень проточности водоема и, вероятно, другие факторы. Чем проточность больше, тем медленнее увеличивается соленость. Соленость влияет на другие параметры среды, но еще не все эти влияния выявлены и поняты. Между изменчивостью различных параметров существуют сложные взаимосвязи, которые по-разному реализовывались в двух озерах. Сравнение изменений солености и других параметров показало, что географическое положение, т.е. приход солнечной радиации, не могут рассматриваться как единственный детерминант этих изменений.

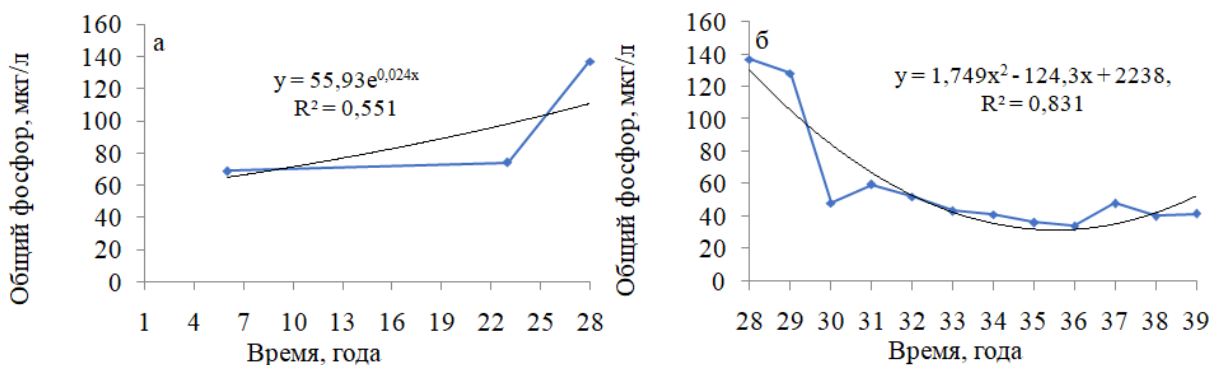


Рисунок 10. Изменение среднегодового содержания общего фосфора во втором озере до максимума (а) и после (б) за период наблюдений

Каждое озеро в определенной степени уникально в тенденциях временной изменчивости, эта индивидуальность должна учитываться при их моделировании и прогнозировании дальнейших изменений.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Экосистемы экстремальных местообитаний Азово-Черноморского бассейна и других регионов: биоразнообразие, функционирование, динамика и биоресурсный потенциал» (№ гос. регистрации 124030100107-9).

Список литературы / References:

1. Anufrieva E.V., Goher M.E., Hussian A.M., El-Sayed S.M., Hegab M.H., Tahoun U.M., Shadrin N.V. Ecosystems of artificial saline lakes. A case of Lake Magic in Wadi El-Rayan depression (Egypt). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 2020, no. 421, article no. 31, 13 p.
2. Shadrin N., Yakovenko V., Moseychenko I., Anufrieva E. Zooplankton in the Technogenic Aquatic Ecosystem of the North Crimean Canal, the Longest in Europe. *Water*, 2023, vol. 15, iss. 13, art. no. 2327, 14 p.
3. El-Shabrawy G.M., Dumont H.J. The Fayum depression and its lakes. In: Dumont H.J., ed. *The Nile*. Dordrecht: Springer, 2009, pp. 95-124.
4. Sayed M.F., Abdel-Satar A.M. Chemical assessment of Wadi El-Rayan Lakes-Egypt. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 2009, vol. 5, pp. 53-62.
5. Goher M.E., Mahdy E.S., Abdo M.H., Farida M., Korium M.A., Elsherif A.A. Water quality status and pollution indices of Wadi El-Rayan lakes, El-Fayoum, Egypt. *Sustain Water Resource Management*, 2019, vol. 5, pp. 387-400.
6. Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. *Таблицы по математической статистике*. М., 1982, 278 с. [Muller P., Neumann P., Storm P. *Tables on Mathematical Statistics*. Moscow, Finance and Statistics Publ., 1982, 278 p. (In Russ.)].
7. Zheng M. *Saline Lakes and Salt Basin Deposits in China*. Beijing: Science Press, 2014, 321 p.
8. Ануфриева Е.В., Шадрин Н.В. *Жизнь в экстремальной среде. Животные в экосистемах гиперсоленых вод*. ФИЦ Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2023, 183 с. [Anufrieva E.V., Shadrin N.V. *Life in extreme environments. Animals in the Ecosystems of Hypersaline Waters*. FRC A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS. Moscow: KMK Scientific Publications Partnership, 2023, 183 p. (In Russ.)].

CHANGES IN ABIOTIC PARAMETERS IN ARTIFICIAL LAKE ECOSYSTEMS OF THE DESERT DEPRESSION OF WADI EL-RAYAN (EGYPT) FROM 1984 TO 2022

Anufrieva E.V.¹, Goher M.E.², Grigorev M.N.^{1,3}, Shadrin N.V.¹

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia

² National Institute of Oceanography and Fisheries, Cairo, Egypt
Aben Mahassen St., 3, Cairo, Egypt

³ Sevastopol State University

University St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: misha79788961008@gmail.com

Received 24.08.2024

Abstract. The number of artificial water bodies in the world is growing, they play a particularly important role in arid zones. In an arid climate, changes begin almost immediately in them, the patterns of which are still poorly understood. To fill this gap, the authors analyzed data on the changes of 6 abiotic parameters in two artificial lakes in the desert region of Egypt, which were obtained by Egyptian colleagues between 1984 and 2022. Trends in the change of average annual indicators were analyzed. Salinity increased exponentially in both lakes, in the upper (open) lake significantly slower than in the lower terminal lake. The average annual temperature in both lakes fluctuated, with no long-term trend noted in the upper lake and an increasing trend in average annual temperature noted in the lower lake. The average annual concentration of dissolved oxygen in both lakes significantly decreased over time. Transparency in the lakes fluctuated, a reliable upward trend was noted in the upper lake, while it is difficult to talk about a regular trend in the lower lake. The average annual content of total phosphorus and nitrogen in both lakes fluctuated with a clearly visible maximum in the middle of the observation period. The increase in salinity in lakes of arid areas is a general pattern, but its manifestation is affected by the degree of flow through a lake or pond. Salinity affects other environmental parameters, such as temperature and oxygen content. There are complex relationships between the variability of various parameters, which were realized differently in the two lakes. Each lake is to some extent unique in its temporal variability trends, and this individuality must be taken into account when modeling them and predicting future changes.

Key words: artificial lakes, arid zones, long-term changes, salinity, temperature, oxygen, nitrogen, phosphorus.

ОЦЕНКА ВЫЖИВАЕМОСТИ И КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ АБОРИГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССАХ БИОАУГМЕНТАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОТХОДАМИ ДЕРЕВООБРАБАТЫВАЮЩИХ ПРОИЗВОДСТВ

Брилькова Е.В.^{1,2}, Суханова А.А.¹, Брильков А.В.³, Логинов Ю.Ю.¹

¹ Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф.Решетнева
просп. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ, e-mail: evmorbril@mail.ru

² Институт биофизики ФИЦ СО РАН
Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ

³ Сибирский федеральный университет
просп. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

Поступила в редакцию 05.09.2024

Аннотация. Статья представляет собой краткий обзор современного состояния проблемы снижения концентрации фенолов и других токсикантов в почвах и сточных водах крупных деревообрабатывающих производств в районе среднего течения р. Енисей Красноярского края (г. Лесосибирск Красноярского Края). После успешной автоселекции при высоких концентрациях токсикантов штаммы дрожжей и бактерий культивировали для определения их кинетических характеристик и сравнивали с известными параметрами. Показано, что для дрожжей *Candida tropicalis* и бактерий *Rhodococcus sp.* лишь небольшая часть зависимости $\mu(S)$ соответствует кинетической модели Холдейна. Причиной несоответствия модели и эксперимента при высоких концентрациях фенола в культуре предположительно является переключение механизмов и мест ингибирования. Таким образом, кинетические закономерности развития популяций микроорганизмов при изменении концентрации ограничивающих рост факторов значительно сложнее и богаче соответствующей кинетики отдельных ферментативных реакций. Для ускорения процессов биоремедиации почвенных и водных экосистем предлагается интродукция отобранных природных или специальных трансгенных микроорганизмов и их автоселекция при длительном непрерывном культивировании.

Ключевые слова: фенолразрушающие дрожжи и бактерии, *Candida tropicalis*, *Rhodococcus sp.*, субстратное ингибирование, кинетические модели, непрерывное культивирование, турбидостат и хемостат, автоселекция.

ВВЕДЕНИЕ

Реабилитация окружающей среды в условиях возрастающего техногенного воздействия человеческой цивилизации на экосистемы планеты и биосферу сейчас становится все более неотложной задачей. Конечно, приоритетные направления работ, связанные с оценкой биологического разнообразия и глобальных изменений климата на планете, необходимы, но недостаточны, т. к. являются по сути своей собирательными, инвентаризационными, и почти не связаны с активной деятельностью живых организмов по борьбе с растущим загрязнением. Необходимо разворачивание более активных действий, связанных с непосредственным противодействием антропогенному потоку загрязнений, с быстрой трансформацией загрязнителей различной природы, с их встраиванием в обычные для природных экосистем круговороты [1].

Известно, что главными процессами в борьбе с загрязнениями различного типа являются основную роль играют микроорганизмы (включая микроводоросли) и высшие растения (наземные и водные). Процессы биоремедиации природных экосистем, при соответствующем использовании технических средств, а также физических и химических подходов, способны наиболее быстро приводить к позитивным результатам, так как опираются на метаболический потенциал живой природы и на разветвленность и многообразие биотического круговорота. Особое внимание уделяется поиску штаммов микроорганизмов, способных утилизировать высокотоксичные субстраты и способных (вследствие этого) выживать в загрязненных ареалах, восстанавливая при этом круговорот биогенных элементов в экосистемах. Интродукция экзогенных микроорганизмов в окружающую среду (т. н. *bioaugmentation*) предлагается для улучшения продуктивности почвы в сельском хозяйстве и для ускорения биоремедиации [2].

Фенол и другие токсичные его производные являются типичными загрязнителями окружающей среды [3]. Биodeградация фенола осуществляется и в природных условиях, и в сточных водах микроорганизмами, использующими его в качестве субстрата. У бактерий и дрожжей типичными путями метаболизма фенола являются дигидроксилирование бензольного кольца до катехола и дальнейшее последовательное расщепление его по орто- либо мета-пути [4-5]. Использование микроорганизмами фенола как субстрата имеет ту особенность, что небольшой избыток фенола в среде резко тормозит рост потребляющей его популяции (субстратное ингибирование). Успешное использование микроорганизмов для биоремедиации во многом зависит не только от полезных катаболических способностей, но еще и от кинетических характеристик роста популяций конкретных штаммов [6-11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Микробная ассоциация, состоящая из 3 штаммов дрожжей и 5 штаммов бактерий, была получена из образцов почвы, загрязненной отходами крупных деревообрабатывающих комплексов (опилки и щепа, многолетние накопления в почве) вблизи г. Лесосибирск в среднем течении р. Енисей, Центральная часть Красноярского края. Штамм дрожжей, определенный как *Candida tropicalis*, был выделен при длительном культивировании (около 30 генераций) этой ассоциации микроорганизмов на минеральной среде с фенолом ($S_0=500$ мг/л) в хемостате при удельной скорости разбавления среды $0,055 \text{ ч}^{-1}$. Штамм бактерий, определенный как *Rhodococcus sp.*, был выделен при длительном культивировании микробной ассоциации в рН-стате, при высокой концентрации фенола на входе $S_0=1500$ мг/л и в культуре $S=400$ мг/л. После успешной селекции эти штаммы *C. tropicalis* и *Rhodococcus sp.* культивировали в хемостате и рН-стате при различных скоростях разбавления среды для определения их кинетических характеристик.

Стационарные состояния при культивировании дрожжей *C. tropicalis* при различных скоростях разбавления среды приведены на рисунке 1. При $D=0,3-0,4 \text{ час}^{-1}$ небольшие флуктуации в скорости разбавления, причиной которых могли быть, например, вариации объема культуры или случайные изменения скорости потока, приводили к резкому возрастанию концентрации фенола в культуре и, в конечном счете, к вымыванию культуры. Таким образом, наши экспериментальные данные подтверждают теоретические выводы о невозможности проведения селекции деградирующих фенол микроорганизмов и исследование субстратного ингибирования роста микроорганизмов фенолом в хемостате, поскольку стационарные состояния в этом случае не устойчивы.

Для исследования субстратного ингибирования роста дрожжей фенолом использовали непрерывное культивирование в рН-стате. Значения кинетических коэффициентов использования фенола, экономического коэффициента Y , удельной скорости разложения фенола q , концентрации биомассы X в зависимости от концентрации фенола S в культуре, которые были получены при хемостатном и рН-статном культивировании дрожжей и бактерий, приведены в таблице 1, 2 и рисунке 1 и 2.

Известны несколько моделей, представляющих интерес для описания субстратного ингибирования: Моно, Гомперца, Холдейна, Перта и др. [6-10]. Ни одна из моделей, как показали наши проверки, достоверно не выделяется среди других по точности описания экспериментальных данных. Однако модель Холдейна:

$$\mu = \mu_{\max} S / (K_S + S + S^2/K_I), \quad (1)$$

содержит лишь три параметра и потому может быть признана более предпочтительной для описания ингибирования роста микроорганизмов избытком субстрата. Отметим очень важную особенность, среди моделей встречаются и эмпирические, и таким образом, теоретически обоснованные модели никак не лучше описывают субстратное ингибирование роста микроорганизмов в сравнении с эмпирическими.

Сравнение немоноотонной зависимости $\mu(S)$, полученной при непрерывном культивировании популяции дрожжей *C. tropicalis* и бактерий *Rhodococcus sp.* (рис. 1, 2) с моделями субстратного ингибирования свидетельствует об их неудовлетворительном соответствии. На рисунках 1, 2 и в таблице 1 приведены коэффициенты наиболее популярной модели Холдейна для субстратного ингибирования роста микроорганизмов. По-видимому, субстратное торможение роста популяции микроорганизмов фенолом включает в себя, скорее всего, совокупность механизмов, чем какой-нибудь один специфический механизм.

Можно указать несколько наиболее вероятных причин неудовлетворительного описания моделями экспериментальных данных по субстратному ингибированию роста микроорганизмов. Во-первых, описать все известные случаи субстратного ингибирования с помощью одной, универсальной модели вряд ли возможно из-за высокой специфичности торможения роста микроорганизмов каждым субстратом в отдельности. Так, например, в наших экспериментах по субстратному ингибированию роста популяции дрожжей *C. tropicalis* и бактерий *Rhodococcus sp.* фенолом было обнаружено, что лишь небольшая часть зависимости $\mu(S)$ соответствует модели Холдейна (рис. 1, 2). Причиной несоответствия модели и эксперимента при высоких концентрациях фенола в культуре предположительно является переключение механизмов и мест ингибирования. Другая причина может заключаться в низкой точности экспериментальных данных, полученных в большинстве работ при периодическом культивировании.

На рисунках 1 и 2 приведены экспериментальные данные, полученные при исследовании лимитирования роста популяции дрожжей и бактерий фенолом в хемостате и рН-стате в координатах q_s от $\mu=D$. Экспериментальные точки хорошо соответствуют линейной зависимости вида:

$$q_s = m + (1/Y_G) \mu, \quad (2)$$

пользуясь которой можно определить «истинный» экономический коэффициент Y_G и удельную скорость затрат энергетического субстрата на поддержание жизнедеятельности популяции дрожжей m при росте на феноле как единственном источнике углерода и энергии при субстратном ингибировании роста дрожжей *C. tropicalis* и бактерий *Rhodococcus sp.* фенолом (таблица 2).

Оценки коэффициентов m и Y_G можно также получить, используя выражение:

$$1/Y = 1/Y_G + q_m/\mu, \quad (3)$$

Таблица 1. Коэффициенты модели Холдейна при использовании микроорганизмами фенола как субстрата

Микроорга- низмы	$\mu_{\max}$ час ⁻¹	K _s мг/л	K _i мг/л	$\mu_{\max}/K_s$	S* мг/л	Авторы
<i>Pseudomonas putida</i>	0,567	2,38	106,0	0,238	16,0	Der.Yang, Humphrey, 1975
<i>Pseudomonas putida</i>	0,534	1,00	470,0	0,534	21,7	Hill, Robinson, 1975
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 548	0,436	6,19	54,1	0,070	18,3	Monteirol e.a., 2000
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0,703	23,90	583,2	0,029	118,0	Borighem, Vereecken, 1981
Сферические бактерии активного ила	0,260	25,40	173,0	0,010	66,3	Pawlowsky, Howell, 1973
Нитчатые бактерии активного ила	0,223	5,86	934,5	0,038	74,0	Pawlowsky, Howell, 1973
<i>Trichosporon cutaneum</i>	0,464	1,66	380,0	0,290	25,1	Der Yang, Humphrey, 1975
<i>Ralstonia eutropha</i>	0,410	2,00	350,0	0,205	26,5	Leonard e. a., 1999
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,542	36,20	145	0,015	72,458	Kumaran e. a., 1997
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,28	1,167	58,5	0,240	8,26	Geng, 2006
<i>Alcaligenes TW1</i>	0,58	10	152	0,058	38,987	Essam, 2010
<i>Rhodococcus sp. SKC</i>	0,30	36,40	418,79	0,008	123,45	Yujuan Wen e. a., 2020
<i>Pseudomonas putida</i>	0,155	85,7	111,6	0,002	97,80	Lin, Gu, 2023
<i>Acinetobacter townveri</i> CFII-87	0,329	150,99	296	0,002	214,88	Szilveszter e. a., 2023
<i>Rhodococcus sp.</i>	0,866 ±0,024	31,01±2, 34	342,7± 18,9	0,028	103,088	Настоящая работа
<i>Candida tropicalis</i>	0,561 ±0,019	2,42 ±0,14	687,4± 95,7	0,232	48,786	Настоящая работа

причем известно, что получаемые при этом значения существенно зависят от способа представления экспериментальных данных. Однако, более равномерные статистические оценки параметров получаются при использовании линейного представления, в котором аргументом является задаваемая непосредственно в эксперименте переменная D , а не ее обратная величина. В нашем случае такой переменной является удельная скорость потока D , или равная ей величина удельной скорости роста в стационарном состоянии в хемостате μ , поэтому мы воспользовались представлением (2).

Штамм дрожжей, определенный как *Candida tropicalis*, был выделен в процессе автоселекции при длительном культивировании (около 30 генераций) смешанной культуры микроорганизмов на минеральной среде с фенолом в хемостате при $S_0=500$ мг/л и скорости разбавления среды $D=0,055$ ч⁻¹. Штамм бактерий, определенный как *Rhodococcus sp.*, был выделен в процессе автоселекции при длительном культивировании

Таблица 2. Величина «истинного» экономического коэффициента (Y_G) и удельной скорости затрат субстрата на поддержание (m) при лимитировании роста микроорганизмов фенолом

Микроорганизмы	Y_G г/г	m з/з	Литература
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0,902	0,061	Borighem, Vereecken, 1981
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0,867	0,058	Там же
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,900	0,240	Jones e.a., 1973
<i>Trichosporon cutaneum</i>	0,850	0,055	Der Yang, Humphrey, 1975
<i>Candida tropicalis</i>	0,778	0,104	Настоящая работа

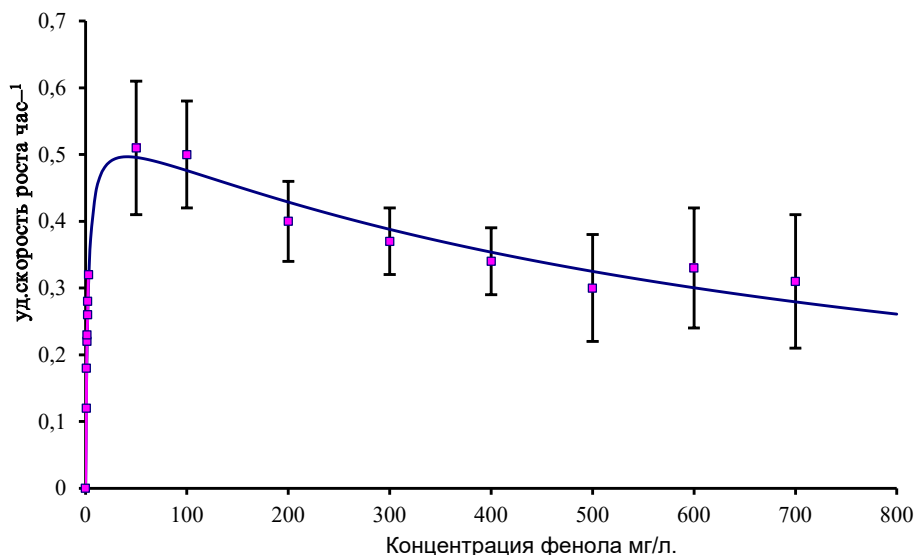


Рисунок 1. Субстратное ингибирование роста популяции дрожжей *Candida tropicalis* фенолом в непрерывной культуре. Обозначения: точки – стационарные состояния в рН-стате; непрерывная линия – теоретическая кривая, рассчитанная по формуле Холдейна (1)

смешанной культуры в рН-стате, при высокой входной концентрации фенола $S_0=3000$ мг/л, стационарная концентрация субстрата S в культуре 400 мг/л. После успешной автоселекции эти штаммы *C. tropicalis* и *Rhodococcus sp.* культивировали в хемостате и в рН-стате для определения их кинетических характеристик (табл. 1, 2, рис. 1, 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Коэффициенты модели Холдейна, определенные при использовании дрожжами *C. tropicalis* и бактерий *Rhodococcus sp.* фенола как субстрата в хемостате и рН-стате вместе с аналогичными данными других исследователей приведены в таблице 1. Для большинства фенолразрушающих микроорганизмов критическая концентрация фенола в культуре ($S^* = \sqrt{K_s K_i}$) довольно низка, что и является причиной неустойчивости стационарных состояний в хемостате при относительно невысоких (по сравнению с μ_{max}) скоростях разбавления среды D , но при достаточно высоких концентрациях фенола S во входной среде (рис. 1, 2, табл. 1).

Таким образом, можно предположить, что субстратное ингибирование роста популяций дрожжей и бактерий фенолом, скорее всего, включает в себя два механизма. Начальный участок торможения (50-500 мг/л

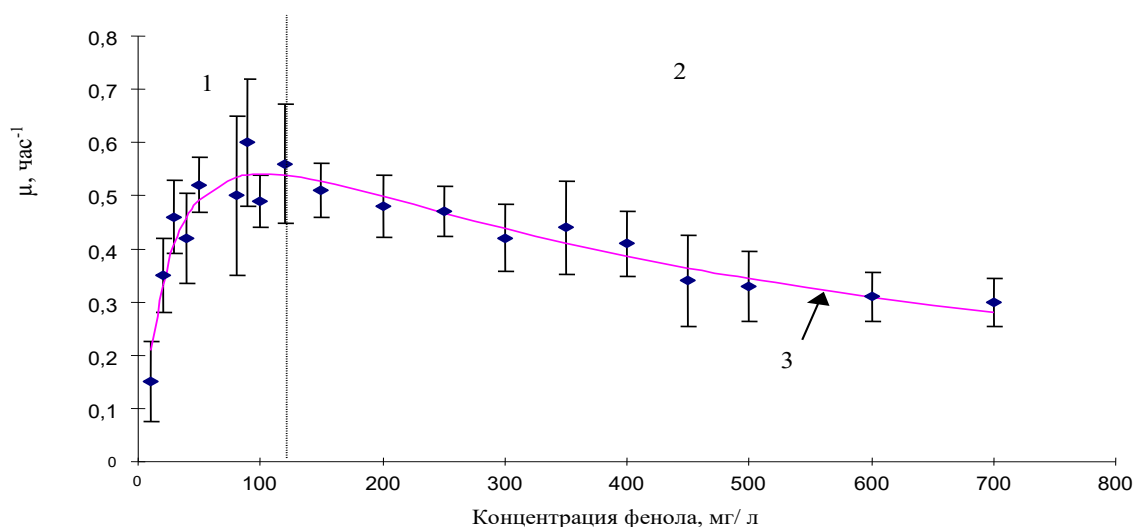


Рисунок 2. Непрерывное культивирование в рН-стате бактерий *Rhodococcus sp.* при субстратном ингибировании их роста фенолом. Обозначения: (1) – периодическое культивирование в колбах на качалке; (2) – стационарные состояния в рН-стате; (3) – теоретическая кривая, рассчитанная по формуле Холдейна (1)

фенола в культуре) соответствует субстратному ингибированию, описываемому функцией Холдейна. При дальнейшем возрастании концентрации фенола происходит наложение неконкурентного торможения на собственно субстратное ингибирование ферментативного окисления фенола в клетках дрожжей. Это предположение подтверждается экспериментальными данными и нашими наблюдениями (рис. 1, 2, табл. 1). Величины констант моделей таковы, что ингибирование роста бактерий субстратом было преобладающим фактором уже при его концентрации 10 мг/л и более в культуре. Таким образом, на примере субстратного ингибирования роста дрожжей фенолом видно, что кинетические закономерности развития популяций микроорганизмов при изменении концентрации ограничивающих рост факторов значительно сложнее и богаче соответствующей кинетики отдельных ферментативных реакций.

С целью получения штаммов микроорганизмов с высокими кинетическими характеристиками, оценки их способности деградировать токсичные экополлютанты, такие как фенол, в наших экспериментах использованы методы автоселекции активных форм в условиях непрерывного культивирования. С этой целью нами испытаны методы непрерывного культивирования с обратной связью (рН-стат), позволяющие проводить процессы автоселекции штаммов-деструкторов и их ассоциаций в условиях длительного развития при высоких концентрациях токсикантов в среде, и в хеостате при низких концентрациях фенола в среде.

Для исследования субстратного ингибирования роста дрожжей фенолом использовали непрерывное культивирование в хеостате и рН-стате (рис. 1, 2). Считается общепризнанным, что микроорганизмы, обладающие высокой катаболической активностью токсичных субстратов, или другими словами, те, у которых выше отношение μ_{max}/K_S для данного субстрата, растут быстрее в таких условиях и, как правило, более приемлемы для целей биоремедиации. Однако это положение пока еще не было доказано на достаточно большом экспериментальном материале. А в отношении высокотоксичных загрязнителей окружающей среды, таких как в нашем случае фенол или его производные, это может быть даже неверно. Например, было показано, что штаммы бактерий и их сообщества, обладающие высокой фенол-деградирующей способностью, были менее конкурентоспособными по сравнению со штаммами, которые имели низкую фенолразрушающую активность после их интродукции в активный ил с фенолом [7,11].

В наших экспериментах штамм бактерий *Rhodococcus sp.*, победивший в конкуренции при длительном культивировании микробной ассоциации в рН-стате при высокой концентрации фенола в культуре обладал, однако, более низким значением показателя μ_{max}/K_S по сравнению с другими видами микроорганизмов, характеристики которых были изучены (таблица 1). Таким образом, грамотная селекция активных штаммов-деструкторов токсичных поллютантов должна проводиться в условиях, соответствующих их дальнейшему успешному применению.

Интродукция экзогенных микроорганизмов в окружающую среду широко предлагается в последнее время как один из наиболее перспективных современных подходов для улучшения продуктивности почвы в сельском хозяйстве и для ускорения биоремедиации загрязненных почвенных и водных экосистем. В этом случае применяют аборигенные или аллохтонные микроорганизмы для снижения концентрации загрязняющих веществ в почвах, активном иле, биореакторах и др., причем используемые организмы могут быть как природные, так и генетически модифицированные [12-15]. В целом ряде случаев было показано, что такая целенаправленная интродукция может быть весьма полезной, однако сообщалось и о том, что интродуцированные с целью биоремедиации микроорганизмы плохо выживают, а иногда даже и вовсе не оказывают практически никакого заметного влияния на общие функции загрязненных экосистем [14].

К настоящему времени факторы окружающей среды, влияющие на выживаемость интродуцированных микроорганизмов, и в конечном счете, на успешность биоремедиации, изучены пока недостаточно полно, среди них, например, физико-химические параметры, доступность субстратов, давление хищников, существование экологических микрониш. Для получения штаммов микроорганизмов с высокими кинетическими характеристиками развития популяции, оценки их биodeградирующей способности токсичных экополлютантов, таких, как фенол, нами использованы методы селекции активных форм в условиях непрерывного культивирования при высокой концентрации токсикантов. С этой целью испытаны методы непрерывного культивирования с обратной связью (рН-стат), позволяющие проводить процессы селекции штаммов-деструкторов и их ассоциаций в условиях длительного развития при этих условиях.

Современные технологии биоремедиации природных экосистем, загрязненных токсичными отходами производств, опираются на активизацию метаболического потенциала микроорганизмов. Целенаправленная интродукция специальных штаммов микроорганизмов весьма перспективна в тех случаях, когда интродуцируемые микроорганизмы могут использовать субстраты, недоступные для большинства аборигенных микроорганизмов, что может обеспечить им селективное преимущество и устойчивость в ареалах, содержащих такие поллютанты. Автоселекция штаммов микроорганизмов при непрерывном культивировании предназначена для получения штаммов микроорганизмов с высокими кинетическими характеристиками развития, улучшения их биodeградирующей способности токсичных экополлютантов, таких, как фенол и его производные, повышения выживаемости и конкурентоспособности штаммов и их ассоциаций в процессах биоремедиации.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (FEFE-2024-0027 «Исследование закономерностей химико-биотехнологического синтеза

биоразлагаемых полимеров и разработка комплексной технологии получения конструкционных композитных материалов с контролируемыми сроками биodeградации для промышленного применения».

Список литературы / References:

1. Брильков А.В., Печуркин Н.С., Логинов Ю.Ю. Экологическая биофизика. Красноярск: СибГУ им. М.Ф. Решетнева, 2024, 144 с. [Brilkov A.V., Pechurkin N.S., Loginov Y.Yu. *Ecological biophysics*. Krasnoyarsk: M.F. Reshetnev Siberian State University, 2024, 144 p. (In Russ.).]
2. Fiko D.-R., Raduly B., Mathe I., Felfoldi T., Lanyi S., Szilveszter S. Bioaugmentation Potential Investigation Using a Phenol Affinity Analysis of Three *Acinetobacter* Strains in a Multi-Carbon-Source Condition. *Water*, 2023, vol. 15, p. 2815.
3. Xu N., Yang X., Yang Q., Guo M. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of Phenol Degradation and Tolerance in *Acinetobacter lwoffii* through Adaptive Evolution. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 16529.
4. Gu Q., Chen M., Zhang J., Guo W., Wu H., Sun M., Wei L., Wang J., Wei X., Zhang Y., Ye Q., Xue L., Pang R., Ding Y., Wu Q. Genomic Analysis and Stability Evaluation of the Phenol-Degrading Bacterium *Acinetobacter* sp. DW-1 During Water Treatment. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12, p. 687511.
5. Asimakoula S., Marinakos O., Tsagogiannis E., Koukkou A.-I. Phenol Degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, p. 524.
6. Sridevi V., Hamzah H.T., Alawi N.M., Teja D.D., Poiba V.R., Spandana B., Mahdi H.S. Haldane Kinetic Study on Biodegradation of Phenol. A Comprehensive Review. *Int. J. Res.*, 2023, vol. 11, no. 1, pp. 92-105.
7. He Y., Wang Z., Li T., Peng X., Tang Y., Jia X. Biodegradation of phenol by *Candida tropicalis* sp.: Kinetics, identification of putative genes and reconstruction of catabolic pathways by genomic and transcriptomic characteristics. *Chemosphere*, 2022, vol. 308, pt. 3, p. 136443.
8. Kovarova-Kovar K., Egli T. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1998, vol. 62, no. 3, pp. 646-666.
9. Szilveszter S., Fiko D.R., Mathe I., Felfoldi T., Raduly B. Kinetic characterization of a new phenol degrading *Acinetobacter townieri* strain isolated from landfill leachate treating bioreactor. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2023, vol. 17, no. 39(3), p. 79.
10. Wen Y., Li C., Song X., Yang Y. Biodegradation of Phenol by *Rhodococcus* sp. Strain SKC: Characterization and Kinetics Study. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 16, p. 3665.
11. Zang M., Ma Z.H., Xu Y.L., Long X.F. Taxonomic identification, phenol biodegradation and soil remediation of the strain *Rhodococcus sacchari* sp. nov. Z13^T. *Arch Microbiol.*, 2024, vol. 206, no. 7, p. 313.
12. Nowak A., Wasilkowski D., Mroziak A. Implications of Bacterial Adaptation to Phenol Degradation under Suboptimal Culture Conditions Involving *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 and *Pseudomonas moorei* KB4. *Water*, 2022, vol. 14, p. 2845.
13. Garbisu C., Garaiyurrebaso O., Epelde L., Grohmann E., Alkorta I. Plasmid-Mediated Bioaugmentation for the Bioremediation of Contaminated Soils. *Front Microbiol.*, 2017, vol. 8, p. 1966.
14. Panigrahy N., Priyadarshini A., Sahoo M.M., Verma A.K., Daverey A., Sahoo N.K. A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. *Environmental Technology and Innovation*, 2022, vol. 27, art. 102423.
15. Xu N., Yang X., Yang Q., Guo M. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of Phenol Degradation and Tolerance in *Acinetobacter lwoffii* through Adaptive Evolution. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 16529.

ASSESSMENT OF SURVIVAL AND COMPETITIVENESS OF TRANSGENE MICROORGANISMS IN THE
PROCESSES OF BIOAUGMENTATION OF SOIL CONTAMINATED WITH WASTE FROM WOOD
PROCESSING PRODUCTS

Brilkova E.V.^{1,2}, Suhanova A.A.¹, Brilkov A.V.³, Loginov Yu.Yu.¹

¹ Reshetnev Siberian State University of Science and Technology
Krasnoyarskii rabochii Ave., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru

² Institute of biophysics FRC SB RAS
Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³ Siberian Federal University
Svobodny Ave., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

Received 05.09.2024

Abstract. The article is a brief overview of the current state of the problem of reducing the concentration of phenols and other toxicants in soils and wastewater from large wood processing industries in the area of the middle reaches of the river Yenisei, Krasnoyarsk Territory (Lesosibirsk, Krasnoyarsk Territory). After successful autoselection at high concentrations of toxicants, yeast and bacterial strains were cultivated to determine their kinetic characteristics and compared with known parameters. It has been shown that for the yeast *Candida tropicalis* and bacteria *Rhodococcus* sp. only a small part of the $\mu(S)$ dependence corresponds to the Haldane kinetic model. The reason for the discrepancy between the model and experiment at high concentrations of phenol in the culture is presumably a switching of mechanisms and sites of inhibition. Thus, the kinetic patterns of development of microbial populations when the concentration of growth-limiting factors changes is much more complex and richer than the corresponding kinetics of individual enzymatic reactions. To accelerate the processes of bioremediation of soil and aquatic ecosystems, it is proposed to introduce selected natural or special transgenic microorganisms and their autoselection during long-term continuous cultivation.

Key words: phenol-degrading yeasts and bacteria, *Candida tropicalis*, *Rhodococcus* sp., substrate inhibition, kinetic models, continuous cultivation, turbidostat and chemostat, autoselection.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2024 ГОД

ОБЩАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

- Башарина О.В., Лушева А.А., Секретарева У.С., Артюхов В.Г.** Влияние УФ-излучения на образование комплексов бычьего сывороточного альбумина с лизоцимом и олеиновой жирной кислотой № 3, с. 215-219
- Гребнева Е.А.** Механизм образования редких таутомерных форм цитозина и гуанина при облучении одноцепочечной РНК ультрафиолетовым светом № 1, с. 7-15
- Клочкова В.С., Лелеков А.С.** Применение однокомпонентного подхода при моделировании линейного роста культуры микроводорослей различных систематических групп № 4, с. 304-310
- Королева В.А., Панкова С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.** Исследование модуляции каталитических свойств цистеиновых протеаз при действии УФ-излучения и температуры путем иммобилизации ферментов на хитозане № 1, с. 16-21
- Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.** Антиоксидантные свойства аминокислот и роль долгоживущих радикалов в составе белков при действии ультрафиолетового-В излучения № 1, с. 28-33
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Активатор гетеротримерных G-белков, комплекс AlF_4^- , подавляет Ca^{2+} -ответы в макрофагах № 2, с. 121-130
- Подгурская А.Д., Цвеляя В.А., Слотвицкий М.М., Агладзе К.И.** Распространение волн возбуждения в монослой кардиомиоцитов крыс при влиянии различных доз ацетальдегида № 4, с. 299-303
- Солдатов А.А., Шалагина Н.Е., Рычкова В.Н., Кухарева Т.А., Лантушенко А.О.** Уровень окислительных процессов в эритроцитах морского ерша (*Scorpaena porcus*, L. 1758) в преднерестовый и нерестовый периоды годового цикла № 1, с. 34-38
- Тимченко Н.Н., Шупова Е.В.** Взаимодействие гемоглобина с липосомами до и после замораживания-оттаивания и влияние растворов соли и сроков хранения на структуру гемоглобина № 1, с. 22-27
- Чернышев Д.Н., Клочкова В.С.** Декомпозиция спектра поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Phaeodactylum tricomutum* № 3, с. 220-223
- Чернышев Д.Н., Клочкова В.С.** Разделение спектра поглощения водного экстракта микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl. № 2, с. 131-135

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ И БИОИНФОРМАТИКА

- Аксёнова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.** Моделирование сетевой активности нейронов при окислительной модификации глутаматных рецепторов № 2, с. 136-142
- Гордеева Е.Л., Изотова С.А.** Применение вейвлет-анализа для исследования распределения гидролитических ферментативных активностей в осадках № 3, с. 230-234
- Ивлиева (Перетоккина) И.В., Мещерякова А.А., Бабков Л.М., Сорокин В.В.** Структурно-динамические модели и ИК спектры метилзамещенных пиридо[1,2-а]пиримидиновых систем № 2, с. 143-147
- Исмаилова Л.И., Ахмедов Н.А.** Пространственная организация трипептидного и тетрапептидного аналогов молекулы ноцицептина № 4, с. 325-332
- Мегер Я.В., Пацановская Е.А., Дегтяр И.В., Хохлова О.И., Лантушенко А.О.** Генотипирование паразитического клеща, поражающего медоносных пчел рода *Apis* на крымских пасеках № 4, с. 320-324
- Фадеева М.В., Силаков М.И., Воронин Д.П., Кузнецов А.В.** Изучение гидроакустических воздействий на *Mnemiopsis leidyi* и *Danio rerio*: роль TRP-рецепторов № 1, с. 39-44
- Филиппов С.В.** Визуально-дифференциальный анализ (био-)макромолекул: методы исследования молекулярных структур с высокой степенью гомологии № 4, с. 311-319
- Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Луговая Е.А.** Модель организации клеточной функциональной группы № 1, с. 45-54

- Ян Т., Орехов Ф.С.** Сравнительный анализ крупнозернистого и полноатомного моделирования для оценки транспортных свойств малых молекул, белков и растворителей № 3, с. 224-229
- Янь А., Боздагян М.Е.** Исследование проницаемости мембраны кожи методами крупнозернистой молекулярной динамики № 3, с. 235-239

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Solano Gonzalez L.I., Morales Marco A., Agustin Serrano R., Zenteno Mateo B., Cervantes Tavera A.M., Hernandez Santiago A.A.** Study of electronic properties by DFT of Se6 and 5-fluorouracil drug delivery system № 3, с. 240-243
- Беликов Н.Е., Сафинова А.Я., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Демина О.В., Ходонов А.А.** Исследование особенностей селективности взаимодействия аналогов ретиноидов с различными микробными родопсинами № 1, с. 71-80
- Ботин А.С., Пулин А.М., Каминская Л.А., Макарова А.О., Кордова А.В.** Оценка возможности производства и применения бактериофагов при профилактике и лечении туберкулеза № 4, с. 364-377
- Ботин А.С., Ризк М.Г.Х., Логвиненко И.С., Кордова А.В.** Перспективы применения графен-содержащих перевязочных материалов для заживления ран различной природы № 4, с. 378-387
- Бутенко Е.В.** Патохимические особенности рака молочной железы на фоне приёма бигуанида № 4, с. 359-363
- Грановский Н.В., Аносов А.А., Ерофеев А.В., Мансфельд А.Д., Беляев Р.В., Казанский А.С.** Основные зависимости при корреляционном измерении теплового акустического излучения № 3, с. 255-263
- Ерофеев А.В., Острейко О.В., Шаракшанэ А.С., Грановский Н.В., Спирин Д.В., Мансфельд А.Д., Аносов А.А.** Совместное применение методов пассивной акустической термометрии и инфракрасной термографии при моделировании локальной гипертермии опухоли головного мозга человека № 2, с. 160-167
- Коломбет В.А., Лесных В.Н., Елистратов А.В.** «Навязанное мышление» как работа полураспределенного мозгового мультивибратора № 1, с. 61-65
- Куулар Мангалтепе А.Р., Ботин А.С.** Комбинация биофизической микрополяризации с другими методами в комплексной реабилитации неврологических заболеваний. Базовые и новые варианты № 4, с. 388-395
- Ланда С.Б., Верлов Н.А., Эмануэль В.Л.** Экстраклеточные частицы (EPs). Классификация, свойства, биогенез (Обзор) № 4, с. 333-358
- Малиновская Е.М., Савинова Е.А., Ершова Е.С., Сергеева В.А., Каменева Л.В., Краевая О.А., Трошин П.А., Вейко Н.Н.** Влияние двух водорастворимых производных фуллерена C₆₀ на антиоксидантную активность и окислительный метаболизм клеток фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ), культивируемых *in vitro* № 1, с. 88-95
- Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бадюлина В.И.** Агонист рецепторов сигма-1, соединение SKF-10047, подавляет стимулирующее влияние глутоксида на транспорт Na⁺ в эпителии кожи лягушки № 3, с. 244-248
- Набережных Г.А., Бахолдина С.И., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф.** Хитозаны и их ацилированные производные в липосомальной форме как потенциальные терапевтические препараты при эндотоксемии № 1, с. 55-60
- Нерсисян Э.С., Клименко И.В., Лобанов А.В.** Фотохимические свойства супрамолекулярных систем на основе β-циклодекстрина и тетрафенилпорфирина № 1, с. 81-87
- Никитина Е.Р., Чеботарева М.А., Шуколюкова Е.П., Полина Ю.А., Катюхин Л.Н.** Диагностический потенциал осмотической градиентной эктацитометрии № 1, с. 66-70
- Проскурнина Е.В., Созарукова М.М., Ершова Е.С., Савинова Е.А., Каменева Л.В., Вейко Н.Н., Иванов В.К., Костюк С.В.** Цитотоксичность и генотоксичность стабилизированного кардиолипидом наноразмерного диоксида церия № 2, с. 155-159
- Рощина В.В., Сергиевич Л.А.** Исследование влияния азуленов как защитных факторов на жизнеспособность мышей № 2, с. 168-173

- Скворцова П.В., Пергат А.В., Хайрутдинов Б.И.** Влияние противоионов на разделение фаз жидкость-жидкость в системе олигонуклеотид-пиллар[5]арен № 3, с. 271-275
- Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В.** Влияние изменения концентрации дейтерия в организме на активность лимфоцитопоеза в тимусе № 2, с. 179-183
- Титов А.С., Полников И.Г., Титов С.В., Казаринов К.Д.** Изучение физической модели биологического действия микроволнового излучения КВЧ диапазона на клеточном уровне организации биообъекта № 3, с. 264-270
- Чжу О.П., Маринич И.И., Аравияшвили Д.Э., Агаджанова Н.Э.** Физико-химические методы определения показателей оксидативного стресса при возникновении и развитии патологического процесса на модели лабораторных приматов № 2, с. 174-178
- Шипко М.Н., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Степович М.А.** О возможности использования метода газоразрядной визуализации для оценки структурной организации водных растворов лекарственных средств № 3, с. 249-254
- Шишкина Л.Н., Белецкая П.Д., Машукова А.В., Фенин А.А.** Последствия воздействия фракционированного рентгеновского излучения на липосомы в зависимости от физико-химических свойств и состава липидов лецитина № 2, с. 148-154
- Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Яглов В.В.** Изменения продукции ионообменных белков при увеличении содержания дейтерия в организме № 1, с. 96-100

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ

- Алёмов С.В.** Многолетние изменения экологического статуса акваторий региона Севастополя по биотическим индексам и структурным показателям основных видов макрозообентоса № 2, с. 196-201
- Ануфриева Е.В., Гохер М.Е., Григорьев М.Н., Шадрин Н.В.** Изменение абиотических показателей в экосистемах искусственных озёр пустынной депрессии Вади-эль-Райан (Египет) в период с 1984 по 2022 гг. № 4, с. 411-416
- Брилькова Е.В., Суханова А.А., Брильков А.В., Логинов Ю.Ю.** Оценка выживаемости и конкурентоспособности аборигенных микроорганизмов в процессах биоаугментации почв, загрязненных отходами деревообрабатывающих производств № 4, с. 417-423
- Будник М.И., Апашева Л.М., Барнашова Е.К., Ведутенко В.В., Вертикова Е.А., Грудзинский А.В., Касакина О.Т., Круговов Д.А., Овчаренко Е.Н., Пролетова Н.В., Ростовцев Р.А., Савранский В.В., Симагин А.Д., Смурова Л.А., Тараскин К.А., Ущаповский И.В.** Инновационные методы переработки отечественного льна в целлюлозу и биотехнологические приемы его предпосевной стимулирующей обработки № 3, с. 276-281
- Бурдяня Н.В.** Влияние атмосферных осадков, волнового перемешивания, окислительно-восстановительных условий на численность анаэробных бактерий в прибрежных наносах (на примере прибрежной акватории Севастополя, Чёрное море) № 2, с. 191-195
- Дорошенко Ю.В.** Бактериобентос и его роль в индикации загрязнений (на примере Стрелецкой бухты, Севастополь, Чёрное море) № 4, с. 402-406
- Куликова А.А., Габрин В.А., Саратовских Е.А., Лебедев А.Т., Голосов Е.В., Яруллин Р.Н.** Сравнение эффективности окисления нитрованных полимеров химическим способом и с помощью микроорганизмов № 1, с. 107-113
- Мутовкин П.А., Мосунов А.А., Дегтяр А.Д.** Мониторинг изменений прототипов антиообращающих покрытий в ходе экспонирования в морской среде № 3, с. 287-290
- Проскурнина Е.В., Костюк С.В., Савинова Е.А., Ершова Е.С., Каменева Л.В., Вейко Н.Н., Проскурнин М.А., Шевченко Н.Н., Сапрыкин В.П., Иванов В.К.** Влияние нанопластика на выживаемость эмбриональных фибробластов легкого человека № 1, с. 101-106
- Сигачева Т.Б., Скуратовская Е.Н., Чекмарева Т.М.** Анализ популяционных, биохимических и токсикологических показателей бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) из двух районов Азовского моря № 4, с. 396-401
- Скуратовская Е.Н., Чекмарева Т.М., Левина Н.А.** Сравнительный анализ показателей про-оксидантно-антиоксидантной системы в жабрах морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 из разных акваторий г. Севастополя № 3, с. 282-286

- Тужилкин Д.А., Бородин А.С., Бер К.И. Воздействие факторов внешней среды на эктопическую активность сердца человека № 2, с. 202-206
- Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Дробецкая И.В., Минюк Г.С. Морфобиологические характеристики зеленой каротиногенной микроводоросли *Coelastrella* sp. в условиях лабораторной накопительной культуры № 2, с. 184-190
- Шадрин Н.В., Празукин А.В., Гассиев Д.Д., Ануфриева Е.В. Перспективы использования зеленых нитчатых водорослей *Cladophora* в животноводстве № 4, с. 407-410