

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 10, № 2
2025**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 10, № 2
2025**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 10, No. 2, 2025**

Севастополь
2025

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);
Пеньков Н.В. (Пушино);
Пионтковский С.А. (Севастополь);
Ризниченко Г.Ю. (Москва);
Семенов К.Н. (Санкт-Петербург);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Холявка М.Г. (Воронеж);
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);
Penkov N.V. (Pushchino);
Piontkovski S.A. (Sevastopol);
Riznichenko G.Yu. (Moscow);
Semenov K.N. (Saint Petersburg);
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 10, №2, 2025

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Д.Н. Чернышев, А.Р. Осокин, Ю.О. Веляев, И.В. Дегтяр, А.О. Лантушенко**
Применение математического моделирования для дополнительной идентификации пигментов, разделённых методом ВЭЖХ-ФЛД.....101

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

- С.В. Филиппов**
Картографирование поверхности домена холодового шока: Часть 1. Определение единого конформационного пространства для CSD-гомологов из разных таксономических групп..... 106
- Я.В. Мегер, А.О. Лантушенко**
Сравнение перспективных молекулярных маркеров среди генов митохондриального генома для рода *Artemia*..... 111

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- И.В. Дегтяр, Ю.О. Веляев, А.Р. Осокин, А.О. Лантушенко**
Анализ состава жирных кислот у *Dunaliella salina*, синтезируемых под воздействием различных стрессовых факторов 116
- Н.А. Торхов, И.И. Ращенкова, А.О. Лантушенко**
Исследование микромеханических свойств клеток меланомы «Clone M-3» методами атомно-силовой микроскопии.....121
- Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, В.В. Яглов, С.В. Назимова, Э.С. Цомартова, М.Ю. Иванова, Е.В. Черешнева, Т.А. Ломановская, О.В. Паюшина, Д.А. Цомартова**
Динамика цитологических параметров тимуса крыс при постепенном уменьшении поступления дейтерия в организм..... 126
- О.П. Чжу, Д.Э. Аравиашвили, Н.С. Руденко, И.И. Маринич**
Оценка показателей состояния антиоксидантной системы как инструмент для понимания процессов старения 131
- П.А. Мутовкин, И.И. Ращенкова, А.Ю. Рындин, А.Д. Дегтяр, А.А. Мосунов**
Исследование механических свойств клеток HeLa методом атомно-силовой спектроскопии.....137
- И.В. Клименко, Е.А. Трусова, А.В. Лобанов**
Новые супрамолекулярные системы на основе металлокомплексов фталоцианинов и бескислородного графена для биомедицинских приложений 143

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ**А.А. Солдатов, Т.И. Андреев**Тканевая специфика белкового обмена у двусторчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 148**Н.В. Шадрин, М.Н. Григорьев, А.Д. Мушин, Е.П. Шапова, В.К. Помазкин,
Ю.А. Широкова, Е.В. Ануфриева**

Подледная динамика кислорода и температуры в малом лесном озере (Прибайкальский национальный парк): роль абиотических и биотических факторов 154

CONTENTS

Volume 10, No. 2, 2025

GENERAL BIOPHYSICS

- D.N. Chernyshev, A.R. Osokin, Yu.O. Velyaev, I.V. Degtyar, A.O. Lantushenko**
The use of mathematical modeling for additional identification of pigments separated by the HPLC-FLD method 101

MOLECULAR BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

- S.V. Filippov**
Cold shock domain surface mapping: Part 1. Definition of a single conformational space for CSD homologs from different taxonomic groups 106
- Ya.V. Meger, A.O. Lantushenko**
Comparison of promising molecular markers among the genes of the mitochondrial genome for the genus *Artemia* 111

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- I.V. Degtyar, A.O. Lantushenko, Y.O. Velyaev, A.R. Osokin**
Analysis of fatty acid composition in *Dunaliella salina* under different stress factors 116
- N.A. Torkhov, I.I. Rashchenkova, A.O. Lantushenko**
Investigation of micromechanical properties of "Clone M-3" melanoma cells by atomic force microscopy 121
- N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, E.S. Tsomartova, M.Yu. Ivanova, E.V. Cheresheva, T.A. Lomanovskaya, O.V. Payushina, D.A. Tsomartova**
Dynamics of cytological parameters of the rat thymus with a gradual decrease in deuterium intake..... 126
- O.P. Chzhu, D.E. Araviashvili, N.S. Rudenko, I.I. Marinich**
Assessment of antioxidant system parameters as a tool for understanding aging processes 131
- P.A. Mutovkin, I.I. Raschenkova, A.Yu. Ryndin, A.D. Degtyar, A.A. Mosunov**
Study of mechanical properties of HeLa cells by atomic force spectroscopy 137
- I.V. Klimenko, E.A. Trusova, A.V. Lobanov**
New supramolecular systems based on metal complexes of phthalocyanines and oxygen-free graphene for biomedical applications..... 143

BIOPHYSICAL ECOLOGY**A.A. Soldatov, T.I. Andreenko**Tissue specificity of protein metabolism in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*

Lamarck, 1819 148

N.V. Shadrin, M.N. Grigorev, A.D. Mutin, E.P. Shchapova, V.K. Pomazkin,**Yu.A. Shirokova, E.V. Anufriieva**

Under-ice dynamics of oxygen and temperature in a small forest lake (Pribaikalsky national

park): the role of abiotic and biotic factors 154

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПИГМЕНТОВ, РАЗДЕЛЁННЫХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-ФЛД

Чернышев Д.Н., Осокин А.Р., Веляев Ю.О., Дегтяр И.В., Лантушенко А.О.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 02.08.2025

Аннотация. В данной работе продемонстрировано практическое применение разработанных математических моделей спектров поглощения отдельных каротиноидов для их сопоставления с экспериментальными спектрами, полученными из образцов культуры микроводоросли *Dunaliella salina*. В рамках исследования была показана принципиальная возможность точного и надежного сопоставления ультрафиолетовых (УФ-) спектров каротиноидов, полученных в результате хроматографического разделения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), с моделями спектров, построенными на основе известных спектральных характеристик этих пигментов. При этом в исследовании использовались пигменты, выделенные как из образцов реальных микроводоросли *Dunaliella salina*, так и из стандартных аналитических образцов. Такой подход значительно повышает эффективность и точность определения состава пигментов без необходимости использования дорогостоящих аналитических стандартов при проведении методов слепого детектирования. В обычных условиях такие методы требуют наличия стандартных образцов для сравнения спектров, что зачастую усложняет анализ. Использование математических моделей спектров поглощения в сочетании с экспериментальными данными открывает новые возможности для автоматизации и ускорения процесса идентификации каротиноидов в биологических образцах. В целом, продемонстрированные подходы позволяют значительно расширить арсенал методов анализа пигментов водорослей и повысить их надежность без существенных затрат на стандартизацию и подготовку аналитической базы.

Ключевые слова: микроводоросли, каротиноиды, стресс, ВЭЖХ, УФ-идентификация.

Определение и идентификация каротиноидов в сложных биологических матрицах, например, микроводорослях или различных экстрактах из них, являются актуальной задачей. Особенно это является важным при разработке различных биотехнологий, связанных с накоплением каротиноидов путём различного воздействия на продуценты этих веществ, к которым относятся, например, *Dunaliella salina*. Зачастую более доступным и наиболее быстрым (в зависимости от режима) методом их обнаружения, будет их хроматографическое разделение в нативном виде на жидкостном хроматографе с последующим флуоресцентным детектированием. При этом и для качественного, и для количественного определения каротиноидов требуются их аналитические стандарты, для которых по времени удерживания и УФ-спектру можно провести их идентификацию. Однако при отсутствии стандартов, которые сами по себе являются весьма дорогостоящими элементами методики анализа, количественно определение становится невозможным, а качественное возможно только лишь при их идентификации по имеющимся в открытых литературных источниках базах данных. Но и этого иногда бывает достаточно в зависимости от аналитической цели исследования. Но особенность некоторых каротиноидов заключается в том, что их молекулы крайне похожи друг на друга, как, например, лютеин и зеаксантин, которые по сути являются оптическими изомерами друг друга, и, как следствие, обладают очень похожими УФ-спектрами.

Соответственно, для более точной и быстрой идентификации выделенных каротиноидов по доступным УФ-спектрам лучшим решением является применение методом математического моделирования. Так спектр поглощения пигментов можно представить, как сумму кривых нормального распределения с фиксированными величинами (полуширина отдельной кривой, соотношения амплитуд, позиция максимума). Метод математического моделирования спектров поглощения пигментов детально описан в статье [1].

Авторы приводят математические модели спектров поглощения фотосинтетических пигментов в чистом виде, в растворе ацетона. Используя модели пигментов, можно проводить разделение спектров поглощения смеси на спектры отдельных пигментов. А также работать с чистыми пигментами, для установления качественного и количественного состава. Спектры растворов пигментов состоят из нескольких максимумов, каждый из которых определяется наличием хромофорных групп. Такие отдельные пики имеют симметричную форму распределения, относительно максимума. Это позволяет описать зависимость поглощения пигментов от длины волны в виде суммы гауссиан, при этом каждый отдельный пик был описан выражением:

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

где: $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед; $D_{\max}$ – амплитуда пика, отн. ед; λ_i – длина волны, нм; $\lambda_{\max}$ – положение максимума пика, нм; σ – полуширина пика, нм.

В нашей работе приводится пример по идентификации неизвестного каротиноида, который не удалось идентифицировать в смеси экстрагированных из микроводоросли (*D. salina*, штамм IBSS-1) каротиноидов с помощью имеющихся УФ-спектров в специализированной литературе [2], ввиду чего пришлось пользоваться методами математического моделирования.

Микроводоросль (*D. salina*, штамм IBSS-1, предоставлена ФИЦ ИНБИОМ) культивировалась в климатической камере для роста растений ВРС МИР 500 с регулируемой температурой при температуре 20 ± 2 °C с освещением, обеспечиваемым в течение 12 часов светового цикла, 12 часов темнового цикла (12/12 LD) с помощью белых светодиодных ламп (LED) с интенсивностью света ~ 90 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Рост клеток контролировался путем спектрофотометрического измерения оптической плотности культуры на волны 750 нм. Экстракцию каротиноидов проводили путём центрифугирования 15 мл раствора биомассы водоросли на 10000 об/мин в течении 5 мин на лабораторной центрифуге-встряхивателе ELMi CM-50M. Полученный осадок отделяли от жидкой фазы и взвешивали. Затем равным по объёму с полученным осадком экстрагентом, приготовленным в соотношении метанол: метилтретбутиловый эфир (далее – МТБЭ) - 3:7 (согласно [3]), проводили экстракцию с помощью лабораторного шейкера ПЭ-6300 в течении 5 минут. Далее полученную взвесь пропускали через мембранный шприцевый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Анализ на каротиноиды проводился с помощью сверхбыстрого tandemного жидкостного хроматомасс-спектрометра Shimadzu LCMS-8060 оснащённого детектором со встроенной фотодиодной матрицей SPD-M30A, а также спектрофлуориметрический детектором RF-20Axs.

Каротиноиды идентифицировали на следующей длине волны: лютеин и α -каротин – 446 нм, β -каротин – 452 нм, 9-цис- β -каротин – 448 нм, неизвестный каротиноид – 442 нм. Идентификацию каротиноидов проводили по их УФ-спектрам, согласно литературным данным [2], однако неизвестный каротиноид пришлось идентифицировать с помощью методов математического моделирования, описанных ранее. Также для проверки работоспособности модели сравнивались полученные в экстракте *D. salina* УФ-спектры зеаксантина со спектром стандартного аналитического образца данного вещества и его математической модели.

Для того, чтобы убедиться, что выбранная математическая модель работает, сначала с её помощью были обработаны известные каротиноиды, которые были идентифицированы, как с помощью литературных данных, например, α -каротин, так и с помощью аналитического стандарта, например, УФ-спектр зеаксантина. Данные, полученные для α -каротина, представлены на рисунке 1 и в таблице 1. Поскольку в литературе отсутствует готовая модель данного пигмента, она была составлена нами на основании оцифрованного спектра поглощения чистого пигмента и приведенного к 1 оптической плотности в точке максимума [4] в программе MagicPlotStudent.

Затем полученной моделью аппроксимировали спектр поглощения стандартного образца α -каротина, растворенный в МТБЭ. Приближение проводилось в программе MATLAB (Curve Fitting). Результаты приведены на рисунке 2.

Оказалось, что коэффициент детерминации (R^2) составил 0,9993, а сдвиг максимумов всего 0,49 нм, при этом коэффициент уширения полос – 1,01. Что говорит о соответствии полученного спектра стандартного образца и математической модели α -каротина. Примечательно, что форма спектров и сдвиг максимума

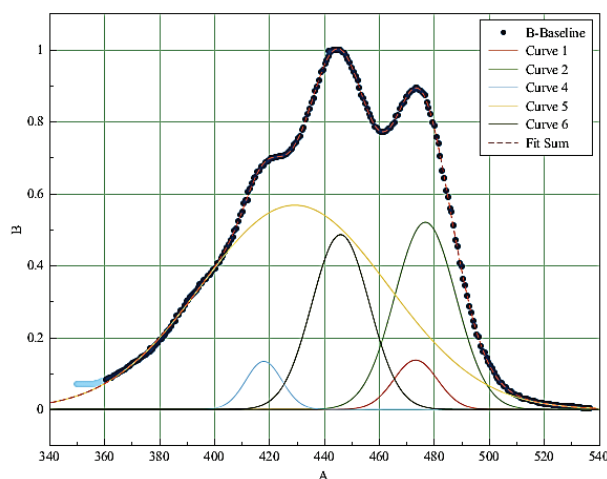


Рисунок 1. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта α -каротина [4] на отдельные кривые Гаусса

Таблица 1. Параметры модели спектра поглощения ацетонового экстракта α -каротина [4]

Номер пика	1	2	3	4	5
D_{max} – амплитуда.	0,1334	0,5671	0,4853	0,1369	0,5198
σ – полуширина, нм.	418,08	429,33	446,04	473,34	476,88
λ_{max} – положение максимума, нм.	6,57	34,02	10,48	7,94	11,12

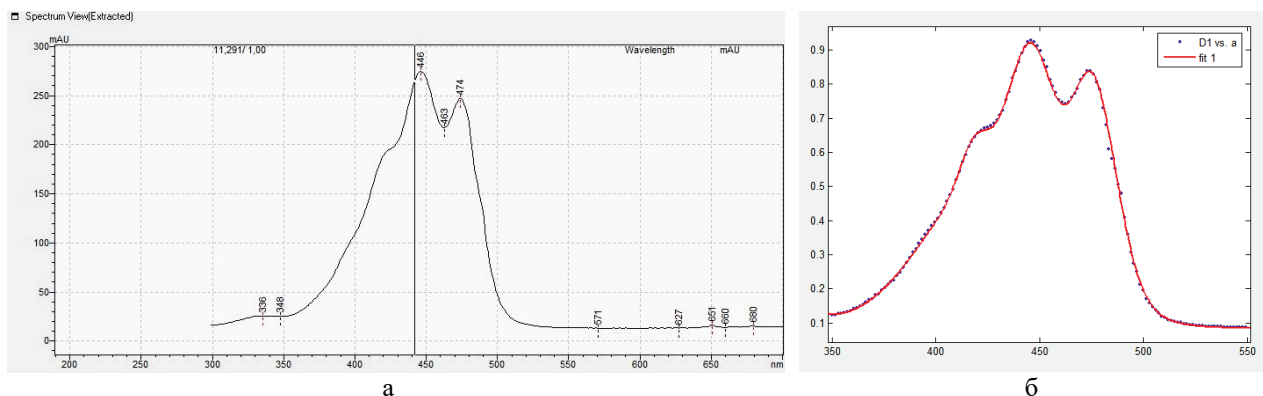


Рисунок 2. Спектр стандартного спектра α -каротина: а – полученный в ходе анализа, б – обработанный мат. моделью. Аппроксимация спектра поглощения стандартного образца α -каротина, растворенного в МТБЭ, математической моделью спектра α -каротина в ацетоне

Таблица 2. Результаты аппроксимации стандартного зеаксантина различными моделями

№	Название каротиноида	R^2	Сдвиг максимума, нм	Коэффициент уширения полос
1	transZeaxanthin	0,9998	-3,09	1,03
2	cis9Zeaxanthin,	0,9996	2,75	1,05
3	cis13Zeaxanthin	0,9981	3,51	0,97

практически не изменился в зависимости от растворителя, у модели это ацетон, а стандартный образец растворен в МТБЭ. Установлено, что качественная характеристика пигмента – это максимально близкий к единице коэффициент детерминации (R^2), малый сдвиг максимума пигментов (± 5 нм) [1] и коэффициент уширения полос близкий к 1. Так же форма спектра поглощения одинакова и в ацетоне, и в МТБЭ.

В результате аппроксимирования спектра аналитического стандарта зеаксантина рядом математических моделей каротиноидов ((transZeaxanthin, cis9Zeaxanthin, и cis13Zeaxanthin)) [1] (таблица 2) показано, что данная кривая лучше всего описывается моделью transZeaxanthin (транс-зеаксатин) [1] ($R^2=0.9998$, сдвиг – 3 нм, уширение полос 1,02).

Отмечается, что форма спектра и сдвиг максимума практически не меняются в зависимости от растворителя у моделей (ацетон), и предоставленных спектров, полученных в смеси метанола и МТБЭ. Результаты приближения и спектр приведены на рисунке 3.

Пигмент, полученный путем хроматографического разделения экстракта биомассы микроводоросли (*D. salina*, штамм IBSS-1) и идентифицированный как зеаксантин, так же бы описан рядом математический моделей каротиноидов (transZeaxanthin, cis9Zeaxanthin, и cis13Zeaxanthin) приведенных в статье [1]. Результаты приближения приведены в таблице 3.

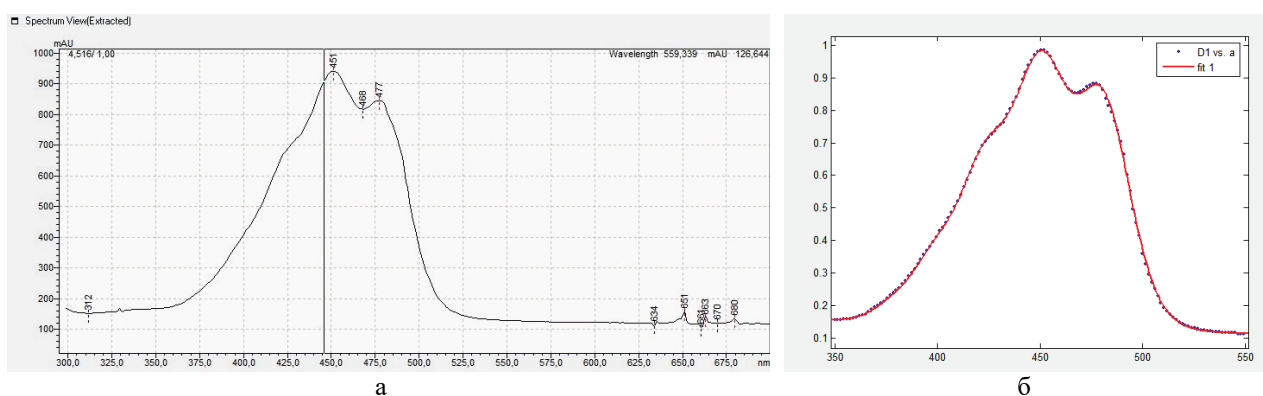


Рисунок 3. Спектр стандартного зеаксантина, растворенного в МТБЭ (а) и его приближение (б) моделью transZeaxanthin (ацетон) [1]

Таблица 3. Результаты аппроксимации зеаксантина из микроводоросли *D. salina* различными моделями

№	Название каротиноида	R^2	Сдвиг максимума, нм	Коэффициент уширения полос
1	transZeaxanthin	0,9992	-7,61	1,00
2	cis9Zeaxanthin,	0,9993	-1,83	1,02
3	cis13Zeaxanthin	0,9975	-1,09	0,94

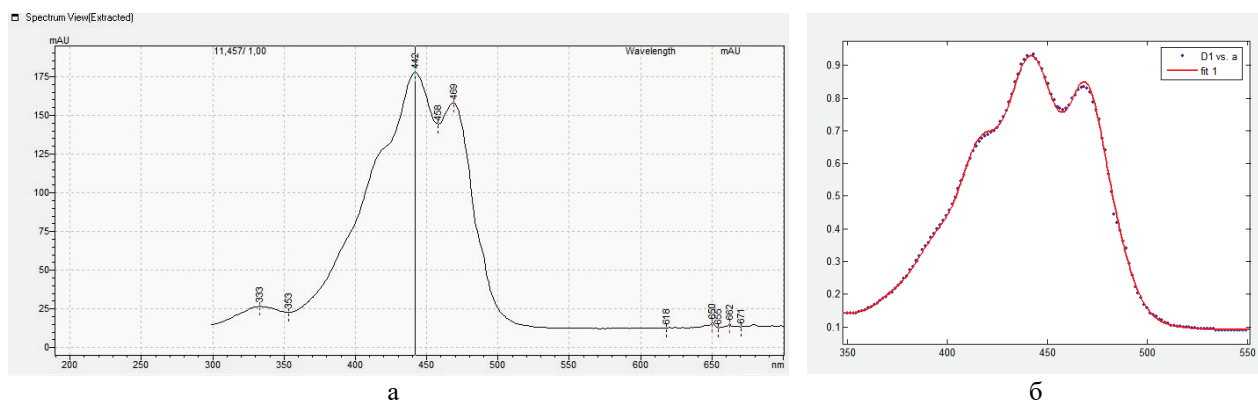


Рисунок 4. Спектр неустановленного пигмента из *D. salina* и его аппроксимация моделью Anthraxanthin

Таблица 4. Результаты аппроксимации неустановленного каротиноида различными моделями

№	Название каротиноида	R ²	Сдвиг максимума, нм	Коэффициент уширения полос
1	Antheraxanthin	0,9994	-1,03	1,05
2	transLutein	0,9991	-6,21	1,08
3	Betacryptoxanthin	0,9982	-13,56	0,977
4	transZeaxanthin	0,9984	-13,36	0,98
5	cis9Zeaxanthin,	0,9992	-7,60	0,9957
6	cis13Zeaxanthin	0,9981	-6,88	0,9247

Лучше всего данный пигмент описывается моделью cis9Zeaxanthin: самый близкий из всех вариантов к единице R²=0,9993, сдвиг максимума минимальный -1,8 нм, уширение полос 1,01.

Аппроксимация неустановленного пигмента проведена имеющимися в базе моделями каротиноидов с похожими спектрами, а именно (Antheraxanthin, transLutein, Betacryptoxanthin, transZeaxanthin, cis9Zeaxanthin, cis13Zeaxanthin). Результаты приближения показаны в таблице 4. Выявлено, что лучше всего спектр описывается уравнением для Antheraxanthin (антероксантин)

Наиболее близкий к 1 R² и самый малый из всех сдвиг максимумов (R-square: 0,9994, сдвиг максимума -1,03 нм, уширение полос 1,05). На рисунке 4 приведено приближение спектр неустановленного пигмента и его приближение антероксантином.

Таким образом, в работе показано, что методы математического моделирования могут применяться в хроматографическом и других видах анализа при обработке УФ-спектров каротиноидов для дополнительной верификации или первичной идентификации веществ, при отсутствии аналитических стандартов, при этом конечный результат обладает достаточно высокой сходимостью со спектрами модельных веществ. Так, например, в ходе наших исследований в процессе исследования сложной биоматрицы, полученной экстракцией каротиноидов из биомассы микроводоросли (*D. salina*, штамм IBSS-1), и её хроматографического разделения был идентифицирован неизвестный каротиноид, который с помощью описанного математического моделирования был определен как антераксантин.

Работа выполнена в рамках государственного задания Севастопольского государственного университета «Фотобиофизический мониторинг окружающей среды на основе спектрально-флуоресцентных свойств, структурно-организованных молекулярных (включая наночастицы) и супрамолекулярных биологически важных систем (FEFM-2023-0005).

Список литературы / References:

1. Kupper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analytical chemistry*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
2. Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. *Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus, 2004, 63 p.
3. Xu Y., Ibrahim I.M., Wosu C.I., Ben-Amotz A., Harvey P.J. Potential of New Isolates of *Dunaliella Salina* for Natural β -Carotene Production. *Biology*, 2018, vol. 7, no. 14, DOI: 10.3390/biology7010014.
4. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography*. Paris: UNESCO, 1997.

**THE USE OF MATHEMATICAL MODELING FOR ADDITIONAL IDENTIFICATION OF PIGMENTS
SEPARATED BY THE HPLC-FLD METHOD****Chernyshev D.N., Osokin A.R., Velyaev Yu.O., Degtyar I.V., Lantushenko A.O.**

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: chernishev@gmail.com

Received 02.08.2025

Abstract. The paper shows the practical application of the developed mathematical models of absorption spectra of individual carotenoids for their comparison with experimental spectra obtained from samples of the *Dunaliella salina* microalgae culture. The study demonstrated the fundamental possibility of accurate and reliable comparison of ultraviolet (UV) spectra of carotenoids obtained as a result of chromatographic separation using high-performance liquid chromatography (HPLC) with spectral models constructed on the basis of known spectral characteristics of these pigments. The study used pigments isolated both from samples of real *Dunaliella salina* microalgae and from standard analytical samples. This approach significantly increases the efficiency and accuracy of determining the composition of pigments without the need for expensive analytical standards when carrying out blind detection methods. Under normal conditions, such methods require standard samples for spectral comparison, which often complicates the analysis. The use of mathematical models of absorption spectra in combination with experimental data opens up new possibilities for automating and accelerating the process of identifying carotenoids in biological samples. In general, the demonstrated approaches make it possible to significantly expand the arsenal of methods for analyzing algal pigments and increase their reliability without significant costs for standardization and preparation of the analytical base.

Key words: *microalgae, carotenoids, stress, HPLC, UV-identification.*

КАРТОГРАФИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ДОМЕНА ХОЛОДОВОГО ШОКА: ЧАСТЬ 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕДИНОГО КОНФОРМАЦИОННОГО ПРОСТРАНСТВА ДЛЯ CSD-ГОМОЛОГОВ ИЗ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

Филиппов С.В.

ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН
ул. проф. Виткевича, д.1, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: fsv141@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2025

Аннотация. В рамках решения задач по исследованию взаимосвязей между структурой и функциями CSD-белков при помощи визуально-дифференциального анализа, пригодного для анализа молекулярных структур с высокой степенью гомологии, было решено проанализировать особенности топологии поверхностей 23-х CSD/CSP-белков прокариот и эукариот, трёхмерная структура которых известна. Поскольку данная работа основана на построении гипсометрических карт поверхностей отобранных макромолекул, то первейшим условием для её выполнения является приведение всех отобранных структур к единому конформационному пространству на получаемых гипсометрических картах, что, в свою очередь, достигается при помощи единообразной ориентации проекционной поверхности по трём «опорным атомам», локализованным в наиболее консервативных из всех гомологичных участков белковых молекул. Исходные аминокислотные последовательности выравнивались по методу T-Coffee, после чего выполнялся поиск подходящих гомологичных участков при помощи специально написанной для этого Python-программы. Из всех возможных вариантов, на построенных 3D-моделях белков, визуально, по критерию максимально возможной равноудалённости «опорных атомов» были определены три гомологичных участка (LYS-TRP-PHE-ASN, ASP-VAL-PHE-VAL-HIS, PHE), в каждом из которых «опорными атомами» стали β-углероды фенилаланина. Их центры будут использованы в качестве «реперных точек» для генерации единообразно сориентированных проекционных поверхностей, которые, в свою очередь и обеспечат единство конформационного пространства на получаемых гипсометрических картах поверхностей всех 23-х молекулярных структур CSP/CSD-белков.

Ключевые слова: Домен холодного шока, CSD, CSP, YB-1, визуально-дифференциальный анализ, конформационное пространство, топология поверхности макромолекул.

Домен холодного шока (Cold Shock Domain – CSD) являет собой одну из самых удивительных белковых молекул, обнаруживаемых у представителей самых разных таксономических групп [1]. У прокариот белки холодного шока практически всегда состоят только из CSD (точнее, CSP – Cold Shock Protein), а у эукариот имеют в своем составе ещё и дополнительные неупорядоченные домены, повышающие их полифункциональность [2]).

Пространственная организация CSP/CSD практически идентична таковой у прокариот и у эукариот, и представляет собой β-баррель, образованный пятью антипараллельными β-тяжами. При этом, отличия CSD-доменов эукариот от прокариотических CSP заключаются лишь в большей длине полипептидной цепи и различиях в аминокислотном составе участка, соединяющего β3 и β4 тяжи [3].

Практически все известные на данный момент функции прокариотических CSP определяются их взаимодействием с (одноцепочечными) нуклеиновыми кислотами [1]. Для эукариот это утверждение пусть и не столь строго, но в основном тоже справедливо [4]. Взаимодействие CSP/CSD с нуклеиновыми кислотами (например, связывание и плавление) происходит за счет стэкинг-взаимодействий и обусловлено ароматическими радикалами аминокислотных остатков, входящих в состав РНК-связывающих мотивов RNP1 и RNP2, расположенных на тяжах β2 и β3 [5].

По сути, в лице CSP/CSD-белков мы имеем дело с унифицированной «деталью», используемой всеми клеточными организмами, которая вовлечена практически во все ДНК- и мРНК-зависимые процессы в клетке. Соответственно, из данного обстоятельства произрастает и особая важность исследования структуры и свойств вышеназванных белков. В особенности это касается YB-1 человека, поскольку в его организме данный белок участвует в онкотрансформации клеток, метастазировании опухолей, в воспалительных процессах и процессах, связанных с вирусной инфекцией [4].

В рамках решения задач по исследованию взаимосвязей между структурой и функциями CSD-белков, нами было принято решение проанализировать особенности топологии их поверхностей с целью выявить те закономерности пространственной организацией этого класса макромолекул, которые в настоящий момент не раскрыты.

Объектом исследования выступил ряд из 23-х, принадлежащих разным таксономическим группам (от прокариот до эукариот), CSD/CSP-белков, перечисленных в таблице 1, трёхмерная структура которых была получена при помощи ЯМР и рентгеноструктурного анализа [6].

Таблица 1. Список доменов/белков холодового шока с известной 3D-структурой [6], выбранных для построения гипсометрических карт их поверхностей

1	2hax <i>Bacillus caldolyticus</i> CSP / <i>Bacillus subtilis</i> CSP B in complex with hexathymidine	13	3ts2 Lin28A Mouse with let-7g microRNA pre-element
2	2115 CspA <i>E-Coli</i> (NMR and CS-Rosetta)	14	3ulj Lin28B <i>Xenopus</i> CSD apo
3	1mjc CSPA <i>E-Coli</i> MAJOR CSP	15	4a76 Lin28b <i>Xenopus</i> CSD with heptathymidine
4	2i5m CspB <i>B.subtilis</i> CSP var.A46K S48R	16	4a75 Lin28b <i>Xenopus tropicalis</i> - SYNTH CSD with hexathymidine
5	2i5l CspB <i>B.subtilis</i> CSP var.M1R.E3K.K65I	17	4alp Lin28b <i>Xenopus tropicalis</i> - SYNTH CSD with hexauridine
6	2f52 CSPB <i>B.subtilis</i> with heptathymidine	18	6a6j YB-1 <i>Danio rerio</i> fish CSD with 6mer m5C RNA
7	2es2 CspB <i>B.subtilis</i> with Hexathymidine	19	1h95 YB1 Human CSD DNA-binding (10 lowest energy structures)
8	3pf4 CSPB <i>B.subtilis</i> with r(GUCUUUA)	20	5ytx YB1 Human - SYNTH CSD with UCAACU
9	3pf5 CSPB <i>B.subtilis</i> with rU6	21	5ytv YB1 Human - SYNTH CSD with UCAUCU
10	5udz LIN28A Human with let-7f-1 microRNA pre-element	22	5ytt YB1 Human - SYNTH CSD with UCAUGU
11	3trz Lin28A Mouse with let-7d microRNA pre-element	23	5yts YB1 Human - SYNTH CSD with UCUUCU
12	3ts0 Lin28A Mouse with let-7f-1 microRNA pre-element		

В перечень отобранных нами CSP/CSD-структур в особом порядке был также включён ряд белков **5yt?** (№ 20-23 в табл. 1), для которых получены кристаллические структуры их комплексов с РНК и, соответственно, имеются экспериментальные данные об аминокислотных остатках, взаимодействующих с такими нуклеиновыми кислотами [7].

В качестве метода исследования был выбран визуально-дифференциальный анализ [8], пригодный для анализа молекулярных структур с высокой степенью гомологии [9]. В основе этого метода лежит построение гипсометрических карт поверхностей (био-)макромолекул, поэтому самым первым и ключевым этапом для его реализации является приведение всех отобранных структур к единому конформационному пространству.

Применительно к столь разным по происхождению молекулам, данные о строении которых были получены разными методами и разными научными коллективами, абсолютной необходимостью стал поиск «геометрического центра», абсолютно идентичного у всех исследуемых молекул. А точнее – трёх «опорных точек», необходимых для однозначной ориентации в пространстве проекционной поверхности, расположенных исключительно внутри гомологичных участков этих белковых молекул. То есть таких, которые имелись бы у всего ряда выбранных нами CSP/CSD-белков и которые смогли бы однозначно и, самое главное, единообразно сориентировать проекционную поверхность [10].

Поиск гомологичных участков выполнялся в два этапа. На первом, в online версии T-COFFEE [11,12], проводилось выравнивание исходных белковых последовательностей (рис. 1), а далее, для автоматического поиска подходящих гомологичных участков, был написан Python-скрипт. Из всех найденных им потенциально подходящих гомологичных участков, на втором этапе три необходимых участка, отбирались уже визуально – на нескольких 3D-моделях, построенных программой PDBImp for VDA [13], по критерию максимально возможной равноудалённости «опорных точек» (рис. 2, 3). Данный критерий отбора призван «сгладить» различия в ориентации проекционных поверхностей для каждой из 23-х отобранных структур, обусловленных различиями в геометрии пусть и гомологичных, но при этом очень разных макромолекул.

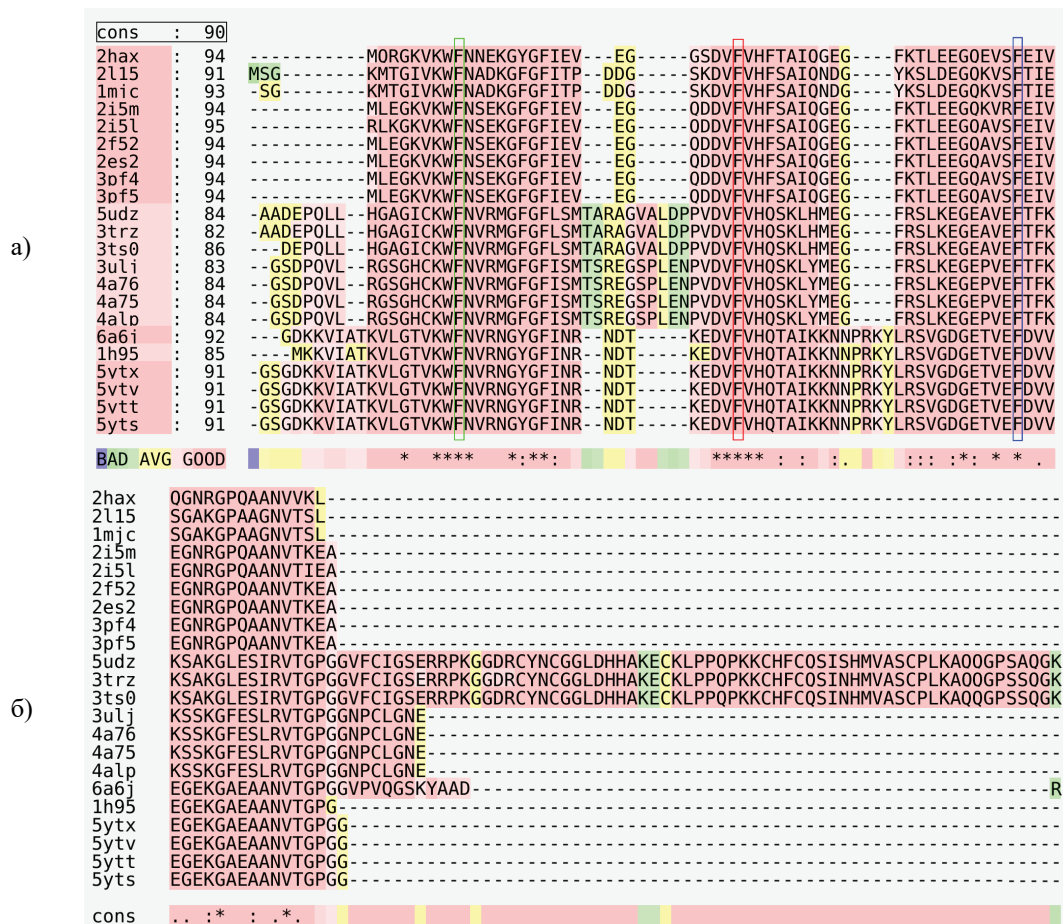


Рисунок 1. Аминокислотные последовательности 23-х отобранных белков (доменов) холодового шока, совмещённые в ходе выравнивания. (а) – Часть первичной структуры, в которой сосредоточено наибольшее количество консервативных участков, содержащих найденные нами «опорные» β -атомы углерода фенилаланина (символы «F», обведённые цветными прямоугольниками). (б) – Оставшаяся часть первичной структуры отобранных CSP/CSD с наименьшим количеством гомологичных последовательностей

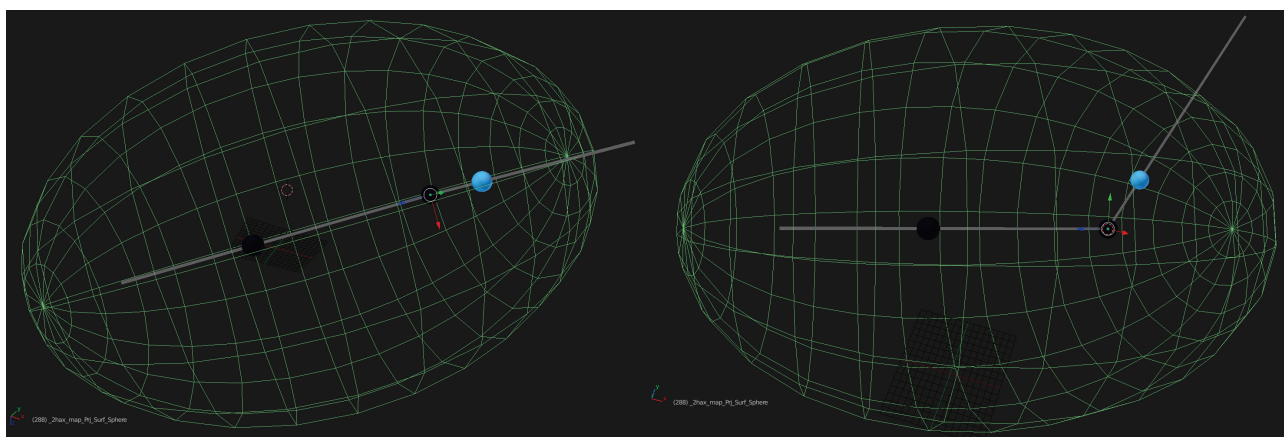


Рисунок 2. Проекционная поверхность эллиптической формы, ориентированная в пространстве относительно трёх «опорных атомов» (три маленькие сферы внутри каркаса «проекционного эллипса») – β -атомов углерода фенилаланина CSP *Bacillus subtilis* (2hax); серыми линиями обозначены оси: «горизонтальная» – ось проекционного эллипса, совмещённая с линией проведённой между «опорными» атомами C β 329 (Phe 9) и C β 666 (Phe 49); «вертикальная» – ось поворота проекционной поверхности (эллипса) вокруг своей («горизонтальной») оси, проведённая между атомами C β 329 (Phe 9) и C β 472 (Phe 27)

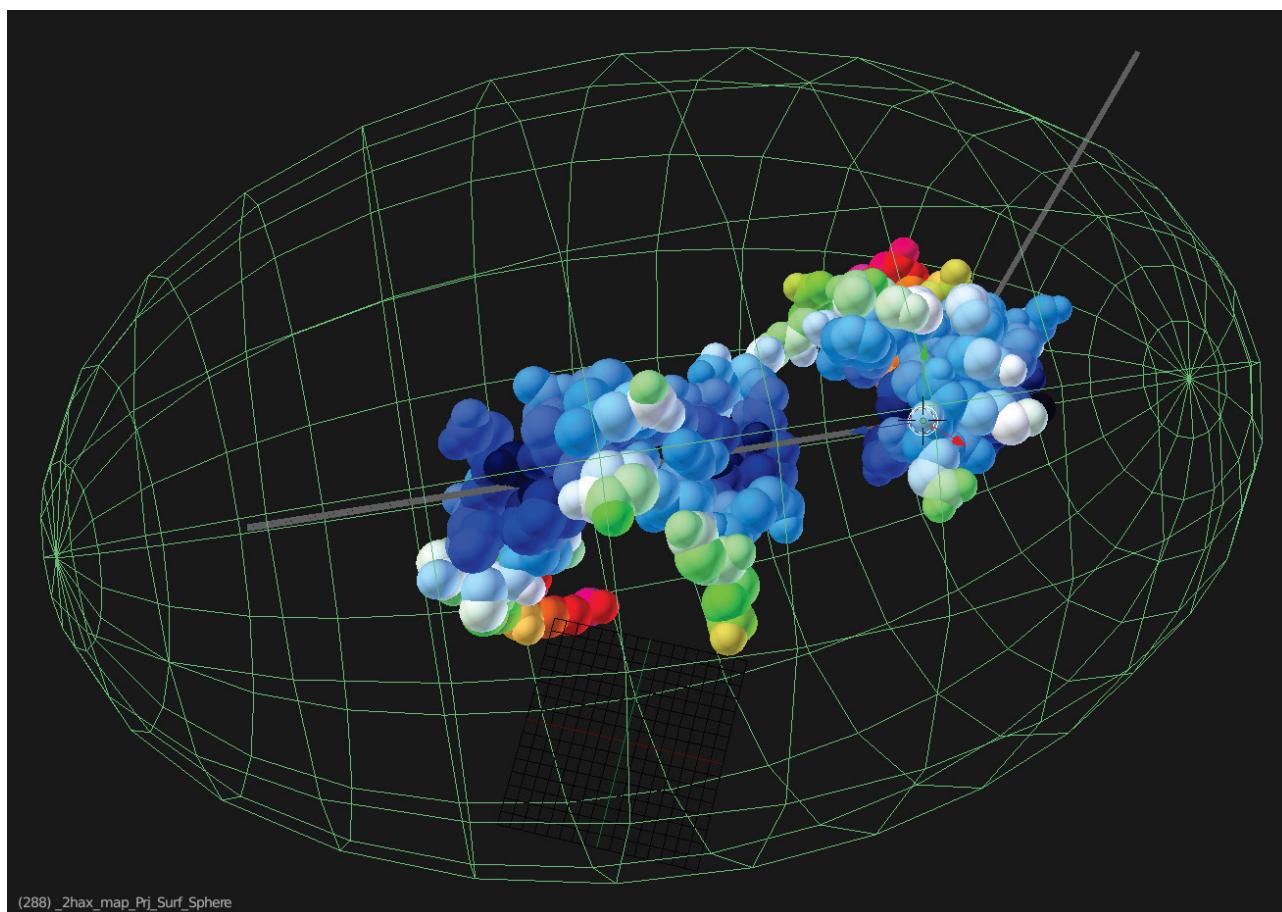


Рисунок 3. Молекулярная модель CSP *Bacillus subtilis* (2hax) в «гипсометрической окраске», окружённая проекционной поверхностью (эллипсом), сориентированной в пространстве относительно трёх «опорных» β -атомов углерода фенилаланина: C β 329 (Phe 9), C β 666 (Phe 49) и C β 472 (Phe 27); ось серого цвета, проведённая между «опорными» атомами C β 329 (Phe 9) и C β 666 (Phe 49), обозначает не только ось «проекционного эллипса», но и прямую, кратчайшее расстояние до которой, рассчитываемое для каждого атома CSP (2hax), выражается цветом, что и формирует «гипсометрическую окраску» молекулярной модели

Итогом данной работы стал список номеров опорных β -атомов углерода фенилаланина, входящего в состав трёх высококонсервативных гомологичных последовательностей (LYS-TRP-PHE-ASN, ASP-VAL-PHE-VAL-HIS, PHE). Номера атомов из этого списка будут использованы в качестве основного параметра программы Proj-Mol-Geom-Builder [14], генерирующей сориентированные проекционные поверхности (рис. 2, 3) для каждой из 23-х структур, что, в свою очередь, обеспечит единое конформационное пространство для всех исследуемых молекулярных моделей отобранных нами CSP/CSD-белков на гипсометрических картах их поверхности.

Список литературы / References:

1. Будкина К.С., Злобин Н.Е., Кононова С.В., Овчинников Л.П., Бабаков А.В. Белки с доменом холодового шока: структура и взаимодействие с нуклеиновыми кислотами. *Успехи биологической химии*, 2020, т. 60, с. 3-42 [Budkina K.S., Zlobin N.E., Kononova S.V., Ovchinnikov L.P., Babakov A.V. Cold shock domain proteins: structure and interaction with nucleic acids. *Advances in Biological Chemistry*, 2020, vol. 60, pp. 3-42 (In Russ.)].
2. Varadi M., Zsolyomi F., Guharoy M., Tompa P., Levy Y.K. Functional advantages of conserved intrinsic disorder in RNA-binding proteins. *PLoS One*, 2015, vol. 10, e0139731.
3. Skabkin M.A., Kiselyova O.I., Chernov K.G., Sorokin A.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V., Vasiliev V.D., Ovchinnikov L.P. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. 5621-5635.
4. Елисеева И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П., Лябин Д.Н. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Успехи биологической химии*, 2011, т. 51, с. 65-132 [Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. Y-box-binding protein 1 (YB 1) and its functions. *Advances in Biological Chemistry*, 2011, vol. 51, pp. 65-132 (In Russ.)].
5. Horn G., Hofweber R., Kremer W., Kalbitzer H.R. Structure and function of bacterial cold shock proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007, vol. 64, pp. 1457-1470.
6. Berman H., Henrick K., Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2003, vol. 10, p. 980, doi: 10.1038/nsb1203-980.

7. Xiao-Juan Yang et al. Crystal structure of a Y-box binding protein 1 (YB-1)-RNA complex reveals key features and residues interacting with RNA. *J. Biol. Chem.*, 2019, vol. 294, no. 28, pp. 10998-11010, doi: 10.1074/jbc.RA119.007545.
8. 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.)].
9. Филиппов С.В. Визуально-дифференциальный анализ (био-)макромолекул: методы исследования молекулярных структур с высокой степенью гомологии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2024, т. 9, № 4, с. 311-319 [Filippov S.V. Visual differential analysis of (bio-)macromolecules: methods for studying molecular structures with a high degree of homology. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2024, vol. 9, no. 4, pp. 311-319 (In Russ.)].
10. 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 hypsometric maps. *Preprints of the Keldysh Institute of Problems of Materials Science*, 2019, no. 61, 14 p., doi: 10.20948/prepr-2019-61 (In Russ.)].
11. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.*, 2000, vol. 302, no. 1, pp. 205-217, doi: 10.1006/jmbi.2000.4042.
12. *T-Coffee is a multiple sequence alignment package.* (дата обращения: 17.07.2025) [Электронный ресурс].
13. *PDBImp for VDA*: Гос.регистрация программы для ЭВМ, регистрационный № 2024610662 от 12.01.2024 [PDBImp for VDA: State registration of a computer program, registration no. 2024610662 dated 12.01.2024 (In Russ.)].
14. *Proj-Mol-Geom-Builder*: Гос.регистрация программы для ЭВМ, регистрационный № 2025610866 от 15.01.2025 [Proj-Mol-Geom-Builder: State registration of a computer program, registration no. 2025610866 dated 01.15.2025 (In Russ.)].

**COLD SHOCK DOMAIN SURFACE MAPPING: PART 1. DEFINITION OF A SINGLE
CONFORMATIONAL SPACE FOR CSD HOMOLOGS FROM DIFFERENT TAXONOMIC GROUPS**
Filippov S.V.

IMPB RAS – Branch of KIAM RAS

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

Received 01.08.2025

Abstract. In the context of solving the problems of studying the relationships between the structure and functions of CSD proteins using visual differential analysis suitable for analyzing molecular structures with a high degree of homology, it was decided to analyze the surface topology features of 23 selected CSD/CSP proteins of prokaryotes and eukaryotes, the three-dimensional structure of which is known. Since this work is based on the construction of hypsometric maps of the surfaces of the selected macromolecules, the primary condition for its implementation is to bring all the selected structures to a single conformational space on the resulting hypsometric maps, which, in turn, is achieved using a uniform orientation of the projection surface by three "reference atoms" localized in the most conservative of all homologous regions of protein molecules. The original protein sequences were aligned using the T-Coffee method, after which a search for suitable homologous sequences was performed using a Python program specially written for this purpose. Of all possible variants, on the constructed 3D protein models, three homologous regions (LYS-TRP-PHE-ASN, ASP-VAL-PHE-VAL-HIS, PHE) were visually identified according to the criterion of the maximum possible equidistance of the "reference atoms", in each of which the β -carbons of phenylalanine became the "reference atoms". Their centers will be used as "reference points" for generating uniformly oriented projection surfaces, which, in turn, will ensure the unity of the conformational space on the resulting hypsometric maps of the surface of all 23 molecular structures of CSP/CSD proteins.

Key words: Cold shock domain, CSD, CSP, YB-1, visual differential analysis, conformational space, surface topology of macromolecules.

СРАВНЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ СРЕДИ ГЕНОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ДЛЯ РОДА *ARTEMIA*

Мегер Я.В., Лантушенко А.О.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 01.08.2025

Аннотация. Задача анализа распространения партеногенетических и двуполых популяций, а также динамика биоразнообразия жаброногих ракообразных рода *Artemia* крайне популярна в данное время. Получение достоверных и достаточных данных для этого осложнен отсутствием общепринятого для рода филогенетического маркера. Использование *COI* приводит к частым ошибкам в систематике, использование ядерных маркеров осложняется наличием полиплоидных популяций. Данная работа посвящена изучению применения митохондриальных генетических маркеров для филогенетического анализа жаброногих ракообразных рода *Artemia*. Проанализированы 13 белок-кодирующих фрагментов и два рРНК участка митохондриальных геномов, исследована их внутри- и межвидовая изменчивость, оценены параметры филогенетических деревьев, построенных по каждому гену. Была проанализирована топология полученных деревьев, параметры правдоподобия, а также внутри- и межвидовая изменчивость по каждому участку. Проведенный анализ показал состоятельность использования *ATP6* ввиду его высокой изменчивости. Выявлены маркеры, обладающие низкой разрешающей способностью в рамках данного рода, среди которых оказался и *COI*. По результатам анализа был выбран участок, включающий фрагмент гена тРНК, а также белок-кодирующих генов *ATP8* и *ATP6*, с стабильным для данного рода сайтом посадки праймеров.

Ключевые слова: митохондриальный геном, *Artemia*, генетические маркеры.

ВВЕДЕНИЕ

Проблематика систематики рода *Artemia* регулярно привлекает внимание ученых, поскольку данный род широко применяется в аквакультурных приложениях в качестве живого корма. Наряду с видами, размножающимися половым путем, известны также партеногенетические популяции разной пloidности. Исследования динамики популяций и эволюционного развития особей, использующих оба способа размножения, активно проводятся в настоящее время. Эволюционные связи артемии были исследованы с помощью различных подходов, которые зачастую не согласовывались между собой. К ним относятся фрагментные анализы на основе электрофореза [1], морфометрические характеристики [2], последовательности частичных митохондриальных генов (*COI*, *16S* и *12S*) [2-4], а также полная последовательность ядерного гена *ITS1* [2], и маркеры ядерных простых последовательностей (SSR) [2]. Наиболее популярными для филогенетического анализа на протяжении длительного времени являлись генетические маркеры, однако их использование приводило к ряду несоответствий. Так, на основании анализа митохондриальной *16S* рДНК средиземноморские *A. salina* и американские *A. franciscana* были объединены в одну группу [5]. В исследовании [6], основанном на анализе митохондриального гена *COI*, *A. salina* и *A. persimilis* были отнесены к одной кладе, а *A. sinica* – к сестринской кладе *A. franciscana* и других азиатских видов *Artemia*, при этом *A. franciscana* оказалась между ними. В работе [7], используя ядерный ген *ITS1* и митохондриальный ген *COI*, было показано, что американская *A. franciscana* была родственным видом по отношению к азиатским видам и партеногенетическим линиям, а *A. sinica* была базовой по отношению к ним обоим.

Альтернативой вышеперечисленным генам могут служить другие фрагменты митохондриального генома, так как мтДНК наследуется одинаково вне зависимости от формы размножения, поэтому использование ее фрагментов перспективно для оценки генетической структуры популяций и реконструкции исторических миграций.

В данной работе были проанализированы 13 белок-кодирующих фрагментов и два рРНК участка митохондриальных геномов *Artemia* на предмет их внутривидовой и межвидовой изменчивости, консервативности участков посадки праймеров, был выбран один из перспективных участков для филогенетического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выявления перспективного фрагмента для популяционно-генетических исследований для данного рода были проанализированы 13 белок-кодирующих фрагментов и два рРНК участка на предмет их внутривидовой и межвидовой изменчивости, консервативности участков посадки праймеров. Исследовались все доступные на данный момент митохондриальные геномы для рода *Artemia*, общее количество 58 митохондриальных геномов. В качестве внешней группы использовали митохондриальный геном *Daphnia pulex* NC_000844.1. Все использованные в работе последовательности были загружены с базы данных NCBI NT.

Выделение белок-кодирующих областей из митохондриальных геномов производили по поиску участков, гомологичных референтной последовательности, с помощью программы MitoS2 [9]. Отдельные выравнивания для каждого набора последовательностей выполнялись при помощи MAFFT [10]. Для всего семейства выравниваний производили поиск оптимальной модели эволюции нуклеотидов при помощи bmodeltest [11]. Филогенетическая реконструкция проводилась в BEAST2[12] с применением оптимальных моделей и популяционной настройкой Birth-Death process [13]. В качестве укореняющей группы использовалась *Daphnia pulex*. Анализировались параметры правдоподобия полученного дерева с помощью Tracer [14], согласованность клад с таксономическими группами и порядок узлов, обозначающих видообразующие события. В качестве образца для сравнения было выбран консенсусный в научном сообществе на данный момент порядок данных событий [8]. Для увеличения эффективного размера выборки (ESS) сравниваемых параметров деревьев проведено 2 независимых анализа длиной 100 млн итераций марковской цепи Монте-Карло (mcmc).

Внутривидовая и межвидовая изменчивость оценивалась двумя способами, определением средней генетической дистанции попарно [15] внутри и вне таксономической группы и количеством замен внутри группы и до ближайшего соседа – на основе гаплотипической сети TSC [16], построенной в POPart [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диаграммы внутривидовых и межвидовых дистанций, рассчитанных по разным генам для разных видов, представлены на рисунке 1.

Видно, что внутривидовые дистанции принимают наибольшее значение для вида *A. urmiana*, наименьшее – для *A. tibetiana*. Следует также отметить достаточно высокую вариабельность внутри вида *A. salina*. Среди генетических фрагментов наибольшую изменчивость показали ND6, ATP8, ND4.

Межвидовые дистанции наибольшие для *A. salina*. Интересно отметить, что у *A. tibetiana* межвидовая изменчивость сопоставима с аналогичными показателями других видов. Наибольшую вариабельность по межвидовым расстояниям показали гены ND6, ATP8 и ND4.

Были построены филогенетические деревья по каждому из 13 белок кодирующих фрагментов митохондриального генома, в качестве референса для сравнения использовалось дерево, построенное по полным митохондриальным геномам, топология которого является общепринятой в научном сообществе [8] (рис. 2а). Важно заметить, что топология дерева, построенного по самому вариабельному участку ND6 (рис. 2б), имеет иной порядок расхождения узлов, чем в референсном, и использование этого участка для филогенетических исследований нецелесообразно. Следующим по величине изменчивости после ND6 является фрагмент ATP8, который был выбран в качестве перспективного.

Однако в начале и конце данного фрагмента отсутствуют консервативные участки, подходящие для разработки праймеров, поэтому для анализа использовалась последовательность, включающая в себя фрагмент тРНК гена, ATP8 и ATP6 гены, обладающая с одной стороны достаточно высокой вариабельностью, с другой стороны – содержащая на концах консервативные участки для посадки праймеров, схема расположения показана на рисунке 3.

Дерево, построенное по нуклеотидным последовательностям генов тРНК, ATP8 и ATP6 (рис. 2б) по топологии наиболее соответствует референсному и обладает наилучшей поддержкой узлов из всех проанализированных.

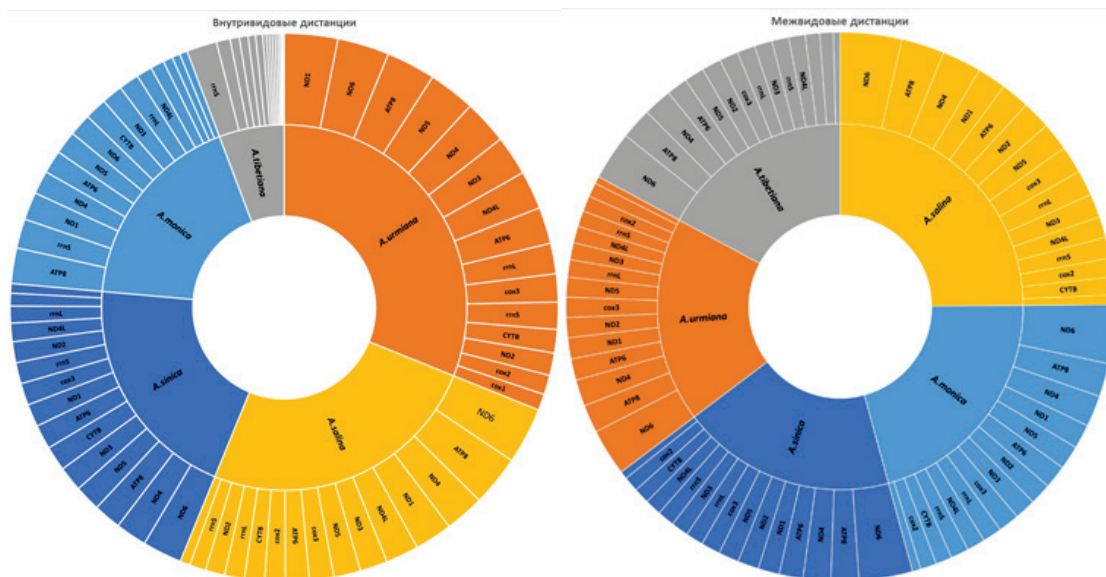


Рисунок 1. Диаграммы внутривидовых (слева) и межвидовых (справа) дистанций для белок-кодирующих генов митохондриальных геномов *Artemia*

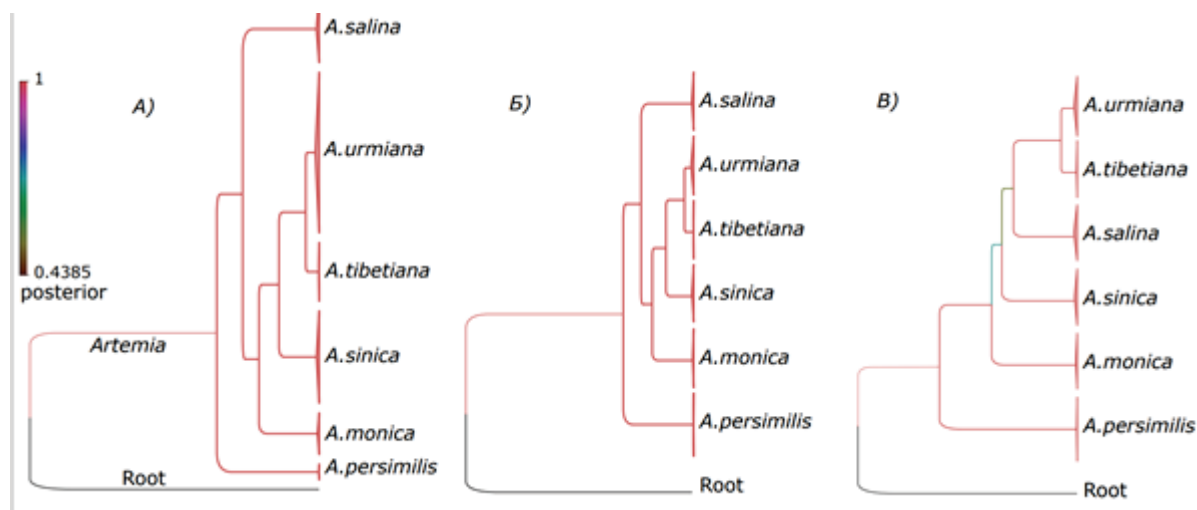


Рисунок 2. Филогенетические деревья, построенные по полным митохондриальным геномам (а) по фрагментам *trnK*+*ATP8*+*ATP6* (б) и *ND6* (в)

Параметры правдоподобия деревьев, построенных по различным фрагментам показаны на рисунке 4. Исходя из полученных данных наиболее достоверной является дерево, построенное по *ATP8*, что подтверждает его перспективность для филогенетических и популяционных исследований в данном роде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для изучения внутривидовых и межвидовых различий, а также уровня консерватизма областей связывания праймеров было проанализировано тринадцать белоккодирующих фрагментов и два участка рибосомальной РНК (рРНК) митохондриального генома представителей рода *Artemia*. По результатам исследования был выделен наиболее подходящий участок, наиболее информативный для дальнейшего филогенетического анализа.

Работа выполнена в рамках государственного задания Севастопольского государственного университета «Фотобиофизический мониторинг окружающей среды на основеспектрально-флуоресцентных свойств, структурно-организованных молекулярных (включая наночастицы) и супрамолекулярных биологически важных систем (FEFM-2023-0005)».



Рисунок 3. Схема посадки праймеров для секвенирования выбранного фрагмента. Разработан и визуализирован инструментами NCBI Primer-BLAST [18]

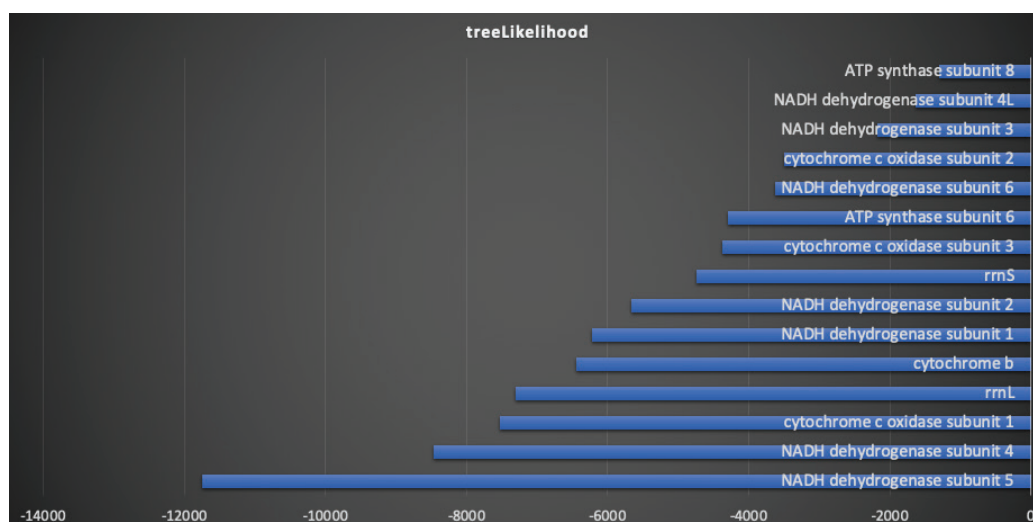


Рисунок 4. Рассчитанные параметры правдоподобия для филогенетических деревьев по генам. Более высокие значения предпочтительны

Список литературы / References:

1. Beardmore J.A., Abreu-Grobois F.A. *Taxonomy and Evolution in the Brine Shrimp Artemia*. In: Oxford G.S., Rollinson D., editors. *Protein Poly morphism: Adaptive and Taxonomic Significance*. London: Academic Press, 1983, pp. 153-164.
2. Asem A., Yang C., Eimanifar A., Hontoria F., Varo I., Mahmoudi F., Fu C., Shen C., Rastegar-Pouyani N., Wang P., Li W., Yao L., Meng X., Dan Y., Rogers C., Gajardo G. Phylogenetic analysis of problematic Asian species of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea, Anostraca), with the descriptions of two new species. *J Crustac Biol.*, 2023, vol. 43, no. 1, pp. 1-25.
3. Asem A., Yang C., Mahmoudi F., Chen S., Long B., Wang B., Fu C., Hontoria F., Rogers D.C., Gajardo G. Tibetan *Artemia* (Crustacea: Anostraca) mitogenomic biodiversity and population demographics. *Zool J Linn Soc.*, 2024, vol. 201, no. 1, pp. 32-56.
4. Lantushenko A. et al. *Artemia* spp. (Crustacea, Anostraca) in Crimea: new molecular genetic results and new questions without answers. *Water*, 2022, vol. 14, no. 17, p. 2617.
5. Baxeianis A.D., Triantaphyllidis G.V., Kappas I., Triantafyllidis A., Trianta phyllidis C.D., Abatzopoulos T.J. Evolutionary assessment of *Artemia tibetiana* (Crustacea, Anostraca) based on morphometry and 16S rRNA RFLP analysis. *J Zool Syst Evol.*, 2005, vol. 43, pp. 189-198, DOI: 10.1111/j.1439-0469.2005.00309.x.
6. Munoz J., Gomez A., Green A.J., Figuerola J., Amat F., Rico C. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). *Mol Ecol.*, 2008, vol. 17, no. 13, pp. 3160-3177.
7. Maniatsi S., Baxeianis A.D., Kappas I., Deligiannidis P., Triantafyllidis A., Papakostas S., Bougiouklis D., Abatzopoulos T.J. Is polyploidy a persevering accident or an adaptive evolutionary pattern? The case of the brine shrimp *Artemia*. *Mol Phylogenet Evol.*, 2011, vol. 58, no. 2, pp. 353-364, DOI: 10.1016/j.ympev.2010.11.029.
8. Asem A. et al. Mitogenomic phylogeny and divergence time estimation of *Artemia* Leach, 1819 (Branchiopoda: Anostraca) with emphasis on parthenogenetic lineages. *BMC genomics*, 2025, vol. 26, no. 1, p. 228.
9. Bernt M. et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2013, vol. 69, no. 2, pp. 313-319.
10. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 2013, vol. 30, no. 4, pp. 772-780.
11. Bouckaert R.R., Drummond A.J. bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC evolutionary biology*, 2017, vol. 17, no. 1, p. 42.
12. Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A. et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 2019, vol. 15, no. 4, e1006650.
13. Ho L.S.T. et al. Birth/birth-death processes and their computable transition probabilities with biological applications. *Journal of mathematical biology*, 2018, vol. 76, no. 4, pp. 911-944.
14. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 2018, syy032, DOI: 10.1093/sysbio/syy032.
15. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 2021, vol. 38, no. 7, pp. 3022-3027.
16. Clement M., Posada D., Crandall K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 2000, vol. 9, no. 10, pp. 1657-1659.
17. Leigh J.W., Bryant D., Nakagawa S. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology & Evolution*, 2015, vol. 6, no. 9.
18. Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 2012, vol. 13, no. 1, p. 134.

COMPARISON OF PROMISING MOLECULAR MARKERS AMONG THE GENES OF THE MITOCHONDRIAL GENOME FOR THE GENUS *ARTEMIA***Meger Ya.V., Lantushenko A.O.**

Sevastopol State University

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

Received 01.08.2025

Abstract. The task of analyzing the distribution of parthenogenetic and bisexual populations, as well as the dynamics of biodiversity of gill-bearing crustaceans of the genus *Artemia*, became extremely popular recently. Obtaining reliable and sufficient data for this is complicated by the lack of a generally accepted phylogenetic marker for the genus. The use of COI leads to frequent errors in systematics, and the use of nuclear markers is complicated by the presence of polyploid populations. This work is devoted to the study of mitochondrial genetic markers for phylogenetic analysis of gill-bearing crustaceans of the genus *Artemia*. Thirteen protein-coding fragments and two rRNA regions of mitochondrial genomes were analyzed, their intraspecific and interspecific variability was compared, and the parameters of phylogenetic trees constructed for each gene were evaluated. The topology of the obtained trees, likelihood parameters, as well as intraspecific and interspecific variability for each site were analyzed. The analysis showed the validity of using ATP6 due to its high variability. Markers with low resolution within this genus were identified, including COI. Based on the results of the analysis, a region was selected that included a fragment of the tRNA gene, as well as the protein-coding genes ATP8 and ATP6, with a primer landing site that was stable for this genus.

Key words: *mitochondrial genome, Artemia, genetic markers.*

АНАЛИЗ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ У *DUNALIELLA SALINA*, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Дегтяр И.В., Веляев Ю.О., Осокин А.Р., Лантушенко А.О.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию 22.07.2025

Аннотация. В статье исследовано влияние абиотических стрессовых факторов на биосинтез жирных кислот (ЖК) у микроводоросли *Dunaliella salina* штамм IBSS-1 и оптимизированы методы их экстракции. *D. salina* известна своей способностью адаптироваться к экстремальным условиям, таким как высокая соленость и световое излучение, что делает ее перспективным объектом для изучения механизмов биосинтеза ЖК. В работе рассматриваются условия, при которых происходит накопление ЖК, а также методы их экстракции и анализа. В исследованном в данной работе штамме *D. salina* идентифицировано 12 жирных кислот, среди которых доминирующими (с содержанием свыше 10%) являются линоленовая, пальмитиновая, линолевая и 4,7,10,13-гексадекатетраеновая кислоты. Во всех экспериментальных условиях отмечено увеличение концентрации миристиновой, 4,7,10-гексадекатриеновой (C16:3n-6,9,12), пальмитиновой и стеариновой кислот. При этом характер накопления насыщенных и ненасыщенных жирных кислот варьировал в зависимости от сочетания применяемых стрессовых факторов. Результаты исследования могут быть использованы для оптимизации условий культивирования *Dunaliella salina* с целью увеличения выхода ценных для здоровья человека ЖК, что имеет важное значение для биотехнологических и промышленных применений.

Ключевые слова: микроводоросли, *Dunaliella salina*, жирные кислоты, стрессовые факторы, биотехнология, хромато-масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли – это универсальные микроорганизмы, способные синтезировать широкий спектр ценных биомолекул, включая белки, липиды, и другие молекулы, на основе которых могут быть получены фармацевтические препараты и нутрицевтики. Их способность адаптироваться к различным условиям и использовать солнечную энергию делает их возобновляемым и устойчивым ресурсом, что открывает большие перспективы для устойчивого производства на их основе указанных ранее продуктов [1]. Если говорить более предметно о синтезируемых микроводорослями соединениях, то необходимо отметить, что они способны синтезировать такие соединения, как полиненасыщенные жирные кислоты, белки, незаменимые аминокислоты, фенольные соединения, летучие вещества, стерины, пептиды, витамины, полисахариды и пигменты [2], которые могут использоваться при их выделении из общей биомассы в качестве функциональных пищевых ингредиентов и кормовых добавок благодаря их потенциальной пользе для здоровья [3]. Кроме того, эти соединения обладают различными терапевтическими эффектами, включая противоопухолевые, противовоспалительные и кардиопротекторные свойства [4].

Dunaliella salina представляет собой уникальную одноклеточную водоросль, обладающую феноменальной устойчивостью к экстремально солёным условиям среды. Особый научный и коммерческий интерес вызывает её способность к интенсивному накоплению β-каротина, что обусловило широкое использование данного вида в промышленном производстве натуральных каротиноидов благодаря неприхотливости к условиям культивирования и быстрому росту [5]. Еще одной особенностью *D. salina* является значительное накопление липидных соединений, преимущественно в форме триацилглицеридов (далее – ТАГ), содержащих ценные моно- (далее – МНЖК) и полиненасыщенные жирные кислоты (далее – ПНЖК). Помимо этого, водоросль служит природным источником богатого спектра белковых соединений, включая стресс-регулирующие протеины и внеклеточные ферменты. Подобные метаболические особенности возникли как адаптационный механизм к гиперсолёным условиям, сопровождающийся активацией генов, ответственных за биосинтез белка и другие ключевые метаболические пути [6]. Производимые *D. salina* биологически активные соединения находят применение в нутрицевтиках, косметике и фармацевтике, а также в качестве питательного компонента в аквакультуре [7]. Благодаря своим универсальным свойствам *Dunaliella salina* представляет собой перспективный вид микроводорослей, которые делают ее пригодной для широкого спектра биотехнологических применений.

Микроводоросль *Dunaliella salina* представляет значительный интерес как продуцент полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Многочисленные исследования демонстрируют, что *D. salina* способна синтезировать широкий спектр ТАГ, включая и содержащие ценные омега-3,6,9 жирные кислоты (далее – ЖК). В составе ТАГ *D. salina* после их гидролиза идентифицированы значительные количества α-линоленовой кислоты (ALA, 18:3ω3), содержание которой может достигать 15-20% от общего пула ЖК [8]. При воздействии абиотических стрессов, таких как повышенная солёность или дефицит азота, наблюдается увеличение доли ПНЖК на 25-30%

от общего содержания ЖК [9]. В условиях азотного голодания у *D. salina* обнаружено накопление эйкозапентаеновой кислоты (EPA, 20:5 ω 3) – важного компонента для фармацевтики и нутрицевтики [10]. Основными насыщенными жирными кислотами (далее – НЖК) являются пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0), составляющие до 40-50% от общего жирнокислотного состава [11]. Оптимизация условий культивирования (освещённость, температура) позволяет увеличить продукцию ПНЖК до 15-18 мг на грамм сухой биомассы [12]. Особую ценность представляет уникальное соотношение ω -3/ ω -6 кислот (3:1), что делает *D. salina* перспективным источником для производства биологически активных добавок [13].

В данной работе изучалось накопление ПНЖК у микроводоросли *D. salina* штамм IBSS-1 под воздействием различных стрессовых факторов. Микроводоросль *Dunaliella salina* штамм IBSS-1 была предоставлена отделом биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование. Культуры содержались в климатической камере для роста растений BPC МИР 500 с регулируемой температурой при температуре 20 ± 2 °C с освещением, обеспечиваемым в течение 12 часов светового цикла, 12 часов темного цикла (12/12 LD) с помощью белых светодиодных ламп (LED) с интенсивностью света ~ 90 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Рост клеток контролировался путем спектрофотометрического измерения оптической плотности культуры на волны 750 нм.

Введение в стрессовое состояние. Культура клеток микроводоросли *Dunaliella salina* штамма IBSS-1 культивировалась до достижения стационарной стадии без добавления дополнительной питательной среды (рисунок 1). Процесс проводился при температуре 20 °C и освещенности 90 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. После достижения стационарной стадии культура была разлита по 200 мл в четыре колбы объемом 500 мл каждая. Образец в одной колбе культивировался без изменения условий (контроль), остальные три были подвергнуты различным экспериментальным воздействиям (температура везде поддерживалась постоянной 20 ± 2 °C):

Эксперимент 1: увеличение концентрации NaCl до 4 М и повышение интенсивности света примерно до 1000 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Эксперимент 2: повышение интенсивности света до 1000 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и добавление раствора пероксида водорода (H_2O_2 с концентрацией 2,5 mM).

Эксперимент 3: сочетание высокой концентрации NaCl (4 М), повышенной интенсивности света (~ 1000 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и добавки H_2O_2 (2,5 mM).

В течение 1 часа, 4 часов, 1 суток, 1 недели, 2 недель и 5 недель были взяты пробы объемом 15 мл.

Определение содержания жирных кислот. Водный раствор биомассы водоросли центрифугировали на 10000 об/мин в течении 5 мин на лабораторной центрифуге-встряхивателе ELMi CM-50M. Полученный осадок отделяли от жидкой фазы и взвешивали. Затем равным по объёму с полученным осадком экстрагентом, приготовленным в соотношении метанол: метилтретбутиловый эфир - 3:7, проводили экстракцию с помощью лабораторного шейкера ПЭ-6300 в течении 5 минут. Далее, полученный экстракт упаривали и подвергали дериватизации с получением метиловых эфиров жирных кислот. Метилирование образца проводилось следующим образом: полученный сухой остаток растворялся в 180 мкл диметилсульфоксида (ХЧ, АО «ЭККОС-1») и 20 мкл 25% метанольного раствора тетраметиламмония гидроксида (ХЧ, Sigma-Aldrich). Растворение проводилось при перемешивании в течении 2 минут, с последующей обработкой 30 мкл йодметаном (ХЧ, Sigma-Aldrich). Далее полученную смесь выдерживали в течении 20 минут при комнатной температуре, а затем добавляли гексан (ХЧ, АО «ЭККОС-1»). Затем пробу интенсивно перемешивали с помощью лабораторного шейкера ПЭ-6300 в течении 5 минут и центрифугировали на центрифуге-вортексе «Микроспин» FV-2400. Полученный гексановый экстракт, содержащий метилированные формы жирных кислот, переносили в вials для проведения анализа. Объём пробы, вводимой в хроматограф, составлял 1 мкл. Для разделения компонентов пробы использовали капиллярную колонку HP-5MS UI (Agilent) с неподвижной фазой, представляющую собой 5%-фенил-,95%-метилполисиликан. Длина колонки составляла – 30 м, а внутренний диаметр – 0,25 мм. Толщина неподвижной фазы – 0,25 мкм. В качестве газа-носителя использовали гелий марки 6,0, расход которого

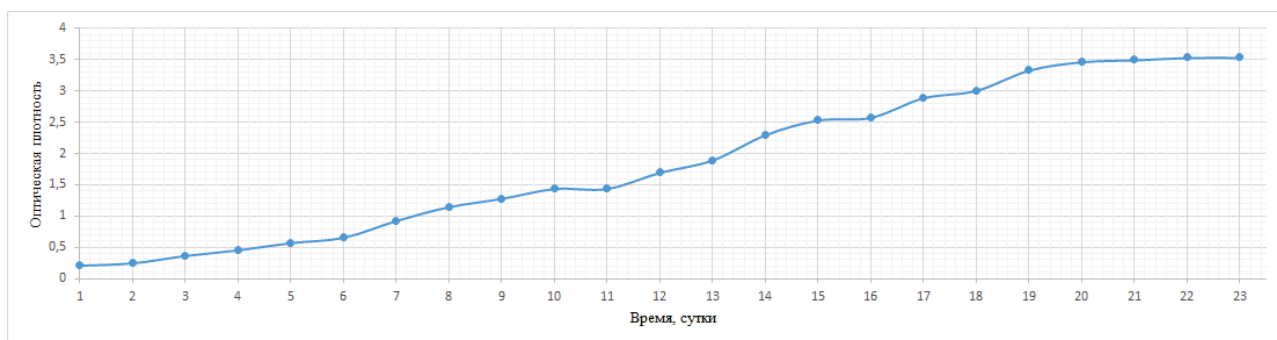


Рисунок 1. Кривая роста микроводоросли *Dunaliella salina* штамм IBSS-1 (среда Ben-Amotz с соленостью 120 г/л)

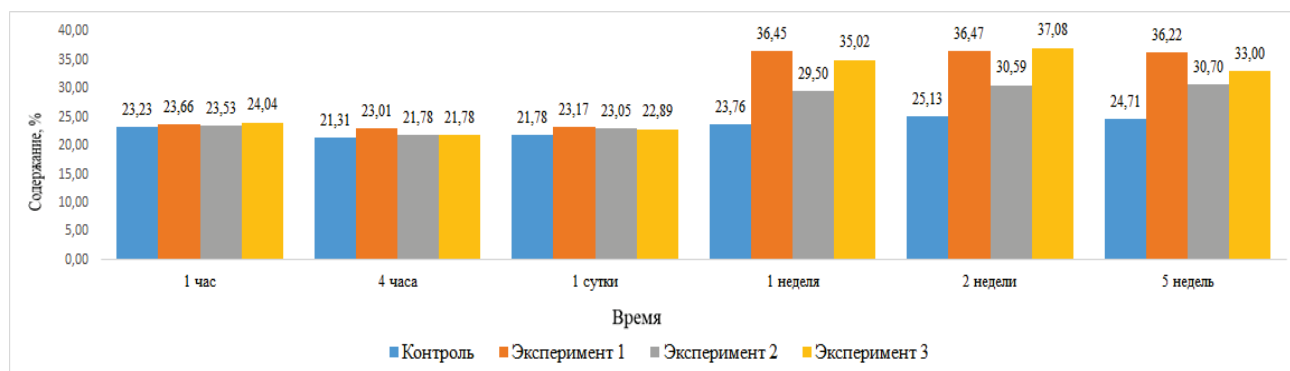


Рисунок 2. Процентное содержание пальмитиновой кислоты (16:0)

составлял 1 мл/мин. Температурный режим колонки - градиентный с начальной температурой 80 °С, изотермой 2,0 мин и нагревом 5 °С/мин до 280 °С. На испарителе деление потока соответствовало 20:1, температура 280 °С. Анализ проводили с использованием масс-спектрометрического детектора с электронной ионизацией (70 эВ) и температурой ионного источника 230 °С. Температура переходной линии составляла 280 °С. Полученный спектр регистрировали в диапазоне масс от 30 до 650 m/z [15,16]. Для обработки, полученной хромато-масс-спектрометрической информации, использовали программное обеспечение Хроматэк Аналитик 3.1 (сборка 3.1.2211.3), NIST MS Search v.3.0 и библиотека масс-спектров - NIST 2023 с базой данных от 18 апреля 2023 года. Каждая из липидных формул, представленная в результатах, была получена путем соотношения ее метилового эфира, образующегося при этерификации карбоксильной группы, с исходной формулой кислоты с открытых баз данных. Дополнительно верификация полученных пиков производилась путём соотношения их с данными, полученными для аналитического стандарта смеси метиловых эфиров жирных кислот (37 штук) фирмы Supelco. В качестве выходных данных представлено процентное содержание ионов, характерных для указанного соединения, в общем количестве поступающих в детектор ионов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

И в контрольных, и в экспериментальных образцах наибольшее содержание характерно для линоленовой (42,92%) и пальмитиновой (37,08%) кислот, также были идентифицированы 16:4 ω 3 (4,7,10,13-гексадекатетраеновая кислота) – 15,76%, 18:2 ω 6 (линолевая кислота) – 11,68%, 18:1 ω 9(c) (олеиновая кислота) – 6,73%, 16:3 ω 3 (7,10,13-гексадекатриеновая кислота) – 5,53%, 18:0 (стеариновая кислота) – 2,35%, 16:3 ω 6 (4,7,10-гексадекатриеновая кислота) – 2,37%, 18:3 ω 6 (γ -линоленовая кислота) – 1,32%, 14:0 (миристиновая кислота) – 1,26%. Также были идентифицированы минорные ЖК (с долей менее 1%) – эйкозеновая и докозановая ЖК.

В качестве примера на рисунках 2-4 представлена динамика содержания пальмитиновой кислоты (16:0), стеариновой кислоты (18:0) и линоленовой кислоты (18:3 ω 3).

Для всех условий культивирования наблюдался рост содержания миристиновой, 4,7,10-гексадекатриеновой, пальмитиновой и стеариновой кислот. При этом для 16:4 ω 3, 16:3 ω 3 и 18:1 ω 9(c) характерно уменьшение относительного процентного содержания.

Интересно отметить, что динамика накопления ЖК существенным образом зависит от стрессового фактора: при комбинированном воздействии повышенной концентрации соли, интенсивном световом воздействии при добавлении пероксида водорода повысилось содержание миристиновой и пальмитиновой кислот, воздействие повышенной концентрации соли и пероксида водорода оказало наибольшее влияние на динамику накопления С16:3 ω 6, 18:3 ω 6 и 18:2 ω 6, а при стрессовых условиях, наиболее близких к природным воздействиям

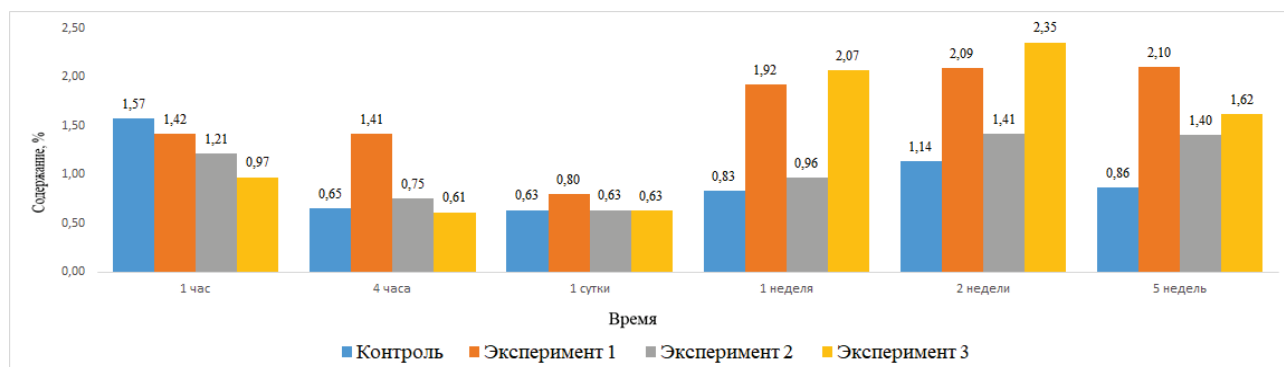


Рисунок 3. Процентное содержание стеариновой кислоты (18:0)

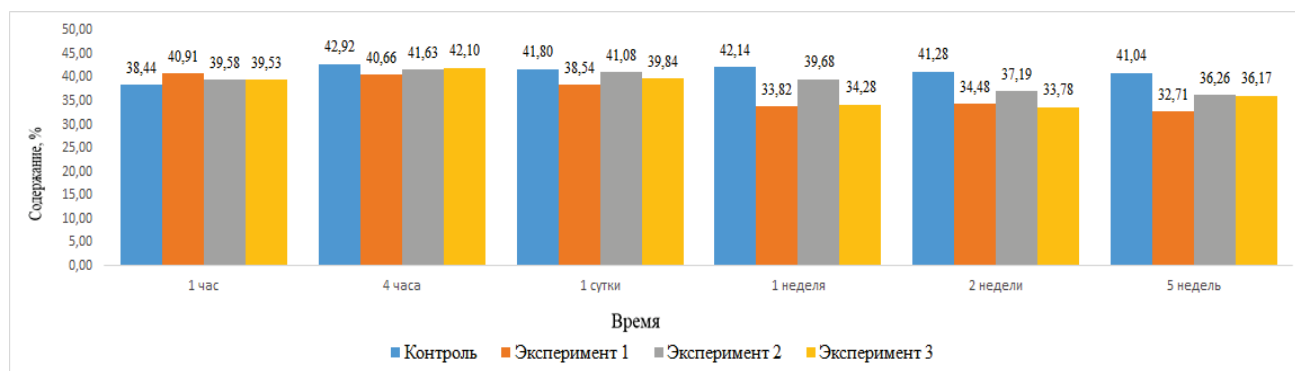


Рисунок 4. Процентное содержание линоленовой кислоты (18:3ω3)

(повышенная концентрация соли и интенсивное освещение) сильнее всего изменилось содержание пальмитиновой, олеиновой и стеариновой кислот.

Известно, что насыщенные ЖК (пальмитиновая и стеариновая) преобладают в триацилглицеридах [17], а триненасыщенные (главным образом, линоленовая кислота) ассоциированы с гликолипидами мембран тилакоидов. Наиболее вероятно, что наблюдаемое в данной работе увеличение процентного содержания насыщенных ЖК и снижение содержания триненасыщенных отражает приспособление клеток к действию стрессовых факторов: редукции мембран тилакоидов и индукция синтеза запасных липидов. Важно отметить, что для исследованного ранее некаротиногенного штамма *D. viridis* наблюдалось более существенное снижение содержания триненасыщенных ЖК, чем для штаммов *D. salina* [17], и стабильность в содержании триненасыщенных ЖК, зафиксированная в данной работе, свидетельствует о устойчивости тилакоидов клеток к стрессовым воздействиям.

Таким образом, в исследованном штамме *D. salina* идентифицировано 12 ЖК, наибольшее содержание (с долей более чем 10%) наблюдается для линоленовой, пальмитиновой, линолевой и 4,7,10,13-гексадекатетраеновой кислот. Для всех условий культивирования имеет место рост содержания миристиновой, 4,7,10-гексадекатриеновой, пальмитиновой и стеариновой кислот. При этом динамика накопления насыщенных и ненасыщенных ЖК зависит от комбинации стрессовых факторов в эксперименте.

Работа выполнена в рамках государственного задания Севастопольского государственного университета «Фотобиофизический мониторинг окружающей среды на основе спектрально-флуоресцентных свойств, структурно-организованных молекулярных (включая наночастицы) и супрамолекулярных биологически важных систем (FEFM-2023-0005).

Список литературы / References:

1. Hertzler S.R., Lieblein-Boff J.C., Weiler M., Allgeier C. Plant proteins: assessing their nutritional quality and effects on health and physical function. *Nutrients*, vol. 12, no. 12, p. 3704, doi: 10.3390/nu12123704.
2. Andrade L.M., Andrade C.J., Dias M., Nascimento C., Mendes M.A. Chlorella and spirulina microalgae as sources of functional foods. *Nutraceuticals, and Food Supplements*, 2018, vol. 6, no. 1, pp., 45-58, doi: 10.15406/mojfpt.2018.06.00144.
3. Gao L., Qin Y., Zhou X., Jin W., He Z., Li X., Wang Q. (2024). Microalgae as future food: Rich nutrients, safety, production costs and environmental effects. *Science of the Total Environment*, vol. 927, p. 172167, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172167.
4. Saide A., Martinez K. A., Ianora A., Lauritano C. Unlocking the health potential of microalgae as sustainable sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 9, p. 4383, doi: 10.3390/ijms22094383.
5. Gao F., Nan F., Feng J., Lv J., Liu Q., Liu X., Xie S. Comparative morphological, physiological, biochemical and genomic studies reveal novel genes of *Dunaliella bioculata* and *D. quatolecta* in response to salt stress. *Molecular Biology Reports*, 2022, vol. 49, no. 3, pp. 1749-1761, doi: 10.1007/s11033-021-06984-9.
6. Hu J., Meng W., Su Y., Qian C., Fu W. Emerging technologies for advancing microalgal photosynthesis and metabolism toward sustainable production. *Frontiers in Marine Science*, 2023, vol. 10, p. 1260709, doi: 10.3389/fmars.2023.1260709.
7. Patidar S.K. Metabolic interactions between microalgae and bacteria: Multifunctional ecological interplay and environmental applications. *Algal Research*, 2025, p. 103904, doi: 10.1016/j.algal.2025.103904.
8. Ben-Amotz A. Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products-Major Industrial Species: *Dunaliella*. Handbook of microalgal culture: *Biotechnology and applied phycology*, 2003, pp. 273-280, doi: 10.1002/9780470995280.
9. Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C., Bino R.J., Wijffels R.H. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of biotechnology*, 2012, vol. 162, no. 1, pp. 21-27, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.018.

10. Solovchenko A.E. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynthesis research*, 2015, vol. 125, no. 3, pp. 437-449, doi: 10.1007/s11120-015-0156-3.
11. Pick U. *Dunaliella acidophila—a most extreme acidophilic alga. In Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999, pp. 465-478.
12. Guschina I.A., Harwood J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 2006, vol. 45, no. 2, pp. 160-186, doi: 10.1016/j.plipres.2006.01.001.
13. Khozin-Goldberg I., Iskandarov U., Cohen Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, vol. 91, no. 4, pp. 905-915, doi: 10.1007/s00253-011-3441-x.
14. Abd El-Baky H.H., El Baz F.K., El-Baroty G.S. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2004, vol. 6, no. 1, pp. 49-57.
15. Веляев Ю.О., Бородин А.В., Пименов К.А., Осокин А.Р. Изучение различных методологических подходов к извлечению жирнокислотной фракции из сложной биологической матрицы и идентификация её состава с помощью хромато-масс-спектрометрии. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2025, т. 25, № 1, с. 73-89 [Velyaev Y.O., Borodina A.V., Pimenov K.A., Osokin A.R. Study of various methodological approaches for extraction of fatty acid fraction from complex biological matrix and identification of its composition using chromatography-mass spectrometry. *Sorption and Chromatographic Processes*, 2025, vol. 25, no. 1, pp. 73-89, doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/12796 (In Russ.)].
16. Бородин А.В., Пименов К.А., Веляев Ю.О., Осокин А.Р. Сезонная динамика липидов тканей двустворчатого моллюска *Cerastoderma glaucum* псевдोलиторальной зоны. *Техника и технология пищевых производств*, 2024, т. 54, № 3, с. 558-570 [Borodina A.V., Pimenov K.A., Velyaev Y.O., Osokin A.R. Seasonal lipid dynamics in tissues of the brackish-water bivalve *Cerastoderma glaucum* from the pseudolittoral zone. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2024, vol. 54, no. 3, pp. 558-570, doi: 10.21603/2074-9414-2024-3-2528 (In Russ.)].
17. Solovchenko A.E., Selivanova E.A., Chekanov K.A., Sidorov R.A., Nemtseva N.V., Lobakova E.S. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no. 11, pp. 1508-1513, doi: 10.1134/S0006297915110139.

ANALYSIS OF FATTY ACID COMPOSITION IN *DUNALIELLA SALINA* UNDER DIFFERENT STRESS FACTORS

Degtyar I.V., Lantushenko A.O., Velyaev Y.O., Osokin A.R.

Sevastopol State University

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

Received 22.07.2025

Abstract. The article investigates the effect of abiotic stress factors on fatty acid (FA) biosynthesis in the microalga *Dunaliella salina* strain IBSS-1 and optimizes FA extraction methods. *D. salina* is known for its ability to adapt to extreme conditions such as high salinity and light radiation, making it a promising object for studying FA biosynthesis mechanisms. The study examines conditions promoting FA accumulation as well as extraction and analysis methods. In the investigated *D. salina* strain, 12 fatty acids were identified, with linolenic, palmitic, linoleic, and 4,7,10,13-hexadecatetraenoic acids being dominant (content >10%). Under all experimental conditions, increased concentrations of myristic, 4,7,10-hexadecatrienoic (C16:3n-6,9,12), palmitic, and stearic acids were observed. The accumulation patterns of saturated and unsaturated fatty acids varied depending on the combination of applied stress factors. The research results can be used to optimize *Dunaliella salina* cultivation conditions for enhanced production of health-beneficial fatty acids, which is significant for biotechnological and industrial applications.

Key words: microalgae, *Dunaliella salina*, fatty acids, stress factors, biotechnology, chromatography-mass spectrometry.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ «CLONE M-3» МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Торхов Н.А.^{1,2}, Ращенкова И.И.², Лантушенко А.О.²

¹ АО «НПП «Пульсар»

Окружной проезд, д. 27, г. Москва, 105187, РФ; e-mail: administrator@pulsarnpp.ru

² Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 23.07.2025

Аннотация: Механочувствительность, преобразование механических сигналов и реакция клеток на механические воздействия имеют большое значение для миграции, прикрепления, проникновения и распространения раковых клеток, так как эти процессы зависят от взаимодействия клеток с окружающей средой, включая клеточный и внеклеточный матрикс организма-хозяина. Современные достижения в области атомно-силовой микроскопии позволяют проводить детальное изучение механических и энергетических характеристик живых клеток на микро- и наноразмерных масштабах без нарушения их целостности. В данной работе методом АСМ был получен точный цифровой двойник внешней оболочки клетки меланомы мыши «Clone M-3», что дало более широкие возможности для изучения различных взаимосвязей между её объемом, формой, микроструктурой и функциональными свойствами. Исследован рельеф клеточной мембраны и его Хаусдорфова размерность D_H . Проведено сравнение полученных результатов с аналогичными параметрами клеток букального эпителия человека. Результаты микромеханических исследований показали, что именно микромеханические свойства клеток меланомы (жесткость их мембран F_{stif} , сила адгезии F_{adh} , упругие деформации Δh_{dfrm}) определяют наряду с остальными биологическими факторами их высокий инвазивный потенциал.

Ключевые слова: клетки меланомы, инвазивный потенциал, микромеханические свойства, атомно-силовая микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Механосенсорика, механотрансдукция и механореакция играют важную роль в подвижности, адгезии, инвазии и метастазировании клеток меланомы, поскольку все эти процессы связаны с их реакцией на микромеханическое взаимодействие с внешней средой, например, с клеточным или внеклеточным матриксом носителя (хозяина). Интенсивное развитие методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволяет сейчас на новом качественном и количественном уровнях, например, с использованием гибридных АСМ-методов сканирования подойти к неразрушающему исследованию локальных микромеханических и энергетических свойств живых клеток меланомы на микро и нано -уровнях. К настоящему времени основной объем АСМ-исследований был направлен в основном на поиск и оптимизацию способов обнаружения таких клеток, их механического вклада в некоторые биохимические процессы, связанные, например, с пигментацией, различиями между нормальными и раковыми клетками [1,2], исследованию синергии между меланоцитами, кератиноцитами, фибробластами и матриксом носителя [3]. В то же время, до сих пор всё ещё не установлены окончательные причины, обуславливающие их высокий инвазивный потенциал, связанный вероятно с их уникальными микромеханическими свойствами. В связи с этим в данной работе будет исследован комплекс таких микромеханических свойств и энергетических характеристик клеток меланомы, как: упругие деформации Δh_{dfrm} , жесткость F_{stif} , сила адгезии F_{adh} и механическая работа адгезионных сил A_{adgh} .

ЭКСПЕРИМЕНТ

В качестве примера использовались клетки меланомы мыши «Clone M-3» (далее – клетки), культивированные в полной питательной среде F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотиков (пенициллин, стрептомицин). Культура поддерживалась при температуре воздуха $T=37^\circ\text{C}$, влажности 90% и концентрации CO_2 5% в культуральных флаконах объемом 25 мл (Eppendorf, США), размещенных в культиваторе Binder (Германия). Формирование монослоя с 70% заполнением поверхности происходило на протяжении 24-48 часов инкубации.

В дальнейшем перевод клеток в суспензию осуществлялся посредством двукратной промывки раствором DPBS с последующим добавлением трипсина с экспозицией 10 минут при $T=37^\circ\text{C}$. Инактивация трипсина производилась добавлением полной питательной среды. Далее суспензия центрифугировалась в течение 5 минут при 1000 об/мин. Затем клетки ресуспендировались в полной питательной среде.

Приготовленные таким образом клетки вносились на поверхность образцов эпитаксиального кремния дырочного типа проводимости p-Si{111}, размещенных в лунках шестилуночного планшета с питательной средой и помещались в культиватор на 24 часа.

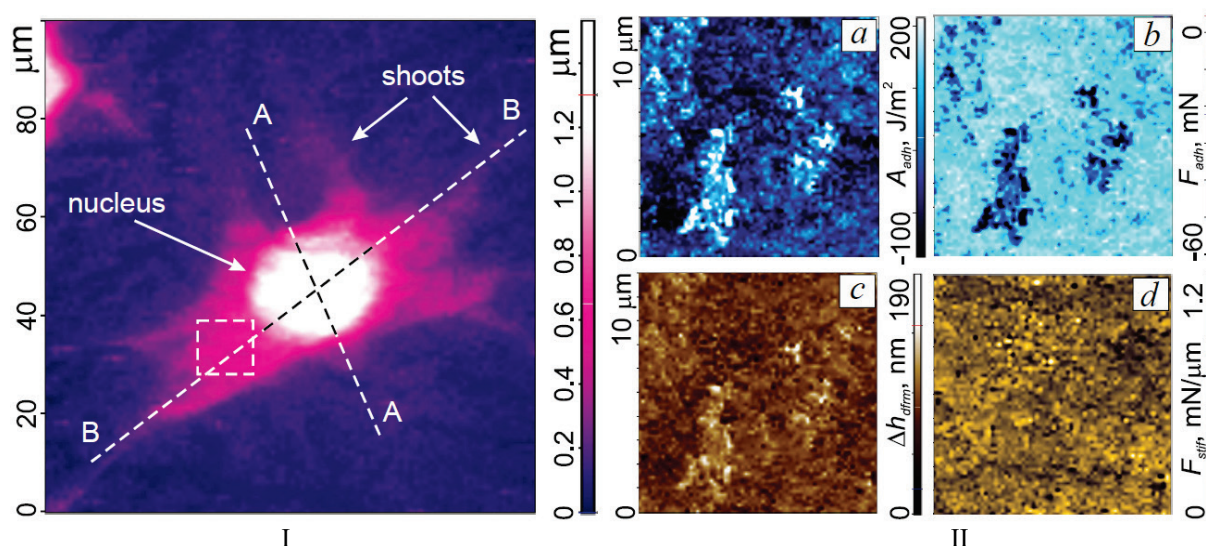


Рисунок 1. АСМ-изображение клетки меланомы мыши “Clone M-3” – I и карты микромеханических параметров на участке 10×10 мкм (выделено пунктиром на I) – II: A_{adgh} – (a), F_{adgh} – (b), Δh_{dfrm} – (c) и F_{stif} – (d)

После отмытки поверхность образцов с живыми клетками исследовалась при нормальных условиях на воздухе методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) в контактном (рис. 1 I, рис. 2a, A-A, “*contact mode*”) и гибридном (рис. 1 II, рис. 2a, B-B, “*hybrid mode*”) режимах сканирования с разрешением 256×256 pt. Непосредственно перед проведением АСМ-измерений осуществлялась калибровка механических параметров балки кантилевера на резонансной частоте её механических колебаний $f_{res} = 73$ kHz. Подвод кантилевера к поверхности осуществлялся в режиме “*touch*”, обеспечивающем достаточно аккуратное пошаговое приближение зонда к поверхности мембраны. Оставшийся на поверхности адсорбат (рис. 2a, 1-слой адсорбата и рис. 2b) толщинами d от 7 нм до 50 нм позволял сохранять клеткам активное состояние в процессе АСМ-измерений в течении достаточно длительного промежутка времени.

Исследования морфологии поверхности клеток (рис. 1 I, рис. 2a) и их микромеханических свойств (рис. 1 II, рис. 2b) осуществлялось прямыми измерениями с использованием АСМ NTEGRA-AURA производства NT-MDT г. Зеленоград, Москва. В качестве измерительного зонда использовались кантилеверы HA-FM/ W_2C , представляющие собой микромеханическое кремниевое устройство, состоящее из прямоугольного $3,6 \times 1,6$ мм кремниевого основания толщиной 0,4 мм, по центру меньшей стороны верхней грани которого была сформирована балка длиной 183 мкм, шириной 34 мкм и толщиной 3 мкм. Верхняя поверхность балки была покрыта светоотражающим золотым покрытием. С нижней стороны свободного конца балки было сформировано покрытое высокопрочным слоем карбида вольфрама W_2C острие высотой 12 мкм, углом при вершине $\alpha \approx 22^\circ$ и радиусом закругления $r \leq 6$ нм (далее – зонд, probe). Конструктивные параметры иглы и условия проведения зондовых измерений (низкая твердость исследуемых биологических объектов) накладывали ограничения на выбор моделей контактного взаимодействия острия иглы (зонда, probe) с поверхностью мембраны. С учетом этого использовалась коническая DMT-модель (модель Derjagin, Muller and Toropov), применяемая для расчетов значений микромеханических параметров в случаях, когда размеры упругой деформации поверхности значительно превышают радиус закругления острия иглы r [4].

В общем случае, методы АСМ позволяют получать цифровой двойник внешней оболочки клетки и её функциональных характеристик, что открывает широкие возможности для изучения различных взаимосвязей между её объемом, формой, микроструктурой и функциональными свойствами. В целом, морфология поверхности мембраны исследуемой клетки характеризуется достаточно развитым самоафинным статистически самоподобным рельефом со средним значением неровностей по высоте $118,4 \pm 33,6$ нм и перепадом на исследуемом участке ~ 230 нм. Средние значения латеральных размеров неровностей мембраны (в горизонтальной плоскости ($x; y$)) составляют ~ 200 нм. Определенная методом островков размерность подобия D_S (Хаусдорфова размерность $D_H = D_S$) неровностей мембраны составила $D_H = 1,71$, что позволяет оценить значение фактической площади поверхности клетки, которое может на порядки отличается от её проекции на плоскость ($x; y$).

Построение профилей поперечных сечений позволяет не только точно определить внешние размеры клетки, но и особенности её строения (рис. 2a). В частности, хорошо видно, что ядро занимает большую часть клеточного объема, а его поперечный размер в несколько раз превышает толщину отростков (рис. 1 I, shoots) и окружающих её областей. Кроме этого, профиль позволяет хорошо визуализировать распределение по толщине клетки областей с разными микромеханическими свойствами, что позволяет соотнести эти области с расположением тех или иных клеточных органоидов.

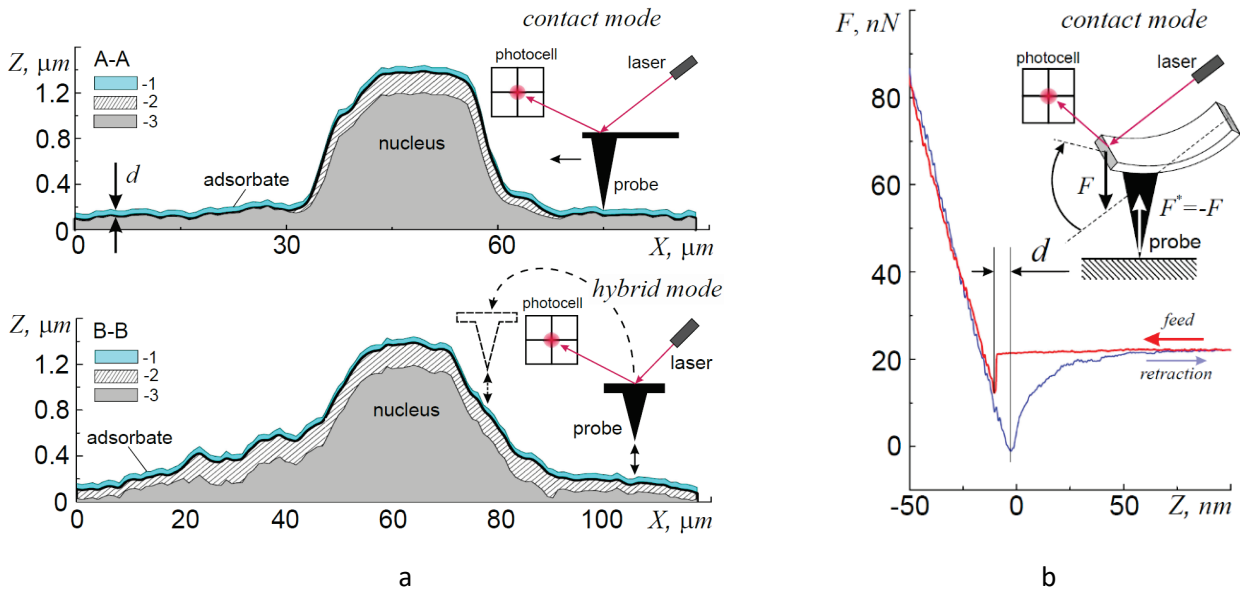


Рисунок 2. Профили поперечных сечений поверхности мембраны исследуемой клетки «Clone M-3»: а) сечение А-А и сечение В-В (рис. 1 I) со схематическими изображениями: 1 – слоя адсорбата, 2 – области упругих деформаций и 3 – области пластических деформаций; б) способ определения эффективной толщины адсорбционного слоя d методом силовой спектроскопии с использованием силовых кривых подвода (feed) и отвода (retraction) $F=F(z)$ в одной из точек сканирования

Исследования функциональных свойств показали, что клетки «Clone M-3» обладают уникальными микромеханическими свойствами, обуславливающими их сильное сцепление с поверхностью подложки и способность к перемещению, например, в сторону наиболее близко расположенных биологических объектов – в данном случае аналогичных клеток меланомы. В основном акты перемещений связаны с распространением от материнской клетки в выбранном направлении отростков на достаточно большие (превышающие размеры самой клетки) расстояния (рис. 1 I, shoots).

Статистический анализ микромеханических характеристик выделенного участка показал, что распределения $N=N(A_{adh})$ (рис. 2a) и $N=N(F_{adh})$ (рис. 2b) лучше описывается лоренцианом (2-Lorentz.) имеющим несколько более широкий, чем в гауссиане (1-Gauss.) пик и более растянутые хвосты. Это означает, что вероятность наблюдения значений F_{adh} и A_{adh} отличных от среднего больше, чем распределение случайных

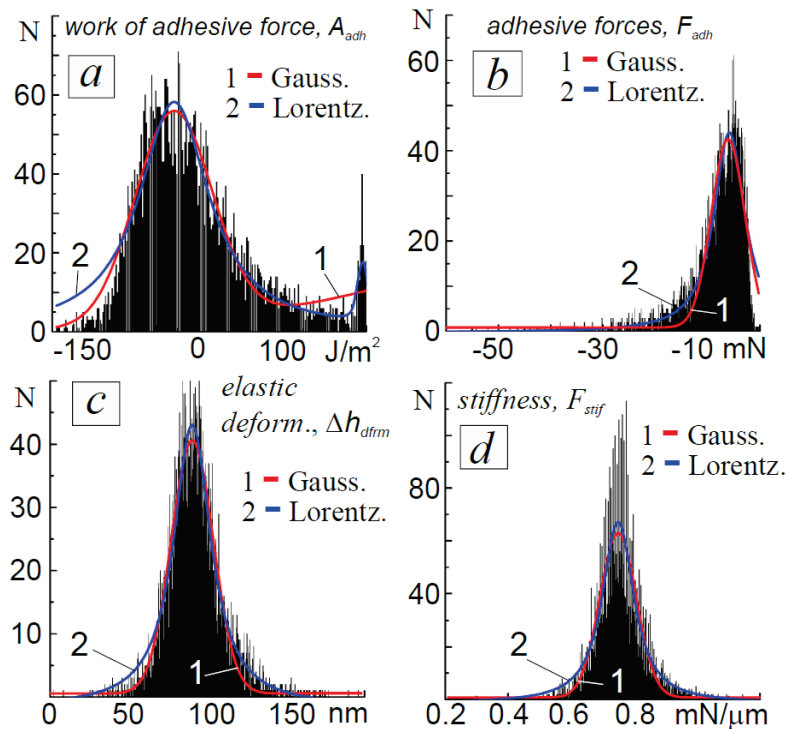


Рисунок 3. Гистограммы распределения значений параметров микромеханических характеристик исследуемого участка $10 \times 10 \mu m$ ($70 \times 70 pt = 4900$ точек, рис. 1, I, пунктир) клетки «Clone M-3»: а) $N=N(A_{adh})$ – (рис. 1, II а); б) $N=N(F_{adh})$ – (рис. 1, II б); в) $N=N(\Delta h_{dfrm})$ – (рис. 1, II в); д) $N=N(F_{stif})$ – (рис. 1, II д).

Таблица 1

Клетка	Средние значения микромеханических и энергетических параметров.			
	$\langle F_{adh} \rangle$, N	$\langle A_{adgh} \rangle$, Дж/м ²	$\langle F_{stif} \rangle$, Н/м	$\langle \Delta h_{dfm} \rangle$, нм
буккального эпителия человека [4,5].	12×10^{-6}	198,0	36,5	3,0
меланомы мыши.	$8,2 \times 10^{-3}$	$6,8 \times 10^{-4}$	$7,59 \times 10^2$	92,4

величин (больше, чем в гауссиане). Такое уширение, как правило, может быть вызвано заметным влиянием на F_{adgh} , а, следовательно, и на A_{adgh} , каких-либо сопутствующих биофизических процессов. По всей вероятности, происхождение адгезионных сил в данном случае имеет более сложную природу, определяемую совокупностью нескольких одновременно протекающих процессов, требующих дополнительных исследований.

В отличие от предыдущего случая, гистограммы $N=N(\Delta h_{dfm})$ (рис. 2 c) и $N=N(F_{stif})$ (рис. 2 d) хорошо описываются гауссовским статистическим распределением. Это может указывать на то, что в области упругих (линейных) деформаций микромеханические свойства клетки (например, жёсткость F_{stif}) подчиняются классическим линейным законам. Более острый пик и короткие экспоненциально спадающие хвосты гауссиана могут указывать на то, что вероятность влияния сторонних процессов на локальные упругие свойства клетки крайне незначительны.

Интересно сравнить полученные результаты с аналогичными параметрами клеток буккального эпителия человека [5,6]. Так как последние являются одними из наиболее прочных и устойчивых к воздействиям внешней среды клеток человека, то их можно использовать в качестве некоего сравнительного эталона по отношению к микромеханическим свойствам и других клеток человека (табл. 1).

В результате, относительно большой интервал упругих деформаций Δh_{dfm} позволяет клеткам «Clone M-3» затрачивать существенно меньше энергии на совершение механической работы адгезионных сил A_{adgh} в клеточном и внеклеточном матриксе носителя (хозяина), а большая жёсткость их мембран F_{stif} и сила адгезии F_{adh} способствуют достаточно свободно (практически не ощущая границ) и относительно быстро перемещаться в клеточной и внеклеточной среде носителя. Таким образом было выявлено, что именно микромеханические и энергетические свойства данных клеток могут определять наряду с остальными биологическими факторами их высокий инвазивный потенциал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом АСМ был получен точный цифровой двойник внешней оболочки исследуемой клетки «Clone M-3», что дало более широкие возможности для изучения различных взаимосвязей между её объемом, формой, микроструктурой и функциональными свойствами. В целом, морфология поверхности мембраны имеет достаточно развитый самоафинный статистически самоподобный рельеф, определяемый локальным перепадом высот более 230 нм, средними значениями неровностей по высоте $118,4 \pm 33,6$ нм и латеральными размерами ~200 нм. Определённая методом островков размерность подобия D_S (Хаусдорфова размерность $D_H=D_S$) неровностей мембраны составила $D_H=1,71$, что позволяет оценить значение фактической площади поверхности клетки, которое может на порядки отличаться от её проекции на плоскость (x; y).

Результаты микромеханических исследований показали, что именно микромеханические свойства данных клеток (большая жёсткость их мембран F_{stif} и сила адгезии F_{adh} , определяющая силу сцепления с поверхностью, или окружающей средой) могут определять наряду с остальными биологическими факторами их высокий инвазивный потенциал, определяемый способностью клетки достаточно свободно (практически не ощущая границ) и относительно быстро перемещаться в клеточной и внеклеточной среде носителя. Инвазивность усиливается ещё и тем, что большой интервал упругих деформаций Δh_{dfm} клеточной мембраны позволяет при прочих равных условиях затрачивать данным клеткам при перемещении существенно меньше энергии на совершение механической работы адгезионных сил A_{adgh} .

Работа выполнена в рамках Программы развития научного центра мирового уровня «Новые материалы специального назначения» (Соглашение №075-15-2025-605).

Список литературы / References:

1. Laidler P., Dulinska J., Lekka M., Lekki J. Expression of prostate specific membrane antigen in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, vol. 435, pp. 1-14.
2. Lekka M., Laidler P., Labedz M., Kulik A.J., Lekki J., Zajac W., Stachura Z. Specific Detection of Glycans on a Plasma Membrane of Living Cells with Atomic Force Microscopy. *Chem. Biol.*, 2006, vol. 13, pp. 505-512.
3. Bras M.M., Radmacher M., Sousa S.R., Granja P.L. Melanoma in the Eyes of Mechanobiology. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, vol. 8, no.54, pp. 1-19, doi: 10.3389/fcell.2020.00054.
4. Derjaguin B.V., Muller V.M., Toropov Yu.P. Effect of Contact Deformations on the Adhesion of Particles. *J. Colloid. Interface Sci.*, 1975, vol. 53, 314 p., doi: 10.1016/0021-9797(75)90018-1.

5. Torkhov N.A., Mosunov A.A., Novikov V.A., Ivonin I. V. Study of tribological properties of human buccal epithelium cell membranes using probe microscopy. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, p. 11302, doi: 10.1038/s41598-022-14807-5.
6. Torkhov N.A., Buchelnikova V.A., Mosunov A.A., Ivonin I.V. AFM methods for studying the morphology and micromechanical properties of the membrane of human buccal epithelium cell. *Scientific Reports*, 2023, vol. 13, p. 10917, doi: 10.21203/rs.3.rs-2131384/v1.

INVESTIGATION OF MICROMECHANICAL PROPERTIES OF "CLONE M-3" MELANOMA CELLS BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Torkhov N.A.^{1,2}, Rashchenkova I.I.², Lantushenko A.O.²

¹ JSC NPP Pulsar

Okruzhny proezd, 27, Moscow, 105187, Russia; e-mail: administrator@pulsarnpp.ru

² Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 23.07.2025

Abstract. Mechanosensitivity, the conversion of mechanical signals, and the response of cells to mechanical influences are of great importance for the migration, attachment, penetration, and spread of cancer cells, since these processes depend on the interaction of cells with the environment, including the cellular and extracellular matrix of the host organism. Modern advances in atomic force microscopy make it possible to conduct a detailed study of the mechanical and energy characteristics of living cells on micro- and nanoscale scales without violating their integrity. In this work, the AFM method was used to obtain an accurate digital twin of the outer shell of a mouse melanoma cell "Clone M-3", which provided broader opportunities for studying various relationships between its volume, shape, microstructure and functional properties. The relief of the cell membrane and its Hausdorff dimension D_H have been studied. The obtained results were compared with similar parameters of human buccal epithelial cells. The results of micromechanical studies have shown that it is the micromechanical properties of melanoma cells (F_{stif} membrane stiffness, F_{adh} adhesion strength, Δh_{dfm} elastic deformations) that determine, along with other biological factors, their high invasive potential.

Key words: melanoma cells, invasive potential, micromechanical properties, atomic force microscopy.

ДИНАМИКА ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ТИМУСА КРЫС ПРИ ПОСТЕПЕННОМ УМЕНЬШЕНИИ ПОСТУПЛЕНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМ

Яглова Н.В.¹, Обернихин С.С.¹, Тимохина Е.П.¹, Яглов В.В.¹, Назимова С.В.¹,
Цомартова Э.С.^{1,2}, Иванова М.Ю.², Черешнева Е.В.², Ломановская Т.А.²,
Паюшина О.В.², Цомартова Д.А.²

¹ НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»

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

² ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.С. Сеченова»
ул. Трубецкая, 8, г. Москва, 119048, РФ

Поступила в редакцию 30.07.2025

Аннотация. Пролиферация, дифференцировка и миграция Т-лимфоцитов происходит в тимусе. Нарушения тимопоэза приводят к недостаточности клеточного звена адаптивного иммунитета, что является существенной проблемой, поскольку способствует повышению риска как инфекционных заболеваний, так и опухолевых процессов. В настоящее время практически не существует эффективных способов эндогенной активации процессов тимопоэза, поскольку помимо эффекта цитокинов мало известно о естественных стимуляторах деления и дифференцировки клеток. Цель исследования – определить динамику цитологических параметров тимуса крыс при постепенном уменьшении поступления дейтерия в организм. Эксперимент выполнен на 60 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 340-370 г. Животные контрольной группы (n=30) потребляли водопроводную питьевую воду с содержанием дейтерия 146 ppm. Для понижения содержания дейтерия крысам опытной группы (n=30) водопроводная вода была заменена на воду с содержанием дейтерия 10 ppm в течение 28 дней. Проводили цитофлуориметрическое исследование тимоцитов. Результаты исследования показывают, что у взрослых животных снижение содержания дейтерия изменяет морфодинамические процессы в тимусе, что связано с активацией пролиферации и дифференцировки клеток, а также поддержанием большего числа лимфобластов. При этом снижение поступления дейтерия в организм оказывает различное влияние на созревание Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов.

Ключевые слова: дейтерий, тимус, Т-лимфоциты, тимопоэз.

ВВЕДЕНИЕ

Тимус является центральным органом иммунной защиты, в котором происходит созревание Т-лимфоцитов. Оно включает пролиферацию лимфобластов, их дифференцировку и селекцию, а также миграцию в периферические органы иммунной системы. Для тимуса характерна ранняя возрастная инволюция, которая начинается после полового созревания. Также тимус подвержен и акцидентальной инволюции в ответ на действие разнообразных стрессовых факторов [1-4]. Нарушения тимопоэза приводят к недостаточности клеточного звена адаптивного иммунитета, что является существенной проблемой, поскольку способствует повышению риска как инфекционных заболеваний, так и опухолевых процессов. В связи с этим поиск факторов, способных влиять на генерацию Т-лимфоцитов в тимусе является актуальной задачей.

В настоящее время практически не существует эффективных способов эндогенной активации процессов тимопоэза, поскольку помимо эффекта цитокинов мало известно о естественных стимуляторах деления и дифференцировки клеток. Дейтерий является стабильным изотопом водорода, и его содержание в организме достаточно высоко [5,6]. В клетках дейтерий находится в виде полутяжёлой воды HDO, которая образуется в результате обмена атомами водорода между H₂O и D₂O. Известно, что замена дейтерия на протий на в химических веществах значительно уменьшает энергию разрыва связи и тем самым увеличивает относительную скорость химических реакций [7]. Таким образом, сдвиг баланса изотопов водорода можно рассматривать как гипотетический регулятор метаболических и физиологических процессов. Ряд исследований показывают, что снижение дейтерия в физиологических условиях вызывает быструю ответную реакцию, включающую секреторные и морфогенетические процессы [8,9].

Цель исследования – определить динамику цитологических параметров тимуса крыс при постепенном уменьшении поступления дейтерия в организм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 60 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 340-370 г. Крысы содержались в стандартных условиях вивария и получали сухой корм для лабораторных грызунов. Животные контрольной группы (n=30) потребляли водопроводную питьевую воду с содержанием дейтерия 146 ppm. Для понижения содержания дейтерия крысам опытной группы (n=30) водопроводная вода была заменена на воду с содержанием дейтерия 10 ppm в течение 28 дней (ФГБУ «ПНИИФ им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»).

Содержание дейтерия в воде верифицировали с помощью изотопного анализатора T-LWIA-45-EP («Los Gatos Research», США) с точностью 1ppm. Было подсчитано количество потреблённой крысами жидкости, рассчитан объём потреблённой жидкости на 100 г массы тела, показавший одинаковый уровень потребления жидкости животными контрольной и опытной групп.

Крысы выводили из эксперимента передозировкой золетила на 1, 3, 7, 14, 21 и 28-й день. Удалённый тимус взвешивали, затем гомогенизировали для получения культуры тимоцитов. Субпопуляцию лимфоцитов тимуса оценивали при помощи антител к CD3, CD4 и CD8, конъюгированных с флуорохромами и использовали в проточной цитофлуориметрии («Invitrogen», США). Для исследования использовали проточный цитометр FC500 («Beckman Coulter», США). Определяли процент CD3-позитивных лимфоцитов, включая одиночные позитивные Т-хелперы (CD3+CD4+CD8-) и Т-цитотоксические (CD3+CD4-CD8+) клетки, а также дубльпозитивные (CD3-CD4+CD8+) и дубльнегативные (CD3-CD4-CD8-) клетки, представляющие лимфобласты. Эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом НИИ морфологии человека (протокол № 23 от 25 марта 2020 г.).

Для статистического анализа использовался программный пакет «Statistica 7.0» (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Количественные сравнения независимых групп проводились с использованием t-критерия Стьюдента с учетом значений теста Левена на равенство дисперсий. Количественные сравнения процентов субпопуляций лимфоцитов проводились с использованием критерия χ^2 . Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В корковом веществе тимуса имеется субкапсулярная зона, представленная активно делящимися недифференцированными дубльнегативными CD4-CD8- лимфобластами. У крыс контрольной группы они представляли собой самую малочисленную субпопуляцию тимических лимфоцитов. Их содержание незначительно варьировало течение первых двух недель и уменьшалось к концу эксперимента у контрольных животных, что свидетельствовало об истощении пула делящихся клеток. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, наблюдалось качественно иная динамика этого параметра. Через сутки после начала потребления воды с пониженным содержанием дейтерия отмечалось 3,5-кратное увеличение доли пролиферирующих CD4-CD8-лимфобластов. Затем происходило постепенное уменьшение содержания дубльнегативных клеток в течение двух недель и увеличением к концу исследования (рис. 1).

Процессы дифференцировки Т-лимфоцитов происходят путем активации экспрессии маркеров обеих субпопуляций Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов. Эти дубльпозитивные CD4⁺CD8⁺-клетки представляют собой наибольшую по численности популяцию в тимусе. У крыс контрольной группы процент дифференцирующихся лимфоцитов варьировал, отражая баланс между CD4⁺CD8⁺ и CD4⁺CD8⁻-клетками, то есть между пролиферацией и дифференцировкой тимоцитов. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, отмечалось значительное уменьшение доли дубльпозитивных клеток после первых суток эксперимента. На 3-и сутки у них наблюдался более высокий уровень CD4⁺CD8⁺-лимфоцитов по сравнению с контрольными животными. Затем различий не наблюдалось (рис 2).

В контрольной группе процент зрелых Т-лимфоцитов CD3⁺-лимфоцитов измнялся волнообразно в течение эксперимента. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, было выявлено 4-кратное увеличения доли CD3⁺-клеток через сутки после начала воздействия. Затем происходило снижение содержания CD3⁺ клеток в тимусе, однако к концу эксперимента их содержание не отличалось от значений контрольной группы (рис. 3).

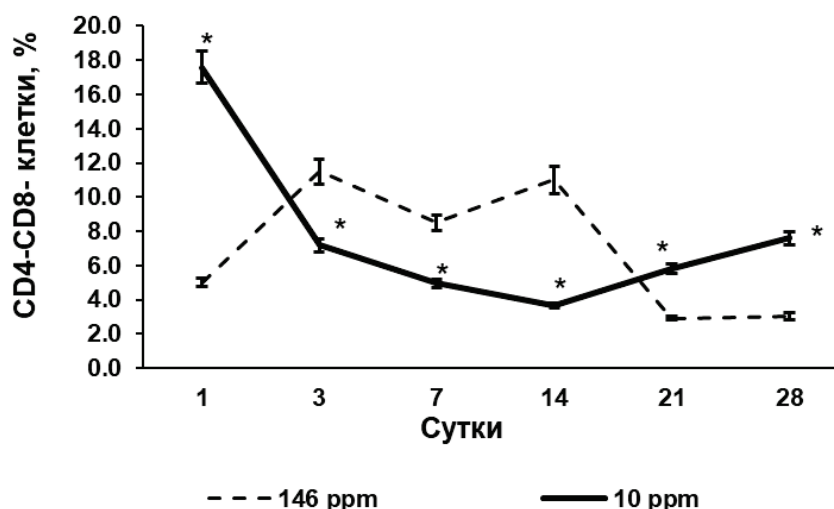


Рисунок 1. Динамика содержания дубльнегативных лимфоцитов в тимусе крыс контрольной группы (146 ppm) и потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия (10 ppm).

Примечания: * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

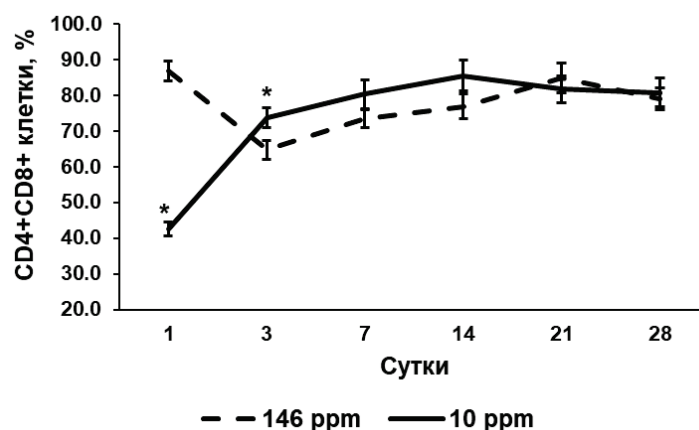


Рисунок 2. Динамика содержания дубльпозитивных лимфоцитов в тимусе крыс контрольной группы (146 ppm) и потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия (10 ppm).

Примечания: * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

Соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в тимусе показало, что у крыс опытной группы оно также всегда превышало единицу, как и контрольной основном в группе. Но значительные изменения в содержании зрелых лимфоцитов были связаны с изменением динамики дифференцировки Т-хелперов. Именно их содержание обеспечило увеличение численности зрелых Т-лимфоцитов через сутки после начала эксперимента. Снижение же численности Т-лимфоцитов в последующие дни эксперимента было обусловлено в значительной степени уменьшением содержания Т-цитотоксических лимфоцитов (рис. 4).

Результаты исследования свидетельствуют, что уменьшение поступления дейтерия в организм значительно изменяло динамику цитологических параметров тимуса крыс, что отражало существенные изменения в темпах морфогенетических процессов. Быстрая реакция на снижение дейтерия уже через сутки показывает, что содержание дейтерия в системном кровотоке является фактором, регулирующим пролиферацию и дифференцировку клеток. Потребление воды с пониженным содержанием дейтерия сначала снижает его концентрацию в крови, а затем и в твердых тканях [10,11]. Уменьшение концентрации дейтерия в кровотоке вызвало наиболее выраженные изменения в созревании Т-клеток. Результаты этого эксперимента подтверждают ранее полученные нами данные о быстром реагировании тимуса на уменьшение содержания дейтерия [9]. Важно отметить, что наибольшее стимулирующее воздействие снижение дейтерия оказывает на дифференцировку Т-хелперов, а снижение темпов морфогенетических процессов более выражено у Т-цитотоксических лимфоцитов. Полученные данные показывают, что выраженная стимуляция продукции Т-клеток через сутки не приводила к усугублению инволютивных процессов в тимусе, о развитии которых у крыс контрольной группы свидетельствовало уменьшение численности недифференцированных лимфобластов. Вероятно, это связано с антиоксидантным действием на клетки активацией клеточного дыхания [12-16]. Это является важным фактором повышения выживаемости клеток [17].

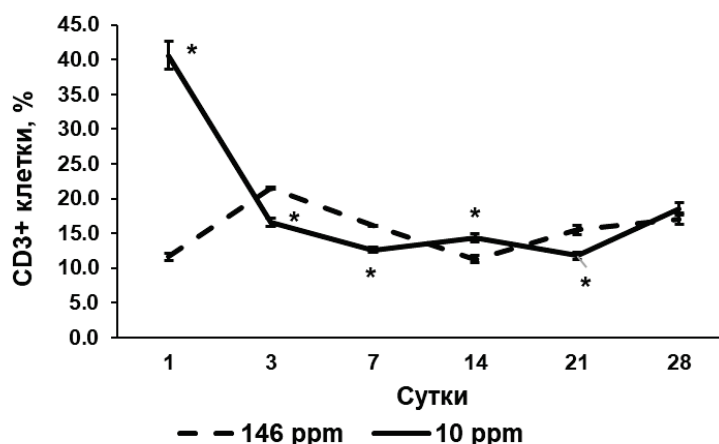


Рисунок 3. Динамика содержания монопозитивных Т-лимфоцитов в тимусе крыс контрольной группы (146 ppm) и потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия (10 ppm).

Примечания: * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

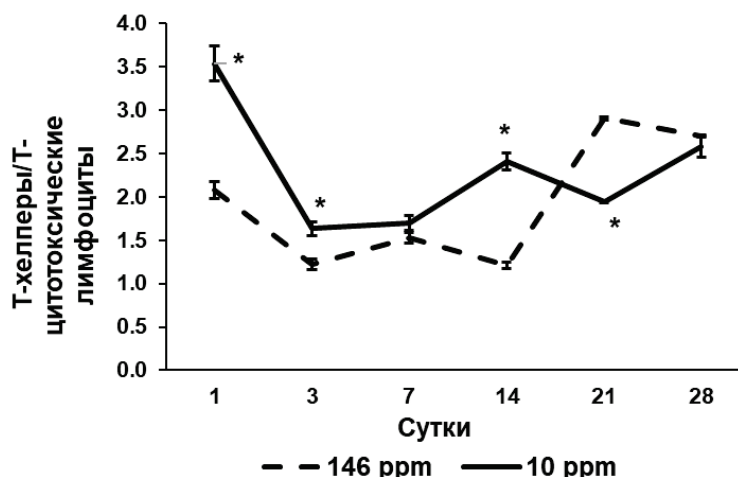


Рисунок 4. Динамика соотношения Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в тимусе крыс контрольной группы (146 ppm) и потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия (10 ppm).

Примечания: * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные характеристики цитологических параметров свидетельствуют, что у взрослых животных снижение содержания дейтерия изменяет морфодинамические процессы в тимусе, что обусловлено активацией пролиферации и дифференцировки клеток, а также поддержанием большего числа лимфобластов. Снижение поступления дейтерия в организм оказывает различное влияние на созревание Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов.

Список литературы / References:

1. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Effects of low-dose dichlorodiphenyltrichloroethane on the morphology and function of rat thymus. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, vol. 155, 701-704, doi: 10.1007/s10517-013-2230-1.
2. Обернихин С.С., Макарова О.В., Малайцев В., Богданова И.М., Болтовская М.Н. Динамика морфофункциональных изменений органов иммунной системы мышей balb/c при экспериментальном гепатите. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2006, т. 141, № 4, с. 451-454 [Obernikhin S.S., Makarova O.V., Malaitsev V.V., Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N. Dynamics of morphofunctional changes in immune organs of balb/c mice with experimental hepatitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, vol. 141, no. 4, pp. 465-467, doi: 10.1007/s10517-006-0200-6 (In Russ.)].
3. Schae D.A. Century of Radiation Therapy and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, p. 431, doi: 10.3389/fimmu.2017.00431.
4. Duah M., Li L., Sen J., Lan Q., Pan B., Xu K. Thymus Degeneration and Regeneration. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12, p. 706244, DOI: 10.3389/fimmu.2021.706244.
5. Kselikova V., Vitova M., Bisova K. Deuterium and its impact on living organisms. *Folia Microbiol.*, 2019, vol. 64, 673-681, doi: 10.1007/s12223-019-00740-0.
6. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, p. 3107, doi: 10.3390/ijms24043107.
7. Jancso G. *Isotope effects*. In: Vertes A., Nagy S., Klencsar Z., editors. Handbook of Nuclear Chemistry. Volume 2. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, The Netherlands: 2013, pp. 85-116.
8. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Response of Pituitary-Thyroid Axis to a Short-Term Shift in Deuterium Content in the Body. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2021, vol. 171, pp. 262-264, doi: 10.1007/s10517-021-05208-1.
9. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Nazimova S.V., Yaglov V.V. Reactive Alterations in Thymic Lymphocytopoiesis to Short-Term Decrease in Deuterium Content in the Body. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2022, vol. 173, pp. 494-496, doi: 10.1007/s10517-022-05568-2.
10. Kosenkov A.V., Lobyshev V.I., Gulyaev M.V., Yusubalieva G.M., Baklaushev V.P. The reversible effect of deuteration on tissue fluid and biopolymers in normal and tumor tissues of mice. *Biophysics*, 2018, vol. 63, pp. 820-824, doi: 10.1134/S0006350918050111.
11. Dzhimak S.S., Basov A.A., Baryshev M.G. Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2015, vol. 465, pp. 370-373, doi: 10.1134/S1607672915060071.
12. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., Butina E., Baryshev M., Malysheko V., Moiseev A., Elkina A., Dzhimak S. Reduction of deuterium level supports resistance of neurons to glucose deprivation and hypoxia: Study in cultures of neurons and on animals. *Molecules*, 2022, vol. 27, p. 243, doi: 10.3390/molecules27010243.

13. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R.A. Anticancer Effect of Deuterium Depleted Water—Redox Disbalance Leads to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Proteom.*, 2019, vol. 18, pp. 2373-2387, doi: 10.1074/mcp.RA119.001455.
14. Bayrak B.B., Kulak G.Y., Yanardag R., Yarat A. Short term deuterium depletion in drinking water reduced tumor induced oxidative stress in mice liver. *Pathol. Res. Pract.*, 2022, vol. 240, p. 154186, doi: 10.1016/j.prp.2022.154186.
15. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis. *RusOMJ*, 2020, vol. 9, e0210, doi: 10.15275/rusomj.2020.0210.
16. Seneff S., Kyriakopoulos A.M. Deuterium trafficking, mitochondrial dysfunction, copper homeostasis, and neurodegenerative disease. *Front. Mol. Biosci.*, 2025, vol. 12, p. 1639327, doi: 10.3389/fmolb.2025.1639327.
17. Кравцов А.А., Лясота О.М., Козлова Е.А., Моисеев А.В., Козин С.В. Влияние концентрации дейтерия среды на кальциевый гомеостаз, мембранный потенциал митохондрий и гибель нейронов при глюкозной депривации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2025, т. 179, № 1, с. 37-42 [Kravtsov A.A., Lyasota O.M., Kozlova E.A., Moiseev A.V., Kozin S.V. Effect of Deuterium Concentration in the Incubation Medium on Intracellular Ca^{2+} Level, Mitochondrial Membrane Potential, and Neuronal Death during Glucose Deprivation. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2025, vol. 179, pp. 29-33, doi: 10.1007/s10517-025-06424-9 (In Russ.)].

DYNAMICS OF CYTOLOGICAL PARAMETERS OF THE RAT THYMUS WITH A GRADUAL DECREASE IN DEUTERIUM INTAKE

Yaglova N.V.¹, Obernikhin S.S.¹, Timokhina E.P.¹, Yaglov V.V.¹, Nazimova S.V.¹, Tsomartova E.S.^{1,2}, Ivanova M.Yu.², Cheresheva E.V.², Lomanovskaya T.A.², Payushina O.V.², Tsomartova D.A.²

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”

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

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov, First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University) *Trubetskaya str., 8, Moscow, 119048, Russia*

Received 30.07.2025

Abstract. Proliferation, differentiation and migration of T lymphocytes occur in the thymus. Thymopoiesis disorders lead to insufficiency of the cellular link of adaptive immunity, which is a significant problem, since it contributes to an increased risk of both infectious diseases and tumor processes. Currently, there are practically no effective methods for endogenous activation of thymopoiesis processes, since, in addition to the effect of cytokines, little is known about natural stimulators of cell division and differentiation. The aim of the study was to determine the dynamics of cytological parameters of the rat thymus with a gradual decrease in deuterium intake. The experiment was performed on 60 mature male Wistar rats weighing 340-370 g. Animals of the control group (n = 30) consumed tap drinking water with a deuterium content of 146 ppm. To reduce the deuterium content in the rats of the experimental group (n=30), tap water was replaced with water containing 10 ppm deuterium for 28 days. Cytofluorometric study of thymocytes was conducted. The results of the study show that in adult animals, a decrease in the deuterium content changes the morphodynamic processes in the thymus, which is associated with the activation of proliferation and differentiation of cells, as well as maintaining a larger number of lymphoblasts. A decrease in deuterium intake into the body has a different effect on the maturation of T-helpers and T-cytotoxic lymphocytes.

Key words: *deuterium, thymus, T-lymphocytes, thymopoiesis.*

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОНИМАНИЯ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ

Чжу О.П., Аравиашвили Д.Э., Руденко Н.С., Маринич И.И.

Курчатовский комплекс медицинской приматологии

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

Поступила в редакцию 30.07.2025

Аннотация. В статье проводится оценка некоторых показателей состояния оксидативной системы организма как одной из составляющих комплексного описания модели старения нечеловекообразных приматов, являющихся генетически, морфологически и физиологически наиболее близкими к человеку животными. В ходе анализа было установлено, что с увеличением возраста наблюдается рост содержания окисленных форм, среди которых особенно выделяется малоновый диальдегид (МДА). Активность супероксиддисмутазы (СОД) зафиксирована на более высоком уровне у самцов всех возрастных групп. Это может указывать на различия в метаболических процессах между полами, а также на то, что мужские особи имеют более выраженные механизмы защиты от окислительного стресса. Активность каталазы изменяется с возрастом только у самцов и, как правило, имеет тенденцию к уменьшению. Это также наблюдается и в отношении активности СОД, что может свидетельствовать о снижении защитных механизмов организма с течением времени. В ходе сравнительного анализа маркеров окислительного стресса и состава белковых фракций у возрастных животных была выявлена повышенная реакция со стороны иммунной системы, что может указывать на наличие воспалительных процессов. Результаты исследования также показали, что структурные aberrации хромосом являются одним из типов генетических нарушений, которые вносят свой вклад в сложный многофакторный процесс старения у приматов. Полученные данные могут быть полезны для дальнейших исследований в области геронтологии и медицины, направленных на понимание механизмов старения и разработки методов его замедления.

Ключевые слова: антиоксидантная система организма, маркеры, модели старения, приматы.

Введение. Старение представляет собой сложный и многофакторный процесс, который изучается с различных точек зрения, что порождает множество определений. Каждое из них акцентирует внимание на определенных аспектах старения, таких как биологические, социальные и психологические компоненты. В рамках научных исследований выделяются такие термины, как биологическое старение, успешное старение, преждевременное старение и активное старение. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предлагает свою интерпретацию этого процесса, определяя старение на биологическом уровне как результат воздействия множества молекулярных и клеточных повреждений, которые накапливаются в организме с течением времени.

Современные исследования в области геронтологии показывают, что между окислительным стрессом и воспалительными процессами имеется тесная взаимосвязь, которая служит основой для формирования окислительно-воспалительной теории старения. Эта теория подразумевает, что старение можно рассматривать как потерю гомеостаза, что происходит из-за хронического окислительного стресса. Особенно сильно этот стресс воздействует на регуляторные системы организма, такие как нервная, эндокринная и иммунная системы. Когда эти системы подвергаются воздействию окислительного стресса, они активируют иммунный ответ, который, в свою очередь, вызывает воспаление. Этот воспалительный процесс создает порочный круг, в котором хронический окислительный стресс и воспаление подпитывают друг друга. В результате этого взаимодействия возрастает риск развития различных заболеваний и, как следствие, увеличивается уровень заболеваемости и смертности среди пожилых людей.

Экспериментальное моделирование патологий человека на животных является важным инструментом для медицины, особенно в контексте изучения патогенеза заболеваний, связанных со свободно-радикальным окислением. Важным аспектом, который следует учитывать, является то, что основная причина многих заболеваний заключается в нарушении баланса между антиоксидантной системой (АОС) и оксидативной системой (ОС) организма. Антиоксидантная система отвечает за нейтрализацию свободных радикалов, которые образуются в результате обмена веществ и различных внешних воздействий. Когда этот баланс нарушается, и концентрация свободных радикалов в организме увеличивается, это может привести к патологическим состояниям [1].

Патологические состояния возникают, когда уровень свободных радикалов в биосистеме и плотность потока активных частиц на наружной поверхности клеточных мембран значительно увеличиваются. Это может происходить из-за различных факторов, таких как неправильное питание, недостаток физической активности, воздействие токсинов и стрессы. В результате этого увеличения свободные радикалы начинают повреждать клеточные структуры, включая мембраны, ДНК и белки, что в конечном итоге приводит к нарушению клеточной функции и, как следствие, к старению организма.

Таким образом, старение можно рассматривать как сложный процесс, в котором взаимодействуют множество факторов, включая молекулярные, клеточные и системные уровни. Важно понимать, что старение не является лишь биологическим процессом, но также включает в себя социальные, психологические и экономические аспекты, которые могут оказывать значительное влияние на качество жизни пожилых людей. Научные исследования в этой области продолжают развиваться, и новые открытия могут привести к более глубокому пониманию механизмов старения, а также к разработке эффективных стратегий для замедления этого процесса и улучшения здоровья пожилых людей.

Следовательно, старение - многосторонний процесс, который требует комплексного подхода к изучению и пониманию. Изучение его механизмов и факторов, способствующих старению, может помочь в разработке методов профилактики и лечения возрастных заболеваний, что, в свою очередь, может значительно улучшить качество жизни людей в пожилом возрасте.

Процесс старения у людей имеет много общего с аналогичными процессами, наблюдаемыми у других видов приматов. Это сходство объясняется тем, что механизмы старения у приматов и человека имеют полную корреляцию. В связи с этим, использование нечеловекообразных приматов в качестве моделей для изучения старения представляется весьма логичным. Эти животные, как правило, обладают генетическими, морфологическими и физиологическими характеристиками, которые делают их наиболее близкими к человеку. Однако следует отметить, что использование человекообразных приматов для подобных исследований исключается по этическим причинам, что делает выбор в пользу нечеловекообразных приматов еще более актуальным.

На сегодняшний день отсутствует комплексное описание и, соответственно, модель старения нечеловекообразных приматов. Это ограничение не позволяет применять данную модель для испытаний лекарственных препаратов, которые могут предотвратить возрастные патологии, встречающиеся у человека. В Курчатовском комплексе медицинской приматологии существуют группы нечеловекообразных приматов, которые достигли преклонного возраста, что соответствует возрасту 20-30 лет у этих животных, а в человеческом эквиваленте составляет примерно 70-100 лет. Это создает уникальную возможность для глубокого исследования процессов старения и разработки модели старения, которая могла бы быть полезна для научных и медицинских целей.

Тем не менее, анализ научных публикаций за последние два десятилетия не позволил выявить работы, которые бы описывали старение животных, достигших преклонного возраста, соответствующего возрасту человека старше 60 лет. Это подчеркивает существующую пробел в научных данных, который необходимо заполнить для дальнейших исследований в этой области. Исследование старения нечеловекообразных приматов может дать ценные сведения о механизмах, которые лежат в основе старения, и помочь в разработке эффективных методов борьбы с возрастными заболеваниями.

Понимание механизмов старения может привести к новым подходам в медицине, направленным на улучшение качества жизни пожилых людей и продление активного долголетия. Разработка модели старения на основе данных о нечеловекообразных приматах может стать ключом к созданию эффективных терапевтических методов, которые помогут справляться с последствиями старения.

В исследовании состояния оксидативной системы организма были выбраны несколько ключевых маркеров, которые позволяют оценить уровень окислительного стресса и антиоксидантной защиты. Одним из основных маркеров является малоновый диальдегид (МДА), который представляет собой продукт конечного окисления липидов. При анализе редокс-баланса у пациентов, страдающих от возрастных и нейродегенеративных заболеваний, было установлено, что концентрация МДА в плазме крови этих пациентов в два раза превышает таковую у здоровых людей, входящих в контрольную группу. Это указывает на усиление окислительных процессов и повреждение клеточных мембран у больных.

Другим важным компонентом, который используется для оценки состояния антиоксидантной системы, является супероксиддисмутаза (СОД). Этот фермент играет ключевую роль в защите клеток от свободных радикалов. В ходе исследования было обнаружено, что активность СОД в эритроцитах пациентов с возрастными и нейродегенеративными патологиями оказывается в десять раз ниже, чем у контрольной группы. Это снижение активности СОД может свидетельствовать о том, что организм не в состоянии эффективно справляться с окислительным стрессом.

Кроме того, в исследовании рассматривались компоненты белковых фракций, среди которых церулоплазмин, являющийся феррооксидазой, содержащей медь. Этот фермент также является важным элементом антиоксидантной защиты. Результаты показали, что концентрация церулоплазмينا в плазме у пациентов с нейродегенеративными и возрастными заболеваниями в два с половиной раза ниже, чем у здоровых людей. Это может указывать на дефицит антиоксидантных защитных механизмов у данной категории пациентов.

Не менее важным маркером является каталаза, еще один фермент, который участвует в антиоксидантной системе организма. Анализ показал, что активность каталазы в эритроцитах у пациентов с возрастными и нейродегенеративными заболеваниями в два раза ниже, чем у контрольной группы. Это также подтверждает наличие нарушений в системе защиты от окислительного стресса.

Дополнительно, в исследовании была оценена частота хромосомных aberrаций и разрывов ДНК, которые увеличиваются с возрастом. Это увеличение свидетельствует о том, что процессы репарации ДНК ухудшаются с возрастом, что может быть связано с воздействием свободных радикалов.

Таким образом, результаты исследования дают возможность оценить важность оксидативного стресса и состояния антиоксидантной системы для понимания патогенеза возрастных и нейродегенеративных заболеваний, а также для разработки методов их профилактики и лечения.

Цель данной работы заключается в проведении комплексной оценки определенных показателей состояния оксидативной системы организма, что является важной частью полного описания модели старения у нечеловекообразных приматов.

В рамках исследования были выбраны несколько групп приматов, среди которых находились макаки яванские, павианы гамадрилы и макаки резусы. Эти животные были разделены на две возрастные категории: молодые особи в возрасте от 4 до 8 лет (включая 6 самок и 7 самцов) и более взрослые особи в возрасте от 20 до 30 лет (включая 6 самок и 5 самцов). Также в исследование вошли два самца павианов гамадрилов, чей возраст колебался от 27 до 33 лет, и три самца макаков резусов в возрасте от 21 до 25 лет. Все эти приматы были рождены и содержались в вольерах питомника Курчатовского комплекса медицинской приматологии.

Объектами исследования стали образцы биологического материала, включая цельную кровь, сыворотку, плазму, гемолизат и костный мозг. Для оценки состояния оксидативного стресса мы выбрали несколько ключевых показателей. В частности, особое внимание было уделено продукту конечного окисления липидов — малоновому диальдегиду (МДА), а также ферментативным компонентам антиоксидантной системы организма, таким как супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза. Кроме того, мы исследовали состав белковых фракций и частоту хромосомных aberrаций, что также может служить индикатором состояния клеток и организма в целом.

Измерение уровня малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови проводилось с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для этого использовался хроматограф типа «1100 Series» фирмы Agilent, который был оснащен диодно-матричным детектором. Для обнаружения МДА применялась дериватизация с использованием тиобарбитуровой кислоты, что позволяло получить триметиновый комплекс с характерной розовой окраской, максимальная длина волны которого составила 532 нм [2].

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) проводилось в эритроцитарном гемолизате. Методика заключалась в ингибировании реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД. Супероксидные анион-радикалы, которые образуются в результате одного из этапов окислительных процессов, играют одновременно роль как продукта, так и участника этих реакций. Это подчеркивает важность изучения антиоксидантной системы, так как она защищает клетки от повреждений, вызванных оксидативным стрессом [3].

Активность каталазы была определена с использованием метода, который основывается на образовании комплекса, окрашенного в желтый цвет. Этот комплекс формируется в результате реакции неразрушенной перекиси водорода с молибдатом аммония в процессе каталазной реакции. Для измерения полученного результата использовался спектрофотометр, который позволял оценивать экстинкцию как опытной, так и контрольной проб. Измерения проводились при длине волны 400 нм, а в качестве растворителя использовалась дистиллированная вода, помещенная в кювету с толщиной слоя 1,0 см, что обеспечивало точность получаемых данных [4].

Определение компонентов белковых фракций проводили методом биофизической акустики. Он заключается в измерении резонансных частот и последующей математической обработке полученной информации. Основной принцип метода определения белковых фракций состоит в измерении скорости ультразвука как в сыворотке, так и в модифицированной сыворотке крови, которая не содержит β - и γ -глобулины. Это позволяет получить более точные результаты, поскольку исключает влияние определенных белков на измерения.

Для культивирования клеток использовался стандартный полу-микрометод, который применяется для культивирования лимфоцитов, взятых из периферической крови человека, с некоторыми модификациями, направленными на улучшение условий для роста клеток. Важным аспектом исследования является количественная оценка числа хромосом, которая проводилась с использованием метода, основанного на определении митотической активности клеток, модального числа хромосом и выявлении полиплоидных клеток в исследуемом материале.

Митотическая активность клеток, взятых из культур периферической крови обезьян, определялась на рутинно окрашенных препаратах, при этом для подсчета использовалось 1000 клеток, что позволяло получить репрезентативные данные. Анализ модального числа хромосом проводился на основе 100 рутинно окрашенных метафазных пластинок, что обеспечивало достаточную выборку для статистически значимых выводов. Доля полиплоидных клеток также оценивалась на выборке, состоящей из 1000 рутинно окрашенных метафазных пластинок, которые были исследованы на 3-4 препаратах, что позволяло получить более надежные результаты о состоянии клеток и их хромосомного набора.

Полученные результаты. Повышенный уровень малонового диальдегида (МДА) в биологических жидкостях организма может служить важным индикатором, указывающим на наличие повреждений клеток и тканей, а также на риск развития различных заболеваний, связанных с оксидативным стрессом. К таким заболеваниям относятся, в частности, сердечно-сосудистые заболевания, диабет и другие патологии, которые могут негативно сказаться на здоровье человека и животных. Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволило с высокой степенью точности и надежности измерить концентрации МДА и жирорастворимых витаминов в крови приматов. Это стало возможным благодаря тому, что

традиционные методы, такие как иммуноферментный анализ, не могли обеспечить такую же точность в получении данных.

В ходе анализа полученных результатов для макак яванских, представляющих собой приматов различных полов и возрастных групп, было установлено, что у животных более старшего возраста уровень МДА значительно выше по сравнению с молодыми особями. Например, у самок старшего возраста уровень МДА составил 1,060 мкмоль/л, тогда как у самцов в той же возрастной группе этот показатель равен 0,787 мкмоль/л. В то же время у молодых особей этот уровень оказался ниже: у самок он составил 0,789 мкмоль/л, а у самцов – 0,583 мкмоль/л.

Таким образом, независимо от пола, можно наблюдать, что у возрастных животных уровень МДА выше, чем у их более молодых сородичей. При анализе медианных значений выборки также было отмечено, что у самок уровень МДА в аналогичной возрастной категории превышает таковой у самцов. Это может свидетельствовать о том, что у самок в процессе старения происходит более выраженное окислительное повреждение клеток, что требует дальнейшего изучения и анализа. Результаты исследования подчеркивают важность мониторинга уровня МДА как показателя состояния здоровья приматов и, возможно, других животных, а также их потенциальной предрасположенности к различным заболеваниям, связанным с оксидативным стрессом.

Избыточное количество супероксиддисмутазы (СОД) в организме приводит к накоплению перекиси водорода в мозговой ткани, что наблюдается в процессе старения. Это явление может объяснить, почему у людей с синдромом Дауна наблюдается более раннее старение. Важно отметить, что активность данного фермента значительно возрастает в начальной стадии патологических процессов. Однако, по мере прогрессирования заболевания и перехода в стадию декомпенсации, наблюдается снижение активности СОД.

Снижение активности этого фермента также характерно для острого печеночного недостатка, а также у людей с различными нарушениями иммунной системы, включая состояния иммунодефицита и аутоиммунные заболевания. У млекопитающих дефицит каталазы, фермента, отвечающего за детоксикацию активных форм кислорода (АФК), приводит к снижению способности клеток и тканей справляться с этими вредными веществами. Это может быть связано с множеством негативных для здоровья состояний, таких как преждевременное старение, диабет, заболевания сердечно-сосудистой системы, болезни почек, образование опухолей, бесплодие и даже поседение волос.

При анализе активности ферментов СОД и каталазы были получены интересные данные. Например, активность СОД у мужских особей оказалась выше, чем у женских. У молодых самцов этот показатель превышает таковой у пожилых. Конкретные цифры показывают, что активность СОД у самок в возрастной группе составляет 2483,755 U/мин/гHb, в то время как у самцов она равна 2719,379 U/мин/гHb. У молодых самок активность СОД составляет 1976,930 U/мин/гHb, тогда как у молодых самцов этот показатель достигает 2895,126 U/мин/гHb.

Что касается активности каталазы, то у молодых самцов (0,095 ммоль H₂O₂/мин/г Hb) она также выше по сравнению со зрелыми особями (0,069 ммоль H₂O₂/мин/г Hb). Интересно, что у самок уровень активности каталазы практически не зависит от возраста (0,109-0,116 ммоль H₂O₂/мин/г Hb), что может указывать на определенные физиологические особенности или механизмы, регулирующие этот фермент у женских особей. Данные исследования подчеркивают важность понимания активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД и каталаза, в контексте здоровья и старения, а также их роли в патогенезе различных заболеваний. Это знание может помочь в разработке новых подходов к профилактике и лечению состояний, связанных с окислительным стрессом и старением.

Наиболее распространенную категорию белков, находящихся в человеческой крови, представляют альбумины и составляют примерно 60% от общего объема белков, содержащихся в плазме. Эти белки обладают высокой растворимостью в воде и играют важнейшую роль в организме, выполняя функции транспортировки различных веществ. В частности, альбумины отвечают за перенос гормонов, лекарственных средств и других биологически активных соединений, что делает их незаменимыми для нормального функционирования организма.

Кроме того, глобулины составляют группу белков, которые имеют меньшую растворимость в воде по сравнению с альбуминами. Глобулины подразделяются на несколько подгрупп, включая альфа-1, альфа-2, бета-1, бета-2 и гамма-глобулины. Каждая из этих подгрупп включает белки, обладающие уникальными функциями и различной химической структурой, что подчеркивает их разнообразие и важность в биохимических процессах.

Интересно отметить, что содержание общего белка в крови животных различается в зависимости от их возраста. У возрастных особей уровень общего белка оказывается выше, чем у молодых. Например, у самцов уровень общего белка составляет 71,15 г/л у старших особей и 63,08 г/л у молодых, тогда как у самок эти значения составляют 75,07 г/л и 66,94 г/л соответственно. Это различие может быть связано с множеством факторов, включая метаболизм, уровень физической активности и общее состояние здоровья.

Также стоит упомянуть, что процентное содержание альбумина в белковых фракциях имеет тенденцию к снижению с возрастом. У самцов процент альбумина составляет 46,82% у старших особей и 52,83% у молодых, в то время как у самок эти цифры равны 49,65% и 51,43% соответственно. Это может свидетельствовать о том, что с возрастом происходит изменение в белковом составе плазмы, что может влиять на различные физиологические процессы.

Фракция α -1-глобулинов включает в себя такие белки, как α -1-антитрипсин, α -1-липопротеид и кислый α -1-гликопротеид. Увеличение уровня этих белков наблюдается в ответ на острые воспалительные процессы,

патологии печени, а также в ситуациях, связанных с тканевым распадом или клеточной пролиферацией. Интересно, что содержание α -1-глобулинов также возрастает с возрастом животных. У самцов уровень α -1-глобулинов составляет 5,67% у старших особей и 4,96% у молодых, в то время как у самок эти показатели равны 5,67% и 5,07% соответственно.

Фракция γ -глобулинов играет важную роль в функционировании иммунной системы и включает в себя различные классы иммуноглобулинов, таких как IgA, IgM и IgG. Эти белки являются ключевыми компонентами, отвечающими за защиту организма от инфекций и других патогенов. Повышение уровня γ -глобулинов обычно наблюдается при активизации иммунной системы, что происходит, когда организм сталкивается с инфекциями или воспалительными процессами. В таких случаях происходит увеличение выработки антител, которые помогают нейтрализовать вредные микроорганизмы, а также аутоантител, что может быть связано с аутоиммунными заболеваниями.

С другой стороны, снижение концентрации γ -глобулинов может указывать на наличие состояний, таких как первичная или вторичная гипогаммаглобулинемия. Эти состояния приводят к ослаблению иммунной системы, что делает организм более уязвимым к инфекциям и другим заболеваниям. Важно отметить, что уровень γ -глобулинов может варьироваться в зависимости от возраста животных. Исследования показывают, что у возрастных особей содержание γ -глобулинов значительно выше, чем у молодых. Например, у самцов уровень составляет 23,81% в возрастной группе и 19,54% среди молодых, в то время как у самок эти показатели равны 23,22% и 20,29% соответственно.

В дополнение к этому, в области глобулярных фракций можно обнаружить наличие отдельной полосы, известной как М-градиент. Эта полоса состоит из белков, которые вырабатываются злокачественными клонами В-лимфоцитов и является характерным признаком миеломной болезни. Миеломная болезнь – это злокачественное заболевание, связанное с избыточным производством аномальных иммуноглобулинов, что может привести к различным осложнениям. Также стоит отметить, что М-белок может быть выявлен не только у пациентов с миеломной болезнью, но и при других состояниях, таких как хронические гепатиты и цирроз печени. Он также может встречаться у пожилых людей, даже если у них нет явных клинических проявлений патологии. Таким образом, γ -глобулины и их уровень в организме являются важными показателями состояния иммунной системы и могут служить ключевыми маркерами для диагностики различных заболеваний.

Наблюдается выраженная связь между возрастом, составом белков и состоянием здоровья животных, что подчеркивает необходимость мониторинга уровня белков в крови для оценки физиологического состояния и выявления возможных патологий.

В ходе анализа различных кариотипов клеток было установлено, что они демонстрируют значительную стабильность в отношении количества хромосом. В большинстве случаев модальное число хромосом оказалось диплоидным, что соответствует значению $2n=42$. Однако в культурах клеток наблюдался небольшой диапазон изменчивости, который колебался от 1 до 4 хромосом. Эта изменчивость, скорее всего, возникла из-за случайных потерь хромосом в процессе кариотипирования, а также варьировала в зависимости от возраста исследуемых организмов, но при этом не превышала установленного модального числа хромосом.

Кроме того, было отмечено, что процент клеток с полиплоидизацией изменялся среди исследуемых обезьян в зависимости от их возраста. Это может указывать на то, что старение влияет на клеточные процессы, приводя к изменению хромосомной структуры. Важно также отметить, что митотический индекс, который отражает активность клеточного деления, не был высоким. Это соответствует уже известным данным, свидетельствующим о том, что с возрастом происходит снижение клеточного роста и деления.

При количественной оценке хромосом в культуре клеток лимфоцитов возрастных приматов, таких как павианы гамадрилы и макаки резус, было замечено, что с увеличением возраста наблюдается рост диапазона изменчивости числа хромосом. Этот диапазон изменялся от 1 до 4 хромосом при подсчете 100 клеток. В то же время, митотическая активность снижалась, что также подтверждается данными, где она колебалась от 8 до 4 на 100 клеток. Это подчеркивает, что старение влияет не только на стабильность хромосом, но и на общую активность клеток, что может иметь важные последствия для понимания процессов старения и их влияния на здоровье приматов в целом.

Выводы. Исследование различных показателей состояния оксидативной системы организма, основанное на анализе продуктов перекисного повреждения клеток и активности ферментов, составляющих антиоксидантную защиту, дало интересные результаты. В ходе анализа было установлено, что с увеличением возраста наблюдается рост содержания окисленных форм, среди которых особенно выделяется малоновый диальдегид (МДА). Это свидетельствует о нарастающем оксидативном стрессе, который может оказывать негативное влияние на клетки и ткани организма.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) была зафиксирована на более высоком уровне у самцов всех возрастных групп. Это может указывать на различия в метаболических процессах между полами, а также на то, что мужские особи имеют более выраженные механизмы защиты от окислительного стресса. Однако, стоит отметить, что активность каталазы, другого важного антиоксидантного фермента, изменяется с возрастом только у самцов и, как правило, имеет тенденцию к уменьшению. Это также наблюдается и в отношении активности СОД, что может свидетельствовать о снижении защитных механизмов организма с течением времени.

В ходе сравнительного анализа маркеров окислительного стресса и состава белковых фракций у возрастных животных была выявлена повышенная реакция со стороны иммунной системы, что может указывать на наличие

воспалительных процессов. Такие процессы, как известно, часто сопровождают старение и могут существенно влиять на общее состояние здоровья животных.

Кроме того, результаты исследования также показали, что структурные aberrации хромосом являются одним из типов генетических нарушений, которые, безусловно, вносят свой вклад в сложный многофакторный процесс старения у приматов. Эти изменения в хромосомах могут приводить к различным нарушениям в клеточном метаболизме и, как следствие, ускорять процесс старения, что подчеркивает важность изучения генетических аспектов в контексте возрастных изменений.

Таким образом, полученные данные могут быть полезны для дальнейших исследований в области геронтологии и медицины, направленных на понимание механизмов старения и разработки методов его замедления.

Данная работа выполнена в рамках государственного задания с использованием оборудования центра коллективного пользования «Примат».

Список литературы / References:

1. Листов М.В. Концентрация свободных радикалов в организме млекопитающих в условиях изменения активности супероксид-генерирующей и антиоксидантной систем. *Вестник Российской военно-медицинской академии*, 2014, № 1 (45), с. 121-126 [Listov M.V. Concentration of free radicals in the mammalian body under conditions of changes in the activity of superoxide-generating and antioxidant systems. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2014, № 1 (45), pp. 121-126. (In Russ.)].
2. Чжу О.П. Оценка интенсивности свободно-радикальных процессов по изменению концентрации малонового диальдегида при различных способах парентерального введения люминола натрия. *Медико-фармацевтический журнал «Пuls»*, 2023, т. 25, № 4, с. 127-133 [Chzhu O.P. Assessment of the intensity of free radical processes by changing the concentration of malonic dialdehyde in various methods of parenteral drug treatments of sodium luminol. *Medical & pharmaceutical journal "Pulse"*, 2023, vol. 25, no. 4, pp. 127-133 (In Russ.)].
3. Сирота Т.В. RU 2144674 C1, 2000. Опубл. 20.01.2000, Бюлл. № 2. [Sirota T.V. RU 2144674 C1, 2000. Published 20.01.2000, Bull. no. 2. (In Russ.)].
4. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988, № 1, с. 16-19 [Korolyuk M.A. *Method for determining catalase activity*. Lab. case. 1988, no. 1, pp. 16-19 (In Russ.)].

ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS AS A TOOL FOR UNDERSTANDING AGING PROCESSES

Chzhu O.P., Araviashvili D.E., Rudenko N.S., Marinich I.I.

Kurchatov complex of medical primatology

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

Received 30.07.2025

Abstract. The article assesses oxidative system indicators as part of a comprehensive model of aging in non-human primates, the closest animals to humans genetically, morphologically, and physiologically. Analysis revealed increased oxidized forms with age, notably malondialdehyde (MDA). Superoxide dismutase (SOD) activity was higher in males across all age groups, suggesting sex-based metabolic differences and stronger male antioxidant defense. Catalase activity changed with age only in males, generally decreasing, similar to SOD, indicating declining protective mechanisms. Comparative analysis of oxidative stress markers and protein fractions in aged animals showed an elevated immune response, potentially indicating inflammation. Chromosomal aberrations were identified as a genetic factor contributing to primate aging. These findings are valuable for gerontology and medicine research on aging mechanisms and mitigation.

Key words: *body antioxidant system, markers, aging models, primates.*

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК HeLa МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Мутовкин П.А., Ращенкова И.И., Рындин А.Ю., Дегтяр А.Д., Мосунов А.А.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 30.07.2025

Аннотация. Одними из главных причин смертей людей по всему миру на сегодняшний день являются онкологические заболевания. Помимо высокой смертности они характеризуются сложностью диагностики, особенно на ранних стадиях развития. Согласно литературным данным, одним из перспективных и сравнительно оперативных способов диагностики может быть исследование образцов при помощи атомно-силовой микроскопии. Поскольку здоровые клетки отличаются от раковых по ряду микромеханических параметров. В данной работе мы получили в контактном режиме сканирования качественные изображения осажденных и зафиксированных клеток онкологической линии HeLa, которые представляют собой один из часто используемых лабораторных объектов для тестирования методик терапии раковых заболеваний. По полученным сканам были построены профили сечения, по которым измерили размеры клеток, а именно их диаметр и высоту в области ядра. Эти данные оказались согласуются с результатами измерений, проведенных другими методами для аналогичных клеток. Также в работе мы рассматриваем один из микромеханических параметров, а именно адгезию поверхности клеток HeLa и кантилевера. С помощью атомно-силового микроскопа Ntegra Aura были получены средние значения Δz , и по ним рассчитана сила адгезии, которая составила величину $F = 114,63$ нН.

Ключевые слова: онкологическая клеточная линия HeLa, атомно-силовой микроскоп, адгезия.

Исследование раковых клеток и способов терапии рака имеет большое значение, т.к. по данным Всемирной организации здравоохранения онкологические заболевания занимают одно из лидирующих мест среди причин смертей по всему миру [1]. При этом, для характеризации состояния клетки и ее реакции на различные раздражители и воздействия можно использовать различные методы: оптической, флуоресцентной и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, спектроскопии и спектрофотометрии, МТТ-тест и подобные методики. С изобретением в 1986 году сканирующего зондового микроскопа появилась возможность проводить исследования разнообразных микрообъектов еще одним способом – при помощи регистрации его механического отклика на воздействие. При этом, данная методика характеризуется максимальной детализацией (до нанометрового масштаба), высокой точностью анализа и чувствительностью измерительного оборудования. Несмотря на то, что клетки в живом организме в большинстве случаев проявляют свою физиологическую функцию в составе органа или ткани, в литературе представлено большое количество исследований, доказывающих, что анализ даже отдельных клеток имеет большое значение и может дать полезную информацию об их функциональном состоянии [2-4].

К настоящему времени разработано и внедрено в практику несколько методов исследования механических свойств клеток: атомно-силовая микроскопия (АСМ), микрофлюидный метод, аспирация микропипеткой, метод параллельных пластин, магнитный «пинцет», методы оптического растяжения, акустические методы и отслеживание частиц методом микрореологии [2]. В сканирующей зондовой микроскопии можно реализовать методики атомно-силовой спектроскопии, при которой снимается зависимость величины изгиба кантилевера от степени выдвижения пьезотрубки сканера (зависимость $DFL(Z)$). Используя зависимость $DFL(Z)$ и зная жесткость кантилевера, можно вычислить силы, действующие на зонд в точке измерения, в том числе и силу адгезии.

В последние десятилетия развитие методов и экспериментальной базы атомно-силовой микроскопии позволило широко применять данный метод для исследования микромеханических свойств отдельных клеток и даже их органелл (в первую очередь ядра и прилегающих к нему областей). В настоящее время, для исследователей доступен широкий диапазон АСМ-зондов, позволяющих получать информацию о механических свойствах клетки в целом, используя кантилеверы со специальными сферическими наконечниками, жертвуя при этом разрешением из-за размера наконечника зонда, либо с высокой детализацией и некоторым риском повреждения объекта исследования, работая с классическими зондами с пирамидальным наконечником. Следует отметить, что в литературе отмечена большая гетерогенность клеток разных тканей [3,5,6], а также значительные отличия свойств клеток одного типа между собой [3,7-9]. Следует отметить, что несмотря на эти преимущества, у метода атомно-силовой микроскопии есть и существенный недостаток: в одном эксперименте есть возможность получить данные о механических свойствах весьма ограниченного количества клеток, при этом, на эти измерения придется потратить довольно продолжительное время [3].

Клеточный механотип связан с заболеваниями человека [3,10,11] и используется в качестве диагностического биомаркера при выявлении клинических заболеваний [12]. Определение механотипа на уровне отдельной клетки является необходимым условием для количественного исследования внутренних механических свойств клетки, включая жёсткость, деформируемость и динамическое силовое взаимодействие, то есть силу

натяжения, между клеткой и внеклеточным микроокружением [13]. Однако измерить механические свойства на уровне отдельной клетки очень сложно из-за её небольшого размера и малой величины механической силы [3,14].

Также стоит отметить, что методы сканирующей зондовой микроскопии для определения механических свойств клеток являются довольно перспективным направлением, т.к. дают возможность анализировать клетки без использования дорогостоящих флуоресцентных меток и специальных техник окрашивания. Кроме того, несомненным преимуществом данной методики является возможность работать в условиях, близких к физиологическим [3].

В данной работе была использована клеточная линия рака молочной железы HeLa. Эта линия была получена 8 февраля 1951 года из раковой опухоли шейки матки пациентки Генриетты Лакс. Биопсия опухоли была проведена врачом Лоуренсом Уортоном. Образцы тканей для исследования были переданы клеточному биологу Джорджу Отто Гаю. Его лаборантка Мэри Кубичек использовала метод роликовых пробирок для культивирования клеток. Уникальность полученных клеток заключалась в том, что они удваивались каждые 20-24 часа, могли выживать и размножаться в лабораторных условиях, а также не имели предела деления, характерного для нормальных клеток. Открытие бессмертных клеток стало революционным для медицины, так как позволило проводить множество исследований в области онкологии, вирусологии и генетики. Клеточная линия HeLa до сих пор активно используется в научных лабораториях по всему миру, что подчеркивает её значимость в развитии современной науки.

Культивирование клеточной линии производилось с использованием полной питательной среды DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотиков (пенициллин, стрептомицин). Культура поддерживалась при температуре воздуха 37°C, 90% влажности, концентрации CO₂ равной 5% в культуральных флаконах объемом 25 мл (Eppendorf, США). Инкубация производилась в культиваторе Binder (Германия).

Клетки снимали с флакона с использованием растворов Версена и Трипсина (1:1) с инкубацией в культиваторе на протяжении 7 минут, затем во флакон вносили 5 мл полной питательной среды для прекращения реакции расщепления пептидных связей. Далее содержимое флакона центрифугировали в течении 5 минут при 1000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и ресуспензировали в 3 мл полной питательной среды. Полученную клеточную суспензию вносили в конфокальную чашку со стеклянным дном в объеме 500 мкл и культивировали в инкубаторе сутки.

При контактном методе сканирования возможно силовое воздействие на клетки и даже при минимальном давлении зонд может сдвигать нефиксированные клетки. Таким образом фиксация клеток является необходимым этапом подготовки образца для получения качественных результатов при исследовании в атомно-силовой микроскопии.

Для фиксации клеток был выбран оптимальный метод с использованием 4% раствора формальдегида, поскольку данная концентрация обеспечивает максимальную сохранность клеточной структуры при минимальном травмировании. Механизм действия формальдегида основан на образовании межмолекулярных сшивок между аминокислотами белков и нуклеиновыми кислотами, что позволяет стабилизировать клеточные компоненты без существенного искажения их естественной морфологии. При более высоких концентрациях формальдегида, наблюдались дегидратация клеток, значительное уменьшение их диаметра и чрезмерное уплотнение клеточной структуры, затрудняющее последующую обработку.

Процесс подготовки клеток к фиксации включал удаление полной питательной среды и трёхкратное промывание раствором DPBS. Затем добавляли 4% раствор формальдегида с последующей 20-минутной инкубацией при комнатной температуре. После этого раствор формальдегида удалялся, и клетки помещались на 10 минут в 3% раствор BSA. Далее клетки трижды осторожно отмывались раствором DPBS.

Исследование поверхности раковых клеток, зафиксированных в чашке Петри, проводилось с помощью атомно-силового микроскопа Ntegra Aura в контактном режиме с использованием кантилевера NSG10/TiN, представляющего собой покрытое слоем нитрида титана толщиной 20-30 нм микромеханическое кремниевое устройство, состоящее из прямоугольного 3,6×1,6 мм кремниевого основания толщиной 0,4 мм. По центру меньшей стороны верхней грани этого основания сформирована балка длиной 100 мкм и шириной 35 мкм. Верхняя поверхность балки несёт однородное отражающее TiN-покрытие. На свободном конце нижней стороны балки находится острый наконечник с углом при вершине меньше 22° и радиусом кончика около 35 нм.

На рисунке 1 приведен скан топографии клеток, полученный в контактном режиме с постоянной силой прижатия кантилевера $F_{\text{приж}}=4$ нА. Область для сканирования была выбрана 30×30 мкм, число точек - 256×256, скорость сканирования 0,5 Гц. Как видно из рисунка 1, клетки имеют близкую к овальной форму, края неровные, в области А, В, С, D прослеживаются ядра. Неровности на краях клеток могут быть как артефактом сканирования, так и являться результатом взаимодействия зонда с клеточной оболочкой.

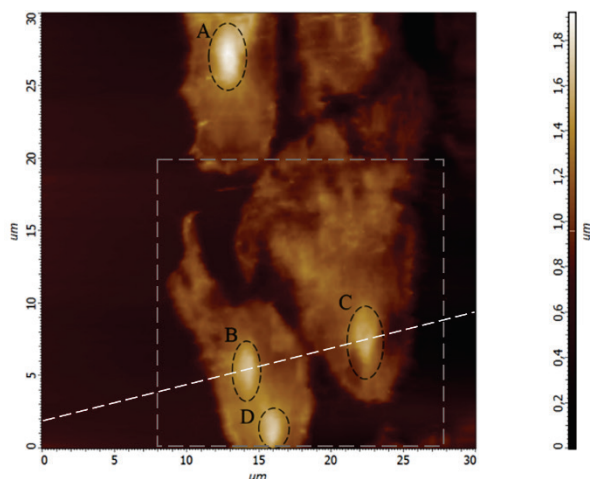


Рисунок 1. Сканы топографии раковых клеток HeLa: черный пунктир – ядра; серый пунктир – область, в которой проводилась атомно-силовая спектроскопия; белый пунктир – линия, вдоль которой строился профиль

Ниже на рисунке 2 приведен профиль скана вдоль линии, проходящей через вершины областей В и С (на рис. 1 показана белым пунктиром). Это необходимо, чтобы убедиться в целостности клеток и определения диаметров и высоты их ядер. Поскольку они столь существенно меняются в результате фиксации, что невозможно ориентироваться только на скан атомно-силового микроскопа [15]. Так диаметр ядра В равен 2 мкм, высота – 1,3 мкм, а для ядра С: диаметр – 2 мкм, высота – 1,1 мкм, что согласуется с литературными данными для клеточной культуры HeLa.

Далее на полученном скане методом атомно-силовой спектроскопии была проанализирована область 10×10 точек (на рис. 1 выделена серым пунктиром). Выбор данной области обусловлен тем, что в нее попадает несколько исследуемых клеток и минимум свободной подложки. В момент начала измерения зонд отводится от поверхности на расстояние $Z_{up}=600$ нм и осуществляется измерение кривой подвода DFL(Z) (рис. 3, красная кривая) путем принудительного опускания зонда до нижней точки $Z_{down}=-50$ нм. После этого происходит измерение кривой отвода (рис. 3, синяя кривая) до верхней точки. За начало координат принимается значение Z, соответствующее положению зонда в контакте с образцом при заданной силе прижима.

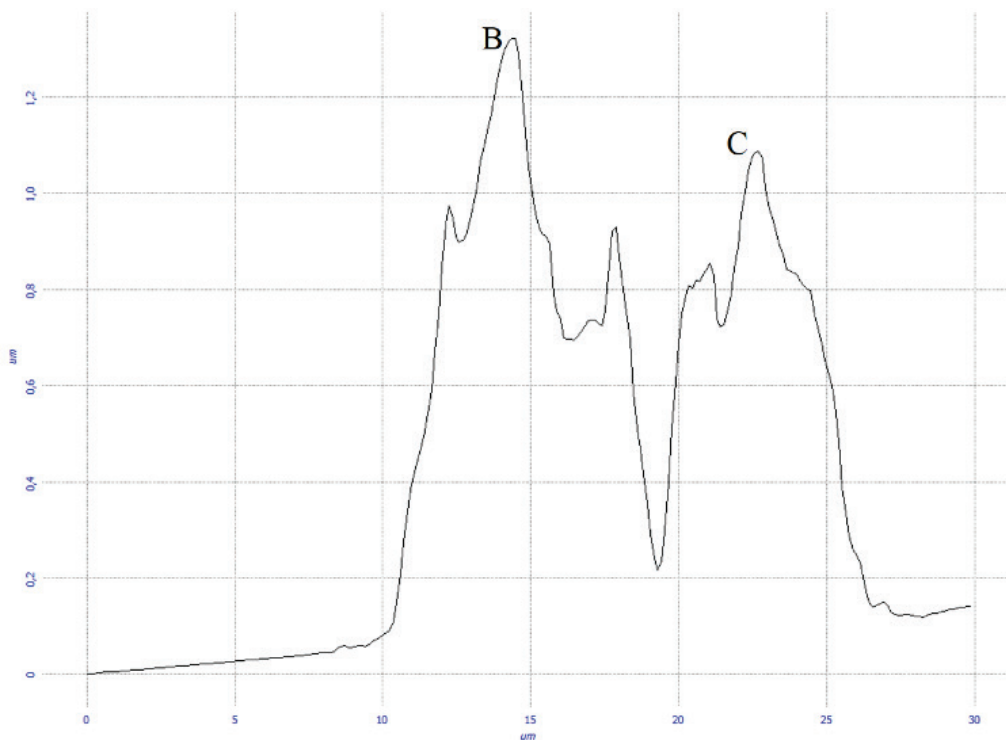


Рисунок 2. Профиль скана вдоль ядер В и С

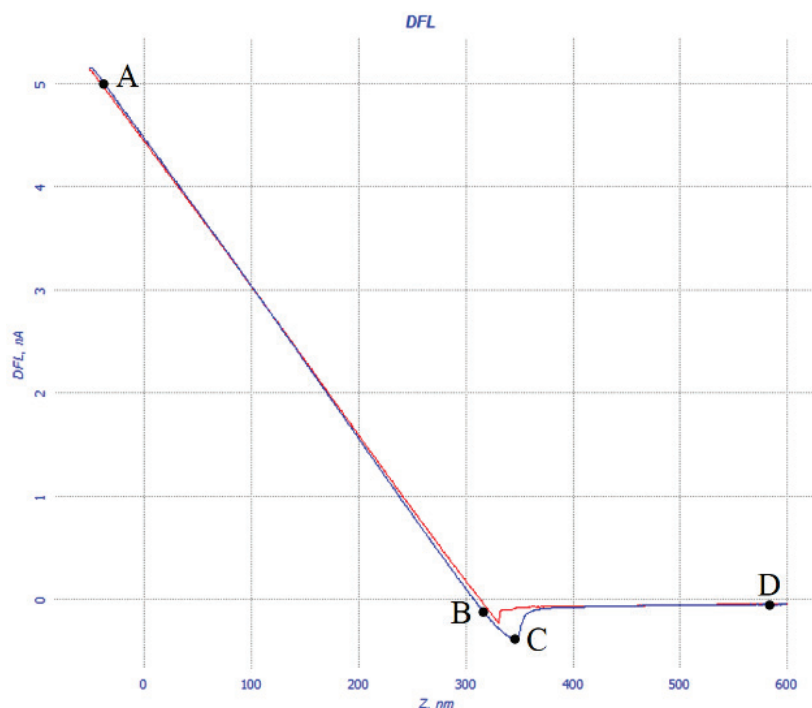


Рисунок 3. Кривые подвода (красная) и отвода (синяя) для одной точки

Горизонтальный участок DC указывает на сближение кантилевера к образцу при отсутствии взаимодействия между ними. По мере приближения к поверхности на зонд начинают оказывать влияние силы Ван-дер-Ваальса, сначала действуют силы отталкивания ($DFL < 0$), а затем силы притяжения ($DFL > 0$), которые достигают максимальных значений в непосредственной близости от поверхности клеток. Скачок в точке С указывает на присутствие сил адгезии, приводящих к возникновению в точке воздействия зонда на поверхность обратимых упругих деформаций, описываемых законом Гука – сила противодействия прямо пропорциональна изменению линейного размера перемещения кантилевера Δz :

$$F = K * \Delta z, \quad (1)$$

где $K = N/m$ – коэффициент жесткости кантилевера ($K = 5,5 \text{ Н/м}$). Совпадение линейных участков АВ кривых подвода и отвода, а также одинаковый их наклон, подтверждают однородность механических свойств приповерхностной области клеток, а также указывают на правильную настройку системы АСМ. При дальнейшем движении кантилевера к образцу начинают преобладать силы отталкивания, это может привести к возникновению необратимых пластических деформаций клеток, что в данной работе мы не рассматривали.

Затем для каждой точки были получены значения Δz с помощью встроенной функции в программе атомно-силового микроскопа Nova, вкладка Curves Analysis-Adhesion и было рассчитано среднее значение. Эти данные приведены в таблице 1.

Таким образом, сила адгезии раковых клеток HeLa в состоянии без воздействия на нее биологически активных веществ составляет величину $F = 114,63 \text{ нН}$.

Данная работа является первым этапом исследования микромеханических свойств клеток HeLa в нашей лаборатории. Мы успешно отработали методики фиксации для зондовой микроскопии, сканирования клеток в режиме атомно-силовой микро- и спектроскопии, измерения и расчетов их микромеханических параметров. Полученное значение силы адгезии будет далее сравниваться с аналогичными величинами, измеренными для клеток после введения в них суспензии углеродных наночастиц, а также их комплексов с различными антиопухолевыми препаратами и биологически активными соединениями. Как следует из литературы, вариации данных параметров могут быть использованы для характеристики отклика клеток на воздействие препаратов.

Таблица 1. Значения изменений линейного размера перемещения кантилевера Δz для каждой точки

№	Δz , нм	№	Δz , нм	№	Δz , нм	№	Δz , нм
1	30,815	26	31,419	51	7,854	76	19,939
2	30,815	27	12,084	52	9,667	77	21,752
3	30,211	28	7,25	53	9,063	78	15,105
4	30,815	29	6,042	54	16,918	79	44,712
5	29,002	30	3,625	55	27,19	80	3,021
6	30,211	31	3,592	56	18,126	81	17,522
7	30,211	32	10,271	57	33,836	82	38,67
8	30,815	33	22,96	58	42,295	83	10,876
9	30,211	34	20,543	59	33,836	84	11,48
10	31,419	35	10,271	60	19,939	85	13,897
11	28,398	36	21,147	61	14,501	86	15,709
12	33,232	37	24,773	62	11,480	87	10,271
13	35,045	38	10,271	63	88,821	88	8,459
14	35,649	39	38,67	64	20,543	89	9,667
15	29,002	40	16,314	65	9,063	90	13,292
16	25,377	41	13,292	66	6,042	91	23,564
17	24,168	42	15,105	67	13,292	92	33,836
18	6,042	43	21,752	68	70,694	93	2,416
19	12,688	44	39,274	69	45,316	94	21,397
20	12,084	45	23,564	70	38,670	95	27,19
21	4,229	46	27,19	71	3,021	96	10,876
22	25,377	47	16,918	72	16,314	97	12,688
23	24,773	48	32,023	73	4,229	98	7,854
24	5,349	49	26,585	74	10,65	99	3,230
25	1,812	50	13,292	75	19,335	100	4,5
Ср. знач. Δz , нм							20,841

Список литературы / References:

1. Riley L., Cowan M. *Noncommunicable diseases progress monitor 2025*. Geneva: World Health Organization; 2025.
2. Hao Y., Cheng S., Tanaka Y., Hosokawa Y., Yalikun Y., Li M. Mechanical properties of single cells: Measurement methods and applications. *Biotechnology Advances*, 2020, vol. 45, p. 107648, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107648.
3. Hu Q., Sun W., Lin F., Xiong C. Mechanoinformatics: High-throughput single cell mechanical properties mapping to unravel cell heterogeneity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, vol. 169, p. 117383, doi: 10.1016/j.trac.2023.117383.
4. Li Q.S., Lee G.Y.H., Ong C.N., Lim C.T. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, vol. 374, pp. 609-613, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.078.
5. Aran D. Extracting insights from heterogeneous tissues. *Nature Computational Science*, 2021, vol. 1, pp. 247-248, doi: 10.1038/s43588-021-00061-8.
6. Altschuler S.J., Wu L.F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell*, 2010, vol. 141, pp. 559-563, doi: 10.1016/j.cell.2010.04.033.
7. Schumacher A., Rookmaaker M.B., Joles J.A., Kramann R., Nguyen T.Q., van Griensven M., LaPointe V.L.S. Defining the variety of cell types in developing and adult human kidneys by single-cell RNA sequencing. *NPJ Regenerative Medicine*, 2021, vol. 6, p. 45, doi: 10.1038/s41536-021-00156-w.
8. Lawson D.A., Kessenbrock K., Davis R.T., Pervolarakis N., Werb Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nature Cell Biology*, 2018, vol. 20, pp. 1349-1360, doi: 10.1038/s41556-018-0236-7.
9. Wang Y.H., Tao Y.C., Wu D.B., Wang M.L., Tang H., Chen E.Q. Cell heterogeneity, rather than the cell storage solution, affects the behavior of mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, vol. 12, p. 391, doi: 10.1186/s13287-021-02450-2.

10. Xu W.W., Mezencev R., Kim B., Wang L.J., McDonald J., Sulchek T. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, e46609, doi: 10.1371/journal.pone.0046609.
11. Kim J., Han S., Lei A., Miyano M., Bloom J., Srivastava V., Stampfer M.R., Gartner Z.J., LaBarge M.A., Sohn L.L. Characterizing cellular mechanical phenotypes with mechano-node-pore sensing. *Microsystems & Nanoengineering*, 2018, vol. 4, p. 17091, doi: 10.1038/micronano.2017.91.
12. Toepfner N. et al. Detection of human disease conditions by single-cell morpho-rheological phenotyping of blood. *eLife*, 2018, vol. 7, e29213, doi: 10.7554/eLife.29213.
13. Kim D.H., Wong P.K., Park J., Levchenko A., Sun Y. Microengineered platforms for cell mechanobiology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2009, vol. 11, pp. 203-233, doi: 10.1146/annurev-bioeng-061008-124915.
14. Basoli F., Giannitelli S.M., Gori M., Mozetic P., Bonfanti A., Trombetta M., Rainer A. Biomechanical characterization at the cell scale: present and prospects. *Frontiers in Physiology*, 2018, vol. 9, 1449, doi: 10.3389/fphys.2018.01449.
15. Плесскова С.Н. *Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях*. Учебное пособие. Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2011, 184 с. [Pleskova S.N. *Atomic Force Microscopy in Biological and Medical Research*. Textbook. Dolgoprudny: Intellect Publishing House, 2011, 184 p. (In Russ.)].

STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF HeLa CELLS BY ATOMIC FORCE SPECTROSCOPY

Mutovkin P.A., Raschenkova I.I., Ryndin A.Yu., Degtyar A.D., Mosunov A.A.

Sevastopol State University

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

Received 30.07.2025

Abstract. Cancer is one of the main causes of death worldwide today. In addition to high mortality, they are characterized by the complexity of diagnosis, especially in the early stages of development. According to the literature, one of the promising and relatively prompt diagnostic methods can be the study of samples using atomic force microscopy. Since healthy cells differ from cancer cells in a number of micromechanical parameters. In this work, we obtained high-quality images of sedimented and fixed HeLa cancer cells in the contact scanning mode, which are one of the frequently used laboratory objects for testing cancer therapy methods. Based on the obtained scans, cross-section profiles were constructed, according to which the cell sizes were measured, namely their diameter and height in the nucleus. These data were consistent with the results of measurements carried out by other methods for similar cells. In the work, we also consider one of the micromechanical parameters, namely the adhesion of the HeLa cell surface and the cantilever. Using an Ntegra Aura atomic force microscope, average Δz values were obtained and the adhesion force was calculated to be $F = 114.63$ nN.

Key words: HeLa cancer cell line, atomic force microscope, adhesion.

НОВЫЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ФТАЛОЦИАНИНОВ И БЕСКИСЛОРОДНОГО ГРАФЕНА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Клименко И.В.¹, Трусова Е.А.², Лобанов А.В.^{1,3}

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

² ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН
Ленинский проспект, д. 49, г. Москва, 119991, РФ

³ ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»
ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 1, г. Москва, 119991, РФ

Поступила в редакцию 31.07.2025

Аннотация. Две супрамолекулярные системы на основе фталоцианинов алюминия (AlClФц) и цинка (ZnФц) и бескислородного графена (БГр) синтезированы в водно-органической среде и изучены с помощью комплекса методов. В качестве органического растворителя использовался N,N-диметилформамид (ДМФА). БГр был получен сонохимическим методом при сочетании золь-гель синтеза и жидкофазного ультразвукового отслаивания листов графена с поверхности синтетического графита в среде ДМФА - вода ($C_{\text{ДМФА}} = 4,7$ об.%). Супрамолекулярные системы БГр – металлокомплексы фталоцианинов (МеФц) получены при титровании 2 мл раствора МеФц в ДМФА суспензией БГр в смеси ДМФА – вода. Концентрация графена в суспензии $C_{\text{Гр}} = 1.3$ вес.%. Показано, что присутствие БГр в супрамолекулярных системах препятствует агрегации фталоцианинов в водной среде и способствует их стабилизации в мономолекулярной форме. Данный факт обеспечивает полученным системам свойства, необходимые для использования их в качестве компонентов платформ векторной доставки лекарств при проведении фотодинамической терапии и ранней диагностики патологий. Оценены стабильность полученных гибридных систем, а также связывающая способность их компонентов. Полученные в результате исследования систем данные свидетельствуют о координационном взаимодействии графена с МеФц.

Ключевые слова: фталоцианин алюминия, фталоцианин цинка, бескислородный графен, супрамолекулярные системы, мономеры, агрегация.

Металлокомплексы фталоцианинов (МеФц) в настоящее время являются предметом обширных и глубоких исследований благодаря их растущему использованию в промышленных и биомедицинских целях. Универсальное применение МеФц связано с их высокой стабильностью, легкостью модифицирования функциональными группами и обладанием уникальных физико-химических свойств, таких как высокая термическая и химическая стабильность, отличные оптические свойства (поглощение в области UV-Vis диапазоне, а именно в В-диапазоне в области $\sim 300\text{--}400$ нм и Q-диапазоне - в области $\sim 600\text{--}700$ нм, (так называемое «терапевтическое окно»)), долгоживущее триплетное возбужденное состояние ($0,1\text{--}1,0$ мс) и высокий квантовый выход синглетного кислорода ($\Phi_{\Delta} \leq 0,95$).

Все эти свойства делают МеФц хорошими кандидатами при разработке компонентов для оптических датчиков и солнечных элементов, полупроводниковых и электрохромных устройств, стабильных красителей и жидкокристаллических систем, химических и биологических датчиков и запоминающих устройств [1-4]. Кроме того, благодаря своим ярко выраженным окислительно-восстановительным свойствам МеФц широко используются в качестве медиаторов или модификаторов электродов для иммобилизации ферментов, таких как глюкозооксидаза. [5]. Также, благодаря устойчивости к высоким температурам и химическим веществам и способности образовывать тонкие покрытия и пленки Langmuir-Blodgett, совместимые с микроэлектронными устройствами, МеФц широко используются в сенсорных устройствах.

Однако, благодаря своей способности поглощать и излучать свет в видимом спектре, особенно в его красной области, фотоактивные молекулы МеФц обладают также и большим потенциалом для применения в биологии и биомедицине, например, в качестве фотосенсибилизаторов (Фс) при фотодинамической терапии (ФДТ) и диагностике. При этом во многих случаях для использования МеФц на практике требуется их солубилизация в водных и водно-органических средах. Кроме того, для использования в качестве Фс, МеФц, особенно сложные структуры с переходными металлами, должны быть нетоксичными для здоровых тканей, обеспечивать высокий выход синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ при энергии возбуждения не менее 94 кДж/моль для реализации фотодинамического эффекта, иметь поглощение в красной области спектра, а также интенсивную флуоресценцию, позволяющая проводить диагностику [3,6]. Также для эффективной работы в качестве Фс принципиально важным является нахождение МеФц в мономерной форме, так как фотофизические свойства МеФц сильно зависят от соотношения мономер/агрегат в системе. В частности, присутствие димеров, тримеров и других видов агрегатов приводит к значительному сдвигу полос поглощения по сравнению с характеристиками поглощения мономерных МеФц. Кроме того, присутствие агрегатов может привести к гашению флуоресценции. С другой стороны, в случае нахождения МеФц в виде мономеров отсутствуют процессы аннигиляции

триплетных возбужденных состояний, что приводит к эффективному триплет-триплетному переносу энергии на кислород и запуску механизма фотодинамического действия.

МеФц, которые относятся к группе Фс второго поколения, удовлетворяют всем вышеупомянутым требованиям. Такие диамагнитные ионы с заполненными электронными оболочками, как Zn^{2+} , Al^{3+} и Ga^{3+} , включенные в фталоцианиновые комплексы, обеспечивают им повышенную генерацию и более долгое времени жизни триплетного состояния Фс, что в конечном итоге выражается в более высоких квантовых выходах $^1O_2$ и длительном сроке службы [7].

К сожалению, МеФц, как и все тетрапиррольные соединения, нерастворимы в воде и в биологически совместимых растворителях и имеют тенденцию к агрегации в водных средах, что значительно снижает их фотодинамическую активность [8]. Агрегация МеФс происходит из-за взаимодействий между металлическим лигандом МеФц и молекулой растворителя, а также за счет π - π взаимодействий между ароматическими системами молекул. Основными подходами при решении проблемы агрегирования МеФц являются модификация макроцикла МеФц путем замены атомов водорода различными группами, такими как алкил-, арил-, арилокси-, алкокси-, фенокси- и другие, введение объемных заместителей, которые создают стерические трудности для контакта между макроциклами, например, карбоновую кислоту и аминогруппу, замещение комплексообразующего металла в молекуле Фц, синтез фталогенных конъюгатов с углеводами, а также создание супрамолекулярных комплексов МеФц с различными макромолекулами и наночастицами, в том числе с наноструктурными коллоидными частицами и биосовместимыми полимерными наночастицами.

Также еще одним способом, который позволяет предотвратить агрегацию МеФц, является их иммобилизация на поверхности инертной твердой подложки (наноуглерода), которая ингибирует агрегацию макроциклов. При этом происходит образование супрамолекулярных комплексов с участием тераностических двумерных (2D) наноматериалов, например, графена (Гр) или материалов на его основе, в составе гибридной системы. Модификация МеФц с помощью Гр, который является отличной платформой для стабилизации МеФц приводит к образованию гибридов с улучшенными фотофизическими свойствами.

В данной работе, принимая во внимание все вышесказанное, были синтезированы в водно-органической среде и изучены с помощью различных методов две супрамолекулярные системы на основе бескислородного графена (БГр) и фталоцианинов алюминия ($AlClC_{32}H_{16}N_8$, $AlClФц$) и цинка ($ZnC_{32}H_{16}N_8$, $ZnФц$) (рис. 1). Оба МеФц являются перспективными Фс второго поколения и демонстрируют сочетание физических, химических и биологических свойств, необходимых для ФДТ, но они агрегируют в водных средах. В экспериментах чистоту и индивидуальность МеФц проверяли с помощью MALDI-масс-спектрометрии на приборе Thermo DSQ II (США), а также по электронным спектрам поглощения. Регистрацию электронных спектров проводили на спектрофотометре TU-1901 фирмы «Beijing Purkinje General Instr. Co. Ltd.» (220-900 нм).

БГр был выбран для синтеза, так как среди многих разновидностей Гр только в БГр все атомы углерода имеют sp^2 гибридизованные орбитали, объединенные в π -систему с высоким потенциалом для координационного взаимодействия. Только БГр содержит минимальное количество кислородсодержащих групп, расположенных по периферии листов. Сравнивая БГр и окисленный Гр (ГрО), следует сказать, что образовавшиеся во время синтеза ГрО кислородсодержащие функциональные группы необратимо разрушают π -электронную систему, и Гр безвозвратно теряет свои уникальные свойства. БГр – это чистый углеродный материал, в котором π -электронная система содержит минимальное количество дефектов по периферии листов и способна вступать как в кулоновское взаимодействие с образованием Ван-дер-Ваальсовых сил, так и в координационное взаимодействие.

Для биомедицинского применения очень важно получать стабильные коллоиды Гр с определенным узким распределением по размерам, при этом жидкая среда играет очень важную роль в стабилизации отдельных листов Гр и предотвращении их агломерации. В нашем случае, БГр получали комбинацией золь-гель синтеза и жидкофазного ультразвукового отслаивания в водно-органической среде листов Гр с поверхности синтетического графита (НПО «УНИХИМТЕК»), который представлял собой порошок (размер частиц 600-800 мкм) и имел следующий состав: углерод – 99,99 вес. %, сера – <10 ppm, ионы Cl^- – 10 ppm. Использовали подкисленный азотной кислотой водный раствор N,N-диметилформамида ($(CH_3)_2NC(O)H$, ДМФА, дважды перегнанный, Реахим, Россия). Концентрация ДМФА в водном растворе составляла 4,7 об.%. Навеску графита 0,5 г смешивали с 30 мл раствора ДМФА – вода и обрабатывали в ультразвуковой ванне (SW1H, 200 Вт) в течение

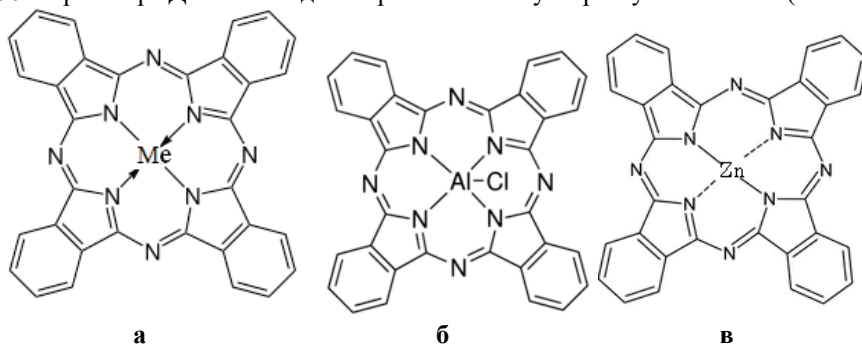


Рисунок 1. Структурные формулы МеФц (а), $AlClФц$ (б), $ZnФц$ (в)

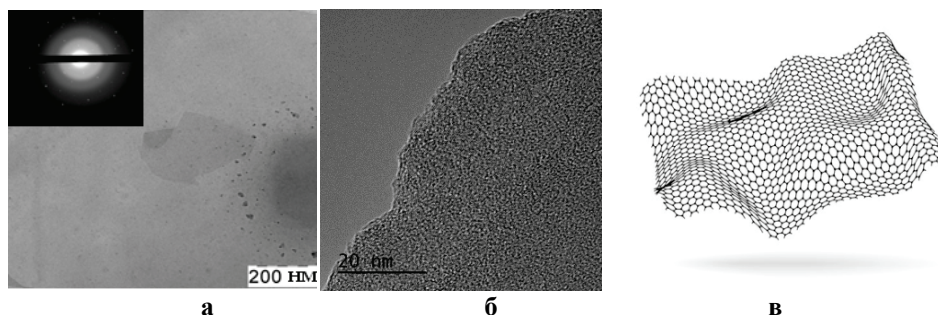


Рисунок 2. Микрофотографии, полученные с помощью ПЭМ и дифракция электронов (вставка) (а), прибор LEO-912 AB OMEGA (Carl Zeiss), работающий при 100 кВ и ПЭМ высокого разрешения (б), прибор JEM 2010 (JEOL Ltd.) частиц графена в смеси ДМФА-вода и схематическое изображение листа графена (в)

30 мин. при 60°C. Полученную взвесь после 24-х-часовой седиментации декантировали. Концентрация графена в полученной суспензии $C_{\text{гр}}=1,3$ вес %.

Использование ДМФА в экспериментах объясняется тем, что данный полярный апротонный растворитель обладает высокой сольватирующей способностью и донорно-акцепторными свойствами. Он смешивается с водой в различных соотношениях, взаимодействует с атомом металла в молекуле МеФц и в качестве сильного акцептора водородной связи очень эффективен для стабилизации катионов. Также ДМФА является гепатотоксическим соединением с уникальными антибактериальными и противовирусными свойствами и, благодаря своим уникальным параметрам растворимости, часто используется в безопасных концентрациях в качестве растворителя для фармацевтических и биомедицинских композиций.

В экспериментах мы использовали только свежеприготовленный золь, что исключает его старение и укрупнение частиц. Действие ультразвука на исходный графит приводит к разрушению сил нековалентного взаимодействия в графите, смещению слоев относительно друг друга и диспергированию отслоившихся листов в жидкую среду. ДМФА, возможно, благодаря созданию стерических помех обеспечивает образование систем Ван-дер-Ваальса в замкнутом объеме микрокапли - микрореактора.

Супрамолекулярные системы БГр - МеФц получали при титровании 2 мл раствора МеФц в ДМФА суспензией графена в смеси ДМФА-вода (0÷1 мл) состоящей в основном из 3D-частиц (с небольшой долей 2D-листов), размер которых не превышал 300 нм (рис. 2).

На рисунке 3 представлены данные спектров поглощения $\text{AlCl}_3\text{Фц}$ и ZnФц в растворе ДМФА (кривые 1 и 3) и водном растворе ДМФА (кривые 2 и 4). Кривые 2 и 4 рисунка 3 показывают значительное уширение линий спектра, резкое уменьшение интенсивности и уширение Q-полосы, а также сдвиги максимумов спектра поглощения в коротковолновую область по сравнению со спектрами поглощения фталоцианинов в ДМФА (кривые 1 и 3 рисунка 3). Эти изменения в спектре поглощения в присутствии воды в растворе обусловлены агрегационным поведением МеФц, а именно резким снижением содержания мономеров $\text{AlCl}_3\text{Фц}$ и ZnФц в смесях ДМФА - вода и значительным увеличением содержания Н-агрегатов и редко наблюдаемых J-агрегатов МеФц.

На рисунке 4 показано изменение спектров оптического поглощения $\text{AlCl}_3\text{Фц}$ и ZnФц во время титрования их растворов суспензией графена в смеси ДМФА - вода. Анализ показал, что взаимодействие МеФц с БГр приводит к значительным изменениям спектров поглощения $\text{AlCl}_3\text{Фц}$ и ZnФц по сравнению с данными рисунка

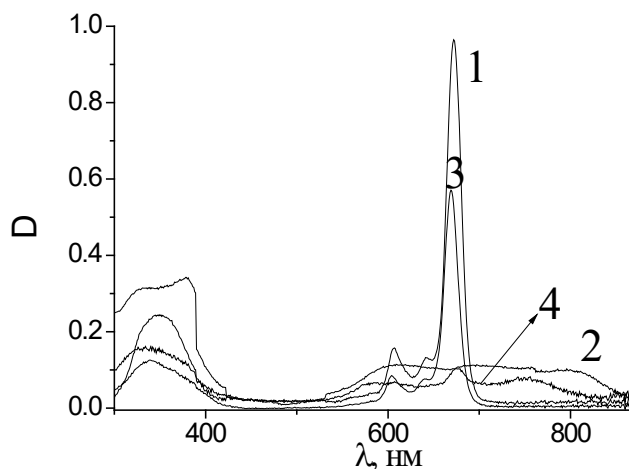


Рисунок 3. Спектры оптического поглощения $\text{AlCl}_3\text{Фц}$ в ДМФА ($C_{\text{AlCl}_3\text{Фц}}= 2.99 \times 10^{-6}$ моль/л, (1)) и смеси ДМФА-вода ($C_{\text{H}_2\text{O}}=15$ об. %) (2)) и ZnФц в ДМФА ($C_{\text{ZnФц}}= 3.3 \times 10^{-6}$ моль/л (3)) и смеси ДМФА-вода ($C_{\text{H}_2\text{O}}=15$ об. %) (4) [3]

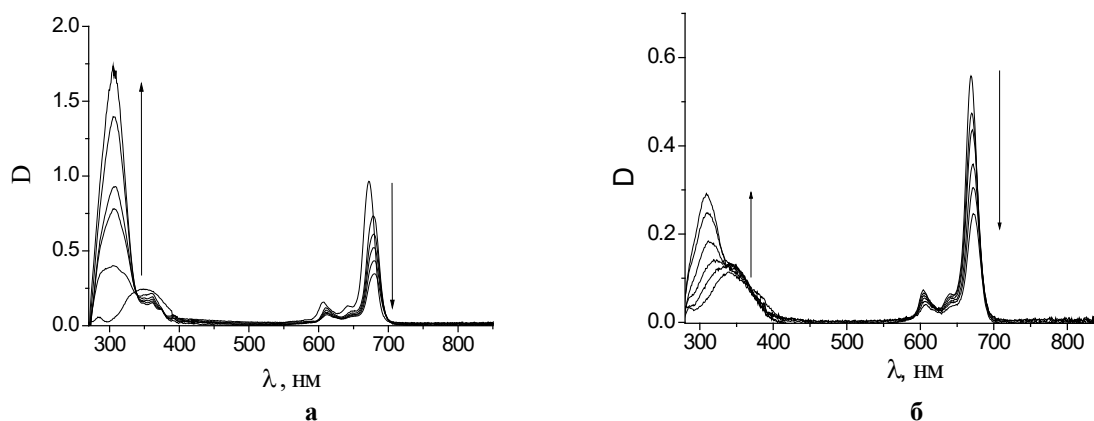


Рисунок 4. Спектры оптического поглощения гибридных систем AlClФц - графен - ДМФА-вода (а) и ZnФц - графен - ДМФА-вода (б), полученных добавлением 0.1 – 1 мл суспензии графена в ДМФА-вода к 2 мл растворов МеФц-ДМФА; стрелки показывают увеличение концентрации суспензии графена в системе

3. В отличие от типичных изменений спектров МеФц в присутствии воды, наблюдается интенсивное поглощение в областях ~ 230 – 400 нм с максимумами при ~ 305 нм (рис. 4а) и ~ 309 нм (рис. 4б), которое представляет собой комбинацию В-полосы (Soret) спектра электронного поглощения монофталоцианинов и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов в графене. Сдвиг максимумов В-полосы в сторону длинных волн по мере увеличения концентрации графена в обеих системах и появление изобестических точек на спектрах обоих МеФц уже при добавлении первых доз суспензии графена, вероятно, являются критериями образования комплексов с переносом заряда. Появление изобестических точек также указывает на стабильность аддуктов (продуктов прямого присоединения), а именно комплексов МеФц - БГр, получаемых без образования промежуточных соединений.

Следует отметить, что особенностью данных супрамолекулярных комплексов является их высокая стабильность, которая обусловлена сильным координационным взаимодействием его составных частей. Обычно для оценки стабильности комплексов определяют константу связывания K_b с использованием соотношения Бенези-Хильдебранда:

$$\log ((D_i - D_n) / (D_k - D_0)) = \log [C] + \log (K_b), \quad (1)$$

где D_n , D_i и D_k – значения поглощения для начальной (в отсутствие графена), промежуточной и конечной точек на длине волны поглощения, соответствующей мономерной форме красителя, $[C]$ – концентрация добавленного компонента, то есть суспензии БГр.

Учитывая данные рисунка 4, мы получили значения K_b для системы AlClФц-БГр-ДМФА-вода $\sim 10^3$ л/моль и для ZnФц-БГр-ДМФА-вода $\sim 10^{10}$ л/моль. Полученные данные свидетельствуют о разных механизмах связывания, реализуемых в двух супрамолекулярных системах, однако высокие значения K_b являются признаком связывания всех компонентов систем.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБХФ РАН (№ 125020401357-4) и Государственного задания ИМЕТ РАН (№. 075-00319-25-00).

Список литературы / References:

1. Cao H., Gong M., Wang M., Tang Q., Wang L., Zheng X. Steady/transient state spectral researches on the solvent-triggered and photo-induced novel properties of metal-coordinated phthalocyanines. *RSC Advances*, 2022, vol. 12, pp. 5964-5970, doi: 10.1039/d1ra08345g.
2. Singh P., Ravindra N.M. Optical properties of metal phthalocyanines. *Journal of Materials Science* 2010, vol. 45, pp. 4013-4020, doi: 10.1007/s10853-010-4476-6.
3. Klimenko I.V., Trusova E.A., Lobanov A.V. Optical properties of complexes based on metal phthalocyanines and oxygen-free graphene. *Macroheterocycles*, 2024, vol. 17 no. 3, pp. 224-230, doi: 10.6060/mhc245851k.
4. Klimenko I.V., Lobanov A.V., Trusova E.A., Schegolikhin A.N. New hybrid oxygen-free graphene and phthalocyanine aluminum structures: preparation and physicochemical properties. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2019, vol. 13, no. 6, pp. 964-968, doi: 10.1134/S1990793119060204.
5. Mani V., Devasenathipathy R., Chen Sh.-M., Gu J.-A., Huang Sh.-T. Synthesis and characterization of Gr-cobalt phthalocyanines and Gr-iron phthalocyanine composites and their enzymatic fuel cell application. *Renewable Energy*, 2015, vol. 74, pp. 867-874, doi: 10.1016/j.renene.2014.09.003.
6. Mikhina P.A., Mishchenko D.V., Lapshina M.A., Tarakanov P.A., Baulin V.E., Goldshlegera N.F. Phthalocyanines and metal phthalocyanines with phosphoryl groups: supramolecular ensembles, photochemical and photobiological properties. *Macroheterocycles*, 2020, vol. 13, no. 2, pp. 113-125, doi: 10.6060/mhc200391g.
7. Ali H., Van Lier J.E. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chemical Reviews*, 1999, vol. 99, no. 9, pp. 2379-2450, doi: 10.1021/cr980439y.

8. Klimenko I.V., Trusova E.A., Shchegolikhin A.N., Lobanov A.V., Jurina L.V. Surface modification of graphene sheets with aluminum phthalocyanine complex. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 2022, vol. 30, no. 1, pp. 133-139, doi: 10.1080/1536383X.2021.1976754.

NEW SUPRAMOLECULAR SYSTEMS BASED ON METAL COMPLEXES OF PHTHALOCYANINES AND OXYGEN-FREE GRAPHENE FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Klimenko I.V.¹, Trusova E.A.², Lobanov A.V.^{1,3}

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

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

² A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science, RAS

Leninsky ave., 49, Moscow, 119334, Russia

³ Moscow Pedagogical State University

Malaya Pirogovskaya str., 1/1, Moscow, 119991, Russia

Received 31.07.2025

Abstract. Two supramolecular systems based on aluminum (AlClPc) and zinc (ZnPc) phthalocyanines and oxygen-free graphene (OGr) were synthesized in an aqueous-organic medium and studied using a range of methods. N,N-dimethylformamide (DMF) was used as the organic solvent. OGr was obtained by the sonochemical method using a combination of sol-gel synthesis and liquid-phase ultrasonic exfoliation of graphene sheets from the surface of synthetic graphite in a DMF-water medium ($C_{DMF} = 4.7$ vol %). Supramolecular systems of OGr - metal complexes of phthalocyanines (MePc) were obtained by titrating 2 ml solution of MePc in DMF with a suspension of OGr in a DMF-water mixture. The concentration of graphene in the suspension is $C_{gr} = 1.3$ wt %. It has been shown that the presence of OGr in supramolecular systems prevents the aggregation of phthalocyanines in an aqueous environment and promotes their stabilization in a monomolecular form. This fact provides the obtained systems with the properties necessary for their use as components of vector drug delivery platforms in photodynamic therapy and early diagnostics of pathologies. The stability of the obtained hybrid systems, as well as the binding capacity of their components, has been evaluated. The data obtained indicate the coordination interaction of graphene and MePc.

Key words: aluminum phthalocyanine, zinc phthalocyanine, oxygen-free graphene, supramolecular systems, monomers, aggregation.

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИКА БЕЛКОВОГО ОБМЕНА У ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819

Солдатов А.А.^{1,2}, Андреев Т.И.^{1,2}

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

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, 299053, г. Севастополь, РФ

Поступила в редакцию 26.07.2025

Аннотация. В работе исследована специфика белкового обмена в тканях (нога, жабры, гепатопанкреас) двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Определена активность аланин- и аспаратаминотрансферазы (АлАТ, 1.6.1.2; АсАТ, 1.6.1.1) и изучено содержание свободных аминокислот. Заметных различий в активности АлАТ между тканями не наблюдали. В отношении АсАТ максимальная активность выявлена в жабрах моллюска $0,134 \pm 0,002$ мкмоль L-Asp · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка, что на 25-35 % ($p < 0,01$) превышало значения, зарегистрированные для других тканей. Содержание аминокислот в данном органе, напротив, было минимально. В сравнении с ногой и гепатопанкреасом различия достигали 2,5-3,0 раз ($p < 0,001$). Учитывая фильтрационный тип питания моллюска, сделано предположение о том, что в данном органе активно протекают процессы регенерации, что может быть обусловлено механическим повреждением ткани. Гепатопанкреас отличался высоким содержанием свободных аминокислот и пониженными активностями АлАТ и АсАТ, что позволяет рассматривать данный орган как источник поступления аминокислот в систему циркуляции гемолимфы. На основе межтканевого сравнения установлена связь между активностью АлАТ и малатдегидрогеназой ($R^2 = 0,990$). Это предполагает участие АлАТ в перехвате гликолитического пирувата.

Ключевые слова: *Mytilus galloprovincialis*, нога, жабры, гепатопанкреас, активность аминотрансфераз, содержание аминокислот.

ВВЕДЕНИЕ

Двустворчатый моллюск *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, или мидия, широко представлен в биоценозах Черного моря [1]. Во многих случаях он выступает в качестве ценозообразующего вида [1]. В последнее время его поселения начинают активно замещаться другим двустворчатым моллюском-вселенцем *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906). Особенно это заметно в акваториях с пониженным содержанием кислорода [2]. Сравнительная оценка показывает, что мидии оказываются более чувствительными к данному фактору [3]. В этой связи представляет интерес изучение особенностей течения процессов энергетического обмена в тканевых структурах *M. galloprovincialis*, что позволит определить ткань наиболее требовательную к содержанию кислорода.

В качестве энергетических субстратов моллюски широко используют углеводы и белки (аминокислоты) [4]. Признанными маркерами соотношения аэробных и анаэробных процессов в тканях является индекс МДГ/ЛДГ (соотношение активности малат- и лактатдегидрогеназы), лактат/пируват [5-7]. Моллюски отличаются высокоэффективной МДГ [5]. Активность ЛДГ существенно ниже, у некоторых видов она даже не выявляется, что отражает низкий уровень экспрессии соответствующего гена (генов) [8]. Об использовании белковых субстратов косвенно можно судить по активности аланин- и аспаратаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ), а также содержанию свободных аминокислот. Однако этот аспект проблемы до конца не разработан.

Необходимо отметить, что особи *M. galloprovincialis* отличаются по цвету створок раковины. Считается, что этот признак генетически детерминирован. Однако схема его наследования до конца не установлена [9]. Окраска створок может выступать в роли маркера ряда генов, контролирующих физиологические и биохимические процессы в организме [10]. Установлено, что моллюски с черной и коричневой окраской раковины существенно отличаются по темпам соматического роста тканей [11], скорости образования бисуссных нитей [12], составу каротиноидов [13], активности ряда ферментов [14,15]. Работа без учета этих особенностей существенно расширяет диапазон вариации контролируемых показателей и может негативно сказаться на получаемых результатах. Поэтому настоящие исследования выполнены исключительно на особях черной морфы.

Цель работы – исследовать особенности процессов белкового обмена в трех основных тканях черноморской мидии (черная морфа): ноге, жабрах и гепатопанкреасе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал. Работа выполнена на взрослых особях черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis*. Размеры раковины: 50-55 мм – длина, 28-32 мм – высота. Использовали исключительно особей черной морфы. Они имели

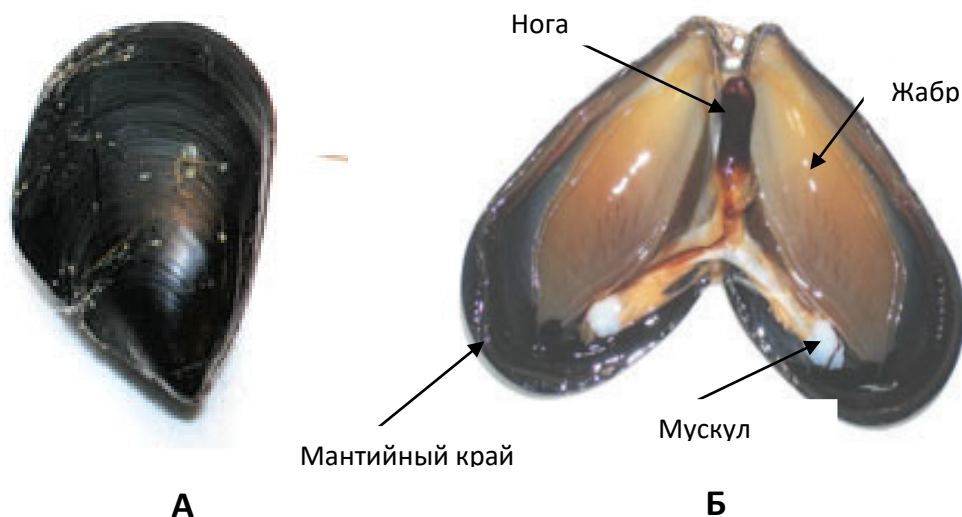


Рисунок 1. Морфологические особенности мидий черной морфы (А – внешний вид, Б – после вскрытия)

черно-фиолетовый цвет створок, темный (почти черный) мантийный край, темно-коричневую ногу (рис. 1). Пигментация внутренних органов была хорошо выражена: темный зелено-коричневый гепатопанкреас, розовато-бежевые жабры.

Моллюсков собирали одновременно с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия «Дон-Комп» (бухта Стрелецкая, г. Севастополь) в ноябре (период минимальной нерестовой активности). Транспортировку животных осуществляли в пластмассовых контейнерах насыпью без воды в течение 1 часа от момента сбора.

После транспортировки для снятия реакции стресса животных выдерживали в стеклянных аквариумах объемом 30 л с проточной морской водой в течение 2-3 суток. Считается, что этот период времени является достаточным для восстановления функциональной нормы [16]. Температуру воды в аквариумах поддерживали на уровне $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Соленость воды составляла 17-18 ‰. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь.

Препарирование, хранение образцов тканей, приготовление гомогенатов. Препарирование моллюсков и подготовку тканей к хранению осуществляли с использованием ледяной бани при температуре $0-4^\circ\text{C}$. Образцы гепатопанкреаса, жабр и ноги упаковывали в пищевую фольгу и хранили в жидком азоте. Препарируемые ткани показаны на рисунке 1.

Непосредственно перед проведением лабораторных исследований замороженные ткани взвешивали на торсионных весах TW-5 (Польша). Навеску ткани, измельчали ножницами и гомогенизировали вручную с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера. В качестве трансформирующей среды применяли 1,15% раствор KCl. Полученные гомогенаты подвергали центрифугированию при 6000 об мин^{-1} в течение 15 минут для осаждения обломков субклеточных структур. В работе использовали рефрижераторную центрифугу K-23D (Германия). Надосадочную жидкость применяли для определения содержания метаболитов и активности ряда ферментов. Все процедуры выполняли при температуре $0-4^\circ\text{C}$.

Биохимические исследования. Определение активности аланин- и аспаратаминотрансферазы (АлАТ, 1.6.1.2 и АсАТ, 1.6.1.1) проводили унифицированным динитрофенилгидразиновым методом Райтмана-Френкеля [17]. В состав инкубационной среды входили 0,25 мл субстратного раствора АсАТ (или АлАТ): при определении АсАТ в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4) растворяли 29,2 мг альфа-кетоглутаровой и 2,66 г L-аспарагиновой кислот; для определения АлАТ вместо L-аспарагиновой кислоты добавили 0,89 г L-аланина. Результаты выражали в мкмоль L-Ala (Asp) $\text{мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ белка.

Определение свободного аминного азота в тканях моллюсков проводили по цветной реакции с нингидрином методом, предложенным [17]. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 536 нм. Количество свободного аминного азота выражали в мкг мг^{-1} ткани. Содержание белка в тканях моллюсков определяли по методу Лоури [18].

Статистический анализ. Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведена с применением стандартного пакета Grapher (версия 11). Результаты представлены в виде $M \pm m$. Достоверность различий между выборочными совокупностями оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. В работе использовано 40 особей мидий (черная морфа).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований представлены на рисунке 2. Активность АлАТ практически не имела тканевой специфики. Различия между максимальными и минимальными значениями не превышали 8 % и не были

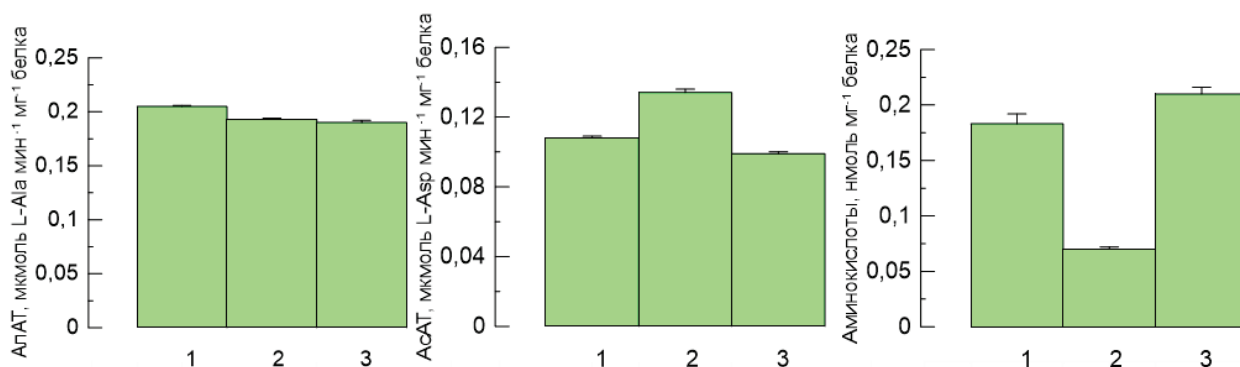


Рисунок 2. Тканевая специфика активности АлАТ, АсАТ и содержания свободных аминокислот (1 – нога, 2 – жабры, 3 – гепатопанкреас)

статистически значимы ($p > 0,05$). В отношении АсАТ максимум был зарегистрирован в жабрах – $0,134 \pm 0,002$ мкмоль L-aspar · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка. Он на 24-35 % ($p < 0,01$) превышал значения, полученные для других тканей. При этом уровень свободных аминокислот здесь был 2,5-3,0 раза ниже ($p < 0,001$), чем в ноге или гепатопанкреасе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных результатов, полученных в настоящей работе, явилась высокая активность АсАТ в жабрах моллюска на фоне минимального содержания свободных аминокислот. Последнее, по-видимому, связано с активно протекающими процессами регенерации в данном органе [19]. Известно, что жабры у двустворчатых моллюсков выполняют двойную функцию: респираторную и фильтрационную [20]. Эпителий представлен всего несколькими слоями клеток и не имеет защитных структур [21]. Повреждение данной структуры происходит постоянно, что должно компенсироваться интенсивными процессами регенерации, что вероятно и было зарегистрировано в настоящей работе.

Гепатопанкреас отличался высоким содержанием свободных аминокислот и пониженными активностями АлАТ и АсАТ в сравнении с другими тканями моллюска. Это позволяет рассматривать данный орган как источник поступления аминокислот в систему циркуляции гемолимфы.

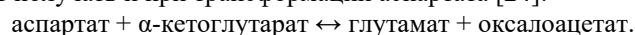
Нога у мидий в значительной степени редуцирована и как орган перемещения не используется. Здесь локализованы железы, осуществляющие продукцию биссуса, посредством которого моллюск крепится к субстрату [12]. Принципиальных отличий в организации белкового обмена в данном органе не отмечали.

В адаптации моллюсков к условиям внешней гипоксии решающее участие принимает цитоплазматическая фракция малатдегидрогеназы (МДГ) [22,23]. Она катализирует как прямую, так и обратную реакцию превращения S-малата (L-яблочная кислота):



Активность МДГ также сопряжена с гликолитическими процессами через фосфоенолпируваткарбоксикиназу (ФЕПКС), трансформирующей фосфоенолпируват в оксалоацетат [24]:
 $\text{фосфоенолпируват} + \text{ГДФ} \leftrightarrow \text{оксалоацетат} + \text{ГТФ}.$

Оксалоацетат МДГ может получать и при трансформации аспартата [24]:



Этот процесс известен для *Anadara kagoshimensis*, которая накапливает в раковине D-аспартат [25].

Следует принять во внимание, что в этих процессах могут быть задействованы также АлАТ и АсАТ. АсАТ трансформирует аспартат в оксалоацетат, а АлАТ гликолитический пируват в аланин, исключая образование токсичного лактата [24]. Тканевая специфика активности МДГ для средиземноморской мидии нами была изучена ранее [26,27]. В настоящей работе мы соотнесли активность данного фермента с АсАТ и АлАТ. Однако какой-либо коррелятивной связи между МДГ и АсАТ установить не удалось. В то же время для системы «МДГ-АлАТ» она была весьма однозначна. Зависимость хорошо описывалась уравнением логарифмической функции: $y = b \cdot \ln(x) + a$, при высоком коэффициенте детерминации (R^2) 0,990 (рис. 3).

Это позволяет предположить участие АлАТ в перехвате гликолитического пирувата. Доказательством наличия данной реакции является сравнение активности МДГ с лактатдегидрогеназой (ЛДГ). Активность МДГ была в 5-6 раз ниже [26,27].

Таким образом, на основе проведенных исследований можно сделать ряд обобщений. Заметных различий в активности АлАТ между тканями не наблюдали. В отношении АсАТ максимальная активность выявлена в жабрах. Содержание аминокислот в данном органе, напротив, было минимально. Учитывая фильтрационный тип питания моллюска, можно предположить, что в данном органе активно протекают процессы регенерации. Последнее может быть обусловлено механическим повреждением ткани. Гепатопанкреас отличался высоким содержанием свободных аминокислот и пониженными активностями АлАТ и АсАТ, что позволяет

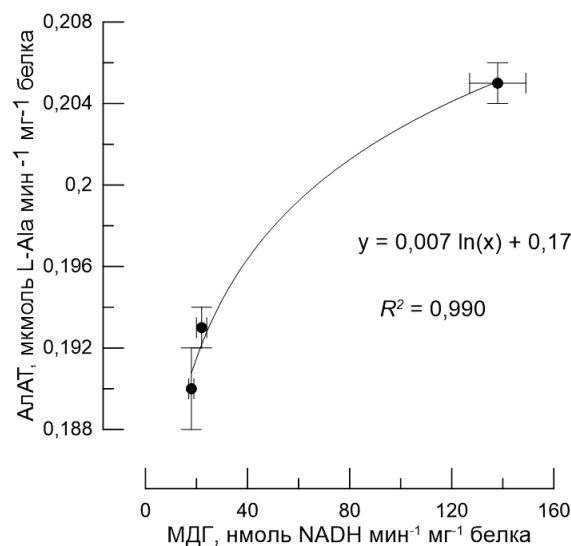


Рисунок 3. Корреляционные отношения для системы «МДГ–АлАТ»

рассматривать данный орган как источник поступления аминокислот в систему циркуляции гемолимфы. На основе межтканевого сравнения установлена связь между активностью АлАТ и МДГ ($R^2 = 0,990$). Это предполагает участие АлАТ в перехвате гликолитического пирувата.

Работа выполнена в рамках государственной программы «Функциональные, метаболические и молекулярно-генетические механизмы адаптации морских организмов к условиям экстремальных экотопов Черного и Азовского морей и других акваторий Мирового океана». Номер государственной регистрации темы: 124030100137-6.

Список литературы / References:

1. Холодов В.И., Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Выращивание мидий и устриц в Черном море. Образовательная научно-техническая серия для морских фермеров: Практическое руководство. Севастополь: DigitPrint, 2010, вып. 2, 424 с. [Kholodov, V.I., Pirkova A.V., Ladygina L.V. Growing mussels and oysters in the Black Sea. Educational scientific and technical series for marine farmers: A practical guide. Sevastopol: DigitPrint, 2010, iss. 2, 424 p. (In Russ.)].
2. Ревков Н.К. Особенности колонизации Черного моря недавним вселенцем-двустворчатым моллюском *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). *Морской биологический журнал*. 2016, т. 1, вып. 2, с. 3-17 [Revkov N.K. Features of colonization of the Black Sea by a recent invader, the bivalve mollusk *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae). *Marine Biological Journal*. 2016, vol. 1, iss. 2, pp. 3-17, doi: 10.21072/mbj.2016.01.2.01 (In Russ.)].
3. Soldatov A.A., Andreenko T.I., Golovina I.V., Stolbov A.Y. Peculiarities of organization of tissue metabolism in molluscs with different tolerance to external hypoxia. *J. Evolutionary Biochem. Physiol.*, 2010, vol. 46, no. 4, pp. 341-349, doi: 10.1134/S0022093010040022.
4. Hochachka P.W., Fields J.H.A. Arginine, glutamate and praline as substrate for oxidation and for glycogenesis in cephalopod tissues. *Pacific Science*, 1983, vol. 36, pp. 325-336.
5. Washizu T., Nakamura M., Izawa N., Suzuki E., Tsuruno S., Washizu M., Nakajo S., Arai T. The Activity Ratio of the Cytosolic MDH/LDH and the Isoenzyme Pattern of LDH in the Peripheral Leukocytes of Dogs, Cats and Rabbits. *Veterinary Res. Communications*, 2002, vol. 26, iss. 5, pp. 341-346, doi: 10.1023/A:101627840.
6. Bishop R.E., Kakuk B., Torres J.J. Life in the Hypoxic and Anoxic Zones: Metabolism and Proximate Composition of Caribbean Troglolithic Crustaceans with Observations on the Water Chemistry of Two Anchialine Caves. *J. Crustacean Biol.* 2004, vol. 24, iss. 3, pp. 379-392, doi: 10.1651/C-2459.
7. Bishop R.E., Iliffe T.M. Ecological physiology of the anchialine shrimp *Barbouria cubensis*: a comparison of epigeal and hypogean populations. *Marine Biodiversity*, 2012, vol. 42, iss. 3, pp. 303-310, doi: 10.1007/s12526-012-0113-8.
8. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford: University Press, 2002, 466 p.
9. Щурова Н.М., Золотарев В.Н. Анализ фенотипической структуры поселений мидий *Mytilus galloprovincialis* черного моря по окраске наружного призрачного слоя их раковин. *Морской экологический журнал*, 2008, т. 7, № 4, с. 88-97 [Shchurova N.M., Zolotarev V.N. Analysis of the phenotypic structure of the settlements of the mussels *Mytilus galloprovincialis* of the Black Sea by the color of the outer lymph layer of their shells. *Marine Environmental Journal*, 2008, vol. 7, no. 4, pp. 88-97 (In Russ.)].
10. Булатов К.В. Генетическая природа окраски раковин у черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. Доклады АН УССР. Серия Б. Геологические, химические и биологические науки, 1984, № 6, с. 54-56 [Bulatov K.V. The genetic nature of shell coloration in the Black Sea mussels *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Reports of*

the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR. Series B. Geological, chemical and biological sciences, 1984, no. 6, pp. 54-56 (In Russ.).

11. Щербань С.А., Вялова О.Ю. Половые и фенотипические особенности содержания РНК в гонадах черноморских мидий. Доклады Национальной академии наук Украины, 2008, № 2, с. 166-170 [Shcherban S.A., Vyalova O.Y. Sexual and phenotypic features of RNA content in gonads of Black Sea mussels. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2008, no. 2, pp. 166-170 (In Russ.)].

12. Булатов К.В., Звездина Т.Ф. Различие в прикреплении к субстрату мидий разных генотипов. Цитология и генетика, 1987, т. 21, № 1, с. 71-72 [Bulatov K.V., Zvezdina T.F. The difference in the attachment of mussels of different genotypes to the substrate. Cytology and Genetics, 1987, vol. 21, no. 1, pp. 71-72 (In Russ.)].

13. Бородина А.В., Нехорошев М.В., Солдатов А.А. Особенности состава каротиноидов тканей двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Brugiere. Доклады Национальной академии наук Украины, 2009, № 5, с. 186-190 [Borodina A.V., Nekhoroshev M.V., Soldatov A.A. Features of the composition of carotenoids in the tissues of the bivalve mollusk *Anadara inaequalis* Brugiere. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2009, no. 5, pp. 186-190 (In Russ.)].

14. Александрова О.Л., Солдатов А.А., Головина И.В. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двух цветовых морф черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. Экология моря, 2001, вып. 58, с. 22-26 [Alexandrova O.L., Soldatov A.A., Golovina I.V. Features of the glutathione peroxide system in the tissues of two color morphs of the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. Ecology of the sea, 2001, iss. 58, pp. 22-26 (In Russ.)].

15. Soldatov A.A., Gostukhina O.L., Golovina I.V. State of the antioxidant enzyme complex of tissues of the Black Sea mollusk *Mytilus galloprovincialis* under conditions of natural oxidative stress. J. Evolutionary Biochem. Physiol., 2008, vol. 44, no. 2, pp. 175-182, doi: 10.1134/S0022093008020047.

16. Ribera D., Narbonne J.F., Daubeze M., Michel X. Characterization, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. Mar. Environ. Res., 1989, vol. 28, pp. 279-283.

17. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987, 365 с. [Menshikov V.V. Laboratory research methods in the clinic. Moscow: Medicine, 1987, 365 p. (In Russ.)].

18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, no. 266, p. 75, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

19. Sunila I. Pollution-related histopathological changes in the mussel *Mytilus edulis* L. in the Baltic Sea. Mar. Environ. Res., 1988, vol. 24, no 1-4, pp. 277-280, doi: 10.1016/0141-1136(88)90320-0.

20. Cossu C., Doyotte A., Babut M. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotoxicol. Environ. Safety, 2000, vol. 45, no. 4, pp. 106-121, doi: 10.1006/eesa.1999.1842.

21. Cui L., Liu C., Lu Y. Studies on mussel's gills. Shandong Fish. Qilu. Yuye, 1996, vol. 13, no. 5, pp. 11-14.

22. Hall M.D., Levitt D.G., Banaszak L.J. Crystal structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase: A complex of the apoenzyme and citrate at 1.87 Å resolution. J. Mol. Biol., 1992, vol. 226, iss. 3, pp. 867-882, doi: 10.1016/0022-2836(92)90637-y.

23. Somero G.N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. Journal of Experimental Biology, 2010, iss. 213, pp. 912-920, doi: 10.1242/jeb.037473.

24. Owen T.G., Hochachka P.W. Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals. Biochem. J., 1974, vol. 143, pp. 541-553, doi: 10.1042/bj1430541.

25. Livingstone D.R. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. American zoologist, 1991, vol. 31, pp. 522-534.

26. Солдатов А.А., Андреев Т.И., Головина И.В. Особенности организации тканевого метаболизма у двустворчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequalis* Brugiere. Доклады Национальной академии наук Украины, 2008, № 4, с. 161-165 [Soldatov A.A., Andreenko T.I., Golovina I.V. Features of the organization of tissue metabolism in the bivalve mollusc *Anadara inaequalis* Brugiere. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2008, no. 4, pp. 161-165. (In Russ.)].

27. Андреев Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В. Адаптивная реорганизация метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Brugiere в условиях экспериментальной аноксии. Доклады Национальной академии наук Украины, 2009, № 7, с. 155-160 [Andreenko T.I., Soldatov A.A., Golovina I.V. Adaptive reorganization of metabolism in the bivalve mollusk *Anadara inaequalis* Brugiere under experimental anoxia. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2009, no. 7, pp. 155-160 (In Russ.)].

TISSUE SPECIFICITY OF PROTEIN METABOLISM IN THE BIVALVE MOLLUSK
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAMARCK, 1819

Soldatov A.A.^{1,2}, Andreenko T.I.^{1,2}

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, RAS
Nakhimov ave. 2, Sevastopol 299011, Russia; e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

² Sevastopol State University
University str. 33, Sevastopol 299053, Russia
Received 26.07.2025

Abstract. The work investigated the specificity of protein metabolism in the tissues (foot, gills, hepatopancreas) of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. The activity of alanine and aspartate aminotransferase (AlAT, 1.6.1.2; AsAT, 1.6.1.1) was determined and the content of free amino acids was studied. No noticeable differences in AlAT activity were observed between the tissues. With respect to AsAT, the maximum activity was detected in the gills of the mollusk $0.134 \pm 0.002 \mu\text{mol L-Asp} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, which was 25-35% ($p < 0.01$) higher than the values recorded for other tissues. The amino acid content in this organ, on the contrary, was minimal. Compared with the leg and hepatopancreas, the differences reached 2.5-3.0 times ($p < 0.001$). Given the filtration type of shellfish nutrition, it is assumed that regeneration processes are actively taking place in this organ, which is associated with mechanical damage to the tissue. The hepatopancreas was characterized by a high content of free amino acids and reduced activity of AlAT and AsAT, which makes it possible to consider this organ as a source of amino acids entering the hemolymph circulation system. Based on an interstitial comparison, a relationship was established between the activity of AlAT and malate dehydrogenase ($R^2 = 0.990$). This suggests the involvement of AlAT in the interception of glycolytic pyruvate.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, foot, gills, hepatopancreas, activity of aminotransferases, content of amino acids.

ПОДЛЕДНАЯ ДИНАМИКА КИСЛОРОДА И ТЕМПЕРАТУРЫ В МАЛОМ ЛЕСНОМ ОЗЕРЕ (ПРИБАЙКАЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПАРК): РОЛЬ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Шадрин Н.В.^{1,2}, Григорьев М.Н.^{1,2}, Мутин А.Д.³, Щапова Е.П.³, Помазкин В.К.³, Широкова Ю.А.³, Ануфриева Е.В.^{1,2}

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

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

² Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: misha79788961008@xmail.ru

³ Институт биологии Байкала Иркутского государственного университета

ул. Ленина, 3, г. Иркутск, 664025, РФ

Поступила в редакцию 03.08.2025

Аннотация. В данной статье рассмотрены и проанализированы данные по изменению концентрации растворенного в воде кислорода (РК) и температуры (Т) в небольшом лесном озере, расположенном в бассейне реки Большие Коты, в двух километрах от ее впадения в озеро Байкал. В начале ледового периода (25.10.2021) был установлен логгер (НОВО® Dissolved Oxygen Logger, U26-001, USA), который каждые 30 минут записывал значения РК и Т до 10.04.2022. Получено по 8023 значения каждого параметра. В течении всего периода наблюдений изменения РК и Т имели совершенно разный характер. РК в первые 21 день, колеблясь, плавно уменьшался с 6,9 мг/л до нуля, затем почти два месяца не повышался. 7 марта 2022 г. начался быстрый подъем РК с нуля до 7,9 мг/л 10 марта, затем происходили квазисуточные колебания. Т плавно убывала с начала наблюдений и до середины марта, с 4,48°C до 0,24°C. РК и Т изменялись не скоррелировано, т.е. можно предположить, что изменения Т определялись не биологическими причинами. Ранее было показано, что даже при высокой биомассе организмов и высокой температуре суммарная теплопродукция биомассы практически не влияет на Т водной среды. Во время подледного периода обмен кислородом водоема с атмосферой практически отсутствует, концентрация кислорода поэтому целиком определяется соотношением величин суммарного фотосинтеза и дыхания.

Ключевые слова: кислород, температура, подледный период, лесное озеро, Прибайкалье.

ВВЕДЕНИЕ

Растворенный кислород и температура воды являются одними из основных факторов, влияющих на ход химических и биологических процессов в водоемах. Температура определяет скорость всех биологических и геохимических процессов, а содержание кислорода контролирует биогеохимические циклы и другие экосистемные процессы, а также изменяет реакцию сообществ на стрессовые факторы [1-3]. Изучению пространственно-временной изменчивости на различных масштабах посвящено много работ, но достаточного понимания этой изменчивости все еще нет. Основное внимание при этом уделяется крупным водоемам, малым уделяется немного внимания несмотря на то, что на планете имеется не менее 3154107 озер, размер которых не превышает 0,5 км² [4]. Малые озера занимают лишь 15 % от суммарной площади озер, но роль их в сохранение биоразнообразия, предоставлении рекреационных услуг, регуляции циклов парниковых газов, кислорода и воды значительно больше [4,5]. Изучается динамика этих параметров, как правило, в условиях отсутствия льда, когда идет интенсивный обмен между водоемом и атмосферой. Когда водоем покрыт льдом в них тоже происходят изменения многих параметров [6,7], но характер этой динамики и ее закономерности изучены явно недостаточно. Изучение подледной динамики содержания кислорода в малых водоемах поэтому является важной задачей, необходимой для понимания функционирования и динамики их экосистем. Цель работы – описать и проанализировать данные высокочастотного мониторинга концентрации кислорода и температуры в малом лесном озере.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Район исследований представляет из себя эрозионную чашеобразную котловину, окруженную с трех сторон Приморским хребтом и его отрогами, а с четвертой выходит к озеру Байкал. Котловина разделена на два водосбора рек Большие Коты и Малые Коты, протяженность первой составляет 7588 метров, второй – 5870 метров. Перепад высот реки Большие Коты равен 109 метрам, средняя крутизна падения 5 градусов. В 1842 г. стали разрабатываться россыпи золота в реках западного побережья озера Байкал, первое упоминания о золотодобыче в реках Большая и Малая Коты относится к 1856 году. Золотодобыча велась вначале вручную, но в 1938 году в реке Большие Коты стали использовать небольшую драгу, с 1953 г. – большую драгу, до середины 1970 гг. После работы драг образовалось более 30 лесных техногенных озер, питающихся из реки. Одно из этих озер (N 51°55.250', E 105°04.332'), местное название 14-ое, расположено примерно в 2х километрах от впадения реки в Байкал, и послужило модельным в нашем исследовании (рис. 1).



Рисунок 1. Модельное озеро в системе техногенных озер реки Большие Коты летом

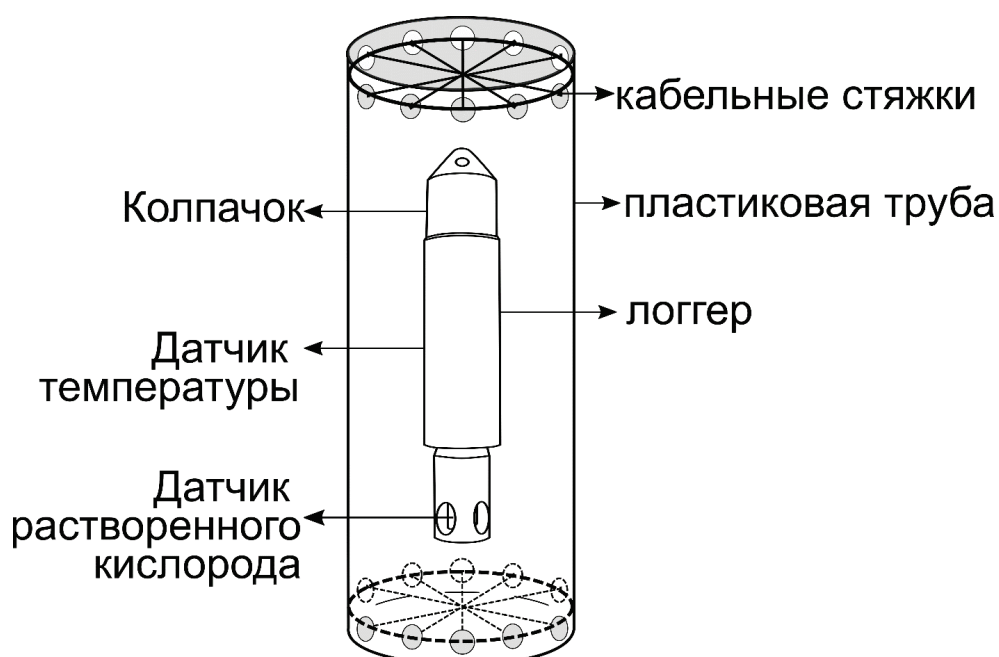


Рисунок 2. Схема логгера (HOBO® Dissolved Oxygen Logger, U26-001, USA), использованного при подледном мониторинге в озере

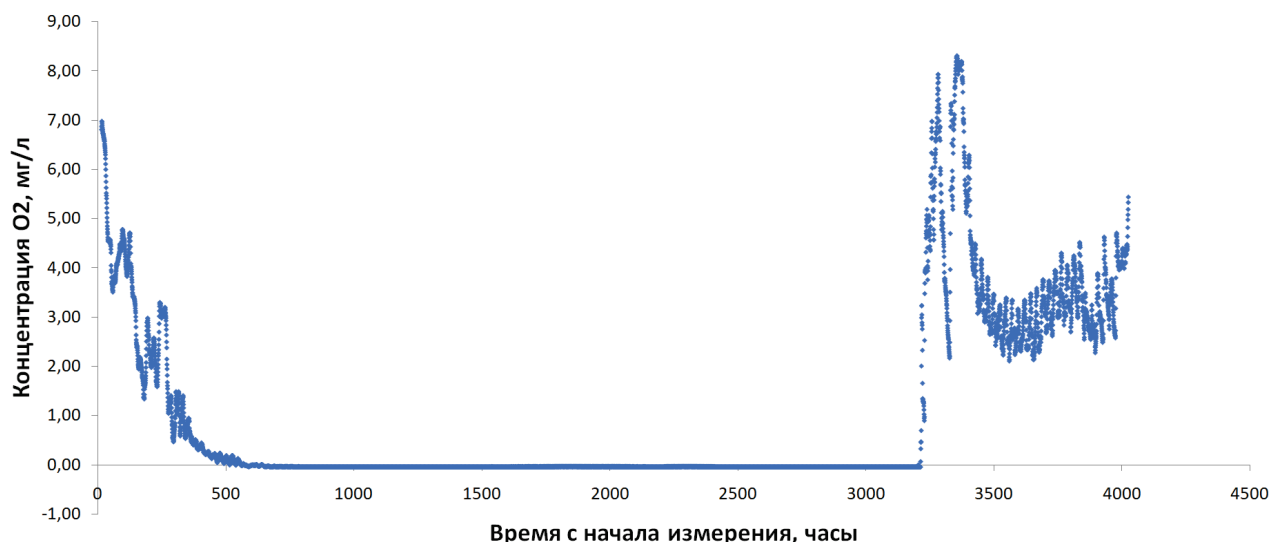


Рисунок 3. График изменений концентрации растворенного кислорода в модельном озере в подледный период (с 25.10.2021 по 10.04.2022)

Для проведения мониторинга использовали логгер HOBOTM Dissolved Oxygen Logger, U26-001, USA (рис. 2), который каждые 30 минут записывал значения концентрации кислорода и температуры. Его установили примерно на глубине 0,5 м 25.10.2021 г., в начальный период образования льда, он записывал значения до 10.04.2022. Всего получено по 8023 значений каждого параметра.

Для анализа данных использовали стандартные статистические методы, такие как уравнения регрессии, расчет коэффициента корреляции R методом наименьших квадратов, р-критерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение всего периода наблюдений изменения концентрации кислорода (РК) и температуры (Т) имели совершенно разный характер (рис. 3, 4).

Изменения РК и Т не коррелировали друг с другом на протяжении всего подледного периода. Можно поэтому сделать вывод, что факторы изменений двух параметров различались. Динамика температуры определялись не внутриводоемными биологическими причинами. Ранее было показано, что даже при высокой биомассе организмов и высокой температуре суммарная теплопродукция биомассы практически не влияет на температуру водной среды [8]. Концентрацию кислорода в водоемах, в первую очередь, обуславливают три процесса – фотосинтез, дыхание и обмен с атмосферой [9]. Во время подледного периода обмен кислородом водоема с атмосферой практически отсутствует, концентрация кислорода поэтому целиком определяется соотношением величин суммарного фотосинтеза и дыхания.

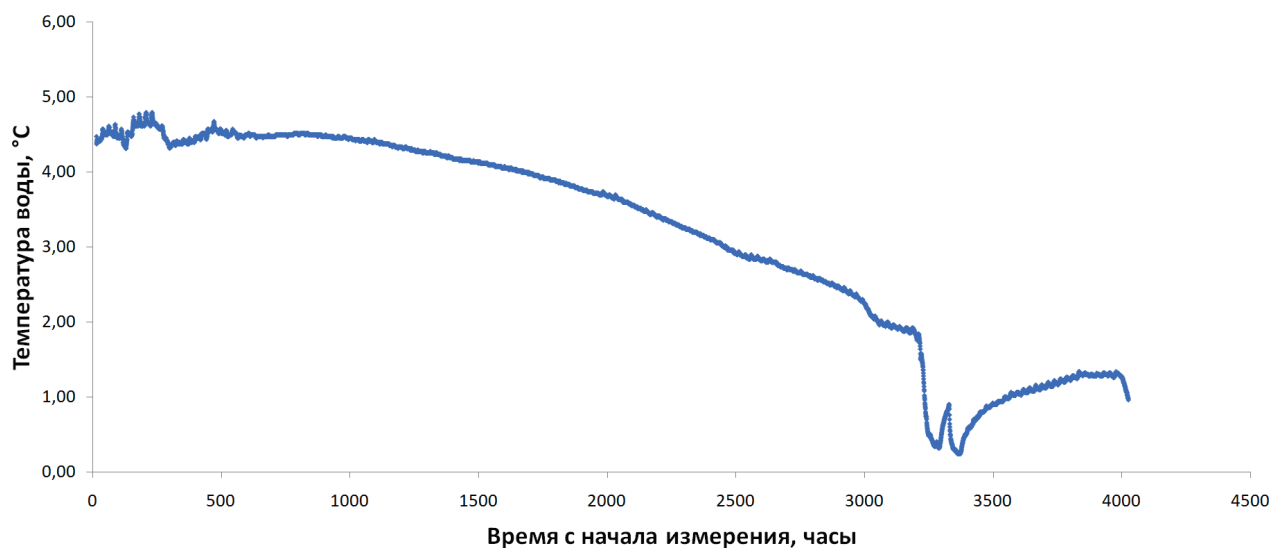


Рисунок 4. График изменений температуры воды в модельном озере в подледный период (с 25.10.2021 по 10.04.2022)

Кислород. В динамике кислорода в подледный период можно выделить несколько стадий, различающихся по характеру изменчивости РК (рис. 3):

1. В период с 25.10.2021 г. по 17.11.2021 г. на фоне кратковременных небольших флуктуаций наблюдалось постепенное снижение РК до нуля. Первые 9 дней мониторинга амплитуда суточных концентрации кислорода колебалась больше-меньше от 2,2 до 0,6 мг/л, в среднем 1,2 мг/л ($CV = 0,534$). Наличие суточных колебаний свидетельствует о том, что фотосинтез подо льдом продолжался, но интенсивность его менялась от дня к дню. Это связано, вероятней всего, что ФАР подо льдом в течении этого периода сильно колебалась в зависимости от облачности и выпавшего на лед снега. Затем амплитуда стала монотонно снижаться до 0 на 22 день (16 ноября 2021 г.). В первые 22 дня наблюдений ФАР подо льдом снижалась, как из-за сокращения светлого времени суток, так и от увеличения толщины слоя снега на льду. Следовательно, можно допустить, что фотосинтез снижался в это время и полностью прекратился к 22 дню (16 ноября).

2. Затем концентрация РК была нулевой до 07.03.2022 г.

3. С 7 марта по 10 марта 2022 г. произошел быстрый подъем РК с нуля до 7,9 мг/л.

4. После этого произошло резкое снижение до 2,2 мг/л, а затем резкий подъем до 8,3 мг/л.

5. В последующий период произошло резкое снижение до 3,9 мг/л, затем концентрация кислорода, колеблясь, падала до 2,1 мг/л, а затем росла до 5,4 мг/л в максимуме.

На первом этапе содержание кислорода снижалось, т.е. суммарное суточное потребление кислорода было больше дневного выделения кислорода в процессе фотосинтеза. Вероятно, основное уменьшение суммарного фотосинтеза было обусловлено уменьшением суточного поступления фотосинтетически активной радиации. Это происходило в результате как сезонного уменьшения ФАР, так и накопления снега на поверхности льда [6,7]. После продолжительного периода аноксийных условий, до 7 марта, произошел настолько быстрый рост концентрации кислорода, что биологическими причинами его не объяснить. Наиболее вероятной причиной скачка было то, что небольшой ручей, впадающий в озеро, растаял, и его насыщенная кислородом вода стала поступать в озеро.

После этого произошло снижение за 11 дней до концентрации 2,6 мг/л (рис. 5а), которое может быть описано уравнением ($R = 0,978$, $p = 0,001$):

$$PK = 8,62 t_1^{-0,52} \quad (1)$$

РК – среднесуточная концентрация растворенного кислорода, мг/л, t_1 – день от начала этого периода

После этого снижения среднесуточная концентрация, колеблясь начала плавно расти (рис. 5б), что можно аппроксимировать ($R = 0,640$, $p = 0,001$):

$$PK = 2,66 t_2^{0,100} \quad (2)$$

t_2 – день от начала этого периода.

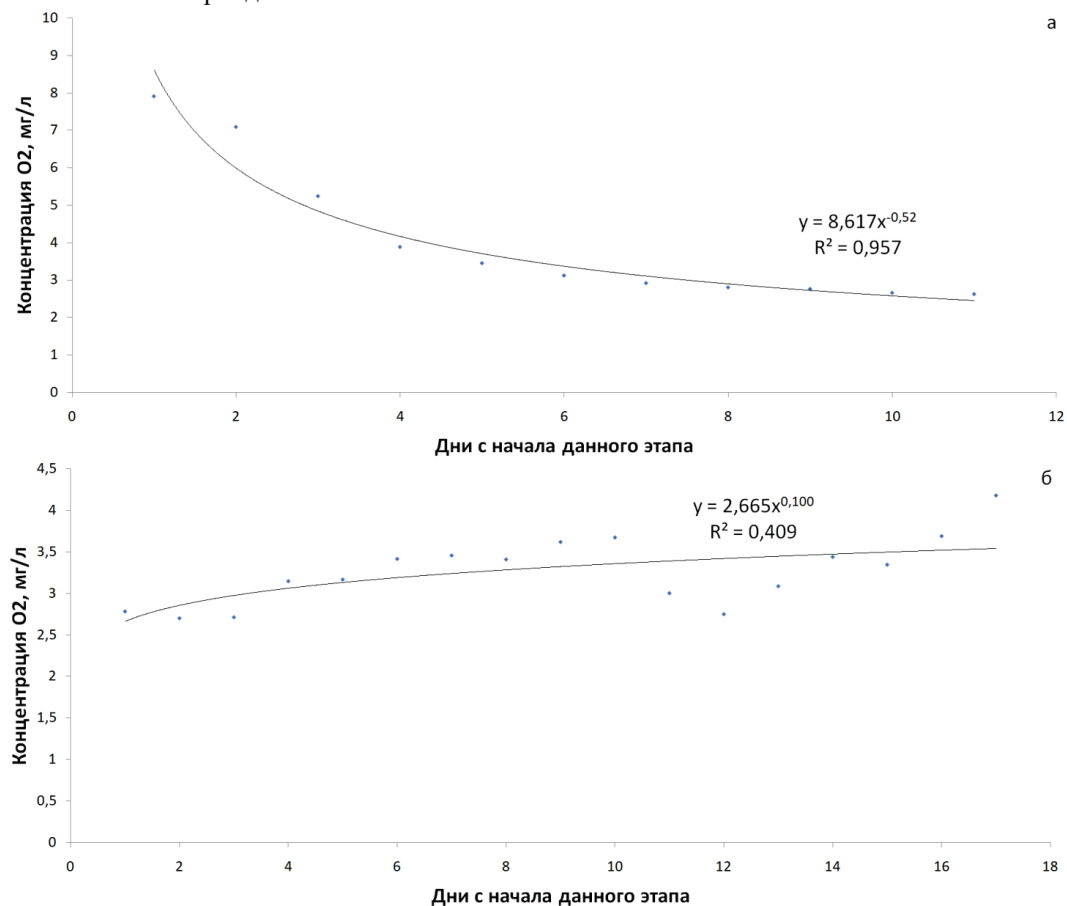


Рисунок 5. Изменение концентрации растворенного кислорода в модельном озере в подледный период (а – с 13.03.2022 по 24.03.2022, б – с 24.03.2022 по 10.04.2022.)

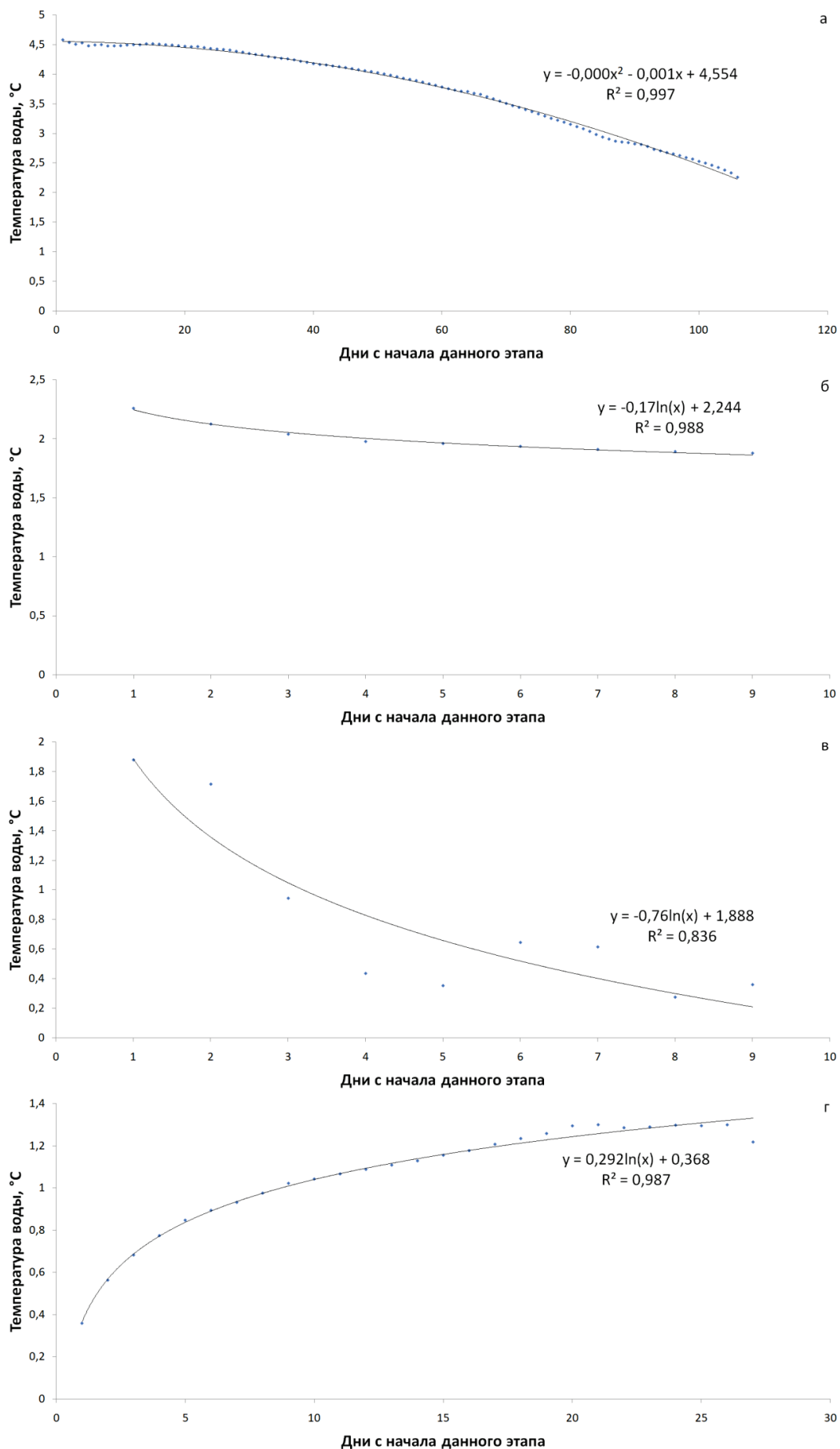


Рисунок 6. Изменение температуры воды в модельном озере в подледный период;(а - с 13.11.2021 по 27.02.2022, б - с 27.02.2022 по 07.03.2022, в- с 07.03.2022 по 15.03.2022, г -с 15.03.2022 по 10.04.2022.), соответственно

Температура. С 25.10.2021 г. до 07.03.2022 г. температура плавно снижалась с 4,5 в начале до 1,8. Затем произошло быстрое ее падение с 1,8 до 0,3 с 07.03.2022 г. по 10.03.2022 г. После чего она начала, флуктуируя, расти до 1,3 к 08.04.2022 г., а затем снижаться до 1 к 10.04.2022 г.

Первые 19 дней мониторинга суточная T колебалась от 4,4 до 4,7 °C без четкой закономерности в среднем 4,5 °C ($CV = 0,022$), затем в течение 106 дней температура убывала (рис. 6а), можно описать падение уравнением ($R = 0,999$, $p = 0,001$):

$$T = -0,000t_1^2 - 0,001t_1 + 4,554 \quad (3)$$

где T – среднесуточная температура воды, °C, t_1 – день от начала этого периода

После этого в течение 9 дней температура также убывала (рис. 6б) ($R = 0,994$, $p = 0,001$):

$$T = -0,17\ln(t_2) + 2,244 \quad (4)$$

где T – среднесуточная температура воды, °C, t_2 – день от начала этого периода

Затем в течение 9 дней T также убывала (рис. 6в) ($R = 0,914$, $p = 0,001$):

$$T = -0,76\ln(t_3) + 1,888 \quad (5)$$

где T – среднесуточная температура воды, °C, t_3 – день от начала этого периода.

Вероятно, резкое падение температуры связано с тем, что ручей растаял, и его более холодная вода стала поступать в озеро.

Следующие 27 дней T росла (рис. 6г) ($R = 0,993$, $p = 0,001$):

$$T = 0,292\ln(t_4) + 0,368 \quad (6)$$

где T – среднесуточная температура воды, °C, t_4 – день от начала этого периода

В целом, изменения температуры, вероятней всего, не зависели от биологических факторов, а определялись количеством солнечной радиации, проникающей под лед и состоянием ручья, впадающего в озеро.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют сделать вывод о сложности взаимосвязей, определяющих изменчивость изученных параметров. Изменение концентрации кислорода определяется сложным «переплетением» биологических, физико-химических и метеорологических процессов. Увеличение скорости продукции кислорода в конце подледного периода характерно и для других озер [6,7,10]. Это, в первую очередь, обусловлено тем, что проникновение ФАР под лед увеличивается за счет того, что сильные ветра сдувают снег со льда, и он также начинает таять, становясь более тонким и рыхлым, что интенсифицирует развитие микроводорослей и интенсивность их фотосинтеза [6,7,10]. Это обуславливает и рост температуры в конце подледного периода. Полученные в исследовании результаты могут содействовать более глубокому пониманию динамики растворенного кислорода и температуры в покрытых льдом небольших озерах, которая определяется сложным взаимодействием совокупности биологических и гидрофизических процессов. Однако они не дают полного понимания хода изменений, требуются новые исследования в этом направлении.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-66-00001.

Список литературы / References:

1. Алимов А.Ф., Богатов В.В., Голубков С.М. *Продукционная гидробиология*. СПб.: Наука, 2013, 343 с. [Alimov A.F., Bogatov V.V., Golubkov S.M. *Production hydrobiology*. St. Petersburg: Nauka, 2013, 343 p. (In Russ.).]
2. Giomi F., Barausse A., Steckbauer A., Daffonchio D., Duarte C.M., Fusi M. Oxygen dynamics in marine productive ecosystems at ecologically relevant scales. *Nature Geoscience*, 2023, vol. 16, pp. 560-566.
3. Shadrin N., Latushkin A., Yakovenko V., Prazukin A., Anufrieva E. 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, art. no. 103643, DOI: 10.1016/j.rsma.2024.103643.
4. Xu N., Lu H., Li W., Gong P. Natural lakes dominate global water storage variability. *Science Bulletin*, 2024, vol. 69, pp. 1016-1019.
5. Pi X., Luo Q., Feng L., Xu Y., Tang J., Liang X., Ma E., Cheng R., Fensholt R., Brandt M., Cai X. Mapping global lake dynamics reveals the emerging roles of small lakes. *Nature Communications*, 2022, vol. 13, iss. 1, p. 5777, doi: 10.1038/s41467-022-33239-3.
6. Obertegger U., Obrador B., Flaim G. Dissolved oxygen dynamics under ice: Three winters of high-frequency data from Lake Tovel, Italy. *Water Resources Research*, 2017, vol. 53, no. 8, pp. 7234-7246, doi: 10.1002/2017WR02059.
7. Пальшин Н.И., Ефремова Т.В., Здорвеннова Г.Э., Гавриленко Г.Г., Здорвеннов Р.Э., Тержевик А.Ю., Волков С.Ю., Богданов С.Р. Суточная динамика растворенного кислорода в малом мезотрофном озере в период весеннего подледного прогрева. *Известия Русского географического общества*, 2019, т. 151, № 4, с. 27-39 [Palshin N.I., Efremova T.V., Zdorvennova G.E., Gavrilenko G.G., Zdorvennov R.E., Terzhevnik A.Yu., Volkov S.Yu., Bogdanov S.R. Diurnal dynamics of dissolved oxygen in the small mesotrophic lake during the under-ice heating period. *Proceedings of the Russian Geographical Society*, 2019 vol. 151, no. 4, pp. 27-3, doi: 10.31857/S0869-6071151427-39 (In Russ.).]
8. Mukhanov V.S., Naidanova O.G., Shadrin N.V., Kemp R.B. The spring energy budget of the algal mat community in a Crimean hypersaline lake determined by microcalorimetry. *Aquatic Ecology*, 2004, vol. 38, no. 3, pp. 375-385.

9. Shadrin N., Anufrieva E., Latushkin A., Prazukin A., Yakovenko V. Daily Rhythms and Oxygen Balance in the Hypersaline Lake Moynaki (Crimea). *Water*, 2022, vol. 14, iss. 22, art. no. 3753, 17 p.
10. Бондаренко Н.А., Русанов И.И., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Пименов Н.В., Земская Т.И. Функционирование микроводорослей подледного планктона и ледовой интерстициали в прибрежной зоне озера Байкал. *Микробиология*, 2020, т. 89, № 3, с. 344-355 [Bondarenko N.A., Rusanov I.I., Chernitsyna S.M., Shubenkova O.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I. Functioning of microalgae of subglacial plankton and ice interstitial in the coastal zone of Lake Baikal. *Mikrobiologiya*, 2020, vo. 89, no. 3, pp. 344-355 (In Russ.)].

UNDER-ICE DYNAMICS OF OXYGEN AND TEMPERATURE IN A SMALL FOREST LAKE (PRIBAIKALSKY NATIONAL PARK): THE ROLE OF ABIOTIC AND BIOTIC FACTORS
Shadrin N.V.^{1,2}, Grigorev M.N.^{1,2}, Mutin A.D.³, Shchapova E.P.³, Pomazkin V.K.³, Shirokova Yu.A.³, Anufrieva E.V.^{1,2}

¹ Federal Research Center A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS
Nakhimova ave., 2, 299011, Sevastopol, Russia

² Sevastopol State University
University str., 33, 299053, Sevastopol, Russia; e-mail: misha79788961008@xmail.ru

³ Institute of Baikal Biology, Irkutsk State University
Lenin str., 3, Irkutsk, 664025, Russia

Received 03.08.2025

Abstract: This article reviews and analyzes data on changes in the concentration of dissolved oxygen (DO) in water and temperature (T) in a small forest lake located in the Bolshaya Koty River basin, two kilometers from where it flows into Lake Baikal. At the beginning of the ice period (10/25/2021), a logger (HOB0® Dissolved Oxygen Logger, U26-001, USA) was installed, which recorded DO and T values every 30 minutes until 04/10/2022. A total of 8023 values for each parameter were collected. Throughout the observation period, the patterns of changes in DO and T were completely different. During the first 21 days, DO fluctuated and gradually decreased from 6.9 mg/l to zero; then, no increase was observed for nearly two months. On March 7, 2022, DO began to rapidly rise from zero to 7.9 mg/l on March 10, followed by quasi-diurnal fluctuations. T gradually decreased from the start of observations until mid-March, from 4.48°C to 0.24°C. DO and T did not fluctuate in a correlated manner, suggesting that biological factors did not drive T changes. Previously, it has been shown that even with high biomass and elevated temperatures, the total heat production of organisms has little to no effect on the Water temperature. During the ice-covered period, there was no oxygen exchange with the atmosphere; therefore, the oxygen concentration depended entirely on the balance between photosynthesis and respiration.

Key words: oxygen, temperature, ice period, forest lake, Baikal region.