

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 10, № 3
2025**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 10, № 3
2025**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 10, No. 3, 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, №3, 2025

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

Д.Н. Чернышев, В.С. Ключкова, Т.М. Новикова

Декомпозиция спектра поглощения криптофитовой водоросли *Rhodomonas salina* 169

А.Д. Подгурская, А.А. Балакина, Д.В. Мищенко, С.В. Блохина, К.И. Агладзе

Выделение первичных кардиомиоцитов неонатальных мышцей ферментативным методом 175

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

С.А. Кузьмичев

Некоторые термодинамические особенности регуляции процессинга пиРНК-подобных транскриптов в соматических клетках у мыши 180

Э.Б. Душанов, С.В. Аксёнова, Я.К.Д. Родригез, С.В. Демидов

Моделирование взаимодействия борсодержащих препаратов с клеточной мембраной при различных концентрациях 186

А.Ю. Верисокин, Д.В. Вerveйко, П.Р. Иванова

Роль нейромодуляторов в активности нейроглиоваскулярной единицы 191

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Д.А. Шабанова, О.В. Крюкова, А.В. Тюменцева, Н.Г. Максимов, С.В. Столяр

Определение методом ЭПР металлсодержащих молекул в суспензии асцитной карциномы Эрлиха после криоконсервации 197

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

Определение концентрации уромодулина у животных с использованием фильтрации 202

Е.В. Бутенко, Ю.Д. Турсунова, Н.М. Добаева, Е.М. Бакурова

Некоторые особенности метаболизма карцином молочной железы, опосредованные метформином 206

К.Д. Казаринов, И.Г. Полников

Механизм эффективности использования микроволнового излучения в фармакологическом производстве 211

Ю.А. Черных, М.Н. Плешкова, Д.Ю. Вандышев, С.С. Антипов, И.В. Леденёва

Разработка флуоресцентных красителей на основе азолотриазин и оценка их физико-химических параметров..... 216

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

**В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова, А.М. Оюн, Е.М. Колосова, Д.Е. Чуяшенко,
Е.Я. Мучкина, О.С. Сутормин**

Биolumинесцентные ферментативные биотесты для экологического мониторинга 221

И.А. Мишкин, Д.Н. Ахмеров, А.А. Мишкина, В.А. Богданович, А.В. Кузнецов

Горизонтальный лов микропланктона устройством последовательной фильтрации

«Бобрёнок» 227

CONTENTS

Volume 10, No. 3, 2025

GENERAL BIOPHYSICS

D.N. Chernyshev, V.S. Klochkova, T.M. Novikova

Decomposition of the absorption spectrum of cryptophyte algae *Rhodomonas salina* 169

A.D. Podgurskaya, A.A. Balakina, D.V. Mishchenko, S.V. Blokhina, K.I. Agladze

Isolation of primary cardiomyocytes from neonatal mice by enzymatic method 175

MOLECULAR BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

S.A. Kuzmichev

Some thermodynamic features of the regulation piRNA-like transcripts processing in somatic cells in the mouse.....180

E.B. Dushanov, S.V. Aksenova, Y.K.D. Rodriguez, S.V. Demidov

Modeling the interaction of boron-containing structures with the cell membrane at different concentrations.....186

A.Yu. Verisokin, D.V. Verveiko, P.R. Ivanova

The role of neuromodulators in the activity of the neuroglial unit.....191

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

D.A. Shabanova, O.V. Kryukova, A.V. Tyumentseva, N.G. Maksimov, S.V. Stolyar

EPR determination of metal-containing molecules in Ehrlich ascites carcinoma after cryopreservation 197

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

Determination of uromodulin concentration in animals using filtration 202

E.V. Butenko, Y.D. Tursunova, N.M. Dobayeva, E.M. Bakurova

Some features of metformin-mediated breast carcinoma metabolism 206

K.D. Kazarinov, I.G. Polnikov

Mechanism of effective use of microwave study in pharmacological production 211

Yu.A. Chernykh, M.N. Pleshkova, D.Yu. Vandysh, S.S. Antipov, I.V. Ledeneva

Development of azolotriazine-based fluorescent dyes and assessment of their physicochemical parameters.....216

BIOPHYSICAL ECOLOGY

**V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova, A.M. Oyun, E.M. Kolosova,
D.E. Chuyashenko, E.Ya. Muchkina, O.S. Sutormin**

Bioluminescent enzymatic bioassay for environmental monitoring..... 221

I.A. Mishkin, D.N. Akhmerov, A.A. Mishkina, V.A. Bogdanovich, A.V. Kuznetsov

Horizontal sampling of microplankton using the sequential filtration device "Bobryonok" 227

ДЕКОМПОЗИЦИЯ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КРИПТОФИТОВОЙ ВОДОРОСЛИ *RHODOMONAS SALINA*

Чернышев Д.Н.¹, Клочкова В.С.¹, Новикова Т.М.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

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

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

Поступила в редакцию 03.08.2025

Аннотация. В данной работе проведена комплексная математическая декомпозиция истинного спектра поглощения культуры криптофитовой водоросли *Rhodomonas salina* (Wislouch) Hill & Wetherbee IBSS-29. Исследование было направлено на выделение и количественную оценку отдельных пигментов, входящих в состав этой водоросли, а именно фикоэритрина с максимумом поглощения 545 нм, аллоксантина, хлорофилла *a* и хлорофилла *c*. Концентрации этих пигментов являются ключевыми параметрами для оценки физиологического состояния культуры. Для достижения поставленной цели в рамках исследования были использованы данные литературных источников, содержащие спектральные характеристики каждого из указанных пигментов. На основе этих данных были построены математические модели спектров поглощения, представляющие собой сумму кривых Гаусса. Полученные выражения позволили точно моделировать вклад каждого пигмента в общий спектр поглощения исследуемой культуры. Далее на базе сформированных моделей отдельных пигментов была составлена модель нативного спектра поглощения *R. salina*. Практическая реализация метода выполнена в программной среде Microsoft Excel. В рамках этого подхода реализована процедура математического разделения спектра поглощения микроводоросли на составляющие компоненты с помощью метода минимизации суммы квадратов отклонений между экспериментальным спектром и моделью. Для этого использовался встроенный инструмент поиска решения (Solver). Данный метод обладает рядом преимуществ: он не требует сложного оборудования, является быстрым и достаточно точным для практических целей контроля пигментного состава микроводорослей.

Ключевые слова: микроводоросли, спектры поглощения, фикобилины, хлорофилл *a*, математическое моделирование, кривые Гаусса.

ВВЕДЕНИЕ

Криптофитовые водоросли, представителем которых является *Rhodomonas salina*, обладают уникальным набором пигментов, включая хлорофиллы *a* и *c*, каротиноиды и фикобилипротеины. Изучение их динамики и кинетики под воздействием различных лимитирующих рост факторов (интенсивность света, температура, солёность, питательные вещества и др.) позволяют глубже понять механизмы фотосинтеза, в том числе в практическом приложении оптимизации культивирования и получения целевых продуктов *R. salina*.

В настоящее время актуальна разработка оперативных и неразрушающих методов определения концентрации пигментов микроводорослей. Такие методы позволяют быстро получать информацию о биомассе и пигментном составе микроводорослей для корректировки параметров культивирования для достижения максимальной продуктивности культуры и продукции её пигментов. Важно отметить, что благодаря таким методам возможно существенно сократить время и затраты на анализ, что особенно важно для при работе с большими объёмами культур микроводорослей. Значительные перспективы перед исследователями открываются при использовании оптических методов как наиболее чувствительных и не требующих сложной пробоподготовки. Определяемый таким образом спектр поглощения культуры, содержит полную информацию о пигментном составе клеток. Для определения концентрации каждого пигмента необходимо математически разделить общий спектр на отдельные спектры пигментов, учитывая, что оптическая плотность культуры является суммой оптических плотностей отдельных компонентов. Описание спектра пигмента с помощью одной или нескольких кривых нормального распределения (кривых Гаусса) показало свою эффективность в ряде работ на различных видах водорослей [1-5]. Целью данной работы является разработка математической модели спектра поглощения *Rhodomonas salina*, которая основана на литературных данных о спектрах поглощения отдельных пигментов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования являлась криптофитовая водоросль *Rhodomonas salina* (Wislouch) Hill & Wetherbee IBSS-29 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБИОМ). Нативные спектры поглощения регистрировались на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible с

интегрирующей сферой (ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ) в диапазоне от 400 до 750 нм с шагом 0,5 нм. Для определения истинного спектра поглощения использовали подход, предложенный в [6]:

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; r) - L_{\text{осл-е}}(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (1)$$

где $D(\lambda; r)$ – оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $D(\lambda; 0)$ – оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы; $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ – поправочный коэффициент ослабления света.

Спектры растворов пигментов состоят из нескольких максимумов, каждый 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

Каждый отдельный пик был описан выражением:

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

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

Проведено разделение приведённых в литературе спектров на отдельные кривые Гаусса [7]. Полученные параметры кривых использованы на начальном этапе аппроксимации спектров поглощения культуры. Внося поправки (амплитуды, полуширины и сдвига максимума) получены финальные значения. Аппроксимация проводилась методом доверительных областей с заданными ограничениями и начальными параметрами. Коэффициент детерминации R^2 между экспериментальными и реконструированными спектрами составлял от 0,98 до 0,99. Основные расчёты проводились в программе MagicPlotStudent.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно литературным данным [7], культура *Rhodomonas salina* содержит следующие пигменты: α -каротин, аллоксантин, хлорофилл c , хлорофилл a и криптофитовый фикоэритрин (Cr-PE). Далее будут рассмотрены разделения оцифрованных спектров поглощения каждого пигмента.

Хлорофилл a . Оцифрованный спектр поглощения хлорофилла a был приведён к 1 в точке максимума (678 нм) и описан 5 кривыми нормального распределения (рис. 1). Параметры модели приведены в таблице 1.

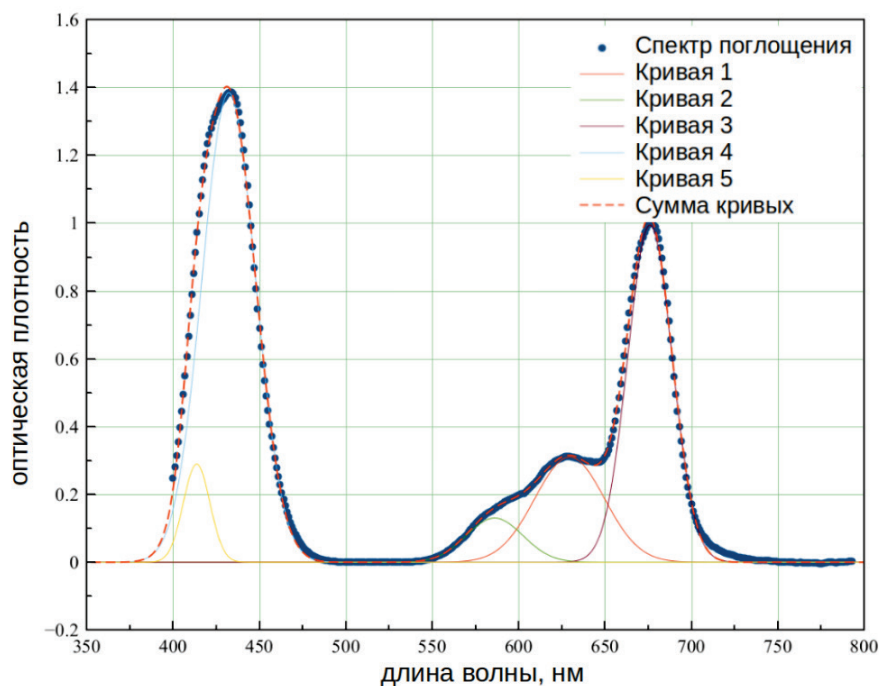


Рисунок 1. Спектр нативной формы хлорофилла a , разделённый на отдельные кривые Гаусса

Таблица 1. Параметры модели нативной формы хлорофилла *a*

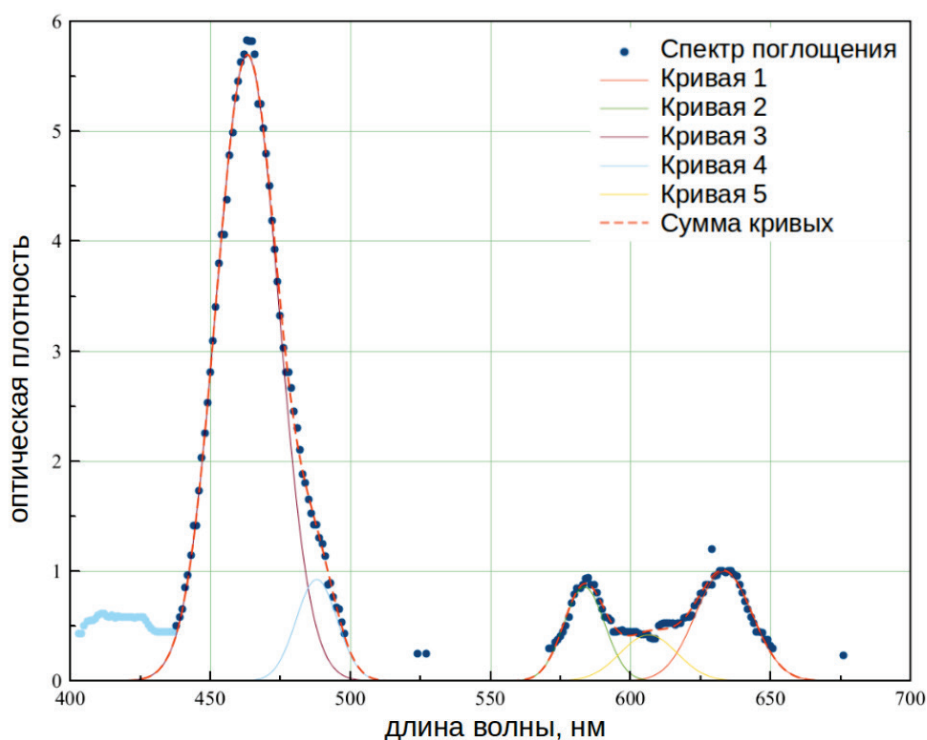
Номер пика	1	2	3	4	5
Амплитуда	0,2893	1,384	0,1302	0,3099	0,994
Полуширина	7,7	15,5	16,3	20,2	12,9
Максимум поглощения	413,7	432,3	586,2	629,6	676

Таблица 2. Параметры модели нативной формы хлорофилла *c*

Номер пика	1	2	3	4	5
Амплитуда	5,6918	0,9225	0,8545	0,4189	0,996
Полуширина	11,2	7,4	7,4	10,2	10,3
Максимум поглощения	466,7	491,5	587,1	610	636,9

Хлорофилл c. Спектр поглощения хлорофилла *c* в нативной форме из [8] был оцифрован и приведён к 1 в точке максимума 633 нм, и разделён на отдельные кривые Гаусса (рис. 2) Параметры модели показаны в таблице 2.

Суммарные каротиноиды. Общие каротиноиды были описаны преобладающим аллоксантином, поскольку спектр α -каротина и аллоксантина имеет близкие максимумы поглощения и разделить их в нативной форме пока не представляется возможным. Спектр аллоксантина в нативной форме полученный из криптофитовой водоросли *Cryptomonas ovata* [7] был оцифрован, приведён к 1 в точке максимума и разделён на отдельные кривые Гаусса (рис. 3). Параметры модели аллоксантина показаны в таблице 3.

Рисунок 2. Спектр нативной формы хлорофилла *c*, разделённый на отдельные кривые Гаусса

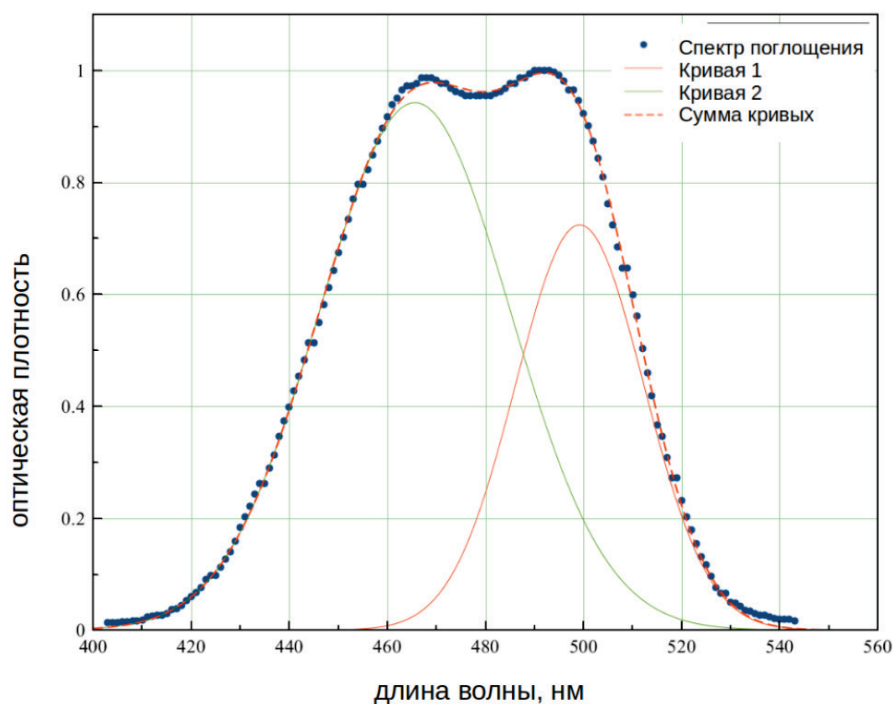


Рисунок 3. Разделение спектра поглощения нативной формы аллоксантина на отдельные кривые Гаусса

Таблица 3. Параметры модели аллоксантина

Номер пика	1	2
Амплитуда	0,9423	0,7239
Полуширина	19,6	13,3
Максимум поглощения	465,1	498,7

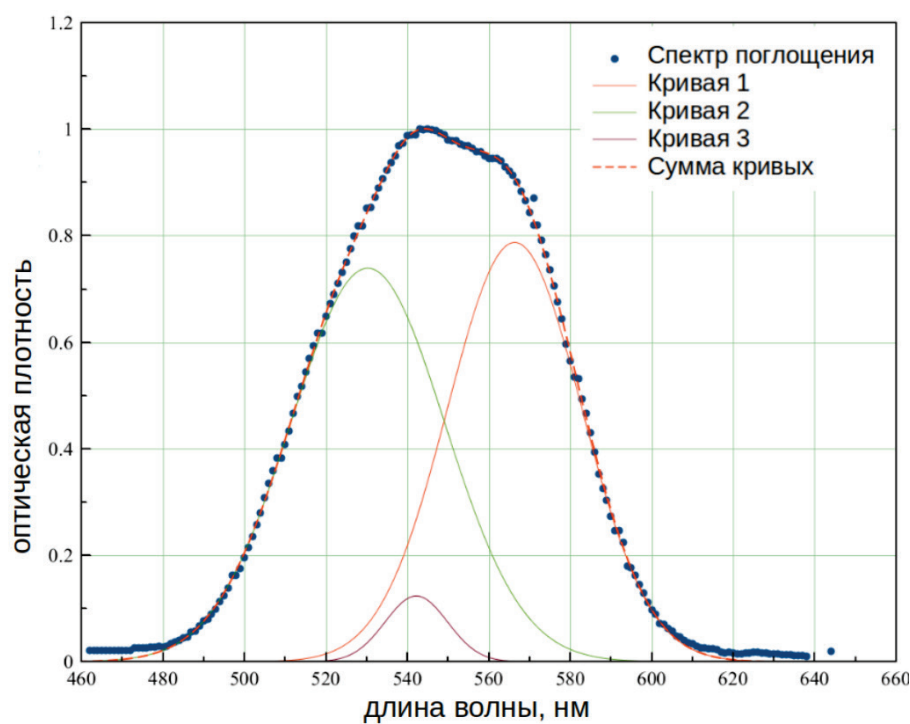
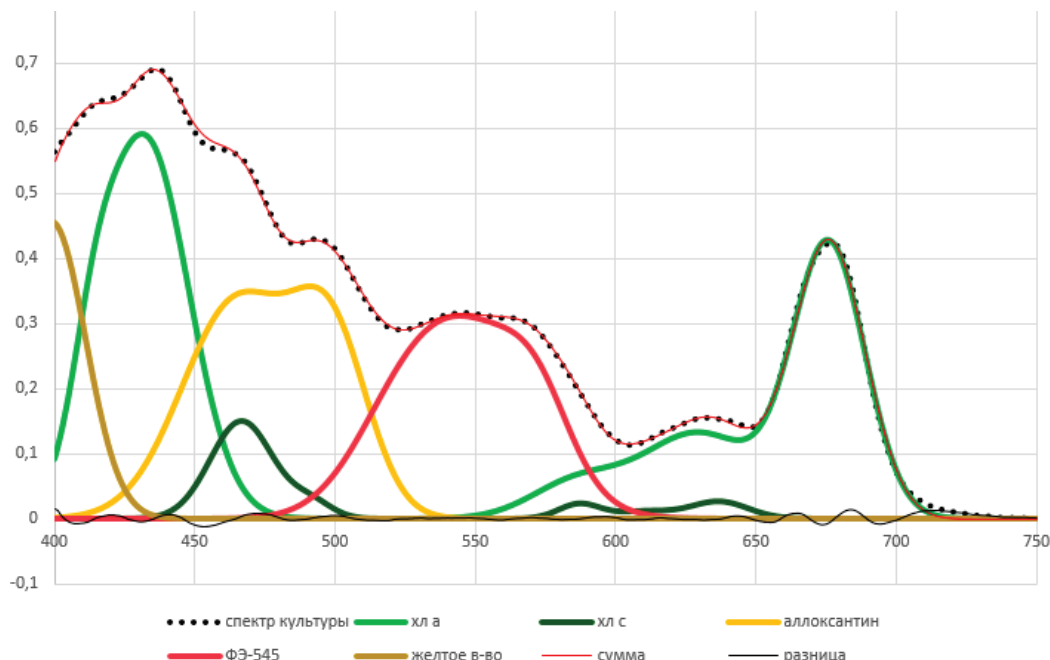


Рисунок 4. Разделение спектра поглощения нативной формы фиксозантрина 545 на отдельные кривые Гаусса

Таблица 4. Параметры модели фикоэритрина 545

Номер пика	1	2	3
Амплитуда	0,2893	0,8689	0,2825
Полуширина	17,4	22,7	11,7
Максимум поглощения	521,8	548,1	572,5

Рисунок 5. Разделение спектра поглощения культуры криптофитовой микроводоросли *Rhodomonas salina* на спектры отдельных пигментов

Фикоэритрин 545. Спектр поглощения нативной формы фикоэритрина 545 из криптофитовой водоросли *Cryptomonas ovata* из статьи [8] был оцифрован, приведён к 1 в точке максимума и разделён на отдельные кривые Гаусса (рис. 4). Параметры модели фикоэритрина 545 показаны в таблице 4.

Жёлтое вещество. При разделении спектра поглощения культуры, нами был выявлен дополнительный пик в области 400 нм, который не принадлежал к конкретным пигментам. Данный пик характеризует детрит или растворенное органическое вещество [9].

Используя разработанную модель, было проведено разделение спектра культуры криптофитовой микроводоросли *Rhodomonas salina* на спектры отдельных пигментов. Коэффициент детерминации r^2 принимал значения от 0,99, что свидетельствует о высокой достоверности и точности модели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря разработанной модели, представляющей собой сумму спектров поглощения отдельных пигментов, возможно количественное определение пигментов культуры *Rhodomonas salina* непосредственно в нативной форме без вмешательства в процессы роста водорослей и без трудоёмкой пробоподготовки при экстракции пигментов. Для вычисления концентрации пигментов на начальном этапе моделирования были использованы стандартные значения экстинкции пигментов, приведённые в литературных источниках [10,11]. Метод разделения спектра поглощения культуры на спектры отдельных пигментов и вычисление концентрации пигментов был реализован в программе Excel, с использованием инструмента «Поиск решения», методом ОПГ. Пример декомпозиции спектра культуры приведён на рисунке 5.

Список литературы / References:

1. Bidigare R.R. et al. In-vivo absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X.*, SPIE, 1990, vol. 1302, pp. 290-302.
2. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, vol. 73, no. 1, pp. 11-23.
3. Чернышёв Д.Н., Ключкова В.С., Лелеков А.С. Модель декомпозиции нативного спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum*. *Вестник Самарского университета. Естественная серия*, 2024, т. 30, № 1, с. 122-131 [Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S. Decomposition model of the native absorption

spectrum of *Porphyridium purpureum* culture. *Bulletin of Samara University. Natural Science Series*, 2024, vol. 30, no. 1, pp. 122-131, DOI: 10.18287/2541-7525-2024-30-1-122-131 (In Russ.).

4. Naqvi K.R., Merzlyak M.N., Melo T.B. Absorption and scattering of light by suspensions of cells and subcellular particles: an analysis in terms of Kramers-Kronig relations. *Photochem Photobiol Sci*, 2004, pp. 132-137, DOI: 10.1039/b304781d.

5. 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.

6. Клочкова В.С., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Ширяев А.В., Бучельников А.С., Шупова Е.В. Изменение спектра оптической плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 4, с. 543-547 [Klochkova V.S., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Shiryayev A.V., Buchelnikov A.S., Shupova E.V. Changes in the optical density spectrum of the cumulative culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 543-547 (In Russ.)].

7. Schomaker R.A., Richardson T.L., Dudyche J.L. Consequences of light spectra for pigment composition and gene expression in the cryptophyte *Rhodomonas salina*. *Environ Microbiol*, 2023, pp. 3280-3297, DOI: 10.1111/1462-2920.16523.

8. Barsanti L., Evangelista V., Frassanito A.M., Vesentini N., Passarelli V., Gualtieri P. Absorption microspectroscopy, theory and applications in the case of the photosynthetic compartment. *Micron*, 2007, vol. 38, no. 3, pp. 197-213.

9. Маньковский В.И. Желтое вещество в поверхностных водах восточной части Тропической Атлантики. *Морской гидрофизический журнал*, 2015, № 3, с. 53-61 [Mankovsky V.I. Yellow matter in the surface waters of the eastern part of the Tropical Atlantic. *Marine Hydrophysical Journal*, 2015, no. 3, pp. 53-61 (In Russ.)].

10. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography*. Paris: UNESCO; ISBN 92-3-103275-5, 1997.

11. Стадничук И.Н. *Фикобилипротеины*. Москва: ВИНТИ, 1990, т. 193 [Stadnichuk I.N. *Phycobiliproteins*. Moscow: VINITI, 1990, vol. 193 (In Russ.)].

DECOMPOSITION OF THE ABSORPTION SPECTRUM OF CRYPTOPHYTE ALGAE RHODOMONAS SALINA

Chernyshev D.N.¹, Klochkova V.S.¹, Novikova T.M.²

¹ Sevastopol State University

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

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

Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia

Received 03.08.2025

Abstract. In this work, a complex mathematical decomposition of the true absorption spectrum of the cryptophyte alga culture *Rhodomonas salina* (Wislouch) Hill & Wetherbee IBSS-29 was carried out. The study was aimed at isolating and quantifying individual pigments included in this alga, namely phycoerythrin with an absorption maximum of 545 nm, alloxanthin, chlorophyll a and chlorophyll c. The concentrations of these pigments are key parameters for assessing the physiological state of the culture. To achieve this goal, the study used literary data containing the spectral characteristics of each of these pigments. Based on these data, mathematical models of the absorption spectra were constructed, representing the sum of Gaussian curves. The obtained expressions made it possible to accurately model the contribution of each pigment to the overall absorption spectrum of the studied culture. Then, based on the formed models of individual pigments, a model of the native absorption spectrum of *R. salina* was compiled. The practical implementation of the method is performed in the Microsoft Excel software environment. Within the framework of this approach, the procedure of mathematical separation of the absorption spectrum of microalgae into components is implemented using the method of minimizing the sum of squared deviations between the experimental spectrum and the model. For this, the built-in solution search tool (Solver) was used. This method has a number of advantages: it does not require complex equipment, is fast and accurate enough for practical purposes of monitoring the pigment composition of microalgae.

Key words: microalgae, absorption spectra, phycobilins, chlorophyll a, mathematical modeling, Gauss curves.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ НЕОНАТАЛЬНЫХ МЫШЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ МЕТОДОМ

Подгурская А.Д.^{1,2}, Балакина А.А.^{1,3}, Мищенко Д.В.^{1,3,4}, Блохина С.В.¹, Агладзе К.И.^{2,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр

«Проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук
просп. Академика Семенова, 1, 142432, г. Черноголовка, РФ; e-mail: alisapodgurskaya@mail.ru

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области
«Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»
ул. Щепкина, 61/2, 129090, г. Москва, РФ

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»
Ленинские горы, ГСП-1, 119234, г. Москва, РФ

⁴ Научно-образовательный центр «Медицинская химия» в г. Черноголовке, Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования «Государственный университет просвещения»
просп. Северный, 1, 142432, г. Москва, РФ

Поступила в редакцию 07.08.2025

Аннотация. Получение жизнеспособных кардиомиоцитов *in vitro* из разных биологических источников и изучение их свойств наряду с исследованием перспективных лекарственных веществ на сердечных клетках является актуальной задачей в связи с высокой смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний. Самым перспективным направлением является использование индуцированных плюрипотентных и эмбриональных стволовых клеток пациентов для дифференцировки их в кардиомиоциты, а также использование первичных клеток сердца пациентов. По-прежнему актуально получать первичные клетки животных для базовых исследований токсичности и кардиопротективности синтезируемых лекарственных веществ. Первичные кардиомиоциты из неонатальных крыс десятилетиями зарекомендовали себя физиологически релевантной моделью, однако использование клеток мышей гораздо менее распространено, и каждая лаборатория ставит протокол выделения под свои цели. Клетки мышей более восприимчивы к ферментативной обработке, нежели крысиные клетки, что требует адаптации протоколов. В работе предложен метод выделения кардиомиоцитов из неонатальных мышей линии BDF1 для электрофизиологических и биохимических исследований. С помощью последовательной ферментативной обработки трипсином и коллагеназой 2 типа в работе получены жизнеспособные кардиомиоциты, которые сохраняли спонтанную активность и функциональность вплоть до 15 дней.

Ключевые слова: мыши BDF1, кардиомиоцит, первичная культура.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с высокой смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний в России актуальна разработка и тестирование кардиопротективных лекарственных средств [1–4] наряду с тестированием кардиотоксичности [5]. За последние годы клеточные технологии получили широкое развитие в биомедицине [6]. Разработка наиболее перспективных клеточных моделей для тестирования включает в себя использование кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток [7–10] и эмбриональных стволовых клеток [11] пациентов, а также разработка протоколов иммортализации, которая реализуется в ряде лабораторий для человеческих [12] и крысиных [13] кардиомиоцитов.

Более доступными моделями выступают первичные человеческие кардиомиоциты [14] и первичные кардиомиоциты животных. Для скрининга лекарств по-прежнему актуальны иммортализованные клеточные линии AC16 (человеческая), H9C2 (крысиная), AT-1 и HL-1 (мышинные), однако не соответствуют ряду физиологических характеристик зрелым кардиомиоцитам. К примеру, в клетках AC16 наблюдается восьмикратное снижение экспрессии мРНК, связанной с элементами сократительного аппарата и рианодиновыми рецепторами 1 и 2, по сравнению с первичными кардиомиоцитами [15]. Далее будут рассмотрены особенности получения первичных кардиомиоцитов.

Метод получения первичных человеческих кардиомиоцитов заключается в помещении фрагментов человеческого сердца в кардиоплегический раствор с последующим измельчением фрагментов механически и (опционально) с помощью микротомы. Затем полученные кусочки помещают в безкальциевый буфер и обрабатывают на первом этапе смесью ферментов: коллагеназой 1/2/4/5 и протеиназой 14/пропазой (в различных соотношениях), затем только коллагеназой [16–19]. Далее помещают выделенные клетки в питательную среду с кальцием, постепенно увеличивая его концентрацию [17,18]. Было выявлено, что добавление блебистатина увеличивает выживаемость кардиомиоцитов при выделении [18]. Данные изолированные клетки удобно использовать для пэтч-кламп исследований ионных токов и исследований сократимости клеток, в частности, изменения длины саркомеров при влиянии лекарственных веществ.

Первичные зрелые (взрослые) кардиомиоциты получают из грызунов [20], морских свинок, кроликов, а также сусликов [21] и перепелов [22]. Протокол включает в себя следующие стадии:

1. Эвтаназия животного и извлечение сердца, помещение его в безкальциевый буферный раствор
2. Канюлирование аорты и подключение к аппарату Лангендорфа, ретроградная перфузия безкальциевым буфером для удаления крови
3. Ретроградная перфузия буфером с кальцием со смесью ферментов протеазы 14 типа/проназы и/или коллагеназы 2 типа. Время ферментативной обработки от 8 до 40 минут.
4. После ферментации сердце измельчают, кусочки фильтруют через клеточное сито с размером пор 100-200 мкм.
5. Центрифугируют суспензию при 50-200g 5 мин для крысиных клеток и 20-30g 3 мин для мышинных. Осадок ресуспендируют в питательной среде.
6. Максимальный выход крысиных клеток составляет порядка 10 млн с одного сердца крысы Вистар 250-400 г [23] и мышинных клеток порядка 1 млн с одного сердца мыши C57BL/6J WT 8 ~ 12 недель [24].

Также предложен метод выделения взрослых кардиомиоцитов без использования установки Лангендорфа [25]. Принципиальным отличием является ферментация сердца в чашке Петри - инъекцией безкальциевым буфером с коллагеназами 2 и 4 и протеазой 14 в правый желудочек сердца. После ферментации, измельчения сердца на кусочки и фильтрации, кардиомиоциты собирали 4 раза гравитационным осаждением с использованием 3 промежуточных буферов с возрастающей концентрацией ионов кальция в них - вплоть до физиологического уровня. Выход составил не более 1 млн клеток с одного сердца мыши C57BL/6J 8 ~ 12 недель [25].

Выделение кардиомиоцитов из неонатальных грызунов проще и дешевле, чем из взрослых животных. Получаемые клетки менее чувствительны к введению в среду с кальцием после выделения. Часто используемой моделью являются неонатальные кардиомиоциты крыс, реже мышей. Кратко, протоколы представляют собой последовательность: эвтаназия животных 1-3 дней от роду и извлечение сердца, измельчение сердца и обработка последовательно трипсином и коллагеназой 2 типа, тритурирование кусочков, их фильтрация и центрифугирование полученной суспензии, прединкубация 1 час. Далее клетки высевают на предварительно покрытую фибронектином/ламинином/желатином подложку. Как правило, сначала делают обработку трипсином в течение ночи и только затем переходят к обработке коллагеназой для получения максимального выхода клеток, протокол занимает около 20 часов. Некоторые исследовательские группы значительно сокращают время, обрабатывая кусочки сердца смесью ферментов трипсина и коллагеназы сразу, и повторяя такую обработку 10 раз, каждый раз отбирая супернатант с клетками [26]. Фирмой Thermofisher scientific в 2014 году была разработана смесь ферментов для выделения кардиомиоцитов за 1 час для коммерческого использования.

Проведение исследований на генетически модифицированных мышах также требует методов выделения кардиомиоцитов из них. Актуальна простая надежная методика выделения мышинных неонатальных кардиомиоцитов для изучения биохимических, электрофизиологических и морфологических характеристик при влиянии новых фармакологических веществ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для посадки и культивирования клеток использовали актоклавированные покровные стекла 18x18 мм и стерильные культуральные планшеты. Для улучшения адгезии кардиомиоцитов использовали человеческий фибронектин (ИМТЕК) в концентрации 20 мкг/мл. Образцы держали в инкубаторе (37°C, 5% CO₂) в течение 12 часов.

Мышей BDF1 до 1-3 дней от роду получили из Вивария ИПХФ РАН. Все эксперименты одобрены этической комиссией ИПХФ РАН. Мышей декапитировали и извлекали сердца в стерильных условиях, помещали в охлажденный до +4 °C солевой раствор Хэнка (Elabscience), удаляли предсердие, остатки артерий и вен и измельчали до кусочков 1 мм³. Кусочки помещали в чашку Петри в раствор трипсина 0.1 мг/мл (1:250, Панэко) в холодильник (+4°C) на 16-20 часов. Затем проводили обработку кусочков раствором коллагеназы 2 типа (Servicebio) 1 мг/мл L-15 (Elabscience) при 37°C, 120 оборотах в минуту в водяной бане в течение 60 минут. После тритурирования и фильтрования кусочков через клеточное сито центрифугировали полученную клеточную суспензию 5 мин при 500 об/мин, сливали надосадочную жидкость и добавляли 10 мл культуральной среды: DMEM (Панэко) с L-глутамином (Панэко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest), 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Панэко). Полученную суспензию переносили в культуральный флакон и ставили в CO₂ -инкубатор (37°C, 5% CO₂) на 1 час, таким образом избавлялись от немиокардиальных клеток, прикрепленных ко дну флакона. Неадгезированные клетки собирали, ресуспендировали в культуральной среде и подсчитывали количество живых клеток с помощью камеры Горяева, предварительно окрасив клетки трипановым синим (Elabscience). Высаживали клетки в необходимой концентрации, на следующий день образцы отмывали от мертвых клеток и меняли культуральную среду на DMEM с пониженным содержанием сыворотки (5%). Далее среду обновляли каждые 48 часов. Культивирование клеток проводили в атмосфере 5% CO₂ и температуре 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 24 ч после посадки клеток наблюдали спонтанные сокращения кардиомиоцитов. Активные клетки непрерывно сокращались вплоть до 15 суток. Частота спонтанных сокращений составляла: 95 ± 27 уд/мин после 1 суток культивирования, 97 ± 15 уд/мин после 2 суток культивирования и 104 ± 15 уд/мин после 4 суток культивирования и далее стабилизировалась.

Спустя 24 ч после посадки кардиомиоциты имели поперечнополосатую исчерченность и далее увеличивались в размерах. На рисунке 1 представлены фотографии выделенных кардиомиоцитов.

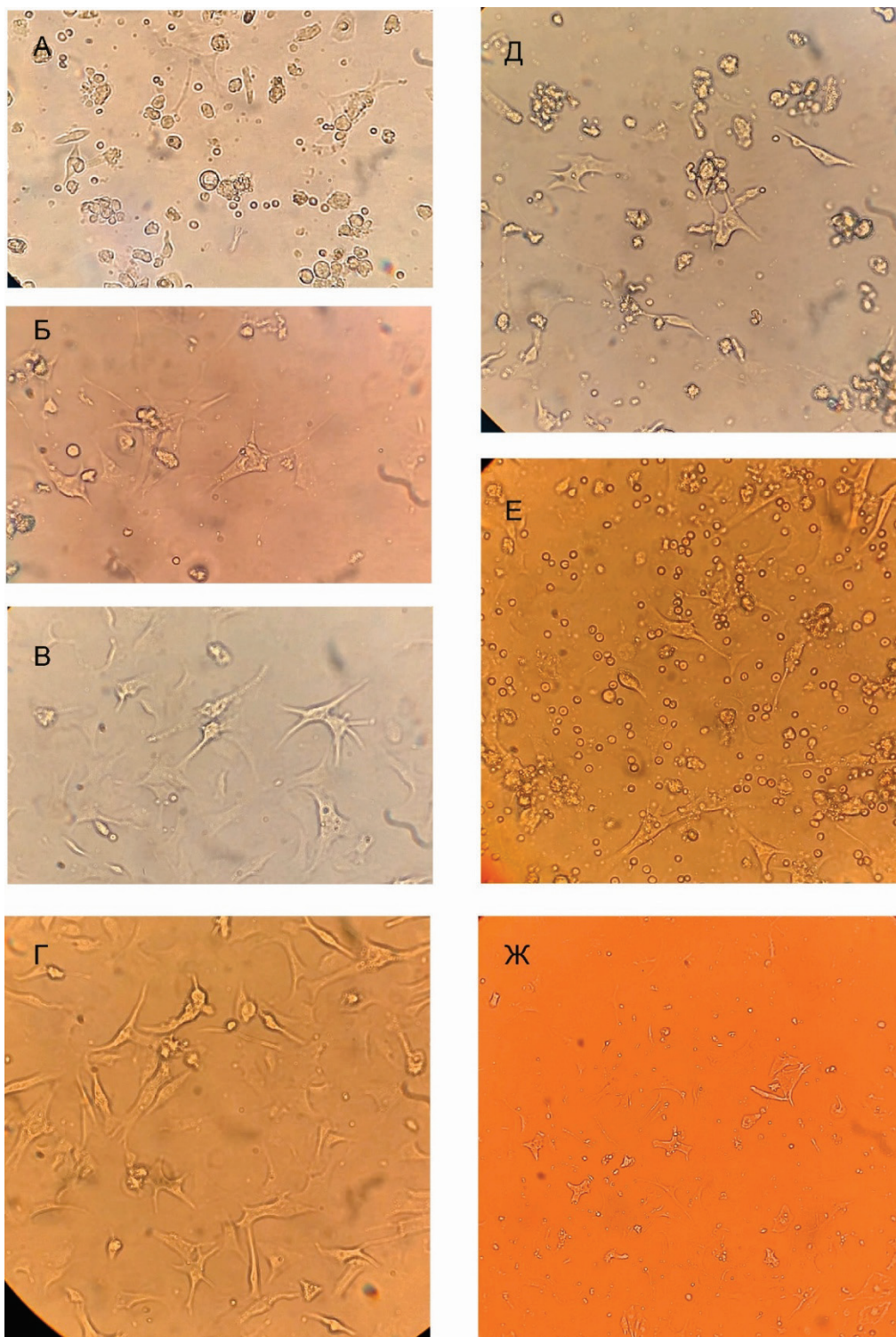


Рисунок 1. Фенотип полученных неонатальных кардиомиоцитов мыши BDF1. А-Д: увеличение $\times 40$, Ж: увеличение $\times 10$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные кардиомиоциты могут быть использованы для долгосрочных многодневных исследований лекарственных веществ, моделирования окислительного стресса и тестирования кардиопротекторов.

Финансирование. Работа выполнена счет государственного задания Министерства Здравоохранения РФ при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание № 124020500019-2)

Благодарности. Работы выполнены на приборной базе ИПХФ РАН.

Список литературы / References:

1. Astrakhantseva I.D. et al. Evaluation of clinical efficiency of cardioprotective therapy in patients with acute myocardial infarction. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care*, 2021, vol. 10, no. 3, pp. 493-503.
2. Mokrov G.V. *Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Publishing House OKI, 2022, no. 4, pp. 3-17.
3. Mokrov G.V. *Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 2. HCN channel blockers.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Publishing House OKI, 2022, no. 2, pp. 3-10.
4. Mokrov G.V. *Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 3. Sodium channel blockers.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Publishing House OKI, 2022, no. 3, pp. 3-9.
5. Осипова Т.В., Бухман В.М. Биомаркеры трансляционной медицины. *Российский биотерапевтический журнал*, 2018, т. 17, № 1, с. 6-13 [Osipova T.V., Bukhman V.M. Biomarkers of translational medicine. *Russian Biotherapeutic Journal*, 2018, vol. 17, no. 1, pp. 6-13 (In Russ.)].
6. Actual issues of the cell technologies application in Russia practical healthcare. Bulletin "Biomedicine and sociology". *Technomed Holdings LLC*, 2021, pp. 30-36.
7. Kistamas K. et al. The Current State of Realistic Heart Models for Disease Modelling and Cardiotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, vol. 25, p. 9186.
8. Windt L. *Tissue engineered models of the human heart*. 2025.
9. Konala V.B.R. et al. CiPA-qualified human iPSC-derived cardiomyocytes: A new frontier in toxicity testing by evaluating drug-induced arrhythmias. *Toxicology in Vitro. Pergamon*, 2025, vol. 108, p. 106100.
10. Podgurskaya A.D. et al. iPSCs for erythromycin arrhythmogenicity testing. *Current Topics in iPSCs Technology. Academic Press*, 2022, pp. 373-392.
11. Vidarsson H., Hyllner J., Sartipy P. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications. *Stem Cell Rev Rep. Springer*, 2010, vol. 6, no. 1, pp. 108-120.
12. Harlaar N. et al. Conditional immortalization of human atrial myocytes for the generation of in vitro models of atrial fibrillation. *Nat Biomed Eng. Nature Research*, 2022, vol. 6, no. 4, pp. 389-402.
13. Zhang Y. et al. Controllable expansion of primary cardiomyocytes by reversible immortalization. *Hum Gene Ther. Mary Ann Liebert*, 2009, vol. 20, no. 12, pp. 1687-1696.
14. Kovalenko S.G. et al. Development of a method for isolation of mature cardiomyocytes from human heart biopsy. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. Publishing House RAMS, 2023, no. 2, pp. 136-143.
15. Grzeszczuk M. et al. Effect of Hypoxia on Irisin Secretion by Human Cardiomyocytes. *In Vivo (Brooklyn). International Institute of Anticancer Research*, 2025, vol. 39, no. 2, pp. 656-668.
16. Putra M.A. et al. Transport viable heart tissue at physiological temperature yielded higher human cardiomyocytes compared to the conventional temperature. *Cell Tissue Bank. Springer Science and Business Media B.V.*, 2022, vol. 23, no. 4, pp. 717-727.
17. Шумаков Д. и др. Способ выделения кардиомиоцитов из ткани сердца человека. 2020 [Shumakov D. et al. *Method for isolating cardiomyocytes from human heart tissue*. 2020 (In Russ.)].
18. Zhou B. et al. Functional isolation, culture and cryopreservation of adult human primary cardiomyocytes. *Signal Transduct Target Ther. Springer Nature*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 1-16.
19. Shi X., Huang Y., Zhou B. Protocol for the dissociation of adult human primary cardiomyocytes using a methylcellulose-supplemented digestion solution. *STAR Protoc. Elsevier*, 2024, vol. 5, no. 4, p. 103379.
20. Ивкин Д.Ю. Экспериментальная оценка эффективности применения эмпагlifлозина при ишемических поражениях миокарда в условиях нормогликемии [Ivkin D.Yu. *Experimental evaluation of the effectiveness of empagliflozin in ischemic myocardial lesions under normoglycemic conditions* (In Russ.)].
21. Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Влияние гибернации на электрическую активность и калиевые токи в миокарде длиннохвостого суслика. *Российский физиологический журнал им. Сеченова*, 2023, т. 109, № 6, с. 788-797 [Filatova T.S., Abramochkin D.V. Effect of hibernation on electrical activity and potassium currents in the myocardium of the long-tailed ground squirrel. *Sechenov Russian Physiological Journal*, 2023, vol. 109, no. 6, pp. 788-797 (In Russ.)].
22. Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Механизм реполяризации в кардиомиоцитах японского перепела. *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, 2021, с. 437-442 [Filatova T.S., Abramochkin D.V. Mechanism of repolarization in cardiomyocytes of Japanese quail. *Receptors and intracellular signaling*, 2021, pp. 437-442 (In Russ.)].

23. Егорова М.В., Афанасьев С.А., Попов С.В. *Способ получения изолированных кардиомиоцитов из сердца взрослой крысы*. 2006 [Egorova M.V., Afanasyev S.A., Popov S.V. *Method for obtaining isolated cardiomyocytes from the heart of an adult rat*. 2006 (In Russ.)].
24. Li H. et al. Optimized Langendorff perfusion system for cardiomyocyte isolation in adult mouse heart. *J. Cell. Mol. Med. Blackwell Publishing Inc.*, 2020, vol. 24, no. 24, pp. 14619-14625.
25. Ackers-Johnson M. et al. A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes from the Adult Mouse Heart. *Circ Res. Lippincott Williams and Wilkins*, 2016, vol. 119, no. 8, pp. 909-920.
26. Ravi V. et al. Isolation and Culture of Neonatal Murine Primary Cardiomyocytes. *Curr. Protoc. John Wiley and Sons Inc.*, 2021, vol. 1, no. 7, p. e196.

ISOLATION OF PRIMARY CARDIOMYOCYTES FROM NEONATAL MICE BY ENZYMATIC METHOD

Podgurskaya A.D.^{1,2}, Balakina A.A.^{1,3}, Mishchenko D.V.^{1,3,4}, Blokhina S.V.¹, Agladze K.I.^{2,4}

¹ Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, RAS
Akademika Semenova ave., 1, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia; e-mail: alisapodgurskaya@mail.ru

² Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI")
Shchepkina str. 61/2, Moscow, 129110, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Physical and Chemical Engineering
Leninskie Gory, GSP-1, Moscow, 119991, Russia

⁴ Scientific and Educational Center "Medical Chemistry" in Chernogolovka, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "State University of Enlightenment"
Severny ave., 1, 142432, Moscow, Russia

Received 07.08.2025

Abstract. Obtaining viable cardiomyocytes in vitro from various biological sources and studying their properties, along with the study of promising medicinal substances on heart cells, is an urgent task due to the high mortality from cardiovascular diseases. The most promising direction is the use of induced pluripotent and embryonic stem cells from patients and differentiate them into cardiomyocytes, as well as the use of primary heart cells from patients. It is still important to obtain primary animal cells for basic studies of the toxicity and cardioprotection. Primary cardiomyocytes from neonatal rats have proven to be a physiologically relevant model for decades, but the use of mouse cells is much less common, and each laboratory sets its own isolation protocol for its own purposes. Mouse cells are more susceptible to enzymatic treatment than rat cells, which requires adaptation of protocols. We propose a method for isolating cardiomyocytes from neonatal BDF1 mice for electrophysiological and biochemical studies. Using sequential enzymatic treatment with trypsin and type 2 collagenase, viable cardiomyocytes were obtained, which retained spontaneous activity and functionality up to 15 days.

Key words: BDF1 mice, cardiomyocyte, primary culture.

НЕКОТОРЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССИНГА пиРНК-ПОДОБНЫХ ТРАНСКРИПТОВ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ У МЫШИ

Кузьмичев С.А.^{1,2}

¹ Российский университет медицины

ул. Делегатская, 20, г. Москва, 127473, РФ

² НИИ канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Каширское шоссе, 24, г. Москва, 115478, РФ; e-mail: kuzs19782005@mail.ru

Поступила в редакцию 01.08.2025

Аннотация. В работе проведено исследование влияния некоторых параметров последовательностей пре-микроРНК на эффективность процессинга пиРНК-подобных транскриптов (пиРНК транскриптов) с помощью биоинформатического анализа. Наибольшее количество пиРНК транскриптов, которые входят в состав пре-микроРНК, выявлено среди фрагментов, содержащих 23-24 нуклеотида. Показано, что при увеличении в пре-микроРНК содержания нуклеотидов G и C более чем на 60 %, и при возрастании минимальной свободной энергии фолдинга пре-микроРНК снижается вероятность биогенеза пиРНК транскриптов длиной от 25 до 29 нуклеотидов. Обсуждаются возможности белка YBX-1 участвовать в качестве вероятного посредника в регуляции процессинга пиРНК транскриптов в соматических клетках. Обнаружено, что большинство пре-микроРНК семейства микроРНК let-7 у мыши способны служить матрицей для синтеза пиРНК транскриптов при неканоническом процессинге.

Ключевые слова: процессинг, пре-микроРНК, фолдинг, пиРНК транскрипты.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования роли малых некодирующих РНК в регуляции экспрессии генов остаются перспективным направлением молекулярной биологии и биоинформатики. В тоже время, этапы процессинга пиРНК (РНК, взаимодействующих с белками PIWI), которые в отличие от микроРНК (миРНК) могут иметь большую длину последовательностей – от 24 до 35 нуклеотидов (нк), и уридин в 1-ом положении на 5'-конце молекулы, а также механизмы выбора РНК, как матрицы для синтеза пиРНК изучены не достаточно [1]. В клетках половых желез пиРНК могут процессироваться из пре-пиРНК с участием эндонуклеазы mitoPLD6 (митохондриальная фосфолипаза D), расположенной на внешней мембране митохондрий, и с помощью механизма «пинг-понг», сопровождающегося деградацией транспозонов [1]. В соматических клетках у домового мыши *Mus musculus* ранее было выявлено меньшее количество пиРНК, по сравнению с половыми [2], возможно, потому что функционирование механизма пинг-понга в них может быть нарушено, в том числе из-за присутствия большого количества миРНК [3]. Длина большинства пиРНК, обозначенных в соматических клетках как пиРНК -подобные транскрипты [4] была близкой к миРНК, и составляла 22-24 нуклеотида [4]. Также в различных тканях у мыши найдены белки семейства PIWI (p-element induced wimpy testis), взаимодействующие с пиРНК [4]. Поскольку пиРНК в соматических клетках могут участвовать и в процессах регуляции трансляции комплементарных им мРНК, а также конкурировать с некоторыми миРНК за гибридизацию с последовательностями мРНК-мишеней [3], исследования особенностей регуляции процессинга пиРНК вне половых желез будут иметь прикладное значение для выявления новых путей воздействия лекарственных препаратов. Обнаружение в составе многих пре-микроРНК (пре-миРНК) последовательностей пиРНК -подобных транскриптов (пиРНК транскриптов) позволило предположить, что процессинг пиРНК может происходить еще до фолдинга части последовательностей пре-микроРНК в пре-миРНК, т.е. образования двухцепочных структур, подобных шпильке [5]. В отличие от канонического процессинга миРНК, для процессинга пиРНК не требуется рибонуклеаза РНКазы III Dicer [1,6]. Однако механизм процессинга пиРНК транскриптов, и факторы способные переключать канонический процессинг пре-миРНК в неканонический, сопровождающийся биогенезом пиРНК остаются не известными. Не изучено влияние на эти процессы коротких фрагментов (от 16 до 19 нуклеотидов) деградации пре-миРНК, несмотря на то что они представлены в базы miRBase и обнаруживаться при секвенировании в различных клетках. Поэтому целью нашей работы было изучение влияния некоторых термодинамических параметров различных пре-миРНК, в том числе способности к гибридизации с короткими фрагментами деградации пре-миРНК, а также отличий в нуклеотидном составе их терминальной петли на процессинг пиРНК транскриптов различной длины у мыши. В качестве термодинамического параметра, характеризующего прочность связи двухцепочной структуры пре-миРНК и вероятности ее фолдинга, сравнивалась минимальная свободная энергия (minimum free energy, MFE) между последовательностями, отличающимися содержанием G и C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований были взяты последовательности транскриптов 457 молекул пре-миРНК, представленных в базе miRBase, версия 22.1 up date, из которых были выбраны только хорошо аннотированные пре-миРНК. Используемые для анализа транскрипты не включали в себя последовательности изомиров, способные образовываться при модификации различных пре-миРНК, после их процессинга [7]. Поиск последовательностей пиРНК транскриптов, которые могут образовываться при неканоническом процессинге пре-миРНК, проводился в базе данных piRNA-IPdb (<https://ipdb2.shinyapps.io/ipdb2/>), содержащей up date информацию о 54,639,148 последовательностях пиРНК. В связи с большим количеством прочтений транскриптов их количество было представлено в виде десятичных логарифмов. Так как особенности процессинга и деградации пре-миРНК могут отличаться в различных клетках, в связи с разной активностью рибонуклеаз, проводилось нормирование количества прочтений ($C2$) транскриптов пиРНК ($N2 - \log_{10}C2$) относительно количества ($C1$) прочтений всех транскриптов ($N1 - \log_{10}C1$) для каждой пре-миРНК. Был проведен поиск пре-миРНК, имеющих мотив UGC для распознавания белком MCP1P 1, (monocyte chemoattractant protein induced protein 1), способным приводить к деградации пре-миРНК на ряд фрагментов с 5' и с 3' конца их стебля [8]. Пре-миРНК с UGC в терминальной петле были исключены из выборок для дальнейшего анализа, чтобы ограничено количество факторов, влияющих на неканонический процессинг. Для вычисления MFE фолдинга пре-миРНК использовалась программа RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), а расчета % GC в пре-миРНК - программный пакет molbiotools (<https://molbiotools.com/>). Влияние нокдауна РНКазы III Dicer на процессинг пиРНК из пре-миРНК оценивалось на основе данных [6]. Возможность гибридизации между пре-миРНК и короткоцепочными фрагментами деградации пре-миРНК представленными в базе miRBase, версия 22.1 определялась с помощью программы RNAhybrid 2.2 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>). В связи с тем, что точность результатов определения параметра MFE на основе метода, базирующегося на модели свободной энергии Тернера, Мэтьюза, и метода генерации ограничений составляет для последовательностей до 100 нуклеотидов порядка 80-87% [9], наименьшее MFE гибридизации было выбрано ≤ -20 ккал/моль. Такой подход позволил учитывать, что даже в случае погрешности определения MFE в 20% от величины этого параметра, он все равно будет превышать значение MFE, необходимое для образования гетеродуплекса (или димера) между двумя короткими РНК [10]. Поскольку количество фрагментов пре-миРНК, в том числе и пиРНК транскриптов может зависеть от количества нуклеотидов в пре-миРНК, пре-миРНК различной длины были ранжированы по диапазонам количества их нуклеотидов. Для этого вычислялся доверительный интервал среднего количества нуклеотидов для пре-миРНК, с которых процессируются последовательности сходного и идентичного нуклеотидного состава в 3-х различных семействах mmi-let-7, mmi-mir-669a и mmi-mir-466, чтобы определить границы диапазона варьирования количества нуклеотидов между пре-миРНК в пределах разных выборок. Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 10, с использованием непараметрического критерия U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты анализа распределения фрагментов деградации пре-миРНК, которые по количеству нуклеотидов соответствовали пиРНК транскриптам от 22 до 30 нуклеотидов, и были найдены в базе piRNA-IPdb, показал неравномерность их распределения. Большое количество пиРНК транскриптов из различных пре-миРНК имели 23-24 нуклеотида, в том числе пиРНК транскрипты из клеток нейробластомы N2a (рис. 1), в которых был проведен нокдаун РНКазы III Dicer. Транскрипты, содержащие 29-30 нуклеотидов, были найдены в единичном количестве только для некоторых пре-миРНК (например, mmi-mir-133a-2).

Количество фрагментов пиРНК соответствующих по длине транскриптам пиРНК ($N2$) достоверно возрастало с увеличением количества всех фрагментов разных пре-миРНК ($N1$), коэффициент корреляции Спирмена - $R = 0,8$. Анализ изменчивости количества нуклеотидов пре-миРНК в 3-х семействах миРНК - mmi-let-7, mmi-mir-669a и mmi-mir-466 показал, что доверительный интервал изменений их длины составляет 85-95 нуклеотидов. Число нуклеотидов в анализируемых последовательностях пре-миРНК варьировало от 61 до 128, при этом количество пре-миРНК увеличилось с достижением их длины до 65 нуклеотидов, а количество пре-миРНК с более чем 110 нуклеотидами было незначительным. Поэтому для корректного сопоставления данных биоинформатического анализа пре-миРНК, их последовательности были распределены по выборкам с периодичностью в 10 нуклеотидов, начиная с 65 нуклеотидов: т.е. в 1-ую выборку были включены пре-миРНК от 65 до 75 нуклеотидов, во 2-ю от 76 до 86 нуклеотидов, в 3-ю от 87 до 97 нуклеотидов, в 4-ю от 98 до 108, в 5-ю от 109 до 119 нуклеотидов.

Результаты проведенного анализа показал, что с возрастанием содержания G и C в пре-миРНК достоверно снижалась относительное количество транскриптов пиРНК длиной от 25 до 29 нк ($N2/N1$), в группе пре-миРНК длиной от 76 до 86 нуклеотидов (рис. 2), для последовательностей с не менее 1 парой GC в их терминальной петле (коэффициент корреляции Спирмена $R = -0,7$).

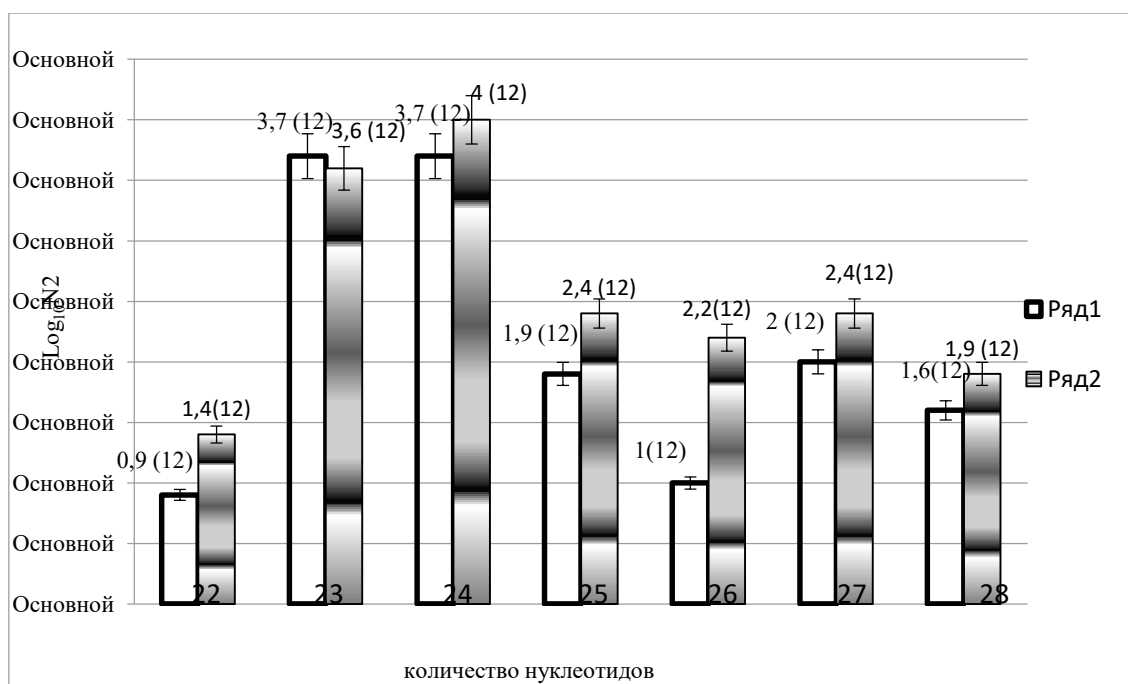


Рисунок 1. Распределение количества пиРНК транскриптов различной длины; ряд 1 по данным работы [6], Ряд 2 по данным базы miRBase, версия 22.1

Также достоверная отрицательная корреляция ($R = -0,6$ по Спирмену) наблюдалась между MFE фолдинга пре-миРНК и параметром N2/N1. Для выборок пре-миРНК большей длины корреляции между параметром N2/N1 и содержанием G и C в пре-миРНК не было обнаружено. При этом было выявлено, что пре-миРНК мыши, с которых процессируются большинство миРНК семейства let-7 (*mmu-let-7i*, *mmu-let-7b*, *mmu-let-7f-1*, *mmu-let-7f-2*, *mmu-let-7g*, *mmu-let-7c-2*, *mmu-let-7a-2*) способны служить матрицей для биогенеза пиРНК транскриптов от 25 до 29 нуклеотидов, параметр N2/N1 для пиРНК транскриптов из последовательностей таких пре-миРНК варьировал от 0,2 до 0,45. Учитывая данное наблюдение, а также то, длина пре-миРНК *mmu-let-7* изменяется от 83 до 96 нуклеотидов, мы сформировали новую выборку пре-миРНК соответствующей длины (83-96 нуклеотидов), для которой была обнаружена более значимая отрицательная корреляция между пиРНК транскриптов и содержанием GC в % от пре-миРНК (коэффициент корреляции Спирмена: $R = -0,87$). В связи с тем, что возрастание % G и C в пре-миРНК позволяет им образовывать более стабильную структуру, т.е. способствует фолдингу пре-миРНК последовательностей, было проведено сравнение параметра N2/N1 для пре-миРНК с более 60 % GC и с $\leq 50\%$ GC (рис. 3а), которое показало статистически значимые различия ($p < 0,01$) между относительным содержанием пиРНК транскриптов длиной от 25 до 29 нуклеотидов. Наличие в терминальной петле некоторых пре-миРНК мотивов CAUC или UAUC, которые распознаются белком YBX-1 (Y box-binding protein 1), способным осуществлять дефолдинг пре-миРНК из двухцепочной структуры до

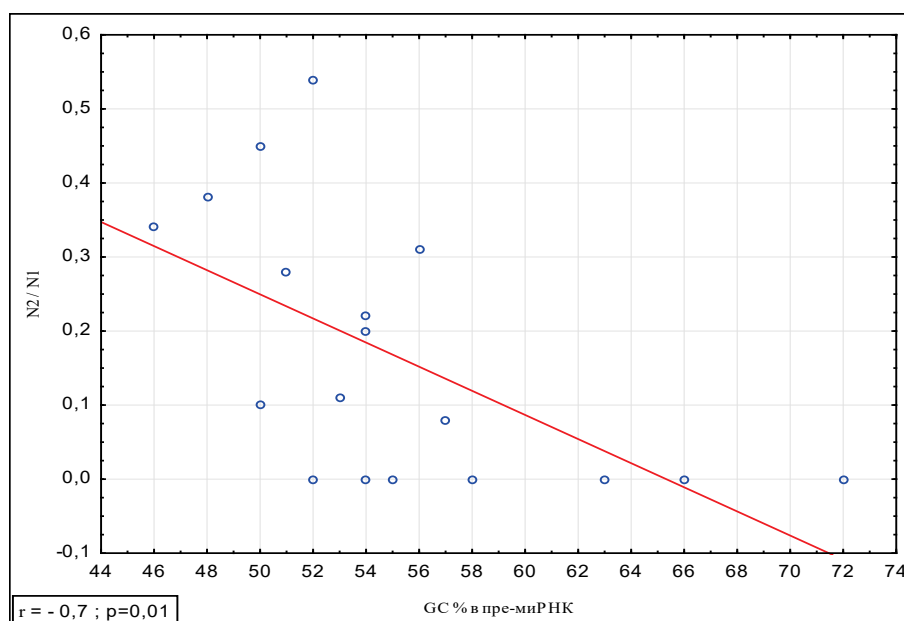


Рисунок 2. Зависимость параметра N2/N1 от процентного (%) содержания GC в пре-миРНК

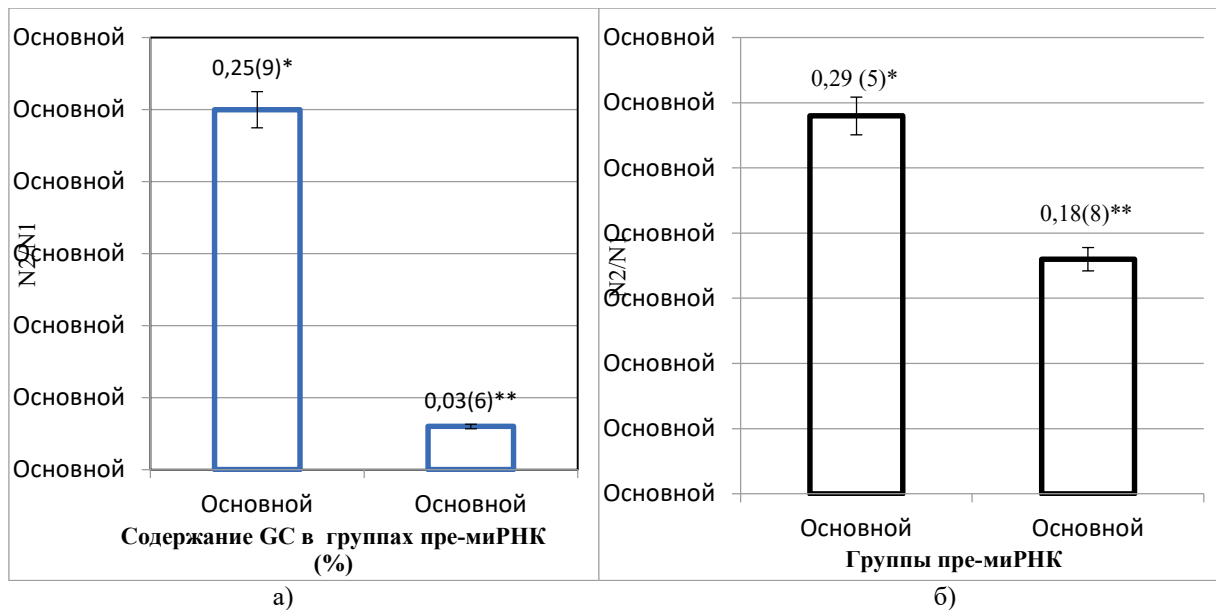


Рисунок 3. Зависимость параметра $N2/N1$ от (а) нуклеотидного состава пре-миРНК, содержания GC в % (где Группа 1- пре-миРНК с количеством GC $\leq 50\%$, Группа 2- пре-миРНК с количеством GC $> 60\%$, n – количество пре-миРНК, * и ** - различия достоверны при $p < 0,01$) и (б) наличия мотивов CAUC или UAUC в терминальной петле пре-миРНК (где Группа 1 – пре-миРНК с мотивами CAUC или UAUC, Группа 2 – пре-миРНК без мотивов CAUC или UAUC, n – количество пре-миРНК, * и ** - различия достоверны при $p < 0,01$)

одноцепочной [11], также может сопровождаться увеличением процессинга пиРНК длиной от 25 до 29 нуклеотидов (рис. 3б).

Для транскриптов пиРНК от 23 до 24 нк корреляции их количества с %GC в пре-миРНК не обнаружено. Биоинформатический анализ способности к гибридизации пре-миРНК с короткими фрагментами длиной от 16 до 19 нуклеотидов выявил, что у большинства пре-миРНК, последовательности которые могут служить матрицей для процессинга пиРНК, количество возможных сайтов гибридизации варьировало от 6 до 10. Интересно, что для последовательностей терминальной петли пре-миРНК возможности гибридизации с короткими фрагментами, образующимися при деградации стебля той же самой пре-миРНК, не было обнаружено у большинства пре-миРНК.

Выявленная нами зависимость между снижением относительного количества пиРНК транскриптов длиной от 25 до 29 нуклеотидов (уменьшением параметра $N2/N1$) и возрастанием содержания G и C в пре-миРНК свидетельствует, что дефолдинг двухцепочной структуры пре-миРНК, подобной шпильке, является одним из условий вовлечения пре-миРНК длиной от 76 до 96 нуклеотидов в процессинг пиРНК транскриптов. Белок YBX-1 может входить в состав Р-теллец, которые по мере их движения по микротрубочкам способны сближаться с внешней мембраной митохондрий [12], и осуществлять АТФ-независимый дефолдинг двухцепочных последовательностей РНК, в том числе пре-миРНК, с мотивами распознавания к нему [13]. Также белок YBX-1 может снижать активность РНКазы III Dicer, что необходимо для переключения канонического процессинга пре-миРНК в неканонический [13].

Кроме того, не исключено что некоторые из пре-миРНК могут поступать в цитоплазму различных клеток млекопитающих без их «вырезания» РНКазой III Drosha из при-микроРНК (при-миРНК) в ядре [14]. Недавние исследования роли последовательностей предшественников миРНК во внутриклеточном сигналинге установили наличие транспорта некоторых при-миРНК в цитоплазму, без процессинга в пре-миРНК [14]. Такие одноцепочные последовательности некодирующих РНК, при наличии в них открытых рамок считывания, могут транслироваться в микропептиды [14,15]. В тоже время, нахождение при-миРНК и других длинных некодирующих РНК (более 200 нуклеотидов в длину) в цитоплазме создает возможность для их использования в процессинге пиРНК [5]. Поскольку механизм выбора РНК как субстрата для mitoPLD6 у мыши *Mus musculus* не известен [1], не исключено, что ряд пре-миРНК (возможно в составе при-миРНК) тоже могут быть использованы для процессинга пиРНК. Результаты нашего биоинформатического показали, что параметрами участвующими в регуляции процессинга пиРНК транскриптов от 25 до 29 нуклеотидов с пре-миРНК определенной длины являются не только содержание G и C в % от всех нуклеотидов пре-миРНК, определяющее прочность внутримолекулярных связей и вероятность фолдинга, но и наличие некоторых мотивов в терминальной петле пре-миРНК, ее уникальный нуклеотидный состав, по сравнению с последовательностями стебля пре-миРНК. Механизмы процессинга для более коротких транскриптов пиРНК могут отличаться от транскриптов пиРНК в 25-29 нуклеотидов, т.к. для транскриптов пиРНК длиной от 23 до 24 нуклеотидов не обнаружено зависимостей изменений их содержания в базе данных секвенирования фрагментов пре-миРНК от нуклеотидного состава и МФЕ фолдинга пре-миРНК. Образование гетеродуплексов между пре-миРНК и миРНК является одним из способов саморегуляции процессинга пре-миРНК, эффективность которого может зависеть от содержания G и C в нуклеотидных последовательностях [16], поэтому перспективным направлением для

дальнейших исследований будет изучение влияния пространственного расположения сайтов гибридизации между пре-миРНК и транскриптами РНК разной длины на процессинг миРНК.

Список литературы / References:

1. Sun Y.H., Lee B., Li X.Z. The birth of piRNAs: how mammalian piRNAs are produced, originated, and evolved. *Mammalian Genome*, 2022, vol. 33, pp. 293-311, doi: 10.1007/s00335-021-09927-8.
2. Yan Z., Hu H.Y., Jiang X., Maierhofer V., Neb E., He L., Hu Y., Hu H., Li N., Chen W., Khaitovich P. Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Research*, 2011, vol. 39, no. 15, pp. 6596-6607, doi: 10.1093/nar/gkr298.
3. Du W.W., Yang W., Xuan J., Gupta S., Krylov S.N., Ma X., Yang Q., Yang B.B. Reciprocal regulation of miRNAs and piRNAs in embryonic development. *Cell Death Differ*, 2016, vol. 23, no. 9, pp. 1458-1470, doi: 10.1038/cdd.2016.27.
4. Perera B.P.Y., Tsai Z.T-Y., Colwell M.L., Jones T.R., Goodrich J.M., Wang K., Sartor M.A., Faulk C., Dolinoy D.C. Somatic expression of piRNA and associated machinery in the mouse identifies short, tissue-specific piRNA. *Epigenetics*, 2019, vol. 14, no. 5, pp. 504-521, doi: 10.1080/15592294.2019.1600389.
5. Barrenada O., Larriba E., Brieno-Enriquez M.A., Jesus del Mazo. piRNA-IPdb: a PIWI-bound piRNAs database to mining NGS sncRNA data and beyond. *BMC Genomics*, 2021, vol. 22, no. 765, doi: 10.1186/s12864-021-08071-6.
6. Li N., You X., Chen T., Mackowiak D.S., Friedlaender M.R., Weigt M., Du H., Gogol-Do" ring A., Chang Z., Dieterich C., Hu Y., Chen W. Global profiling of miRNAs and the hairpin precursors: insights into miRNA processing and novel miRNA discovery. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, no. 6, pp. 3619-3634, doi: 10.1093/nar/gkt072.
7. Tomasello L., Distefano R., Nigita G., Croce C.M. The microRNA family gets wider: The isomiRs classification and role. *Front Cell Dev Biol*, 2021, vol. 9, p. 668648, doi: 10.3389/fcell.2021.668648.
8. Suzuki H.I., Arase M., Matsuyama H., Choi Y.L., Ueno T., Mano H., Sugimoto K., Miyazono K. MCPIP1 ribonuclease antagonizes Dicer and terminates MicroRNA biogenesis through precursor MicroRNA degradation. *Molecular Cell*, 2011, vol. 44, pp. 424-436, doi: 10.1016/j.molcel.2011.09.012.
9. Andronescu M., Condon A., Hoos H.H., Mathews D.H., Murphy K.P. Computational approaches for RNA energy parameter estimation. *RNA*, 2010, vol. 16, no. 12, pp. 2304-2318, doi: 10.1261/rna.1950510.
10. Belter A., Gudanis D., Rolle K., Piwecka M., Gdaniec Z., Naskre t-Barciszewska M.Z., Barciszewski J. Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC. *PLoS ONE*, 2014, no. 9, pp. 11, e113848, doi: 10.1371/journal.pone.0113848.
11. Wu S-L., Fu X., Huang J., Jia T-T., Zong F-Y., Mu S.R., Zhu H., Yan Y., Qiu S., Wu Q., Yan W., Peng Y., Chen J., Hui J. Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43, no. 17, pp. 8516-8528, doi: 10.1093/nar/gkv779.
12. Ma L., Singh J., Schekman R. Two RNA-binding proteins mediate the sorting of miR223 from mitochondria into exosomes. *Elife*, 2023, vol. 12, e85878, doi: 10.7554/ELIFE.85878.
13. Budkina K., Hage K.E., Clement M-J., Desforbes B., Bouhss A., Joshi V., Maucuer A., Hamon L., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N., Pastre D. YB-1 unwinds mRNA secondary structures in vitro and negatively regulates stress granule assembly in HeLa cells. *Nucleic Acids Research*, 2021, vol. 49, no. 17, pp. 10061-10081, doi: 10.1093/nar/gkab748.
14. Kang M., Tang B., Li J., Zhou Z., Liu K., Wang R., Jiang Z., Bi F., Patrick D., Kim D., Mitra A.K., Yang-Hartwich Y. Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Molecular Cancer*, 2020, vol. 19, no. 143, doi: 10.1186/s12943-020-01248-9.
15. Ji J., Anwar M., Petretto E., Emanuelli C., Srivastava P.K. PPMS: A framework to profile primary microRNAs from single-cell RNA-sequencing datasets. *Briefings in Bioinformatics*, 2022, vol. 23, no. 6, pp. 1-7, doi: 10.1093/bib/bbac419.
16. Кузьмичев С.А. Некоторые термодинамические особенности процессинга самокомплементарных микроРНК (миРНК). *Сборник научных трудов VII Съезда Биофизиков России*, 2023, т. 1, с. 313-314 [Kuzmichev S.A. Some thermodynamic features of processing of self-complementary microRNAs (miRNAs). *Collection of scientific papers of the VII Congress of Biophysicists of Russia*, 2023, vol. 1, pp. 313-314 (In Russ.)].

SOME THERMODYNAMIC FEATURES OF THE REGULATION piRNA-LIKE TRANSCRIPTS PROCESSING IN SOMATIC CELLS IN THE MOUSE**Kuzmichev S.A.^{1,2}**¹ Russian University of Medicine*Delegatskaya str., 20, Moscow, 127473, Russia*² Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology
Kashirskoe ave., 24, Moscow, 115478, Russia; e-mail: kuzs19782005@mail.ru

Received 01.08.2025

Abstract. In paper the researches of effect of some parameter's sequences pre-microRNA on the efficiency of processing of piRNA-like transcripts (piRNA transcripts) was carried by bioinformatic analysis. The largest numbers of piRNA transcripts, that are part of pre-microRNA, were found among fragments containing 23-24 nucleotides. It was shown that with an increase in the content of G and C nucleotides in pre-microRNA by more than 60%, and with an increase in the minimum free energy of pre-microRNA folding, the probability of biogenesis of piRNA transcripts from 25 to 29 nucleotides in length decreases. The possibilities of the YBX-1 protein to participate as a likely intermediary in the regulation of piRNA transcripts processing in somatic cells are discussed. It was found that most pre-microRNAs of the let-7 microRNA family in mice are capable of serving as a template for the synthesis of piRNA transcripts during non-canonical processing.

Key words: *processing, pre-microRNA, folding, piRNA transcripts.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БОРСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ С КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНОЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Душанов Э.Б.^{1,2}, Аксёнова С.В.¹, Родригез Я.К.Д.³, Демидов С.В.²

¹ Объединенный институт ядерных исследований

ул. Жюлио Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: kgyr@mail.ru

² Государственный университет «Дубна»

ул. Университетская, 19, г. Дубна, 141980, РФ

³ Центр передовых исследований Кубы

г. Гавана, Куба

Поступила в редакцию 05.08.2025

Аннотация. В состав препаратов, используемых при проведении бор-нейтронозахватной терапии, входят два вида борсодержащих агентов, 4-бороно-L-фенилаланин (BPA) и борокапнат натрия (BSH). В данной работе с помощью метода молекулярной динамики проведён детальный анализ структурных особенностей липидного бислоя POPC при взаимодействии с лигандами BPA и BSH, а также определена возможная концентрация борсодержащих препаратов (БСП) на поверхности клеточной мембраны. Приведены структурные характеристики мембраны, а также локализация и количественная оценка БСП, образовавшие связь с атомами липидной мембраны. Анализ плотности мембраны показывает, что структурные параметры мембраны зависят от концентрации БСП на её поверхности. Исследование взаимодействия БСП с клеточной мембраной показало, что лиганды способны спонтанно связываться с поверхностными компонентами мембраны. Наночастицы борокапната натрия локализуются в структуре мембраны рядом с группой C=O главной ацильной цепочки липидной молекулы. В то время как наночастицы BPA локализуются в области фосфатной группы липидной молекулы. В рассмотренной концентрации молекулы борфенилаланина в меньшей степени (~15%) связываются с мембраной клетки. Результаты моделирования демонстрируют сохранение структурной целостности мембраны при контакте с изучаемыми соединениями.

Ключевые слова: борсодержащие наночастицы, борфенилаланин, борокапнат натрия, молекулярная динамика.

Для безопасного и эффективного терапевтического ответа при проведении бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) требуется достижение относительно высокого поглощения опухолью борсодержащего препарата (приблизительно 30 мкг/г при его низкой токсичности) для нормальной ткани. В течение короткого периода времени между инфузией и нейтронным облучением должна поддерживаться высокая концентрация борсодержащих агентов в области опухоли, а после этого они должны быстро выводиться из нормальной ткани и системы кровообращения [1,2].

В клинической практике при БНЗТ используются два типа борсодержащих препаратов: борфенилаланин ($C_9H_{12}BNO_4$ или BPA) и борокапнат натрия ($(Na_2B_{12}H_{11}SH$ или BSH) (рис. 2). Оба соединения характеризуются низкой токсичностью, селективным поглощением опухолевыми клетками, длительной персистенцией опухоли и безопасностью после их внутривенного введения [3]. Структура 4-бороно-L-фенилаланин одобрена в качестве борсодержащего препарата при лечении рака головы и шеи. Рак головы и шеи, по-видимому, является подходящей мишенью при БНЗТ, поскольку уровни экспрессии транспортера аминокислот LAT1, ответственных за поглощение BPA, повышены в большинстве случаев этого типа рака.

Борокапнат натрия, являясь ионной молекулой, хорошо растворяется в воде и содержит в своей структуре 12 атомов бора, благодаря чему демонстрирует высокую способность к поглощению нейтронов. Способность борокапната натрия проникать через гематоэнцефалический барьер, проницаемость которого снижается при злокачественных новообразованиях, была причиной его первоначального применения в лечении опухолей головного мозга. Однако, борокапнат натрия обладает низкой селективностью к опухолям и не склонен накапливаться внутри клеток, проявляя тенденцию к распределению вблизи опухолевой ткани.

Основным ограничением как BPA, так и BSH является относительно низкое соотношение опухоль-нормальная ткань из-за вариативности поглощения опухолью. Вследствие этих недостатков клиническое использование БНЗТ в основном ограничивалось пациентами с глиомами высокой степени злокачественности или рецидивирующими раковыми заболеваниями головы и шеи, которые не реагируют на традиционную терапию. Для других типов рака БНЗТ до сих пор не применяется в качестве стандартной терапии первой линии лечения.

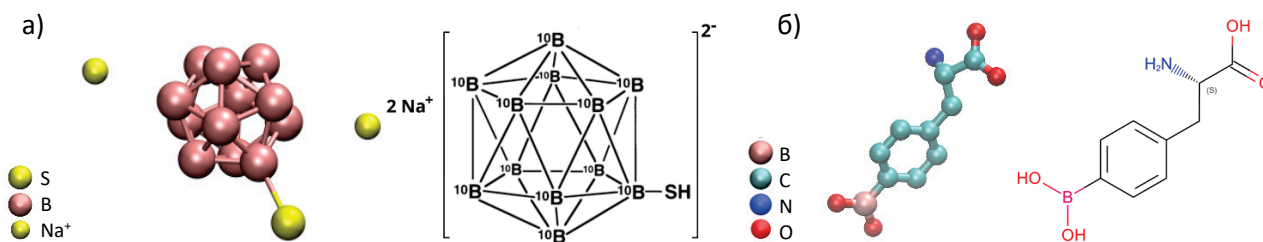


Рисунок 1. Молекулярная структура а) борокаптата натрия, б) борфенилаланина

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью настоящей работы являлось исследование взаимодействия борсодержащих соединений с липидной мембраной клетки.

Кристаллические структуры борсодержащих молекул определены в базе данных RCSB PDB. Структура борфенилаланина выделена из последовательности 4-бороно-L-фенилаланин тРНК-синтетаза в комплексе с 4-бороно-L-фенилаланином и аденозинмонофосфатом (5N5U, лиганд 7N8). Структура борокаптата натрия извлечена из последовательности лизоцима куриного яйца с микроэлементом бора UTX-97 (5B5J, лиганд UTX). Молекула борокаптата натрия параметризована общим потенциалным полем Amber (GAFF) с помощью программы **асруре** [4], топология была построена с помощью Ambertools [5].

Построение молекулярной системы POPC/БСП/вода и генерация необходимых файлов для топологии выполнено в среде Charmm-GUI [6]. При этом число молекул BPA составило 24, а молекул BSH – в концентрациях 10, 14 и 40. Молекулярно-динамическое моделирование в течение 100 нс при температуре 30°C проводилось в среде GROMACS версии 2022.4 [7] системой из 242 молекул липида, 12100 молекул воды и по 32 ионов Na^+ и Cl^- . Произведен расчёт профиля плотности молекулярной системы с помощью утилиты **density**. На основе данных профиля плотности, с помощью программы SIMtoEXP [8], вычислено распределение молекул BPA и BSH на поверхности мембраны. Параметры толщины липидного бислоя и площади, приходящей на молекулу липида (APL), рассчитывались с помощью пакета GridMAT-MD [9]. Для визуализации состояний молекулярной системы на различных этапах молекулярно-динамического моделирования применялся программный пакет VMD [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе моделирования отмечалось активное взаимодействие БСП обоих типов с головной группой липидного бислоя и незначительное проникновение борсодержащих соединений в структуру клеточной мембраны (рис. 2).

Фундаментальными параметрами анализа структурно-функциональных взаимосвязей являются площадь, приходящая на одну молекулу липида и толщина липидного бислоя, которые отражают структурные особенности бислоя и зависят от множества факторов, включающих степень гидратации липида, ионную силу раствора, фазовое состояние и давление. Наши расчётные данные параметров согласуются с экспериментальными данными, полученными методом рентгеновского рассеяния для структуры с мембраной POPC [11], где эти значения при 30°C составляли 39,1 Å и 64,3 Å², соответственно (табл. 1).

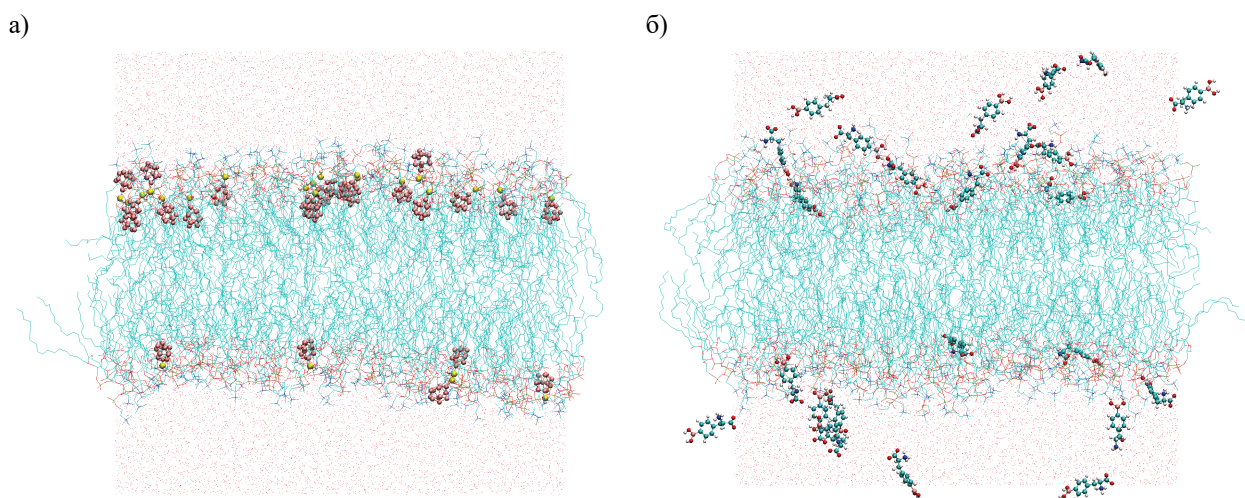


Рисунок 2. Графическое представление мембранной системы в комплексе: а) с BSH; б) с BPA после 100 нс моделирования методом молекулярной динамики

Таблица 1. Параметры толщины бислоя и APL моделированных структур

Параметры	POPC	POPC/BPA(24)	POPC/BSH(10)	POPC/BSH(24)	POPC/BSH(40)
Толщина бислоя, нм	3,98 ± 0,31	3,88 ± 0,30	3,99 ± 0,29	3,98 ± 0,30	3,88 ± 0,36
APL, нм ²	0,64 ± 0,11	0,66 ± 0,11	0,63 ± 0,12	0,64 ± 0,11	0,66 ± 0,14

Анализ параметра плотности показывает, что структурные параметры мембраны зависят от концентрации n БСП на её поверхности. Например, наши расчёты показали, что наночастицы борокаптата натрия локализуются в структуре мембраны рядом с группой C=O главной ацильной цепочки липидной молекулы. В то время как наночастицы BPA локализуются в области фосфатной группы липидной молекулы. Область под кривыми плотности распределения наночастиц различной концентрации разделена на две части на нижнем ($AL1$ и $AL2$) и верхнем ($AR1$ и $AR2$) слоях мембраны, которые для наночастиц представляют собой вне/в мембранные области, соответственно (рис. 3). Границы между $AL1$ и $AL2$ или $AR1$ и $AR2$ определены в виде абсциссы максимума соответствующей атомной группы PCN (N, C, P и O – атомы головной группы мембраны). Соответствующей парой координат для системы POPC:BSH = 242:10 является (–19,68; 19,18), для системы POPC:BSH=242:24 — (–19,56; 19,72), для системы POPC:BSH=242:40 — (–19,51; 19,51), а также для системы POPC:BPA=242:24 — (–19,57; 19,06). Все наночастицы, зарегистрированные внутри этих областей, будут считаться образовавшими связь с мембраной, место образования связи определяется максимумом кривой плотности распределения, соответствующего БСП.

Интегральное число образовавших связь с атомами мембраны наночастиц определено путём вычисления площади $A = AL + AR$ под кривыми плотности их распределения (табл. 2). Для выяснения локализации связанных наночастиц определена граница поверхности мембраны в виде максимума плотности распределений групп атомов PCN (N, C, P и O – атомы головной группы липида). Таким образом, значения $AL2$ и $AR2$, входящие в состав площади AL – левых и AR – правых составляющих площади A , представляют собой количество связанных (проникших) в мембрану наночастиц. Так, для заданных 24 наночастиц БСП, в случае BPA, число связанных с кислородными атомами фосфатной группы составляет 15,26%, для наночастиц BSH – 35,73%. С ростом концентрации BSH число связанных элементов увеличивается до 38,48%. При концентрации $n = 10$ число связанных BSH составляет 46,4%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа была направлена на изучение модели липидного бислоя POPC при его взаимодействии с борсодержащими препаратами. В ходе исследования было проанализировано взаимодействие с клеточной мембраной двух типов борсодержащих препаратов (BPA и BSH), которые широко применяются в бор-нейтронозахватной терапии.

Детальный анализ структурных особенностей бислоя POPC при взаимодействии с лигандами BPA и BSH на основе метода молекулярной динамики показал изменения структурных параметров в зависимости от концентрации БСП на поверхности мембраны. Полученные оценки пороговых значений концентраций на

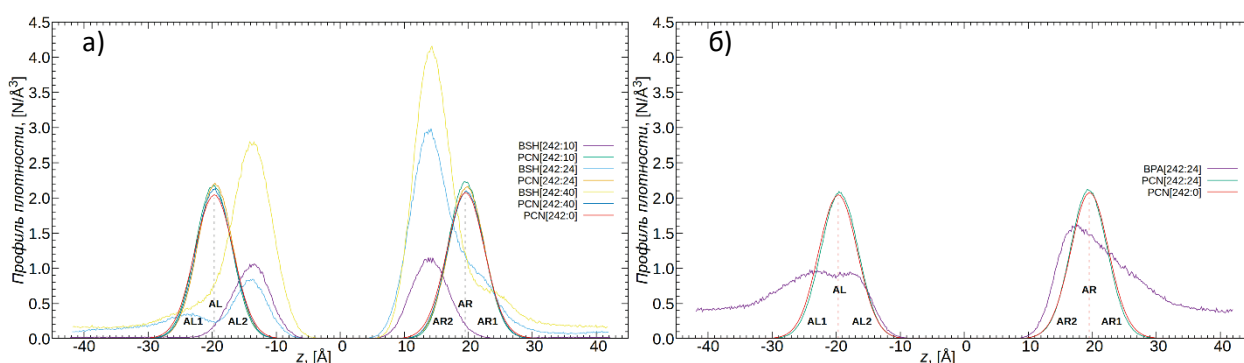


Рисунок 3. Профиль плотности мембраны в молекулярной системе с БСП: а) с BSH и б) с BPA

Таблица 2. Доля концентрации БСП вне/в мембранной области

	POPC:BPA=242:24		POPC:BSH=242:10		POPC:BSH=242:24		POPC:BSH=242:40	
	Å ²	%	Å ²	%	Å ²	%	Å ²	%
A	45,25	100,00	16,56	100,00	39,22	100,00	64,79	100,00
AL	19,69	43,51	8,04	48,59	10,13	25,82	27,70	42,76
$AL1$	14,46	31,96	0,60	3,62	4,54	11,58	6,36	9,81
$AL2$	5,23	11,55	7,45	44,98	5,59	14,25	21,35	32,94
AR	25,57	56,49	8,51	51,41	29,10	74,18	37,09	57,24
$AR1$	16,98	37,53	0,59	3,58	6,66	16,98	8,57	13,23
$AR2$	8,58	18,97	7,92	47,82	22,44	57,20	28,52	44,01

поверхности клеточной мембраны не противоречат экспериментальным данным. Результаты демонстрируют сохранение структурной целостности мембраны при контакте с изучаемыми соединениями. Установлено, что данные лиганды способны спонтанно связываться с поверхностными компонентами мембраны, включая глицериновый фрагмент, холиновую группу и фосфатные остатки.

Анализ полученных результатов показал, что в рассмотренной концентрации молекулы борфенилаланина в меньшей степени (~15%) связываются с мембраной клетки. При этом БСП этого типа активно взаимодействуют с фосфатной группой липида. Молекулы борокаптата натрия проникают в структуру липидной мембраны и локализуются рядом с C=O группой ацильной цепочки. С ростом концентрации число связанных наночастиц растёт, при этом место их локализации не меняется.

Список литературы / References:

1. Hu Q., Padron K., Hara D. et al. Interactions of Urea-Based Inhibitors with Prostate-Specific Membrane Antigen for Boron Neutron Capture Therapy. *ACS Omega*, 2021, vol. 6, no. 49, pp. 33354-33369.
2. Ryabchikova M.N., Nelyubin A.V., Klyukin I.N. et al. Synthesis of New Promising BNCT Agents Based on Conjugates of closo-Dodecaborate Anion and Aliphatic Diamino Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, no. 1 (26), p. 68, DOI: 10.3390/ijms26010068.
3. Porcari P., Capuani S., Pastore F.S. Novel Pharmacological and Magnetic Resonance Strategies to Enhance Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) Efficacy in the Clinical Treatment of Malignant Glioma. *Management of CNS Tumors*, 2011, vol. 11, pp. 267-284, DOI: 10.5772/24756.
4. Souse da Silva A.W., Vranken W.F. ACPYPE – Antechamber Python Parser Interface. *BMC Research Notes*, 2012, vol. 5, p. 367, DOI: 10.1186/1756-0500-5-367.
5. Wang J., Wang W., Kollman P.A., Casa D.A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2006, vol. 25, no. 2, pp. 247-260, DOI: 10.1016/j.jmgm.2005.12.005.
6. Kern N.R., Lee J., Choi Y.K. et al. CHARMM-GUI Multicomponent Assembler for Modeling and Simulation of Complex Multicomponent Systems. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2023, DOI: 10.1101/2023.08.30.555590.
7. Lemkul J.A. Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 2024, vol. 128, no. 39, pp. 9418-9435, DOI: 10.1021/acs.jpcc.4c04901.
8. Kucerka N., Katsaras J., Nagle J.F. Comparing membrane simulations to scattering experiments: introducing the SIMtoEXP software. *J. Membr. Biol.*, 2010, vol. 235, no. 1, pp. 43-45, DOI: 10.1007/s00232-010-9254-5.
9. Allen W.J., Lemkul J.A., Bevan D.R. GridMAT-MD: A Grid-based Membrane Analysis Tool for Use with Molecular Dynamics. *J. Comput. Chem.*, 2009, vol. 30, no. 12, pp. 1952-1958, DOI: 10.1002/jcc.21172.
10. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 1996, vol. 14, no. 1, pp. 33-38.
11. Kucerka N., Nieh M.-P., Katsaras J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2011, vol. 1808, no. 11, pp. 2761-2771, DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.07.022.

MODELING THE INTERACTION OF BORON-CONTAINING STRUCTURES WITH THE CELL MEMBRANE AT DIFFERENT CONCENTRATIONS

Dushanov E.B.^{1,2}, Aksenova S.V.¹, Rodriguez Y.K.D.³, Demidov S.V.²¹ Joint Institute for Nuclear Research

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

² Dubna State University

Universitetskaya str., 19, Dubna, 141980, Russia

³ Center for Advanced Studies

Havana, Cuba

Received 05.08.2025

Abstract. The drugs used in boron neutron capture therapy include two types of boron-containing agents, 4-borono-L-phenylalanine (BPA) and sodium borocaptate (BSH). In this work, using the molecular dynamics method, a detailed analysis of the POPC lipid bilayer structural features during interaction with the BPA and BSH ligands was performed, as well as the possible concentration of boron-containing drugs (BCDs) on the surface of the cell membrane was determined. The membrane structural characteristics, as well as localization and the BCDs quantitative assessment that formed a bond with the lipid membrane atoms are presented. Analysis of the membrane density shows that the structural parameters of the membrane depend on the concentration of BDs on its surface. The study of the BCDs interaction with the cell membrane showed that the ligands are able to spontaneously bind to the surface components of the membrane. Sodium borocaptate nanoparticles are localized in the membrane structure near the C=O group of the main acyl chain of the lipid molecule. While BPA nanoparticles are localized in the region of the phosphate group of the lipid molecule. In the considered concentration, boron phenylalanine molecules bind to the cell membrane to a lesser extent (~15%). The modeling results demonstrate the preservation of the membrane's structural integrity upon contact with the compounds under study.

Key words: boron-containing nanoparticles, boron phenylalanine, sodium borocaptate, molecular dynamics.

РОЛЬ НЕЙРОМОДУЛЯТОРОВ В АКТИВНОСТИ НЕЙРОГЛИОВАСКУЛЯРНОЙ ЕДИНИЦЫ

Верисокин А.Ю., Вервейко Д.В., Иванова П.Р.

Курский государственный университет
ул. Радищева, 33, г. Курск, 305000, РФ; e-mail: ffalconn@mail.ru
Поступила в редакцию 06.08.2025

Аннотация. Функционирование нервной ткани головного мозга является результатом широкого спектра процессов, протекающих во всех составляющих нейроглиоваскулярной единицы (НГВЕ) нервной ткани головного мозга, а именно непосредственно в нейронах, клетках глии (в первую очередь – астроцитах), кровеносных сосудах и в межклеточном пространстве, что и определяет активность нервной ткани в целом. В работе построена математическая модель, в которой учтён широкий спектр процессов, протекающих в элементах нейроглиоваскулярной единицы, а также пути взаимодействий между ними. В межклеточной среде представлены динамически изменяющиеся концентрации ионов калия, влияющих на мембранный потенциал всех клеток в системе, концентрации нейромедиаторов глутамата и гамма-аминомасляной кислоты, отвечающих за соответствующие проводимости в нейронах, и остальных метаболитов, взаимодействующих не только с нейронами, но и с кровеносными сосудами. В модели рассматривается влияние норадреналина как на кальциевую динамику астроцита, так и на функционирование НГВЕ в целом, посредством влияния норадреналина на производство инозитол-1,4,5-трифосфата. Выполнена вычислительная реализация и верификация предложенной теоретической модели. На основе серий вычислительных экспериментов проведена верификация предложенной модели и уточнение параметров. Исследованы режимы повышения возбудимости НГВЕ в случае норадреналиновой стимуляции и угнетения в случае увеличения концентрации гамма-аминомасляной кислоты.

Ключевые слова: нейроглиоваскулярная единица, норадреналин, глутамат, гамма-аминомасляная кислота, синаптическая активность, астроциты, нейроны, кровоток.

Большое количество исследований, связанных с пониманием работы нервной ткани, берёт за основу процессы, определяющие непосредственное функционирование и активность нейронов. При этом роль остальных составляющих нервной ткани либо не учитывается, либо сводится к некоторому минимальному влиянию. Тем не менее последние экспериментальные исследования позволяют утверждать, что целостное функционирование нервной ткани головного мозга поддерживается широким спектром процессов, протекающих во всех структурных единицах, а именно в нейронах, клетках глии (в первую очередь – астроцитах), кровеносных сосудах и в межклеточном пространстве, что и определяет паттерны активности нервной ткани.

Современные экспериментальные исследования однозначно подтверждают, что нормальное функционирование нервной ткани определяется васкулярной динамикой, которая, в свою очередь, подстраивается под уровень текущей активности. При этом регуляция активности нервной ткани мозга обеспечивается процессами, протекающими в глиальных клетках – астроцитах, которые определяют внеклеточный ионный гомеостаз (например, ионов калия, натрия, кальция). Основываясь на последних исследованиях, можно утверждать, что, с одной стороны, концентрация внеклеточного калия отвечает за значения мембранного потенциала покоя нейронов и астроцитов [1], а с другой – важное влияние на астроцитарную кальциевую динамику, приводящую к изменению межклеточного уровня калия, оказывают нейротрансмиттеры/нейромодуляторы, такие как глутамат, ГАМК, АТФ, D-серин, ацетилхолин, дофамин, серотонин, гистамин, эндоканнабиноиды и норадреналин [2]. Нейромодуляторы управляют пространственной буферизацией через щелевые контакты (серотонин, норадреналин), регулируют механизмы функционирования каналов Kir (дофамин, гистамин), модулируют соматосенсорную передачу сигналов (серотонин, норадреналин и ацетилхолин) [2,3].

Увеличение концентрации кальция в астроцитах приводит к высвобождению глиотрансмиттеров, изменяющих активность транспортеров нейротрансмиттеров и/или изменяющих внеклеточную концентрацию ионов, модулирующих нейронную возбудимость [4,5]. Кальциевые сигналы астроцитов способствуют различным астроцитарным функциям, включая модуляцию мозгового кровотока, синаптическую передачу, синаптическую пластичность и высвобождение глиотрансмиттеров [6]. Астроциты реагируют на высвобождение нейронами нейротрансмиттера глутамата увеличением Ca^{2+} через iGluR. Изменения кальциевых сигналов астроцитов модулируют гемодинамику, что способствует высвобождению нейроактивных веществ, в том числе глутамата, замыкая тем самым кольцо положительной обратной связи. Глутамат не расщепляется во внеклеточном пространстве, и возбуждающие аминокислотные транспортёры Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs) отвечают за прекращение сигнализации глутамата путём его удаления из синапса после высвобождения. Образование ГАМК условно можно разделить на 2 этапа: на первом происходит образование глутамата, на втором – альфа-декарбоксилирование глутамата декарбоксилазой глутаминовой кислоты (GAD) в двух изоформах: GAD65 и GAD67. Обе изоформы можно найти в большинстве ГАМК-ергических нейронов. ГАМК

активирует рецепторы, которые открывают хлорные каналы, тем самым создают приток отрицательно заряженных ионов хлора, который противодействует эффекту возбуждающего воздействия [7].

Известно, что некоторые сигналы Ca^{2+} астроцитов являются внутренними, в то время как другие управляются АТФ или нейротрансмиттерами, такими как норадреналин, ацетилхолин и дофамин [8]. Так, норадреналин активирует адренергические рецепторы, увеличивая возбуждающие токи, деполяризуя нейроны. Норадренергические волокна не только влияют на работу нейронов, напрямую стимулируя нейронные адренорецепторы, но и используют астроциты в качестве активных компонентов нейронных цепей [9], что подкрепляется экспериментальными доказательствами функционального вклада астроцитов в нейромодуляцию и нейроваскулярное сопряжение. Показано, что норадреналин, высвобождаемый после световой стимуляции, значительно усиливает сигналы Ca^{2+} астроцитов при локальных изменениях активности нейронов, астроцитарная NE-сигнализация действует как отдельный нейромодуляторный путь, регулируя корковое состояние и связывая десинхронизацию, связанную с возбуждением, с ресинхронизацией корковых цепей [10].

Основываясь на вышеизложенных экспериментальных фактах, можно смело утверждать, что сеть тесно взаимодействующих нейронов, астроцитов и кровеносных сосудов представляет собой фундаментальный модуль обработки информации в мозге. Тем не менее, метаболические пути взаимодействия всех элементов нейроглиоваскулярной единицы как структурной составляющей нервной ткани и терапевтические мишени для нейродегенеративных заболеваний остаются плохо изученными. В работе построена математическая модель НГВЕ, в которой учтён широкий спектр процессов, протекающих в элементах нейроглиоваскулярной единицы, а также пути взаимодействий между ними.

Математическая модель. Отметим основные особенности модели, за основу которой взята модель [11]. Для описания динамики мембранного потенциала нейронов использован модифицированный формализм Ходжкина–Хаксли с готовой параметризацией на основе внутриклеточных концентраций ионов и динамических характеристик мембранных токов на сети из двух типов нервных клеток: возбуждающих пирамидальных нейронов и тормозных интернейронов [12], при этом синапсы описываются биэкспоненциальной моделью. Трансмембранные токи возбуждающих пирамидальных нейронов подчиняются следующим уравнениям, включающим потоки ионов как через быстрые потенциал-зависимые натриевые и калиевые каналы, так и через медленные калиевые каналы и кальциевые каналы, а также токи утечки:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{(-I_M - I_{leak} - I_{Na} - I_K - I_{Ca} - I_{tonic} - I_{EC} - \sum I_{syn})}{C_{mem} S_{pyr}} \quad (1)$$

где:

$$\begin{aligned} I_M &= \sigma_{Mpyr} S_{pyr} (V - V_{revK}); \\ I_{leak} &= \sigma_{leakpyr} S_{pyr} (V - V_{revleak}); \\ I_K &= \sigma_{Kpyr} S_{pyr} n^4 (V - V_{revK}); \\ I_{Na} &= \sigma_{Napyr} S_{pyr} m^3 h^1 (V - V_{revNa}); \\ I_{Ca} &= \sigma_{Capyr} S_{pyr} m_{Ca}^2 h_{Ca} (V - V_{revCa}). \end{aligned} \quad (2)$$

Для связи с остальными элементами модель включает в себя хлорную проводимость, индуцируемую внеклеточной концентрацией ГАМК, и мульти-катионную проводимость, зависящую от внеклеточной концентрации нейромедиатора глутамата; добавлена гиперполяризующая проводимость, индуцируемая через $\alpha 1$ -адренорецепторы. При приходе потенциала действия на любой синапс учитывается выброс нейромедиаторов во внеклеточную среду. Таким образом активизируется глутамат, выбрасывающийся на каждый потенциал действия пирамидальных клеток и ГАМК, выбрасывающийся при каждом потенциале действия интернейронов.

Для описания различных состояний астроглии мы учитываем внутриклеточную кальциевую динамику, которая включает в себя обмен между цитозолем и эндоплазматическим ретикулумом, а также кальций-зависимую продукцию инозитолтрифосфата. Учтено влияния концентрации кальция на синтез арахидоновой кислоты и её производных. Основные уравнения модели без изменений приведены в работе [11].

В описываемой модели НГВЕ кровеносный сосуд выступает в роли вспомогательного элемента, диаметр которого зависит от концентраций нейромедиаторов, ионов калия и метаболитов арахидоновой кислоты во внеклеточной среде. В зависимости от диаметра сосуда также находится концентрация кислорода в ткани, которая влияет на скорость образования вазоактивных метаболитов арахидоновой кислоты. Для упрощения мы считаем кровоток пропорциональным радиусу кровеносного сосуда.

$$\frac{dr}{dt} = \frac{r_{rest} - r}{\tau_r} + k_{EETs}[EETs] - k_{NA}[NA] - k_{HETE}[HETE] + k_{K^+}[K^+].$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{[O_2]_0 - [O_2]}{\tau_{O_2}} + k_{O_2r}r - k_{CMRO_2}.$$
(3)

Уравнение, описывающее влияние нейромедиатора глутамата и тока через натрий-калиевый насос на скорость церебрального метаболизма кислорода:

$$k_{CMRO_2} = k_{CMRO_2_0} + k_{I_{pump}} \cdot MM_s(I_{pump}, k_{s_{I_{pump}}}, m_{s_{I_{pump}}}) + k_{Glu} \cdot MM_s([Glu], k_{s_{Glu}}, m_{s_{Glu}}).$$
(4)

В межклеточной среде представлены динамически изменяющиеся концентрации ионов калия, влияющие на мембранный потенциал всех клеток в системе, концентрации нейромедиаторов глутамата и ГАМК, отвечающих за соответствующие проводимости в нейронах, и остальных метаболитов, взаимодействующих не только с нейронами, но и с кровеносными сосудами. В модели рассматривается влияние норадреналина (NA) как на кальциевую динамику астроцита, так и на функционирование НГВЕ в целом, посредством влияния NA на производство [IP3]. Кроме нейромедиаторов глутамата, норадреналина, ГАМК в модели предусмотрена возможность простого добавления других нейромедиаторов (серотонин, ацетилхолин и другие).

Кроме ГАМК, все остальные метаболиты описываются простой кинетикой с характерным временем приведения концентрации к равновесной, без явного учёта механизмов откачки. Концентрация калия определяется работой натрий-калиевых насосов в неявном виде. Основным источником норадреналина в модели являются норадренергические терминалы, выброс из которых в модели зависит от активации метаболитных глутаматных рецепторов. Важным аспектом модели являются также токи, индуцируемые норадреналином в нейронах, опосредованные активацией соответствующих адренорецепторов [13]. Динамика норадреналина определяется следующим образом:

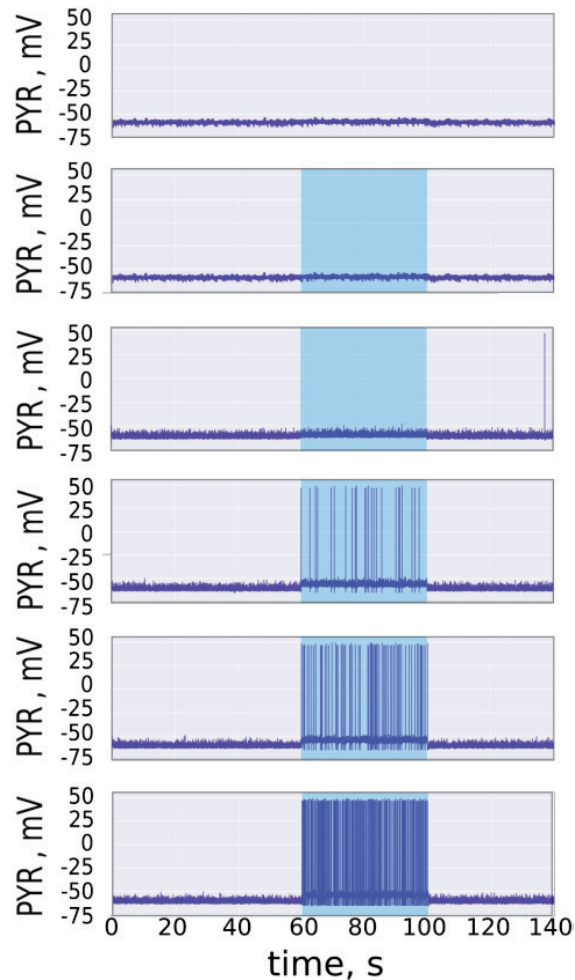


Рисунок 1. Изменение активности НГВЕ при норадреналиновой активации. Базовое значение изменения концентрации внеклеточного норадреналина 1 мкМ, базальная концентрация норадреналина в среде 100 нМ

$$\frac{d[NA]}{dt} = J_{NA} + \frac{[NA]_{amb} - [NA]}{\tau_{NA}} + NA_{diff};$$

$$I_{NA} = v_{NA} \frac{[NA]^{0.3}}{[NA]^{0.3} + k_{NA}^{0.3}} \cdot J_{NA} = r_{NA} + r_{NG} ([Glu] - [Glu]_{amb})$$
(5)

концентрация внеклеточного глутамата подчиняется простой моноэкспоненциальной кинетике:

$$\frac{d[Glu]}{dt} = \frac{[Glu]_0 - [Glu]}{\tau_{Glu}}$$
(6)

ГАМК индуцирует хлорную проводимость пирамидальных возбуждающих и парвальбумин положительных тормозных нейронов.

Результаты численного решения. Вычислительная реализация модели была выполнена на языке Python с использованием программного пакета Brian 2 [14]. Функционирование одной НГВЕ программно реализовывается следующим образом: нейроны располагались на квадратной решётке, образуя связи согласно расстоянию между центрами соответствующей каждому нейрону ячейки. Нейроны связаны с астроцитом и кровеносным сосудом в том числе через межклеточное пространство.

На рисунке 1 показан ответ нейрональной активности на стимуляцию в случае повышения концентрации норадреналина во внеклеточной среде без шумовой активации НГВЕ. Стоит также отметить, что решения демонстрируют наибольшую вариативность проводимостей в области физиологических концентраций норадреналина. При данном подходе принимается, что степень активации норадренергических рецепторов, прямо пропорциональна дальнейшему открытию ионных каналов, через G-белок-опосредованный механизм. Фактическим механизмом действия внеклеточных нейромедиаторов является индуцирование соответствующей проводимости на нейронах, вызванной кинетикой взаимодействия лиганда с рецептором с насыщением, например в случае норадреналина.

Действие ГАМК на нейроны моделируется согласно тому же формализму, что принят и для норадреналина. На рисунке 2 показан ответ нейрональной активности на стимуляцию в случае повышения концентрации ГАМК во внеклеточной среде при шумовой активации НГВЕ. Происходит полное подавление активности НГВЕ.

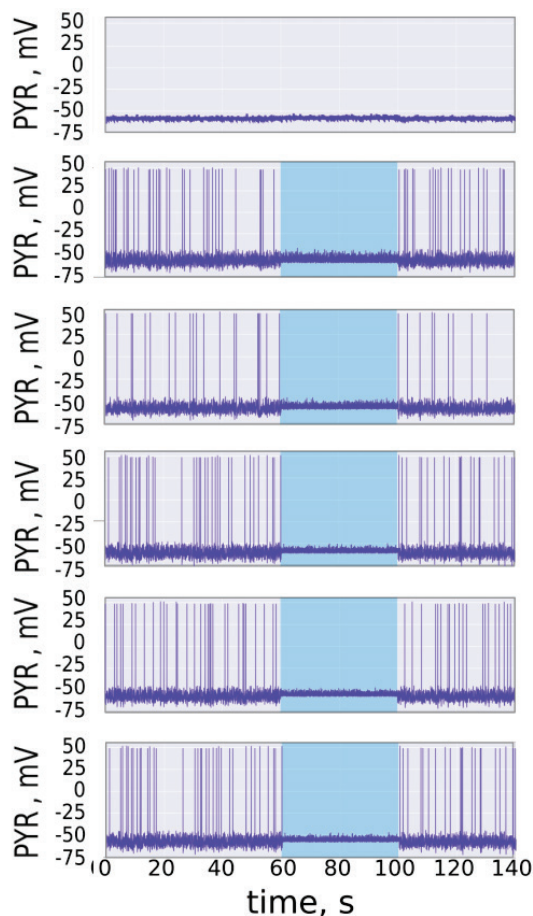


Рисунок 2. Изменение активности НГВЕ при воздействии GABA. Базовое значение изменения концентрации внеклеточной ГАМК 100 нМ, базальная концентрация GABA в среде 10 нМ

Выводы. В работе предложена математическая модель функционирования нейроглиоваскулярной единицы с учётом нейромедиаторного воздействия. Модель включает в себя процессы, протекающие в возбуждающих и тормозных нейронах, астроцитах, кровеносном сосуде, связи между элементами нейроглиоваскулярной единицы через межклеточное пространство. Выполнена верификация параметров модели с учётом известных экспериментальных данных, что позволило провести серии численных экспериментов, направленных на анализ влияния нейромедиаторов на функционирование нейроглиоваскулярной единицы.

Показано, что изменение активности одиночных нейронов в ответ на изменение концентрации норадреналина и ГАМК практически идентично подаче на них деполяризующего или гиперполяризующего тока, имеющего зависимость интенсивности от концентрации нейромедиатора с насыщением, так как большую часть времени мембранный потенциал нейрона меньше или больше потенциала реверсии для каналов, работа которых опосредуется выбранными в работе нейромедиаторами. В рамках сети из нейронов, входящей в состав одной НГВЕ, данное обстоятельство вызывает общее повышение возбудимости в случае норадреналина и угнетение в случае ГАМК, причём оба эти механизма реализуются одновременно, но на разных временных масштабах, определяемых характерными временами захвата нейромедиаторов. Последний эффект можно параметризовать как напрямую, так и косвенно, что придаёт полученной модели гибкость в воспроизведении различных экспериментальных методик. В итоге, можно исследовать динамику одной НГВЕ, как в ситуации нормального функционального состояния, так и в случаях, когда работа какого-то механизма участвующего в обмене медиаторов либо заблокирована с помощью химического воздействия, либо ослаблена путём иного вмешательства в рассматриваемый модельный объект.

Дальнейшее развитие модели предусматривает её расширение на сеть связанных НГВЕ и исследование путей формирования пространственно-временных структур в нервной ткани головного мозга, возникающих при различных нейропатологических состояниях.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда и Министерства образования и науки Курской области, грант 24-24-20117.

Список литературы / References:

1. Bellot-Saez A. et al. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, vol. 77, pp. 87-97.
2. Bellot-Saez A. et al. Neuromodulation of Astrocytic K⁺ Clearance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, v. 22, no. 5, p. 2520.
3. Wotton C.A., Cross C.D., Bekar L.K. Serotonin, norepinephrine, and acetylcholine differentially affect astrocytic potassium clearance to modulate somatosensory signaling in male mice. *J Neuro Res*, 2020, vol. 98, pp. 964-977.
4. Dallerac G., Zapata J., Rouach N. Versatile Control of Synaptic Circuits by Astrocytes: Where, When and How? *Nat Rev Neurosci*, 2018, vol. 19, pp. 729-743, DOI: 10.1038/s41583-018-0080-6.
5. Ibanez I., Bartolome-Martin D., Piniella D., Gimenez C., Zafra F. Activity Dependent Internalization of the Glutamate Transporter GLT-1 Requires Calcium Entry through the NCX Sodium/Calcium Exchanger. *Neurochem Int*, 2019, vol. 123, pp. 125-132, DOI: 10.1016/j.neuint.2018.03.012.
6. Bazargani N., Attwell D. Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nat Neurosci*, 2016, vol. 19, no. 2, pp. 182-189.
7. Bormann J. The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, vol. 21, pp.16-19.
8. Semyanov A., Henneberger C., Agarwal A. Making sense of astrocytic calcium signals – from acquisition to interpretation. *Nat Rev Neurosci*, 2020, vol. 21, no. 10, pp. 551-564.
9. Ma Z., Stork T., Bergles D.E., Freeman M.R. Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature*, 2016, vol. 539, pp. 428-432.
10. Reitman M.E., Tse V., Mi X., Willoughby D.D. et. al. Norepinephrine links astrocytic activity to regulation of cortical state. *Nat Neurosci*, 2023, vol. 26, pp. 579-593.
11. Verisokin A.Yu., Verveiko D.V., Kirsanov A.V., Brazhe A.R., Postnov D.E. Computational model of noradrenaline modulation of astrocyte responses to synaptic activity. *Mathematics*, 2023, vol. 11, no. 3, p. 628.
12. Aussel A., Ranta R., Aron O., Colnat-Coulbois S., Maillard L., Buhry L. Cell to network computational model of the epileptic human hippocampus suggests specific roles of network and channel dysfunctions in the ictal and interictal oscillations. *Journal of Computational Neuroscience*, 2022, vol. 50, no. 4, pp. 519-535.
13. Pang K., Rose G.M. Differential effects of norepinephrine on hippocampal complex-spike and theta-neurons. *Brain research*, 1987, vol. 425, no. 1, pp. 146-158.
14. Stimberg M., Brette R., Goodman D. FM. Brian 2, an intuitive and efficient neural simulator. *Elife*, 2019, vol. 8, e47314.

THE ROLE OF NEUROMODULATORS IN THE ACTIVITY OF THE NEUROGLIOVASCULAR UNIT

Verisokin A.Yu., Verveiko D.V., Ivanova P.R.

Kursk State University

Radichsheva str. 33, Kursk, 305000, Russia; e-mail: ffalconn@mail.ru

Received 06.08.2025

Abstract. The functioning of the nervous tissue of the brain is the result of a wide range of processes occurring in all components of the neurogliovascular unit (NGVU) of the nervous tissue of the brain, namely directly in neurons, glial cells (primarily astrocytes), blood vessels and in the intercellular space, which determines the activity of the nervous tissue as a whole. The work builds a mathematical model that takes into account a wide range of processes occurring in the elements of the neurogliovascular unit, as well as the pathways of interactions between them. The intercellular medium contains dynamically changing concentrations of potassium ions affecting the membrane potential of all cells in the system, concentrations of neurotransmitters glutamate and gamma-aminobutyric acid, responsible for the corresponding conductivity in neurons, and other metabolites interacting not only with neurons, but also with blood vessels. The model considers the influence of norepinephrine on both the calcium dynamics of the astrocyte and the functioning of the NGVU as a whole, through the influence of norepinephrine on the production of inositol-1,4,5-triphosphate. Computational implementation and verification of the proposed theoretical model are performed. Based on a series of computational experiments, the verification of the proposed model and refinement of the parameters are carried out. The modes of increasing the excitability of the NGVU in the case of norepinephrine stimulation and inhibition in the case of increasing the concentration of gamma-aminobutyric acid are studied.

Key words: neurogliovascular unit, norepinephrine, glutamate, gamma-aminobutyric acid, synaptic activity, astrocytes, neurons, blood flow.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ ЭПР МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ МОЛЕКУЛ В СУСПЕНЗИИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Шабанова Д.А.^{1,2}, Крюкова О.В.¹, Тюменцева А.В.¹, Максимов Н.Г.¹, Столяр С.В.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»

ул. Академгородок, 50, г. Красноярск, 660036, РФ

² Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: sulfidna@gmail.com

Поступила в редакцию 01.08.2025

Аннотация. Надежным методом длительного хранения клеточных линий является криоконсервация, однако процесс замораживания, хранения и оттаивания может вызывать повреждение клеток, включая окислительный стресс и деградацию макромолекул. В данной работе методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) рассмотрено влияние различных температур криохранения (-20°C, -80°C, -196°C) на металлсодержащие ферменты в клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). Установлено, что хранение суспензии клеток, разведенных в культуральной среде с криопротекторами, при температуре -20°C приводит к значительному окислению Fe²⁺ в Fe³⁺, снижению интенсивности ЭПР сигнала от молибденсодержащих молекул (Mo⁵⁺) и полному исчезновению сигнала от церулоплазмينا (Cu²⁺), что приводит к гибели клеток в данном образце АКЭ. При температуре -80°C и -196°C наблюдалось частичное сохранение интенсивности ЭПР сигналов от парамагнитных центров Fe²⁺ и Mo⁵⁺, однако сигнал от церулоплазмينا также отсутствовал. Наибольшая жизнеспособность клеток отмечена при -80°C, тогда как сверхбыстрое замораживание в жидком азоте (-196°C) увеличивало долю погибших клеток в суспензии после размораживания. Несмотря на биохимические изменения, клетки после криоконсервации при -80°C и -196°C сохраняли онкогенный потенциал *in vivo*, формируя асцитную опухоль в брюшной полости мышей. Полученные данные указывают на то, что для оптимизации протоколов криохранения и повышения жизнеспособности клеток АКЭ в качестве добавок к криосреде можно использовать компоненты, обладающие антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: криоконсервация, асцитная карцинома Эрлиха, ЭПР-спектроскопия, металлсодержащие белки, жизнеспособность клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Криоконсервация представляет собой технологию длительного хранения клеточных линий, основанную на замедлении метаболических процессов и сохранении жизнеспособности клеток на долгий срок [1,2]. Этот подход обеспечивает возможность последующего использования клеток в экспериментальных или медицинских целях. Однако сам процесс замораживания и оттаивания может оказывать повреждающее действие на клеточные структуры, что требует тщательного подбора протоколов криоконсервации. Одной из ключевых задач при замораживании клеток является предотвращение образования кристаллов льда, способных разрушить мембраны и внутриклеточные органеллы. Для защиты клеток от повреждений используются криопротекторные вещества, такие как глицерин и диметилсульфоксид (DMSO). Однако они обладают цитотоксичностью, что снижает выживаемость клеток, поэтому необходимо тщательно подбирать их концентрацию в питательных средах [1,3].

Особое значение технология криоконсервации приобретает при работе с опухолевыми клетками, в частности, одна из широко применяемых экспериментальных онкологических моделей – асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), поддерживаемая у мышей путем внутрибрюшинной трансплантации [4-6]. Основное преимущество АКЭ – быстрый рост и высокая воспроизводимость. Данная модель подходит для тестирования фармакологических препаратов, изучения метаболических нарушений и иммунного ответа [5-7]. Однако, для поддержания клеточной линии *in vivo* требуется постоянное использование лабораторных животных [4]. В соответствии с принципами биоэтики и требованиями гуманного обращения с экспериментальными животными, внедрение методов криоконсервации клеток АКЭ представляется перспективным подходом. Это позволит обеспечить долгосрочное хранение опухолевого материала между исследованиями, значительно сократить количество необходимых пассажей и, как следствие, минимизировать использование лабораторных животных в экспериментальной практике [8]. Однако существующие протоколы криоконсервации не гарантируют полного сохранения онкогенного потенциала опухолевых клеток, что проявляется в снижении способности к опухолеобразованию после размораживания и возникновению структурно-функциональных нарушений в клетках [9].

В нашей работе методом ЭПР проведена оценка изменения содержания металлсодержащих белков в асцитной карциноме Эрлиха после криохранения суспензии при разных температурах. Метод ЭПР позволяет отслеживать изменения парамагнитных центров в биологических системах и делать выводы об уменьшении или увеличении относительной концентрации молекул, содержащих в своем составе металлы с переменной валентностью. Метод низкотемпературной ЭПР-спектроскопии имеет значительное преимущество перед биохимическими подходами анализа процессов, происходящих в биологических системах, поскольку позволяет

исследовать клетки и ткани без нарушения их структуры, фиксируя состояние исследуемых объектов с помощью быстрого замораживания в жидком азоте. [10,11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФИЦ КНЦ СО РАН (Заключение от 08.07.2024). Уход за животными и манипуляции в процессе экспериментов осуществлялись в соответствии с принципами ухода и использования животных при выполнении исследовательской работы.

Суспензию опухолевых клеток АКЭ получали на 10-е сутки из брюшной полости самцов белых беспородных мышей линии ICR (питомник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора).

Для криоконсервации использовали среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM) с добавлением 30% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 10% DMSO. Клеточную суспензию разводили в криопротекторной среде до конечной концентрации 2×10^6 клеток/мл и разделяли на три группы. Готовую суспензию замораживали в криопробирках (SSIbio, США) при различных температурах (-20°C , -80°C и -196°C).

Через 2 месяца криохранения получали и анализировали ЭПР спектры образцов на Фурье-спектрометре Elexsys E580 (Bruker) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН. Спектры регистрировали в диапазоне 650-4350 Гс. На протяжении всех измерений температуру образцов поддерживали ниже 85K .

Дополнительно определяли жизнеспособность клеток АКЭ методом проточной цитометрии на приборе CytoFLEX (Beckman Coulter), входящем в состав Уникальной научной установки «Комплекс оборудования для управляемого культивирования изолированных органов». Соотношение живых клеток и клеток в состоянии апоптоза и некроза оценивали по окрашиванию флуоресцентными красителями YO-pro и PI («ThermoFisher», США).

Размороженные образцы суспензии АКЭ после криохранения были трансплантированы в брюшную полость мышей по методу [12]. После 10 суток роста опухоли клетки АКЭ извлекали и готовили цитологические препараты с окраской по Романовскому-Гимзе.

Статистическую обработку, полученных данных проводили, используя непараметрические методы. Для оценки различий между группами использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка изменения интенсивности сигналов ЭПР после криоконсервации при разных температурах.

При анализе спектров АКЭ ранее было показано, что в нативной суспензии четко регистрируются парамагнитные центры металлосодержащих молекул: трансферрина (Fe^{3+}), церулоплазмينا (Cu^{2+}), молибден-содержащих ферментов, вероятнее всего сульфитоксидазы [13]. Также имеется сигнал от динитрозильных комплексов железа и радикальных форм кислорода и азота [11,14]. После 2 месяцев хранения образцов при разной температуре получили ЭПР спектры и сравнили их по интенсивности сигнала от трансферрина, церулоплазмينا и молибден-содержащих белков (рис. 1).

Анализ спектров выявил значительные изменения в парамагнитных свойствах исследуемых молекул в зависимости от условий хранения. При температуре -20°C наблюдается исчезновение сигнала, характерного для

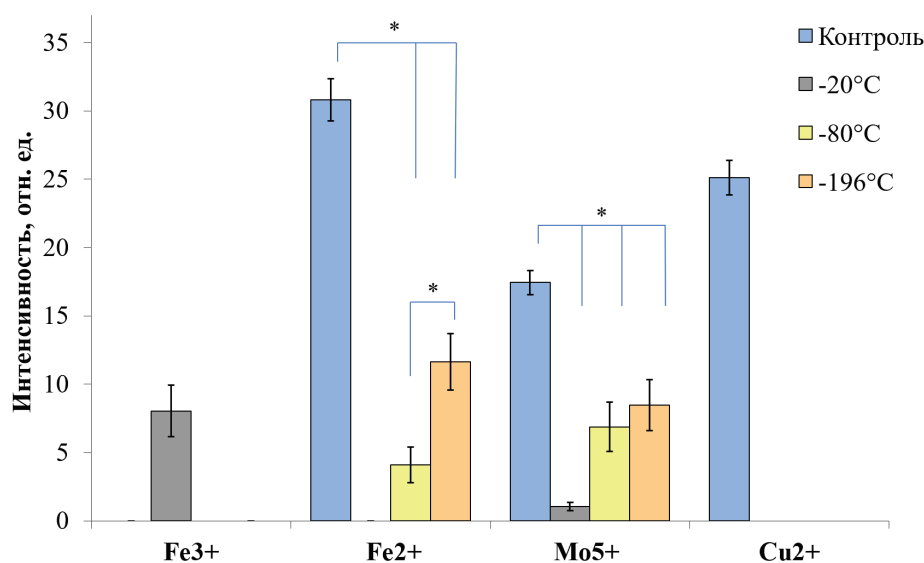


Рисунок 1. Интенсивность регистрируемых ЭПР сигналов в суспензии АКЭ после 2 месяцев хранения образцов. *- различия при $p \leq 0,05$

трансферрина (Fe^{2+}), с одновременным появлением сигнала от трёхвалентного железа (Fe^{3+}). Это свидетельствует о протекании процессов окисления, приводящих к переходу Fe^{2+} в Fe^{3+} . Сигнал от молибден-содержащих молекул (Mo^{5+}) становится слабым, его интенсивность примерно в 16 раз ниже по сравнению с контролем. Отсутствие сигнала от церулоплазмينا (Cu^{2+}) указывает на возможную деградацию медь-содержащих комплексов. Полученные данные позволяют заключить, что при хранении образцов при -20°C в клеточных системах продолжают окислительные процессы, а двухмесячное хранение приводит к существенной деградации исследуемых молекул в образцах.

В образцах, хранящихся при температуре -80°C сигнал от трансферрина (Fe^{2+}) сохраняется, однако его интенсивность уменьшается в 7,5 раз относительно контроля. Интенсивность сигнала молибден-содержащих молекул (Mo^{5+}) также снижается, становясь примерно в 2,5 раза слабее. Сигнал от церулоплазмينا (Cu^{2+}) не детектируется.

При криоконсервации в жидком азоте (-196°C) отмечается сохранение сигнала трансферрина (Fe^{2+}) с интенсивностью в 5,5 раз меньше по сравнению с контролем, но в 2 раза большей интенсивностью по сравнению с хранением при -80°C . Сигнал от молибден-содержащих соединений (Mo^{5+}) демонстрирует снижение интенсивности примерно в 2 раза относительно контроля, но остается примерно на том же уровне, что и при температуре -80°C . Как и в предыдущих случаях, сигнал от церулоплазмينا (Cu^{2+}) отсутствует.

Таким образом, исходя из значений интенсивности ЭПР сигналов, значимым изменением во всех образцах относительно исходной контрольной суспензии АКЭ является отсутствие сигнала от церулоплазмينا, который выполняет в клетках ряд значимых функций, одна из них – регуляция процесса окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} и включение его в апо-трансферин.

Оценка жизнеспособности клеток после криоконсервации в разных температурах. Поскольку при криохранении в образцах наблюдаются изменения в интенсивности ЭПР сигнала, одновременно мы оценили жизнеспособность клеток АКЭ после разморозки (табл. 1).

Криоконсервация при -20°C показала крайне низкую эффективность – доля живых клеток составила менее 1%. При этом наблюдалось резкое увеличение погибших клеток (в 48 раз выше контроля). Такие выраженные изменения согласуются с данными ЭПР-спектроскопии, где отмечалось появление сигнала Fe^{3+} и снижение интенсивности сигнала от молибденсодержащих молекул. Это свидетельствует о высокой интенсивности окислительных процессов при данной температуре хранения, приводящих к разрушению клеточных мембран.

В образцах, хранившихся при температуре -80°C , доля живых клеток была максимально близкой к исходному уровню – только на 8% ниже контрольных значений. Эти данные показывают, что -80°C является оптимальным режимом для сохранения жизнеспособности клеток АКЭ несмотря на то, что происходит снижение интенсивности ЭПР сигнала от трансферрина и исчезновение сигнала от церулоплазмينا (Cu^{2+}).

Криоконсервация в жидком азоте (-196°C) привела к снижению доли живых клеток при значительном увеличении погибших клеток в суспензии (в 13 раз выше контроля). Такое снижение жизнеспособности возможно связано с разрушением клеточных структур в процессе сверхбыстрого замораживания в жидком азоте.

Следует обратить внимание, что всех экспериментальных группах содержание клеток в состоянии апоптоза было одинаковым, что свидетельствует о преимущественно некротическом характере клеточной гибели при криоконсервации.

Оценка трансплантационной способности. Размороженные образцы АКЭ после криохранения трансплантировали в брюшную полость мышей. После 10 суток роста опухоли оценивали состояние клеточной суспензии АКЭ. Было получено, что в результате криохранения при -80°C и -196°C клетки сохраняют не только жизнеспособность, но и их онкогенный потенциал *in vivo*. Во всех группах (исключая образцы, хранившиеся при -20°C , поскольку они не содержали живых клеток) через 10 суток после трансплантации наблюдалось накопление асцитной жидкости равное по объему таковому при обычном способе поддержания клеточной линии, что свидетельствует о полноценной пролиферативной активности клеток АКЭ. Отсутствие различий в объеме опухоли между группами указывает на то, что температура криохранения (-80°C и -196°C) не влияет в дальнейшем на скорость роста опухоли *in vivo*. Цитологический анализ подтвердил, что клетки, выделенные из асцита мышей, сохраняют типичную морфологию, характерную для клеток АКЭ (рис. 2).

Таблица 1. Жизнеспособность клеток после криоконсервации при разных температурах

Температура	Доля живых клеток, %	Доля клеток в состоянии апоптоза, %	Доля погибших клеток, %
Контроль	$90,74 \pm 0,62$	$7,14 \pm 0,59$	$2,12 \pm 0,77$
-20°C	$0,47 \pm 0,06$	$3,51 \pm 0,59$	$96,02 \pm 0,63$
-80°C	$82,86 \pm 0,81$	$3,62 \pm 0,34$	$13,52 \pm 0,66$
-196°C	$68,13 \pm 2,64$	$4,54 \pm 0,44$	$27,33 \pm 2,65$

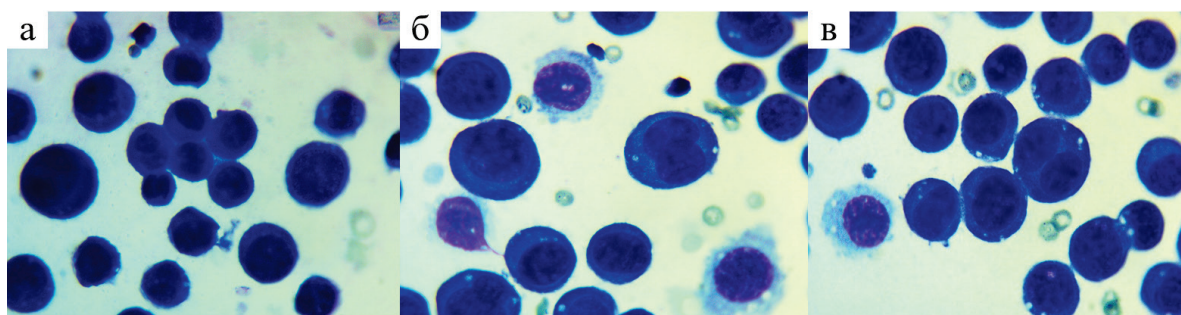


Рисунок 2. Клетки АКЭ в суспензии, извлеченной у мышей на 10 сутки после трансплантации опухолевых клеток, окрашенные по Романовскому-Гимзе: контроль (а), после криоконсервации при -80°C (б) и -196°C (в)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ влияния температурных режимов криоконсервации выявил существенные различия в биохимическом составе и жизнеспособности клеток. После 2 месяцев хранения суспензии АКЭ в разных температурных условиях (-20°C , -80°C и -196°C) ЭПР-спектроскопия выявила отсутствие сигнала церулоплазмينا (Cu^{2+}) во всех исследованных образцах, а также двукратное снижение интенсивности сигнала молибденсодержащих молекул (Mo^{5+}) при хранении при -80°C и -196°C . При -20°C наблюдается появление сигнал от Fe^{3+} и исчезновение сигнал от Fe^{2+} , а от молибденсодержащих ферментов остается слабый сигнал, в 16 раз меньше контрольного образца.

Поскольку трансферрин и церулоплазмин участвуют в транспорте железа и в системе антиоксидантной защиты клетки [15,16], снижение интенсивности ЭПР сигнала от парамагнитных центров может свидетельствовать об активном участии этих молекул в защите клеток при криохранении. Молибден-содержащие белки, а скорее всего в данном случае это сульфитооксидаза [13], в клетках и в условиях гипоксии участвует в процессах окислительно-восстановительного круговорота нитритов, которые, накапливаясь, также приводят к окислительному повреждению клеток.

Таким образом, полученные данные указывают на возможность включения антиоксидантных компонентов состав криопротекторной среды для минимизации окислительного стресса и повышения эффективности криоконсервации клеточных культур при более длительных сроках криоконсервации клеточных линий для повышения доли жизнеспособных клеток, в частности АКЭ.

Несмотря на наблюдаемые изменения при температурах хранения -80°C и -196°C , клетки АКЭ при попадании в брюшную полость животного развивались по обычному сценарию, сохранив пролиферативный потенциал.

Исследование выполнено в рамках научной темы государственного задания Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Список литературы / References:

1. Raju R., Bryant S.J., Wilkinson B.L., Bryant G. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2021, vol. 1865, no. 1, doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129749.
2. Wu X., Yao F., Zhang H., Li J. 2. Antifreeze proteins and their biomimetics for cell cryopreservation: Mechanism, function and application-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, vol. 192, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.211.
3. Joules A., Mallya A.S., Louwagie T., Yu G., Hubel A. Probing mechanisms of cryopreservation damage to natural killer cells. *Cytotherapy*, 2025, vol. 27, no. 8, doi: 10.1016/j.jcyt.2025.01.012.
4. Ozaslanl M., Karagozl I.D., Kilicl I. H., Guldur M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 2011, vol. 10, no. 13, doi: 10.5897/AJBx10.017.
5. Востроилова Г.А., Хохлова Н.А., Шабанов Д.И., Михайлов Е.В., Корчагина А.А., Шабунин Б.В., Некрасов А.В. Характеристика модели асцитной карциномы Эрлиха и перспективы ее применения в экспериментальной фармакологии ветеринарных препаратов. *Лабораторные животные для научных исследований*, 2023, т. 6, № 3 [Vostroilova G.A., Khokhlova N.A., Shabanov D.I., Mikhailov E.V., Korchagina A.A., Shabunin B.V., Nekrasov A.V. Characteristics of the Ehrlich ascites carcinoma model and prospects for its use in experimental pharmacology of veterinary drugs. *Laboratory animals for scientific research*, 2023, vol. 6, no. 3, doi: 10.57034/2618723X-2023-03-10 (In Russ.)].
6. Radulski D.R., Stipp M.C., Galindo C.M., Acco A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. *Translational breast cancer research*, 2023, vol. 4, no. 22, doi: 10.21037/tbcr-23-32.
7. Yılmaz S., Tokpınar A., Eroglu E., Ates S., Zahid R., Avnioglu S., Bozkurt O., Nisari M. The effect of antioxidants in Ehrlich Ascites Cancer. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, vol. 67, no. 2, doi: 10.14715/cmb/2021.67.2.4.

8. Santos K.M., Maciel F.P., Souza C.M., Cassali G.D., Thome R.G., Santos H.B., Ribeiro R.I. Evaluation of different methods of cryopreservation of Ehrlich tumor cells. *Cryo letters*, 2015, vol. 36, no. 2.
9. Goltsev A.M., Bondarovich M.O., Babenko N.M., Gaevska Yu.O., Dubrava T.G., Ostankov M.V. Effect of different cryopreservation regimens on Ehrlich carcinoma growth. *Cell and tissue banking*, 2019, vol. 20, no. 3, doi: 10.1007/s10561-019-09780-9.
10. Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н. Электронный парамагнитный резонанс. *Соровский образовательный журнал*, 1997, № 9 [Blumenfeld L.A., Tikhonov A.N. Electron paramagnetic resonance. *Soros Educational Journal*, 1997, no. 9 (In Russ.)].
11. Ингрэм Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М.: Мир, 1972, 296 с. [Ingram D. *Electronic paramagnetic resonance in biology*. M.: Mir, 1972, 296 p. (In Russ.)].
12. Инжеваткин Е.В. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха: Метод. разработка. Красноярск: Красноярский гос. ун-т, 2004, 10 с. [Inzhevatin E.V. *A workshop on experimental oncology using the example of Ehrlich ascitic carcinoma: A method development*. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State University, 2004, 10 p. (In Russ.)].
13. Wang J., Krizowski S., Fischer-Schrader K., Niks D., Tejero J., Sparacino-Watkins C., Wang L., Ragireddy, V., Frizzell S., Kelley E.E., Zhang Y., Basu P., Hille R., Schwarz G., Gladwin M.T. Sulfite Oxidase Catalyzes Single-Electron Transfer at Molybdenum Domain to Re-duce Nitrite to Nitric Oxide. *Antioxid Redox Signal*, 2015, vol. 23, no. 4, doi: 10.1089/ars.2013.5397.
14. Latyshev N.V., Kryukova O.V., Pyankov V.F., Stolyar S.V. Analysis of Ehrlich ascites carcinoma with electron paramagnetic resonance. *IEEE Ural-Siberian conference on computational technologies in cognitive science, genomics and biomedicine (CSGB)*, 2021, vol. 1, doi: 10.1109/CSGB53040.2021.9496012.
15. Чепкий Л.П., Сидорик Е.П., Долгова М.И., Мельников О.Р., Пятчанина Т.В., Момот В.Я., Трош Р.М., Васильева И.Г. Соотношение церулоплазмин-трансферрин и трансферрин-метгемоглобин в прогнозировании послеоперационных осложнений у больных с внутричерепными вне мозговыми краниобазальными опухолями. *Украинский нейрохирургический журнал*, 2001, № 3 [Chepkii L.P., Sidorik E.P., Kolgova M.I., Melnikov O.R., Pyatchanina T.V., Momot V.Ya., Trosh R.M., Vasilieva I.G. The ceruloplasmin-transferrin and transferrin-methemoglobin ratios for prognostication of the postoperative complications in patients with intracranial extracerebral craniobasal tumor. *Ukrainian Neurosurgical Journal*, 2001, no. 3 (In Russ.)].
16. Ващенко В.И., Ващенко Т.Н. Биология и фармакология церулоплазмينا: от эксперимента до лекарственной терапии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, 2008, т. 6, № 1 [Vaschenko V.I., Vaschenko T.N. Biology and pharmacology of ceruloplasmin: from experiment to drug therapy. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*, 2008, vol. 6, no. 1 (In Russ.)].

EPR DETERMINATION OF METAL-CONTAINING MOLECULES IN EHRlich ASCITES CARCINOMA AFTER CRYOPRESERVATION

Shabanova D.A.^{1,2}, Kryukova O.V.¹, Tyumentseva A.V.¹, Maksimov N.G.¹, Stolyar S.V.^{1,2}

¹ Federal Research Center «Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS»

Akademgorodok str., 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

² Siberian Federal University

Svobodny ave., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: sulfidna@gmail.com

Received 01.08.2025

Abstract. The method for the long-term preservation of cell lines is cryopreservation. In this study, the effect of cryostorage temperatures (-20°C, -80°C, -196°C) on a suspension of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells was determined using electron paramagnetic resonance (EPR). It was shown that cryostorage of a cell suspension at -20°C leads to significant oxidation of Fe²⁺ to Fe³⁺, a decrease of the intensity the EPR signal from molybdenum-containing molecules (Mo⁵⁺) and a complete disappearance of the signal from ceruloplasmin (Cu²⁺), which is the cause of cell death in this EAC sample. At -80°C and -196°C, partial preservation of EPR signal intensities from paramagnetic centers (Fe²⁺ and Mo⁵⁺) was observed, but the ceruloplasmin signal was still absent. The highest cell viability was observed at -80°C, whereas ultra-rapid freezing in liquid nitrogen (-196°C) increased the proportion of dead cells in the suspension after thawing. Despite the biochemical changes, cells cryopreserved at -80°C and -196°C retained their oncogenic potential in vivo, forming ascitic tumors in the abdominal cavity of mice. The obtained data suggest that to optimize cryopreservation protocols and improve EAC cell viability, antioxidant components can be used as supplements to the cryomedium.

Key words: cryopreservation, Ehrlich ascites carcinoma, EPR spectroscopy, metal-containing proteins, cell viability.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УРОМОДУЛИНА У ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИЛЬТРАЦИИ

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

¹ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ

площадь ак. Курчатова, 1, г. Москва, 123098, РФ

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Орлова роцца д.1, г. Гатчина, 188300, РФ; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 01.08.2025

Аннотация. Испытан альтернативный метод определения концентрации уромодулина в моче лабораторных животных, основанный на принципах ультрафильтрации. Метод базируется на уникальной способности уромодулина к полимеризации с образованием высокомолекулярных комплексов массой свыше 1 МДа, которые задерживаются мембранными фильтрами с границей разделения 300 кДа. В отличие от других белков мочи меньшей молекулярной массы (альбумин ~67 кДа, иммуноглобулины ~150 кДа), полимеризованный уромодулин не проходит через фильтр. Концентрацию уромодулина рассчитывали, как разность содержания общего белка, определенного методом Бредфорда, в образцах до и после фильтрации. Исследование проведено на образцах мочи, полученных от 10 клинически здоровых мышей и 10 крыс. Фильтрация не влияла на основные физико-химические показатели мочи (плотность, pH, концентрации электролитов). Концентрации уромодулина, определенные методом фильтрации, составили 15,1 мкг/мл у мышей и 64,2 мкг/мл у крыс. Сравнение с иммуноферментным анализом показало удовлетворительную согласованность методов. Электрофоретический анализ подтвердил эффективность удаления высокомолекулярных белковых компонентов при сохранении альбумина. Предложенный метод характеризуется простотой, доступностью и возможностью применения для различных видов животных.

Ключевые слова: уромодулин, метод Бредфорда, фильтрация, иммуноферментный анализ.

Уромодулин (uromodulin, UMOD), также известный как белок Тамма-Хорсфалла, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 67-100 кДа, который является наиболее распространенным белком в нормальной моче здорового человека [1,2]. Это уникальный почечный белок, синтезируемый исключительно эпителиальными клетками толстого восходящего отдела петли Генле и начального отдела дистального извитого канальца нефрона [3]. В последние десятилетия уромодулин привлекает все возрастающее внимание исследователей как потенциальный биомаркер почечной функции и индикатор различных патологических состояний почек [2,4]. Физиологическое значение уромодулина многогранно и включает участие в регуляции водно-солевого баланса, противодействие образованию почечных камней, защиту от инфекций мочевыводящих путей, а также модуляцию иммунного ответа. Белок секретируется преимущественно в просвет канальца, откуда попадает в мочу, в то время как меньшая часть через базолатеральную мембрану поступает в почечный интерстиций и далее в системный кровоток [5]. Суточная экскреция уромодулина с мочой у здоровых людей варьирует в широких пределах - от 9 до 200 мг в день, при этом концентрация в моче может достигать 50-200 мг/л [4]. Молекулярная структура уромодулина характеризуется высокой степенью гликозилирования (до 30% от общей молекулярной массы), наличием 48 остатков цистеина, образующих 24 внутримолекулярные дисульфидные связи, и способностью к полимеризации с образованием филаментных структур [6]. Эти биофизические свойства определяют не только функциональную активность белка, но и особенности методических подходов к его определению.

Основным методом для количественного определения уромодулина в биологических жидкостях является иммуноферментный анализ (ELISA). Наиболее широкое распространение получили варианты иммуноферментного анализа, основанные на принципе "sandwich-ELISA" с использованием специфических поликлональных или моноклональных антител к уромодулину [7]. Коммерческие наборы для определения уромодулина человека демонстрируют чувствительность в диапазоне от 0,07 до 1,25 нг/мл, с динамическим диапазоном измерений от 0,156 до 400 нг/мл в зависимости от производителя. Для ветеринарной диагностики разработаны специфические наборы для определения уромодулина у различных видов животных, включая мышей, крыс и собак [8,9]. Исследования на животных моделях показали, что сывороточная концентрация уромодулина у собак с хронической болезнью почек достоверно снижается по сравнению со здоровыми животными и может служить ранним диагностическим маркером. Альтернативные методы включают жидкостную хроматографию в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS), которая обеспечивает высокую специфичность и позволяет количественно определять уромодулин на уровне пикомолярных концентраций [10].

Диффузометрические методы анализа, в т.ч. основанные на измерении светорассеяния, представляют альтернативный подход к определению концентрации белковых макромолекул, включая уромодулин. Эти методы базируются на биофизических свойствах белка, таких как размер, форма молекул и их способность рассеивать свет [11]. Метод динамического рассеяния света (Dynamic Light Scattering, DLS) позволяет определять гидродинамический радиус и размерное распределение белковых агрегатов в растворе. Исследования

олигомерных форм уромодулина с использованием DLS показали наличие двух основных изоформ: UM(7) с молекулярной массой 7 МДа и гидродинамическим радиусом 90-100 нм, и UM(28) массой 28 МДа с радиусом 200-300 нм. Эти различия в размерных характеристиках коррелируют с функциональной активностью белка в стабилизации коллоида мочи. Применительно к уромодулину, диффузометрические методы позволяют не только определять общую концентрацию белка, но и характеризовать степень его агрегации и полимеризации, что особенно важно, поскольку уромодулин в моче существует в виде различных олигомерных форм, соотношение которых изменяется при патологических состояниях.

Вместе с тем, основываясь на данных об олигомерном составе уромодулина мочи и особенностях его молекулярной организации в норме и при патологических состояниях у человека и животных, был разработан альтернативный метод определения концентрации уромодулина, основанный на принципах ультрафильтрации. Применение метода Бредфорда [12] для количественного определения общего белка в образцах мочи (человека или животных) до и после фильтрации через мембранные фильтры с границей разделения по молекулярной массе 300 кДа позволяет рассчитать концентрацию уромодулина в исследуемых образцах. Принцип метода базируется на уникальных биофизических свойствах уромодулина, а именно его способности к полимеризации с образованием высокомолекулярных комплексов массой 1 МДа и более. В отличие от других белков мочи меньшей молекулярной массы (альбумин ~67 кДа, иммуноглобулины ~150 кДа), которые свободно проходят через фильтр с границей разделения 300 кДа, полимеризованный уромодулин задерживается на мембране. Таким образом, разность концентраций общего белка в исходном образце и фильтрате соответствует концентрации уромодулина в полимеризованной форме [13]. К достоинствам данного метода можно отнести не только его простоту и доступность, но и возможность применения идентичной процедуры определения концентрации уромодулина для различных видов животных.

Для сравнительного анализа концентрации уромодулина были использованы образцы мочи, полученные от 10 клинически здоровых мышей и 10 крыс, содержащихся в стандартных условиях (температура 22–24 °С, влажность 40–70 %, 12-часовой световой режим, стандартный рацион). Моча собиралась индивидуально в метаболических клетках, объем каждого образца составлял не менее 500 мкл.

Определение массовой концентрации катионов проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы КАПЕЛЬ-105М (Люмэкс, Россия). Свежесобранные образцы мочи предварительно центрифугировали при 1800×g в течение 5 минут для удаления взвешенных частиц, после чего отбирали супернатант. Полученный супернатант разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:250 непосредственно перед анализом. Методом капиллярного электрофореза количественно определяли концентрации катионов аммония (NH_4^+), калия (K^+), натрия (Na^+) и кальция (Ca^{2+}).

Общее содержание белка определяли колориметрическим методом Бредфорда с использованием альбумина в качестве стандарта: исследуемые образцы смешивали с реактивом Бредфорда в одноразовых кюветах, после инкубации в течение 5 минут измеряли оптическую плотность при 595 нм (NanoPhotometer Implen P330). Для фильтрации образцов мочи использовали фильтр-насадку на шприц с фильтром 300 кДа (Ultrafiltration Discs, 300 kDa NMW, Millipore).

Концентрацию уромодулина определяли иммуноферментным методом (ELISA Kit for Uromodulin (UMOD) SEG918Mu, ELISA Kit for Uromodulin (UMOD) SEG918Ra) после 2000-кратного разведения в буфере TEA (0,5% Triton X-100, 20 mM EDTA, pH 7,5). Аналитические измерения проводили в 96-луночных планшетах с регистрацией сигнала при 550 нм (EnSpire Multilabel Plate Reader, PerkinElmer). Расчет концентрации выполняли по калибровочной кривой стандартного образца.

Для анализа белкового состава применяли денатурирующий гель-электрофорез (SDS-PAGE): предварительно диализированные образцы (15 кДа MWCO) наносили на 10% полиакриламидный гель после кратковременного нагрева в буфере для загрузки. Электрофорез проводили при мощности 3 Вт на гель, окрашивали Coomassie Brilliant Blue G 250 и документировали результаты с помощью системы гель-документирования (BioRad GelDoc).

Данные измерения физических свойств нативной и фильтрованной мочи у мышей и крыс представлены в таблице 1. Фильтрация через мембрану 300 кДа не оказала существенного влияния на основные физико-химические показатели мочи у обоих видов животных. У мышей плотность мочи составила 1,025 г/см³ в нативных образцах и 1,023 г/см³ после фильтрации. У крыс эти показатели были несколько выше: 1,035 и 1,033 г/см³ соответственно, что соответствует нормальному диапазону для данного вида (1,022-1,050). Значения pH мочи у мышей и крыс находились в пределах нормальных значений для грызунов (5-9). Проводимость и

Таблица 1. Данные измерения физических свойств нативной и фильтрованной мочи у животных

Параметр	Нативная моча мыши N=10 (95% CI)	Фильтр 300 кДа мыши N=10 (95% CI)	Нативная моча крысы N=10 (95% CI)	Фильтр 300 кДа крысы N=10 (95% CI)
Плотность, г/см ³	1,025 (1,015; 1,035)	1,025 (1,015; 1,035)	1,035 (1,025; 1,045)	1,035 (1,025; 1,045)
pH	5,2 (4,8; 5,6)	5,1 (4,7; 5,5)	5,8 (5,2; 6,4)	5,7 (5,1; 6,3)
Конц. Na ⁺ , мг/мл	2,1 (1,2; 2,8)	2,1 (1,3; 2,8)	2,2 (1,3; 3,6)	2,1 (1,3; 3,5)
Конц. K ⁺ , мг/мл	2,3 (2,2; 2,8)	2,3 (2,1; 2,9)	4,5 (2,8; 5,2)	4,4 (2,7; 5,1)

Таблица 2. Результаты измерения концентрации уромодулина (мкг/мл)

Метод измерения	Мыши N=10, Медиана (95% CI)	Мыши N=10, Медиана (95% CI)
ELISA + TEA, нативная моча	13,40 (12,98; 14,06)	60,56 (57,76; 61,80)
Фильтр 300 кДа	15,01 (14,80; 15,25)	64,22 (61,70; 64,50)

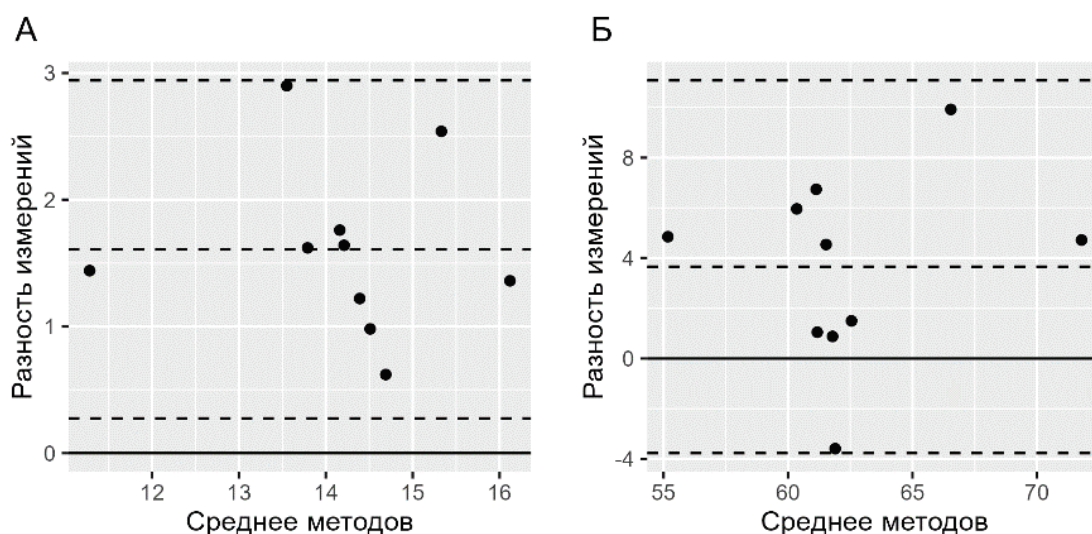


Рисунок 1. Графики Бленда-Альтмана для оценки согласованности между методом иммуноферментного анализа (ИФА) и методом фильтрации при определении концентрации уромодулина в моче для мышей (А) и крыс (Б)

концентрации основных электролитов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+) практически не изменялись после фильтрации, что указывает на стабильность ионного состава мочи при удалении высокомолекулярных компонентов.

Измерение концентрации уромодулина с использованием ИФА у мышей и крыс показало, что применение буфера ТЕА при пробоподготовке образца нативной мочи приводило к увеличению детектируемой концентрации уромодулина примерно в 1,9 раза, что хорошо соотносится с данными, полученными для человека. Концентрация уромодулина в образцах фильтрованной мочи (300 кДа) оставалась низкой и практически не изменялась в зависимости от применения буфера ТЕА: у мышей 0,9 мкг/мл, у крыс – 1,1 мкг/мл. В таблице 2 приведены данные определения концентрации уромодулина в образце мочи с использованием ИФА (стандартный метод) и с использованием фильтрации (рассчитывается как разность концентрации белка (по Бредфорду) до и после фильтрации образца нативной мочи на фильтре 300 кДа).

На рисунке 1 представлены графики оценки согласованности двух методов определения концентрации уромодулина (графики Бленда-Альтмана), по оси абсцисс - среднее значение концентраций уромодулина, определенных двумя методами (мкг/мл), по оси ординат – разность между результатами измерений методом фильтрации и ИФА (мкг/мл). Сплошная горизонтальная линия отображает среднюю разность между методами, пунктирные линии показывают границы согласованности (среднее $\pm$ 1,96 стандартного отклонения). У мышей наблюдается систематическое завышение результатов методом фильтрации относительно ИФА со средней разностью $\sim$ 1,6 мкг/мл. У крыс разброс значений больше, средняя разность составляет $\sim$ 1,5 мкг/мл, что указывает на удовлетворительную согласованность методов с учетом более высоких абсолютных концентраций уромодулина у данного вида.

Электрофоретический анализ образцов мочи подтвердил эффективность фильтрации для удаления высокомолекулярных белковых компонентов. В образцах нативной мочи как у мышей, так и у крыс выявлялись полосы в области 85-90 кДа, соответствующие мономерной форме уромодулина. После фильтрации интенсивность этих полос значительно снижалась, что соответствует данным количественного анализа. При этом полоса в области 67 кДа, советующая альбумину не теряла своей интенсивности.

Полученные результаты демонстрируют, что предложенный подход фильтрации через мембрану 300 кДа эффективно удаляет полимеризованный уромодулин из мочи лабораторных животных, позволяя количественно оценить его концентрацию по разности содержания общего белка в образцах до и после фильтрации. Концентрации уромодулина у крыс были в 3-4 раза выше, чем у мышей, что соответствует известным видовым различиям в экспрессии данного белка.

Список литературы / References:

1. Hammond T.G. et al. Development and characterization of a pseudo multiple reaction monitoring method for the quantification of human uromodulin in urine. *Bioanalysis*, 2016, vol. 8, no. 12, pp. 1279-1296.
2. Thielemans R. et al. Unveiling the Hidden Power of Uromodulin: A Promising Potential Biomarker for Kidney Diseases. *Diagnostics*, 2023, vol. 13, no. 19, p. 3077.

3. Levitskaya E.S., Batiushin M.M., Gasanov M.Z. Uromodulin – Biological Significance and Prospects for Clinical Use. *Arhiv" vnutrennej mediciny*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 5-13.
4. Khasun M. et al. Uromodulin and kidneys. *Nefrologia*, 2020, vol. 24, no. 1, pp. 22-38.
5. Nanamatsu A. et al. Advances in uromodulin biology and potential clinical applications. *Nat Rev Nephrol.*, 2024, vol. 20, no. 12, pp. 806-821.
6. Schaeffer C., Devuyst O., Rampoldi L. Uromodulin: Roles in Health and Disease. *Annu Rev Physiol.*, 2021, vol. 83, pp. 477-501.
7. Youhanna S. et al. Determination of uromodulin in human urine: influence of storage and processing. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, vol. 29, no. 1, pp. 136-145.
8. Seo D. et al. Serum uromodulin in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Internal Medicine*, 2022, vol. 36, no. 6, pp. 2071-2078.
9. Schiano G. et al. The Urinary Excretion of Uromodulin is Regulated by the Potassium Channel ROMK. *Sci Repp.*, 2019, vol. 9, no. 1, p. 19517.
10. Van Duijl T.T. et al. Development and Provisional Validation of a Multiplex LC-MRM-MS Test for Timely Kidney Injury Detection in Urine. *J. Proteome Res.*, 2021, vol. 20, no. 12, pp. 5304-5314.
11. Verlov N.A. et al. Uromodulin: Relationship of protein oligomeric forms and functions. *Zhurnal «Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya»*, 2021, no. 1, pp. 133-140.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254.
13. Verlov N.A. et al. A new approach to assessing the level of uromodulin in urine. *RCLD*, 2023, vol. 68, no. 12.

DETERMINATION OF UROMODULIN CONCENTRATION IN ANIMALS USING FILTRATION

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

Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. PP. Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute»

Kurchatov sq. 1, Moscow, 123098; Russia

Orlova 1, Gatchina, 188300, Russia; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Received 01.08.2025

Abstract. An alternative method for determining uromodulin concentration in laboratory animal urine based on ultrafiltration principles has been developed. The method is based on the unique ability of uromodulin to polymerize forming high-molecular-weight complexes exceeding 1 MDa, which are retained by membrane filters with a 300 kDa molecular weight cutoff. Unlike other urine proteins of lower molecular weight (albumin ~67 kDa, immunoglobulins ~150 kDa), polymerized uromodulin does not pass through the filter. Uromodulin concentration was calculated as the difference in total protein content, determined by the Bradford method, in samples before and after filtration. The study was conducted on urine samples from 10 clinically healthy mice and 10 rats. Filtration did not affect the main physicochemical parameters of urine (density, pH, electrolyte concentrations). Protein loss after filtration was 12.3 µg/ml in mice and 63.2 µg/ml in rats. Uromodulin concentrations determined by the filtration method were 15.01 µg/ml in mice and 64.22 µg/ml in rats. Comparison with enzyme-linked immunosorbent assay showed satisfactory agreement between methods: mean difference was ~1.6 µg/ml in mice and ~1.5 µg/ml in rats. Electrophoretic analysis confirmed the effectiveness of high-molecular-weight protein component removal while preserving albumin. The proposed method is characterized by simplicity, accessibility, and applicability to various animal species.

Key words: uromodulin, Bradford method, filtration, ELISA.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА КАРЦИНОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕТФОРМИНОМ

Бутенко Е.В.¹, Турсунова Ю.Д.¹, Добаева Н.М.², Бакурова Е.М.¹

¹ ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького» МЗ России
пр. Ильича, 16, г. Донецк, 283003, ДНР, РФ; e-mail: 32000023@mail.ru

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» МЗ России
пер. Нахичеванский, 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, РФ

Поступила в редакцию 04.08.2025

Аннотация. В настоящее время известно, что бигуаниды *in vitro* обладают некоторыми эффектами, подавляющими опухолевый рост. Однако, результаты исследований *in vivo* по использованию их в клинической практике неоднозначны. Нами установлены особенности катаболизма аденозина – сигнальной молекулы, участвующей в канцерогенезе, опосредованные метформином. Однако также выявили нарастание прооксидантной активности ксантиноксидазы, снижение активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГПО) и нарастание уровней малонового диальдегида. Это указывает на усиление процессов свободно-радикального окисления на фоне приёма бигуанида неoadъювантно, что может способствовать формированию агрессивного фенотипа опухоли. Возможно. Согласно критерию множественных сравнений Краскела–Уоллиса (H) и медианного теста (χ^2) выявили, что активности АДА и ГПО специфичны для опухолевого процесса, а их активность значимо связана с эффектами метформина: H = 10,1 (p = 0,003), χ^2 = 9,55 (p = 0,002). Учитывая полученные результаты, считаем, что применение метформина в комплексной терапии рака молочной железы может способствовать опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: аденокарцинома, метформин, пурины, аденозиндезаминаза, глутатионпероксидаза, малоновый диальдегид, ксантиноксидаза.

ВВЕДЕНИЕ

По данным международного агентства по изучению рака GLOBOCAN и его прогнозу до 2040 г. общее число заболевших раком может составить 28,4 миллиона. Причём лидирующим среди всех новых случаев уже сейчас является рак молочной железы (РМЖ) [1]. Следовательно, становится как никогда актуальным изучение возможных средств его профилактики и лечения. Значительное число исследователей считает, что такими препаратами могут стать бигуаниды, применяемые при лечении сахарного диабета II типа (СД II), в частности, метформин (МТФ) [2]. Считалось, что у пациенток с СД II приём метформина снижает риск развития РМЖ [3-5]. Однако, накопленный опыт по применению МТФ неоднозначен, а одним из факторов, поясняющих различие в результатах является то, что его максимальная суточная доза, используемая при лечении СД II, значительно ниже его режимов дозирования в эксперименте. Возможным решением этой проблемы может быть применение в клинике метрономных режимов дозирования. Известно, что метрономная химиотерапия – особый дробный режим введения препарата, предполагающий снижение риска развития его побочных эффектов [4,5]. Также неоднозначно выглядит способ оценивания эффектов МТФ на рост опухоли по снижению экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в образцах опухолей пациенток, получавших МТФ неoadъювантно [6]. Так, известно, что низкая пролиферативная активность эпителиальной опухоли зачастую свидетельствует о формировании агрессивного фенотипа, резистентного к химио- и лучевой терапии. Это одна из характеристик, так называемого, эпителиально-мезенхимального перехода или трансформации карциномы (ЭМП), характеризующегося инвазией, метастазированием, низкой выживаемостью пациентов [7]. Также есть результаты исследований, которые не установили какой-либо профилактической роли МТФ в развитии рака даже у пациенток с СД II [8,9]. Таким образом, на настоящий момент имеются противоречивые данные проводившихся клинических исследований в отношении возможных противоопухолевых эффектов этого сахароснижающего препарата [2]. Это делает актуальными дальнейшее изучение воздействия МТФ на растущую опухоль.

В настоящее время имеются некоторые указания на воздействие бигуанида на обменные процессы в организме. Однако, мы не обнаружили данных о механизмах стимулирования МТФ антиоксидантной системы, хотя это представляет собой интерес. Как известно, дисбаланс и усиление прооксидантных процессов на фоне дисфункции антиоксидантной системы – универсальный и значимый фактор канцерогенеза [10]. Также ранее были описаны особенности катаболизма пуриновых нуклеотидов, характерные для патогенеза опухолевого роста [11]. Имеются указания на непосредственное активирующее влияние препарата на активность ключевого фермента катаболизма аденилата – аденозиндезаминазы (АДА) [12]. В рамках данного исследования были изучены эффекты метформина на патохимические особенности обмена пуринов и активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (ГПО).

Цель исследования: определить особенности катаболизма пуринов и ГПО в эпителиальных опухолях молочной железы на фоне приёма метформина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биохимическое исследование выполнено в 30 образцах местно-распространённого рака молочной железы $T_{2-3}N_{0-x}M_0$ стадий. Особенности метаболизма опухоли в каждом случае исследовали в сопоставлении с индивидуальным контролем - визуально нетрансформированными тканями края резекции. Общая выборка делилась на 2 группы ($n=15$) в зависимости от приёма метформина (режим дозирования – 1000 мг в день) дополнительно к проводимой циклической неоадьювантной полихимиотерапии в течение 2–3 месяцев. Больные были информированы и дали письменное согласие на включение их в исследование. Среди образцов РМЖ, включенных в исследование, преобладали инфильтрирующие карциномы G2 и G3 степени – 83% (соответственно, умеренной и низкой степени дифференцировки). Образцы ткани из послеоперационного материала замораживали и хранили при -70°C до использования. Гомогенизацию тканей проводили на льду в фосфатном буфере (35 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH} = 7,0$). Концентрации аденозина, инозина и гипоксантина в гомогенатах определяли методом обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для элюирования использовали 20 мМ раствор аммония хлорида с 2% ацетонитрилом, скорость потока элюента – 1 мл/мин. Для определения активности АДА к 200 мкл гомогената опухоли добавляли 2 мл 10 мМ раствора, инкубировали при 37°C . Реакцию останавливали путем осаждения всех белков ацетонитрилом на 30-й минуте. Ацетонитрил удаляли хлороформом путем экстракции.

Расчет активности АДА производили по степени прироста в реакционной смеси инозина при λ 265 нм. Концентрацию белка в гомогенатах определяли по методу Лоури. Активность ГПО оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя спектрофотометрическим методом его конъюгаты с 2-нитро-5-тиобензойатом [7]. Фотометрически определяли содержание МДА, регистрируя его окрашенные триметилловые комплексы с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при λ 532 нм.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение особенностей патохимических процессов в образцах РМЖ проводили в зависимости от МТФ – в первой группе оценивали изменения на фоне его приёма, во второй группе он не принимался неоадьювантно.

В первую группу вошли образцы РМЖ с максимальной активностью АДА ($108,3 \pm 36,2$ нмоль/мин·мг), которая превышала активность во второй группе в 2,5 раза (соответственно, $42,7 \pm 18,1$ нмоль/мин·мг), а также в 7 раз была выше контроля ($14,6 \pm 5,9$ нмоль/мин·мг ($p < 0,01$)). Изменения активности АДА на фоне приёма МТФ могли способствовать снижению клеточных концентраций субстрата – аденозина. Как известно, целый ряд метаболитов является сигнальными молекулами, запускающими те или иные клеточные программы, в том числе и канцерогенеза [7]. В настоящее время известно, что биологический эффект одной и той же молекулы напрямую зависит от её концентрации. В частности, пуриновый нуклеозид аденозин – регуляторная молекула для целого ряда программ, реализуемых растущей опухолью. Например, в незначительных концентрациях аденозин стимулирует иммунный ответ, способствует усилению синтеза антител. В тоже время, его избыточные концентрации токсичны для иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы. Вызывая их дисфункцию, аденозин «уводит опухолевые клетки от иммунного надзора». Обладает антиапоптозными эффектами, также он стимулирует синтез белков антиоксидантной системы [11]. АДА контролирует клеточные уровни аденозина, запуская его деградацию до мочевого кислоты. Ранее установлено, что метформин способен стимулировать её активность [12].

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

Данные по содержанию катаболитов пуриновой группы в образцах опухолевой ткани в зависимости от приёма метформина также приведены в таблице 1. Нами установлено достоверное повышение уровней инозина и гипоксантина в образцах тканей РМЖ, составивших 2 группу, соответственно, нами выявлено повышение концентрации инозина в 2,9 раза по сравнению с опухолями, вошедшими во 1 группу. Это хорошо согласуется с выявленными особенностями активности АДА, согласно ранговому корреляционному анализу Спирмена между активностью АДА и уровнями катаболитов группы аденозина установлена прямая сильная связь (коэффициент Спирмена $\rho = 0,73$ и $\rho = 0,77$, соответственно; $p < 0,05$). Причём, для гипоксантина характерно максимальное нарастание его уровней (в 3,4 раза) в группе с метформином.

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

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

Примечание: 1-я группа – без метформина; 2-я группа – с метформином;

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

В исследуемых образцах опухолей установлено снижение активности ГПО - фермента антиоксидантной системы. Данные представлены на рисунке 1. Также проведено исследование содержания ТБК-активного продукта, который не только свидетельствует об интенсивности процессов окисления липидов, но и сам является прооксидантом дикарбонилем, способным повреждать белковые молекулы, вызывать их стойкую дисфункцию.

В образцах, составивших 2-ю группу, установлена минимальная активность ГПО, соответственно $1,92 \pm 0,45$ нмоль/мин·мг, однако не выявлено достоверных различий с индивидуальным контролем этой группы. Оба показателя ниже, чем нетрансформированные ткани, составлявшие 1-ю контрольную группу во 1-й группе (без МТФ) (соответственно, $p = 0,002$ и $p = 0,031$). Это указывает на снижение активности ГПО не только в опухолевой, но и в здоровых смежных тканях в группе, получавших метформин. Закономерно были выявлены особенности для уровней МДА в этих тканях (см. рис. 1). При этом было выявлено повышение содержания МДА в 1,9 раза даже в контроле 2-й группы по сравнению с контролем 1-й группы ($p = 0,004$). Это указывает на интенсификацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и в здоровых тканях на фоне приёма метформина. Возможным механизмом могут быть ингибирующие эффекты препарата на убиквитинредуктазу, чья активность связана с дыхательной цепью митохондрий [13]. Это неизбежно приведёт к повышению продукции активных метаболитов кислорода, активации ПОЛ и к окислительной модификации белков (ОМБ), к которой, например, чувствительна ГПО. Усиление процессов гипоксии связано с формированием агрессивных свойств опухоли [5]. Также об усилении прооксидантных процессов в тканях образцов опухоли свидетельствует отрицательная корреляция ГПО и МДА (коэффициент Спирмена $r = -0,51$).

Как известно, одним из главных источников активных форм кислорода в тканях является ксантиноксидаза (КСО), катализирующая финальные реакции катаболизма пуринов в тканях. Причём сама КСО подвержена ОМБ, меняя при этом ксантиндегидрогеназную активность на ксантиноксидазную, продуктом которой помимо мочевиной кислоты будет пероксид водорода (H_2O_2). При этом фермент является по сути прооксидантом,

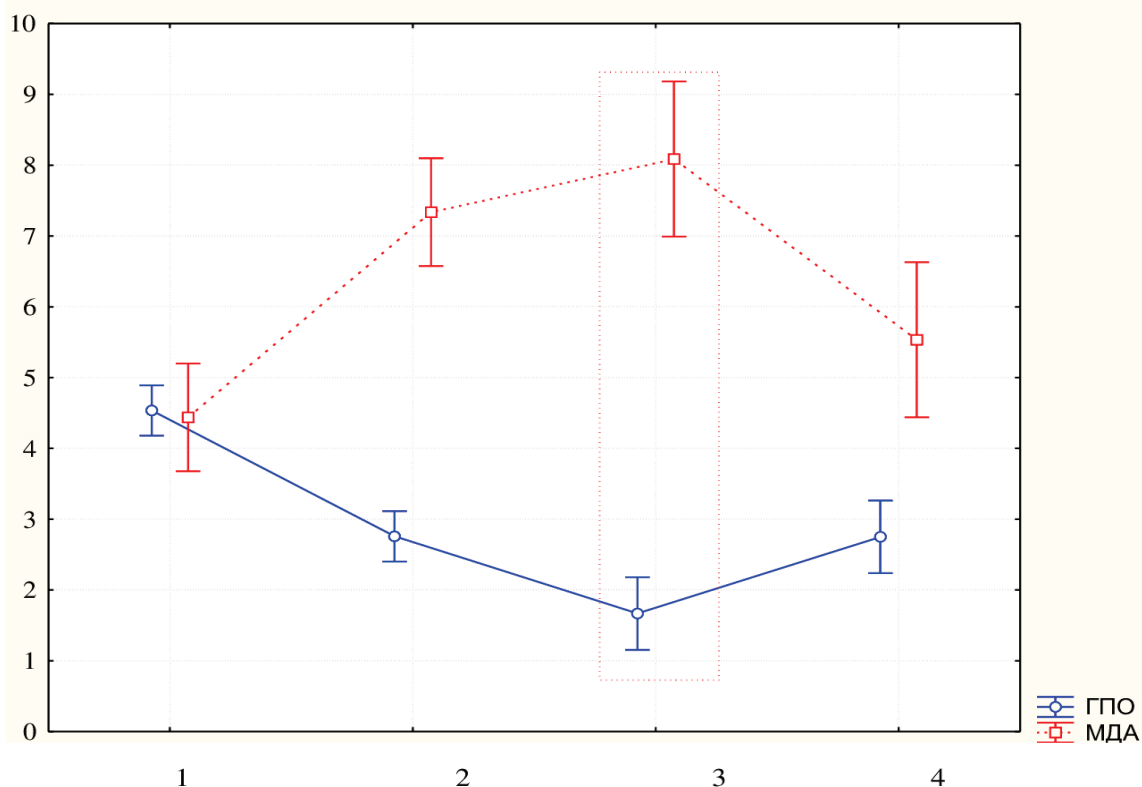


Рисунок 1. Повышение уровней МДА (верхняя кривая) в образцах карцином РМЖ на фоне снижения активности ГПО (нижняя кривая) в зависимости от метформина.

Примечания: 1 – контроль 1 гр (группа без МТФ), 2 – РМЖ 1 гр (группа без МТФ); 3 – РМЖ 2 гр (группа с МТФ), 4 – контроль 2 гр (группа с МТФ)

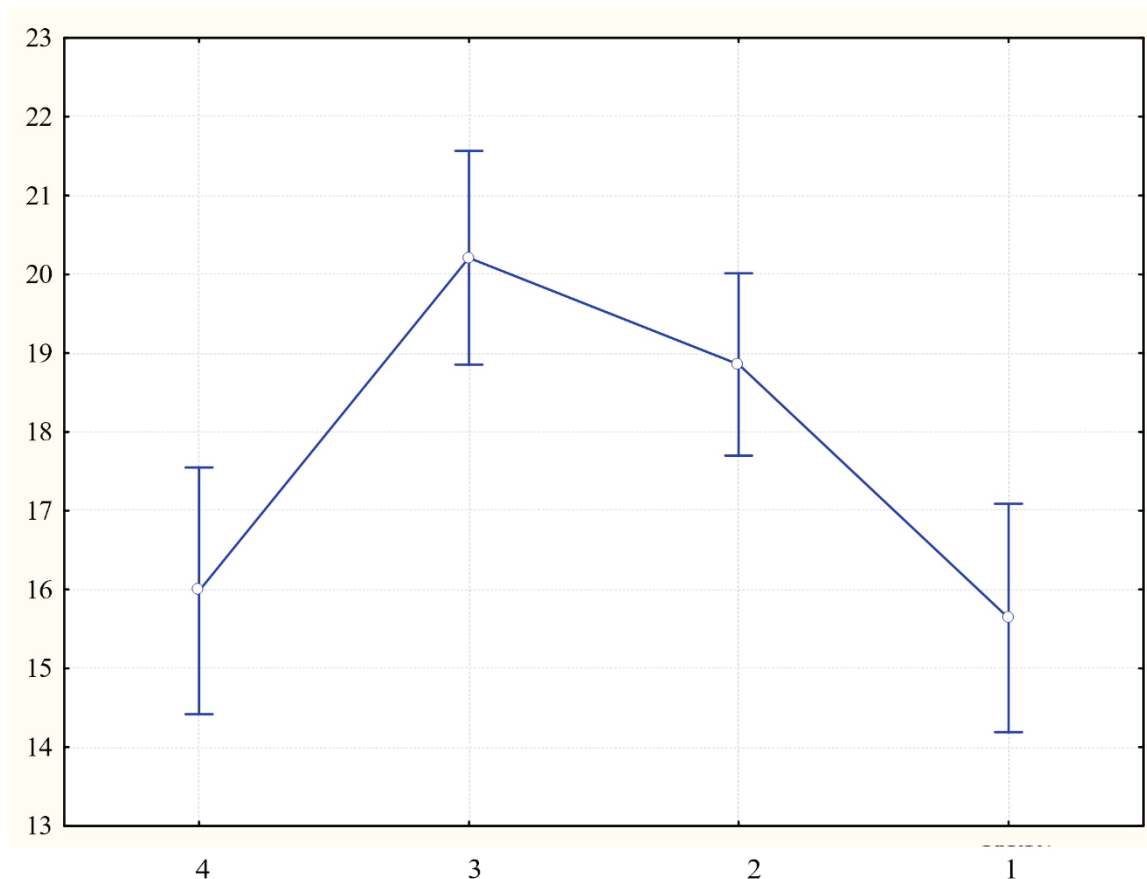


Рисунок 2. Особенности активности КСО в образцах РМЖ, разбитых на кластеры согласно особенностям активности АДА; нмоль/мин·мг.

Примечания: 1 – контроль 1 гр (группа без МТФ), 2 – РМЖ 1 гр (группа без МТФ), 3 – РМЖ (кластер 2), 4 – контроль 2 гр (группа с МТФ)

источником АФК. Проводя множественный регрессионный анализ, рассмотрели наличие взаимосвязей между ферментативной активностью в тканях. О том, что наряду с вовлеченностью в наработку конечного продукта распада пуринов – мочевой кислоты, данный вид активности КСО также связан со свободно-радикальным окислением свидетельствует отрицательная связь средней силы между КСО и ГПО ($r = -0,56$) и положительная прямая связь с уровнями МДА ($r = 0,47$).

Таким образом, в образцах эпителиального рака молочной железы выявлена их метаболическая неоднородность по активности АДА и уровням катаболитов аденозина, обусловленная приёмом метформина. Данные изменения происходят на фоне усиления прооксидантных процессов, в частности при снижении активности ГПО и нарастании уровней МДА, повышении активности КСО.

Действительно, прооксидантные процессы играют ключевую роль в злокачественной трансформации тканей, следовательно, их медикаментозное стимулирование может быть крайне неблагоприятным.

Видим максимальные уровни гипоксантина (субстрата для КСО), свидетельствующие о параллельном образовании фосфорилированных форм рибозы. Избыток субстрата КСО и состоявшийся переход в результате ОМБ на оксидазную активность приведут к нарастанию уровней H_2O_2 . На фоне угнетения активности ГПО в образцах карцином после приёма неoadъювантно метформина, это может стимулировать формируемыми метаболитами (2-дезоксид-рибозо-1-фосфатом и H_2O_2) их общие сигнальные пути канцерогенеза [7]. Поэтому вместо ожидаемых от МТФ эффектов можем наблюдать противоположный, который обусловлен влиянием МТФ на метаболизм опухоли.

Список литературы / References:

1. *Global Initiative for Cancer Registry Development*. Lyon: World Health Organization International agency for research on cancer, 2020, 252 p.
2. Kuznetsov K.O., Safina E.R., Gaimakova D.V., Frolova Ya.S., Oganessian I.Yu., Sadertdinova A.G., Nazmieva K.A., Islamgulov A.H., Karimova A.R., Galimova A.M., Rizvanova E.V. Metformin and malignant neoplasms: a possible mechanism of antitumor action and prospects for use in practice. *Problems of Endocrinology*, 2022, vol. 68, no. 5, pp. 45-55, doi: 10.14341/probl13097.
3. Chen H., Cook L.S., Tang M.C. Relationship between Diabetes and Diabetes Medications and Risk of Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2019, vol. 28, no. 11, pp. 1802-1808, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0291.

4. Алхусейн-Кулягинова М.С., Котиева Е.М., Котиева В.М., Абоу Алоу М.Ш., Додохова М.А., Котиева И.М. Патогенетические аспекты введения соединений с предполагаемым противоопухолевым действием в метронном режиме (обзор). *Журн. мед.-биол. исследований*, 2023, т. 11, № 3, с. 341-350 [Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Kotieva E.M., Kotieva V.M., Abou Alou M.S., Dodokhova M.A., Kotieva I.M. Pathogenetic Aspects of Metronomic Administration of Compounds with an Alleged Antitumour Effect (Review). *Journal of Medical and Biological Research*, 2023, vol. 11, no. 3, pp. 341-350, doi: 10.37482/2687-1491-Z151 (In Russ.)].
5. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a b16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes. *Research Results in Pharmacology*, 2022, vol. 8, no. 1, pp. 85-93, doi: 10.3897/rpharmacology.8.76363.
6. Semiglazova T.Y., Osipov M., Krivorotko P. Neoadjuvant endocrine therapy in combination with melatonin and metformin in locally advanced breast cancer. *Ann Oncol.*, 2019, no. 30, suppl. 5, pp. 99-103, doi: 10.1093/annonc/mdz241.002.
7. Бакурова Е.М. Особенности эпителиальной опухоли при её мезенхимальном переходе. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 4, с. 604-607 [Bakurova E.M. The epithelial tumor metabolism features during its mesenchymal transition. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 4, pp. 604-607 (In Russ.)].
8. Srivastava S.P., Goodwin J.E. Cancer Biology and Prevention in Diabetes. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 6, pp. 1380-1389, doi: 10.3390/cells9061380.
9. Oh T.K., Song I.A. Metformin Use and the Risk of Cancer in Patients with Diabetes: A Nationwide Sample Cohort Study. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2020, vol. 13, no. 2, pp. 195-202, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0427.
10. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma. *Research Results in Pharmacology*, 2021, vol. 7, no. 4, pp. 81-88, doi: 10.3897/rpharmacology.7.71455.
11. Зуйков С.А., Бакурова Е.М., Турсунова Ю.Д., Хомутов Е.В. Повышение активности ферментов катаболизма пуринов как один из факторов патогенеза злокачественных новообразований. *Новообразование*, 2021, т. 13, № 2 (33), с. 86-90 [Zuikov S.A., Bakurova E.M., Tursunova Y.D., Khomutov E.V. Increasing the activity of purine catabolism enzymes as one of the pathogenesis factors of malignant neoplasms. *Neoplasm*, 2021, vol. 13, no. 2 (33), pp. 86-90 (In Russ.)].
12. Барсукова М.А., Дмитриев Л.С., Бутенко Е.В., Кишеня М.С., Хомутов Е.В. Использование нефиксированных срезов опухолевых тканей в качестве релевантной модели ex vivo для оценки воздействия метформина на метаболизм аденозина. *Новообразование*, 2022, т. 14, № 3 (38), с. 135-140 [Barsukova M.A., Dmitriev L.S., Butenko E.V., Kishenya M.S., Khomutov E.V. Increasing the activity of purine catabolism enzymes as one of the pathogenesis factors of malignant neoplasms. *Neoplasm*, 2022, vol. 14, no. 3 (38), pp. 135-140 (In Russ.)].
13. Mahmood S.A., Akhtar J., Ahmad U., Badruddeen, B., Khan, M.I. *Mechanisms of Action of Metformin*. In: Metformin – Pharmacology and Drug Interactions. London: IntechOpen, 2021, DOI: 10.5772/intechopen.99189.

SOME FEATURES OF METFORMIN-MEDIATED BREAST CARCINOMA METABOLISM

Butenko E.V.¹, Tursunova Y.D.¹, Dobayeva N.M.², Bakurova E.M.¹

¹ Donetsk State Medical University named after M. Gorky, Ministry of Health of Russia
Ilyich ave., 16, Donetsk, 283003, DPR, Russia; e-mail: 32000023@mail.ru

² Rostov State University Medical University of the Ministry of Health of Russia
Nakhichevsky Lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Received 04.08.2025

Abstract. Our study established the metformin features of adenosine catabolism. An increase in the prooxidant activity of xanthine oxidase, a decrease in the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPO), and an increase in malondialdehyde levels were recorded. This indicates an increase in free radical oxidation processes when taking biguanide, which may contribute to the formation of an aggressive tumor phenotype. According to the criterion of multiple Kruskal–Wallis comparisons (H) and the median test (χ^2), it was found that the activities of ADA and GPO are specific, and their activity is significantly associated with the effects of metformin: $H = 10.1$ ($p = 0.003$), $\chi^2 = 9.55$ ($p = 0.002$). So, the metformin in the complex therapy of breast cancer may contribute to tumor progression.

Key words: breast cancer, metformin, purines, adenosine deaminase, glutathione peroxidase, malonic dialdehyde, xanthine oxides.

МЕХАНИЗМ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗУЧЕНИЯ В ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Казаринов К.Д., Полников И.Г.

ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН

пл. Введенского, д. 1., г. Фрязино Московской области, 141190, РФ, e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.08.2025

Аннотация. Анализируя опыт использования микроволнового излучения в протеомике, следует отметить, что, по мнению специалистов, этот процесс находится пока еще на начальной стадии своего развития. Почти все исследователи, занятые в этом направлении, утверждают, что пока не будут поняты детальные механизмы воздействия микроволнового излучения на процессы катализа, трудно предсказать пути дальнейшего внедрения этого новшества в биохимические и аналитические процессы. Пока с уверенностью можно сказать, что микроволновое излучение увеличивает денатурацию белка и, тем самым, обеспечивает более легкий доступ к сайтам протеолитического расщепления, либо к аминокислотным остаткам для дериватизации. До сих пор кинетика и специфичность инкубации, опосредованной микроволнами, были глубоко изучены только для небольшого числа протеолитических ферментов, химических расщеплений и модификаций белков. Общее мнение ученых и технологов сводится к тому, что микроволновый катализ приводит к улучшенной подготовке образцов для спектрометрического анализа. Редкие ограничения, наблюдаемые в протеомных расщеплениях и реакциях в условиях микроволнового облучения, связаны с осаждением продуктов, вызываемым быстрым повышением температуры или неоптимальным pH среды для растворимости белка. Результаты многочисленных экспериментальных данных, полученных авторами данной работы на протяжении значительного времени, позволяют заключить, что воздействие КВЧ-облучения на биологические и модельные системы в водных средах приводит к конвективному движению жидкости в объектах с соответствующими физико-химическими последствиями, которые в отдельных случаях могут приводить к ускорению биохимических процессов. Этот вывод дает возможность объяснить приведенные в первой части данной статьи факты увеличения скорости и выхода продукта в технологических процессах пробоподготовки материалов для последующего этапа масс спектрометрических измерений и оптимизировать технологический процесс.

Ключевые слова: протеомный анализ, пробоподготовка, механизм действия микроволн.

Начало изучения биологического действия микроволнового излучения КВЧ-диапазона последовало сразу же после появления на рынке широкополосных генераторов миллиметровых волн низкой интенсивности. Первое время основное внимание в этих работах обращалось на взаимодействие миллиметрового излучения с биологически активными соединениями и полярными жидкостями [1]. В дальнейших работах можно было заметить смещение интереса исследователей к хорошо изученным микроорганизмам (кишечная палочка, стафилокок и др.) [2]. При проведении этих работ обращалось внимание на стерилизующий эффект миллиметрового излучения. У анаэробных бактерий было отмечено снижение порообразования. Было выдвинуто предположение, что губительное действие микроволнового излучения связано с проведением экспериментов в условиях обезвоженной среды (посевы культур непосредственно на агаре). Аналогичный результат бактерицидного действия излучения в условиях обезвоженной среды наблюдался при облучении микрофлоры воздуха [3]. Не обошли вниманием исследователи биологического действия микроволнового излучения и такие объекты, как изолированные клетки животных и растений. Большое количество таких работ посвящено изучению клеток дрожжей [4]. Была обнаружена активация скорости размножения клеток при облучении, что объяснялось наличием собственных клеточных колебаний в диапазоне воздействующего излучения $10^{10} \dots 10^{11}$ Гц [5]. Для уточнения представлений о механизмах воздействия излучения на клетки изучалось влияние на клеточные компоненты и, прежде всего, на клеточные мембраны, которые к середине 80-х годов были уже хорошо изучены и являлись классическими моделями для изучения влияния внешних факторов на структуру и физиологию клетки. Уникальное значение клеточных мембран в функционировании клеток (передача нервных импульсов, разделение водного пространства внутри клетки и сохранение устойчивости ее формы, фотопроводимость, регулирование диффузионных ограничений для заряженных и нейтральных частиц, выстраивание химических и энергетических процессов а также участие в запуске апоптотического процесса самоуничтожения клетки) делает их ведущими элементами восприятия электромагнитного излучения. Наши экспериментальные данные, полученные при изучении влияния микроволнового излучения на модельные и нативные мембранные системы, свидетельствуют о повышении проницаемости мембран для ионов важных биохимических веществ, а также стимуляции структурных перестроек в белково-липидном составе мембран с последующим закрыванием каналов ионных утечек [6]. Если говорить о действии микроволнового излучения на сложные организмы, то, прежде всего, следует учитывать глубину проникновения излучения в кожу, не превышающую 0,4 мм. Тепловое повреждение кожи грызунов можно наблюдать уже при интенсивности падающего излучения более 20 мВт/см². Изучение действия мм волн на уровне нейрофизиологических реакций показало, что оно может оказаться

стимулирующим при использовании его в качестве раздражителя при изучении безусловных рефлексов и оказаться тормозящим на выработанные условные рефлексы. Большие надежды возлагались на изучение действия мм волн на эмбриональное развитие организмов, у которых еще не сформировалась защита к внешним природным воздействиям. Следует отметить, что нескольких сеансов облучения было достаточно, чтобы заметить некоторые задержки в развитии, снижении веса эмбрионов, нарушения в ЭКГ. Обнаружено было также мутагенное действие КВЧ-излучения на дрозофилы. Этот результат имеет большое экологическое значение в случае неблагоприятного влияния электромагнитного излучения. С учетом подобных факторов вырабатывались жесткие гигиенические нормы по соблюдению предельных допустимых уровней электромагнитного излучения. Таким образом, можно заключить, что мы имеем дело с глубоко исследованной областью медицинской электромагнитобиологии, хорошо оснащенной методически, технически, и разработанными подходами к различным структурам организации живой материи. В связи с актуальностью проблем повышения производительности изготовления лекарств, наша работа посвящена использованию микроволнового излучения КВЧ-диапазона в этом направлении и, главное, в изучении механизмов эффективности этого использования. К настоящему времени накоплен достаточный экспериментальный и производственный материал применения микроволнового излучения для ускорения процессов протеомных реакций в фармакологии. Однако, в большинстве публикаций на эту тему ученые и технологи сожалеют о недостаточности результатов фундаментальных исследований, объясняющих активацию химических процессов при микроволновом облучении.

Итак, разберем некоторые экспериментальные и производственные результаты. Для начала отметим, что одно из первых упоминаний об участии микроволн в технологических процессах в подготовительных процедурах контроля образцов было дано в публикации [7], посвященной ускорению технологии исследования тучных клеток брюшины крыс по методике микроволновой фиксации [8]. В одной из первых работ, выполненных в нашей стране, [9] была показана возможность использования КВЧ-излучения для ускорения процессов ферментации на основе опыта Московского экспериментального пивоваренного завода. Микроволновое облучение использовалось для ускорения реакций окисления, катализируемого металлами, которые окисляют аминокислоты, связанные с медью в металлопротеине. В сочетании с масс-спектрометрией эти реакции обеспечивают чувствительный метод определения сайтов связывания соединений медь-белок. Обращает на себя внимание исследование [10], в котором было показано, что микроволновое облучение может увеличить скорость сайт-специфических реакций окисления для супероксиддисмутазы Cu/Zn в 15 раз. При этом, была подобрана мощность микроволнового излучения, безопасная для поддержания структурной целостности белка. В работе [11] был разработан, квалифицирован и реализован новый биоаналитический метод количественного определения расщепляемых конъюгированных антител в плазме. Этот новый метод оказался способен значительно повысить производительность процесса за счет сочетания ферментативного расщепления конъюгированных лекарств с помощью микроволнового излучения с процедурой подготовки образцов. Этот метод был успешно использован для измерения уровня конъюгированного лекарственного средства в доклиническом исследовании у мышей. В работе [12] представлена иммобилизация трипсина. Характеристика была проведена с помощью термогравиметрического анализа, инфракрасного Фурье-преобразования и спектров рамановского рассеяния и сканирующей электронной микроскопии. Цитохром *c* (cyt *c*) был выбран в качестве модельного белка для оценки производительности иммобилизации трипсина, и результаты микроволнового облучения были исследованы с использованием масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией для 15-секундного микроволнового расщепления. Результаты, полученные в данной работе, рекомендуются для применения в будущих исследованиях протеомики благодаря высокой эффективности, хорошей воспроизводимости и стабильности процесса. Результат объемной работы, выполненной учеными-пищевиками, может служить ярким примером эффективности использования микроволнового излучения для быстрого исследования белков и пептидов в сложных тканевых матрицах. Целью исследования работы [13] являлось изучение влияния микроволнового облучения на ускорение ферментативного расщепления и ферментативного переваривания денатурированных белков в приготовленном мясе. Все белковые агрегаты были полностью гидролизваны после 1 часа обработки трипсином с коротким временем воздействия 40 и 20 с микроволнового облучения. Было обнаружено шесть уникальных пептидных маркеров, которые позволили однозначно идентифицировать обработанное мясо, полученное из исследуемых видов. Хотя микроволновое триптическое пищеварение может служить инструментом для быстрой и высокопроизводительной идентификации белка, при количественном определении белка рекомендуется большая осторожность и предварительная оценка отдельных образцов. Результаты, полученные в исследовании, показывают, что микроволновый нагрев на данном этапе разработки технологии имеет потенциал для внедрения в быстрый высокопроизводительный скрининг переработанных белков только для качественных целей. Авторы следующей работы [14] сравнили высокопроизводительный метод гидролиза белка микроволновым методом с традиционным. Бычий сывороточный альбумин гидролизывали в HCl, содержащей фенол, в микроволновой печи при 175 °C в течение 10 мин, а также в конкурирующем эксперименте путем инкубации при 110 °C в течение 24 часов. Белковые гидролизаты контролировали с помощью анализатора аминокислот Hitachi L-8800. Результаты сравнения показали, что извлечения для разделенных аминокислот, полученные после гидролиза с помощью микроволнового излучения и при использовании обычного метода, выглядят идентичными. Было отмечено, что микроволновое излучение оправдывает свое участие в гидролизе белка, сокращая время производственного процесса почти на два порядка.

Подводя итоги вышеприведенным примерам использования микроволнового излучения в протеомике, следует отметить, что, по мнению специалистов, этот процесс находится пока еще на начальной стадии своего развития. Почти все исследователи, занятые в этом направлении, утверждают, что пока не будут лучше поняты детальные механизмы воздействия микроволнового излучения на процессы катализа, трудно предсказать пути дальнейшего внедрения этого новшества в биохимические и аналитические процессы. Пока с уверенностью можно сказать, что микроволновое излучение увеличивает денатурацию белка и, тем самым, обеспечивает более легкий доступ к сайтам протеолитического расщепления, либо к аминокислотным остаткам для дериватизации. До сих пор кинетика и специфичность инкубации, опосредованной микроволнами, были глубоко изучены только для небольшого числа протеолитических ферментов, химических расщеплений и модификаций белков. Общее мнение ученых и технологов сводится к тому, что микроволновый катализ приводит к улучшенной подготовке образцов для спектрометрического анализа. Редкие ограничения, наблюдаемые в протеомных расщеплениях и реакциях при микроволновом облучении, связаны с осаждением продуктов, вызываемым быстрым повышением температуры или неоптимальным pH среды для растворимости белка.

Изучая механизм действия микроволнового излучения на биохимические объекты в водных средах, специалисты оценивают, прежде всего, электродинамические свойства воды в конкретном диапазоне частот излучения. Известно, что вода интенсивно поглощает микроволновое излучение КВЧ-диапазона (в котором проводились наши исследования), приблизительно 20-30 дБ/мм. Теоретическое обоснование интенсивного поглощения КВЧ-излучения в водных средах определяется процессом ориентационной поляризации ее молекул. Электрическое поле стремится повернуть молекулы воды таким образом, чтобы их дипольные моменты ориентировались по направлению приложенного поля. Этому действию препятствует тепловое движение и воздействие соседних молекул. В результате появляется сдвиг фазы поляризации среды относительно направления вектора действующего поля. Это явление в основном и определяет диэлектрические потери в воде. Плохая растворимость неполярных веществ в воде связана с уменьшением энтропии, т.к. имеет место вытеснение неструктурированной воды из полости внутри тетраэдрических ячеек водных кластеров. Вытесненная вода образует новые кластеры и упорядоченность системы увеличивается, а, следовательно, энтропия уменьшается. Это явление имеет принципиальное значение при образовании мембран из амфифильных молекул липидов. Если липиды находятся в воде, их молекулы объединяются друг с другом в микроскопические капельки-мицеллы, у которых полярные головки обращены наружу, а неполярные хвосты упрятаны внутрь. Если же концентрация липидов в воде высока, то мицеллы слипаются, образуя бимолекулярный слой – основу биологических мембран.

Нагревание поверхностного слоя облучаемого объекта является очевидным фактом, сопровождающим биологическое действие микроволнового излучения. В нашей работе [15] решение уравнения теплопроводности для уровня интенсивности микроволнового излучения 10 мВт/см^2 предлагает градиент температуры $0,15 \text{ }^\circ\text{C/см}$ и такие градиенты уже являются существенными для задач межфазной устойчивости. Оценка скорости конвекции была установлена в наших расчетах в пределах 1 мкм/с , что соответствовало нашим экспериментальным результатам. В дальнейших исследованиях мы использовали экспериментальные методы изучения гидродинамических явлений, вызванных поглощением микроволнового излучения в воде [6]. Одним из таких популярных методов исследования является изучение транспортных процессов переноса ионов натрия через препарат изолированной кожи лягушки, разделяющий два водных физиологических раствора в камере Усинга. Скорость переноса натрия увеличивалась под действием КВЧ-излучения, и причина заключалась, прежде всего, в увеличении скорости пассивной диффузии ионов натрия в клетки. Такая возможность была подтверждена в изучении транспортных процессов в моделях искусственных бимолекулярных липидных мембран (БЛМ) [16]. Действие КВЧ-облучения на БЛМ было обнаружено только на модифицированных мембранах, введением селективных индукторов ионного транспорта, и наблюдалось только в случае потока ионов через мембрану. Была установлена решающая роль уменьшения толщины перемешиваемых примембранных водных слоев при КВЧ-облучении как в случае препарата кожи лягушки, так и при использовании в наших экспериментах БЛМ. Температурные градиенты, возникающие в водных перемешиваемых примембранных слоях, вызывают перемешивание в этих пограничных образованиях, снижая их толщину, что увеличивает общую проницаемость мембраны. Для подтверждения идеи микроконвекции в воде в условиях КВЧ-облучения, мы провели эксперименты с платиновым электродом для полярографического измерения концентрации кислорода. Здесь принималось во внимание, что уровень полярографического тока зависит от скорости поступления молекул кислорода к поверхности платинового электрода. Было установлено, что при КВЧ облучении, наблюдается увеличение тока через измерительную полярографическую ячейку. Экспериментальный результат обусловлен возмущением водных слоев, что приводило к перемешиванию и обогащению кислородом приэлектродного слоя водного раствора. Открытое нами явление, оказалось фундаментальным механизмом биологической чувствительности микроволнового излучения КВЧ диапазона, а его биологическое значение было подтверждено результатами дальнейших экспериментов по изучению конвекции в цитозоле с нативными клетками [17].

Работа выполнена в рамках государственного задания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН.

Список литературы / References:

1. Девятков Н.Д., Зусмановский А.С., Цейтлин А.М. Применение СВЧ электронных приборов и квантовых генераторов в народном хозяйстве. Электронная техника. Сер. 1. *Электроника СВЧ*, 1967, № 2, с. 3-13 [Devyatkov N.D., Zusmanovsky A.S., Zeitlin A.M. Application of microwave electronic devices and quantum generators in the national economy. Electronic engineering. Ser. 1. *Microwave electronics*, 1967, no. 2, pp. 3-13 (In Russ.)].
2. Кондратьева В.Ф., Чистякова Е.Н., Иванова Н.Б., Казанская А.Д. Влияние радиоволн на микроорганизмы. Труды Ленинградского химико-фармацевтического института. *Ферменты в экспериментальной и клинической онкологии и радиобиологии*, 1967, вып. 20, ч. 1, с. 83-87 [Kondratieva V.F., Chistyakova E.N., Ivanova N.B., Kazanskaya A.D. Effect of radio waves on microorganisms. Proceedings of the Leningrad Chemical-Pharmaceutical Institute. *Enzymes in experimental and clinical oncology and radiobiology*, 1967, iss. 20, part 1, pp. 83-87 (In Russ.)].
3. Адаменко В.Г., Виленская Р.Г., Голант М.Б., Кирюшина И.Н., Сычева Н.А., Шустрова А.Я. Влияние миллиметровых волн на микрофлору воздуха помещений. Электронная техника. Сер. 1. *Электроника СВЧ*, 1966, № 12, с. 132-136 [Adamenko V.G., Vilenskaya R.G., Golant M.B., Kiryushina I.N., Sycheva N.A., Shustrova A.Ya. Influence of millimeter waves on the microflora of indoor air. Electronic engineering. Ser. 1. *Microwave electronics*, 1966, no. 12, pp. 132-136 (In Russ.)].
4. Grundler W. Biological effects and dosimetry of nonionizing radiation radiofrequency and microwave energies. Eds. Grandolfo M., Michaelson S.M., Rindi A. *Plenum Press*. 1983, pp. 299-318.
5. Grundler W. Keilmann F., Putterlic V. et al. Coherent Excitation in Biological Systems. Eds. Frohlich H., Kremer F. *Springer*, 1983, pp. 21-37.
6. Казаринов К.Д. Исследование мембранотропной активности ЭМИ в широком диапазоне длин волн. Электронная техника. Сер. 1. *СВЧ – техника*, 2018, вып. 2, № 537, с. 62-75 [Kazarinov K.D. Study of the membrane-tropic activity of EMI in a wide range of wavelengths. Electronic engineering. Ser. 1. *Microwave engineering*, 2018, iss. 2, no. 537, pp. 62-75 (In Russ.)].
7. Login G.R., Galli S.J., Morgan E., Arizono N., Schwartz L.B. Rapid microwave fixation of rat mast cells. Localization of granule chymase with an ultrastructural postembedding immunogold technique. *Laboratory Investigation*, 1987, vol. 57, no. 5, pp. 592-599.
8. Login G.R., Dvorak A.M. Microwave energy fixation for electronic microscopy. *Am. J. Pathol.*, 1985, vol. 120, p. 230.
9. Кузнецов Д.Б. Перспективы применения электромагнитных излучений крайне высокой частоты малой мощности в фармации. *Фундаментальные исследования*, 2012, № 2-2, с. 400-404 [Kuznetsov D.B. Prospects for the use of electromagnetic radiation of extremely high frequency and low power in pharmacy. *Fundamental research*, 2012, no. 2-2, pp. 400-404 (In Russ.)].
10. Bridgewater J.D., Vachet R.W. Using Microwave-Assisted Metal-Catalyzed Oxidation Reactions and Mass Spectrometry to Increase the Rate at Which the Copper-Binding Sites of a Protein Are Determined. *Analytical Chemistry*, 2005, vol. 77, p. 14.
11. Ling Xu, Laura E. Packer, Mark G. Qian, Jing-Tao Wu. Rapid quantification of a cleavable antibody-conjugated drug by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with microwave-assisted enzymatic cleavage. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, vol. 128, pp. 226-235.
12. Atacan K., Kursunlu A.N., Ozmen M. Preparation of pillar arene immobilized trypsin and its application in microwave-assisted digestion of Cytochrome c. *Materials science and engineering*, 2019, vol. 94, pp. 886-893.
13. Montowska M., Pospiech E. Rapid Meat Protein and Peptide Identification. *Food Technol. Biotechnol.*, 2016, vol. 54, no. 4, pp. 482-488.
14. Higbee A., Wong S., Henzel W.J. Automated sample preparation using vapor-phase hydrolysis for amino acid analysis. *Analytical Biochemistry*, 2003, vol. 318, no. 1, pp. 155-158.
15. Титов А.С., Полников И.Г., Титов С.В., Казаринов К.Д. Изучение физической модели биологического действия микроволнового излучения КВЧ диапазона на клеточном уровне организации биообъекта. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2024, т. 9, № 3, с. 264-270 [Titov A.S., Polnikov I.G., Titov S.V., Kazarinov K.D. Study of the physical model of the biological action of microwave radiation of the UHF range at the cellular level of organization of a biological object. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2024, vol. 9, no. 3, pp. 264-270 (In Russ.)].
16. Kazarinov K.D., Putvinsky A.V., Malinin V.S. Interface Convection in Water as a Primary Mechanism of Extra High Frequency Irradiation. *Electricity and magnetism in Biology and Medicine. Plenum publishing corporation*, 1999, pp. 441-444.
17. Howard R., Scheiner A., Cunningham J., Gatenby R. Cytoplasmic convection currents and intracellular temperature gradients. *PLoS Comput Biol.*, 2019, vol. 15, no. 11.

MECHANISM OF EFFECTIVE USE OF MICROWAVE STUDY IN PHARMACOLOGICAL PRODUCTION

Kazarinov K.D., Polnikov I.G.

Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Fryasino branch

Vvedensky sq., 1, Fryazino, Moscow region, 141190, Russia; e-mail: kazarinovkonstantin@yandex.ru

Received 06.08.2025

Abstract. The experience of using microwaves in proteomics is analyzed. It is obvious that the process is still in its infancy. A more thorough study of the mechanisms of microwave radiation action on catalytic processes is required. Only after that it will be possible to predict the ways of further implementation of this innovation in biochemical and analytical processes. So far, it can be said with confidence that microwave radiation increases protein denaturation and, thus, provides easier access to proteolytic cleavage sites or to amino acid residues for derivatization. Until now, the kinetics and specificity of microwave-mediated incubation have been deeply studied only for a small number of proteolytic enzymes, chemical cleavages and protein modifications. Researchers believe that microwave catalysis leads to improved sample preparation for spectrometric analysis. Rare limitations observed in proteomic cleavages and reactions under microwave irradiation are associated with precipitation of products caused by a rapid increase in temperature or non-optimal pH of the medium for protein solubility. The results of numerous experimental data obtained by the authors of this work over a considerable period of time allow us to conclude that the effect of UHF radiation on biological and model systems in aqueous media leads to convective movement of liquid. This effect can lead in some cases to acceleration of biochemical processes. This conclusion makes it possible to explain the facts of the increase in the speed and yield of the product in the technological processes of sample preparation of materials for the subsequent stage of mass spectrometric measurements, presented in the first part of this article, and to optimize the technological process.

Key words: proteomic analysis, sample preparation, mechanism of action of microwaves.

РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ АЗОЛОТРИАЗИНОВ И ОЦЕНКА ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Черных Ю.А., Плешкова М.Н., Вандышев Д.Ю., Антипов С.С., Леденёва И.В.

Воронежский государственный университет

Университетская площадь, 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: che.julia1520@mail.ru

Поступила в редакцию 07.08.2025

Аннотация. В работе представлены результаты разработки новых флуоресцентных красителей на основе азолотриазинов. Описаны методы синтеза производных азолотриазинов с различными заместителями, которые оказывают влияние на их люминесцентные свойства. С помощью методов ЯМР и ВЭЖХ/МС подтверждены структуры полученных соединений. Зарегистрированы спектры поглощения флуоресцентных красителей. Показано, что исследуемые красители обладают характерными максимумами поглощения в УФ и видимой областях спектра. Также были зарегистрированы спектры люминесценции флуоресцентных красителей. Установлено, что при возбуждении флуоресценции в ближней УФ-области все красители формировали максимум при 327 нм, что соответствует излучательным переходам с основного возбужденного состояния. Помимо этого, для большинства соединений зарегистрированы дополнительные максимумы испускания в видимой области. Полученные данные свидетельствуют о возможности широкого применения синтезированных красителей в биофизических, биохимических и биотехнологических исследованиях. Результаты работы открывают перспективы для разработки функциональных материалов и тест-систем с использованием азолотриазиновых красителей, а также указывают на возможность их применения для мониторинга биологических процессов.

Ключевые слова: флуоресцентные красители, азолотриазины, синтез, ЯМР, ВЭЖХ/МС.

Флуоресцентные зонды (ФЗ) – это обширный класс органических соединений, нашедший широкое применение в различных областях биологии и биомедицины. Основным вектором их практического применения является решение ряда специфических задач, а также исследование не флуоресцирующих или слабо флуоресцирующих веществ [1].

Значимым преимуществом флуорофоров (как синтетической, так и естественной природы) является их способность изменять свои параметры люминесценции при взаимодействии с биосубстратами, что позволяет оценивать конформационное состояние белков, физическое состояние мембранных липидов, процессы передачи энергии между молекулами. Помимо этого, флуоресцентные красители позволяют исследовать молекулярные механизмы возникновения и развития патологических процессов, а также выявление механизмов действия биологически активных соединений как эндогенного, так и экзогенного происхождения или непосредственно действующих на мембраны клеток, или проникающие через мембраны для того, чтобы достичь своих «мишеней» внутри клеток. Хотя такие зонды широко используются в биофизических и биохимических исследованиях, их применение в практической медицине весьма ограничено в связи с низкой селективностью и высокой токсичностью некоторых из них. Поэтому создание и изучение красителей, выявление общих закономерностей их взаимодействия с биомолекулами является как фундаментальной, так и перспективной задачей для развития доклинической диагностики.

Красители на основе азолотриазинов представляют собой перспективный класс флуорофоров благодаря их уникальным фотофизическим и химическим свойствам, которые могут быть целенаправленно модифицированы в рамках решения различных задач [4,5]. Ключевыми преимуществами таких флуоресцентных зондов являются их высокая фотостабильность, широкая вариабельность спектральных характеристик, высокая селективность и биосовместимость. В связи с этим, азолотриазиновые красители обладают значительным потенциалом, являясь основой для создания флуоресцентных зондов с улучшенными характеристиками [6,7].

Экспериментальная часть. Получение азо[1,2,4]триазиновых систем и их дальнейшая модификация основана на методике, описанной в работе [2] и заключается в следующем:

Этап 1. Смесь соответствующего диаминоазола (1,2-диамино-4-арилимидазола, 1,2-диамино-4,5-дифенилимидазола или 1,5-диамино-3-фенилтриазола) и этилового эфира 2,3-диоксубутановой кислоты перемешивают в абсолютном этаноле при комнатной температуре в течение 2 ч. Целевые продукты выделяют методом колоночной хроматографии или перекристаллизацией.

Этап 2 (получение красителей ФЗ-9, ФЗ-11, ФЗ-12 и ФЗ-13). Соответствующий этиловый эфир азо[1,2,4]триазинкарбоновой кислоты кипятят с диметилацетатом диметилформамида в минимальном количестве ДМФА до образования промежуточного (Е)-этил 3-(2-(диметиламино)винил)азо[1,2,4]триазинкарбоксилата. К полученной реакционной смеси без выделения промежуточного продукта добавляют соответствующую аминокислоту и ледяную уксусную кислоту, после чего реакционную массу кипятят до завершения реакции (ТСХ-контроль). Целевые азо[1,2-*b*]пиридо[4,3-*e*][1,2,4]триазин-6(7*H*)-оны выделяют фильтрованием после охлаждения реакционной смеси.

Этап 3 (получение красителей ФЗ-3, ФЗ-6, ФЗ-7, ФЗ-8, ФЗ-10). Бромирование этиловых эфиров азо[1,2,4]триазинкарбоновых кислот осуществляют с использованием N-бромсукцинимидом или брома в

уксусной кислоте. Для получения соответствующих карбоновых кислот этиловые эфиры подвергают щелочному гидролизу с последующим подкислением реакционной массы соляной кислотой до pH 2-3. Целевые продукты выделяют фильтрованием и очищают перекристаллизацией из подходящего растворителя.

Аналогичным способом, заменяя этиловый эфир 2,3-диоксобутановой кислоты на 2,3,4-пентантрион, были выделены красители Ф3-2 и Ф3-4, а также бромпроизводное Ф3-5.

Аннелирование *as*-триазинового цикла к пиразольному фрагменту осуществляли путем взаимодействия солей пиразол-3(5)-диазония с линейными СН-кислотами по ранее описанной методике [4] (таким образом были получены красители Ф3-14 и Ф3-15). К охлажденному раствору 1*H*-изохромен-1,3(4*H*)-диона (гомофталевого ангидрида) в насыщенном растворе ацетата натрия при перемешивании добавляют свежеприготовленную соль пиразол-3(5)-диазония. Реакционную смесь выдерживают при заданных условиях до завершения процесса азосочетания (контроль методом ТСХ). Циклизация в целевые 2-(4-гидроксипиразоло[5,1-с][1,2,4]триазин-3-ил)бензойные кислоты проходила при нагревании промежуточных соединений в уксусной кислоте.

ЯМР ^1H и ^{13}C спектры были зарегистрированы на спектрометре BrukerDRX-500 (частота облучения 500,13 и 125,76 МГц соответственно) в DMSO- d_6 с внутренним стандартом TMS. Контроль реакции и чистоту синтезированных соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F254 («Merck») с использованием хлороформа, метанола или их смесей в качестве элюента.

ВЭЖХ/МС анализ проводился на приборе Agilent Technologies 1260 infinity с масс-детектором Agilent 6230 TOF LC/MS (времяпролетный детектор масс высокого разрешения), метод ионизации – двойное электрораспыление (dual-ESI). Запись и регистрация сигналов проводилась в положительной полярности; небулайзер (N₂) 20 psig, газ-осушитель (N₂) 6 мл/мин, 325 °С; диапазон обнаружения масс составляет 50-2000 Дальтон. Напряжение на капилляре 4.0 кВ, фрагментаторе +191 В, скиммере +66 В, OctRF 750 В. Условия фракционирования: хроматографическая колонка Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 50 мм; 2.7 мкм). Градиентное элюирование: ацетонитрил/вода (0.1 % муравьиной кислоты); скорость потока 0.4 мл/мин. Температуры плавления определены на аппарате Stuart SMP30.

Оценка спектральных характеристик проводилась с использованием спектрофотометра Shimadzu SF-2401. Спектр был снят в диапазоне длин волн от 190 до 900 нм, при температуре 20° С в объеме 2 мл.

Оценка флуоресцентных характеристик образцов проводилась на спектрофлуориметре Shimadzu RF – 1501. Спектр был снят в диапазоне длин волн от 300 до 550 нм, при температуре 20° С в объеме 2 мл.

Шифр	Структура	Шифр	Структура
Ф3-2		Ф3-9	
Ф3-3		Ф3-10	
Ф3-4		Ф3-11	
Ф3-5		Ф3-12	
Ф3-6		Ф3-13	
Ф3-7		Ф3-14	
Ф3-8		Ф3-15	

Рисунок 1. Структурные формулы синтезированных флуоресцентных красителей на основе азолотриазин, подтвержденные с использованием ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ-МС

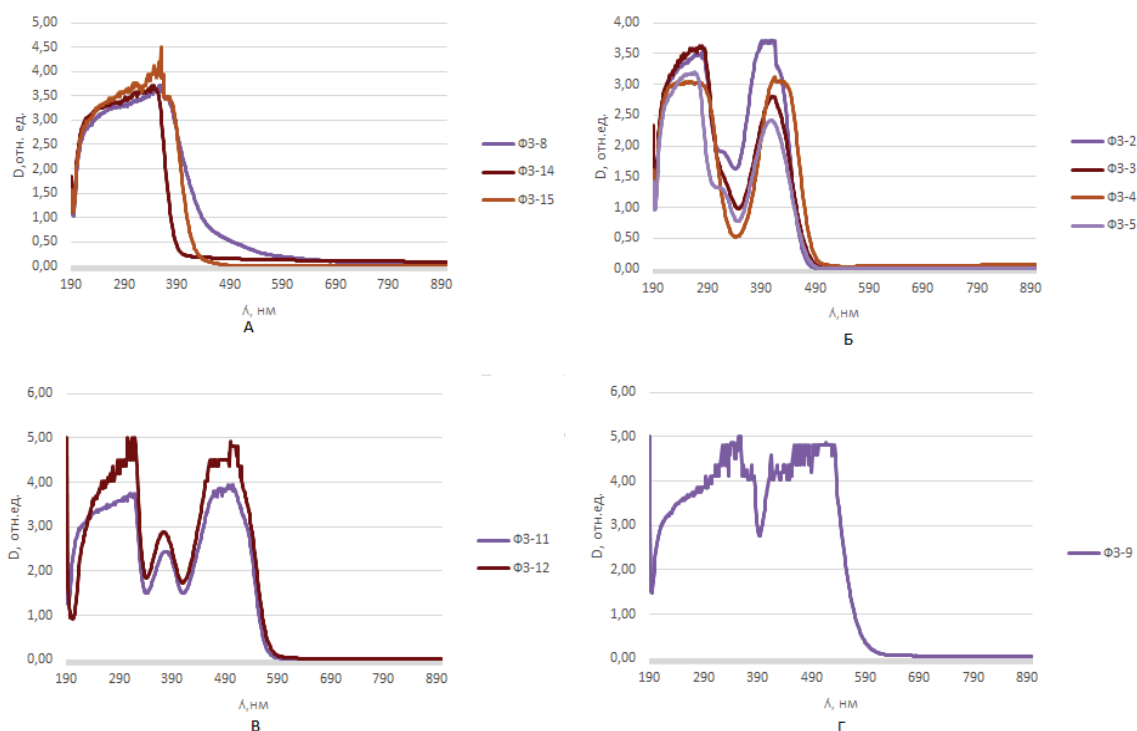


Рисунок 2. Спектры поглощения флуоресцентных зондов: А) спектры поглощения ФЗ-8, ФЗ-14 и ФЗ-15; Б) спектры поглощения ФЗ-2, ФЗ-3, ФЗ-4, ФЗ-5; В) спектры поглощения ФЗ-11 и ФЗ-12; Г) спектр поглощения ФЗ-9

Все исследования были выполнены не менее чем в трех повторах. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ MS Excel и MassHunter Workstation / Data Acquisition V.06.00. Достоверными считали значения, отличающиеся на величину, более чем 3 стандартных отклонения.

Результаты и их обсуждение. Посредством органического синтеза нами были получены структуры, представленные на рисунке 1. Структуры полученных соединений подтверждены с использованием ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии, а также ВЭЖХ-МС.

На следующем этапе, для оценки спектральных свойств флуоресцентных зондов нами были зарегистрированы спектры поглощения и люминесценции (представлены на рис. 2 и 3).

Полученные данные свидетельствуют о наличии характерных максимумов поглощения в УФ и видимой

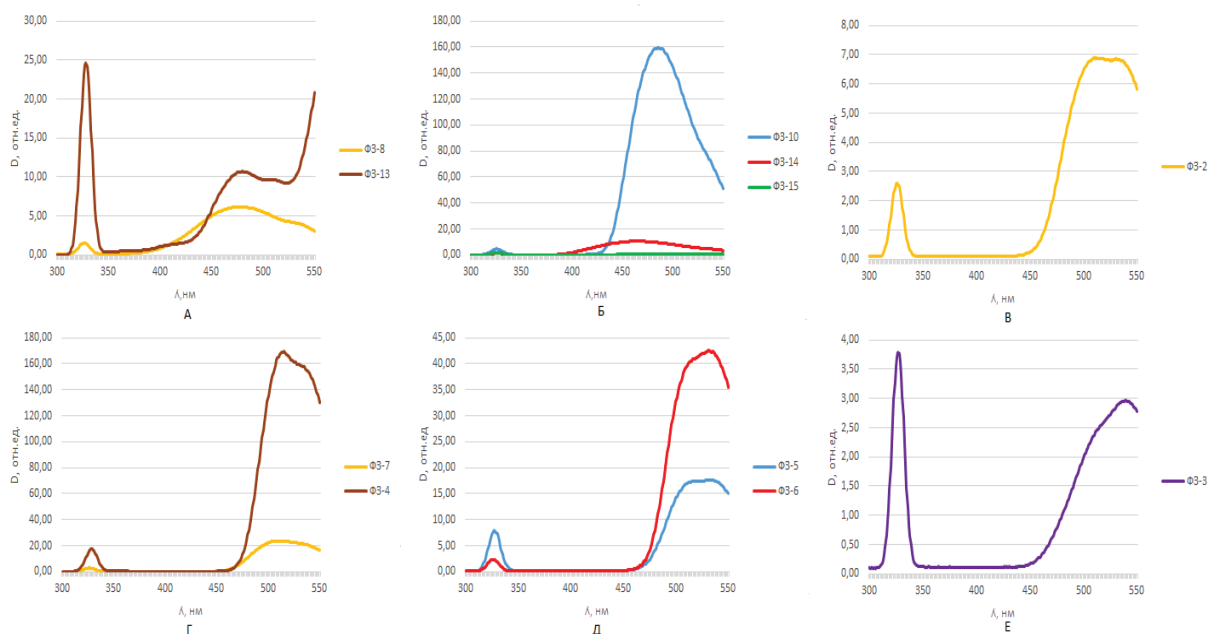


Рисунок 3. Спектры люминесценции флуоресцентных зондов: А) спектры испускания ФЗ-8 и ФЗ-13; Б) спектры испускания ФЗ-10, ФЗ-14, ФЗ-15; В) спектр испускания ФЗ-2; Г) спектры испускания ФЗ-4 и ФЗ-7; Д) спектры испускания ФЗ-5 и ФЗ-6; Е) спектр испускания ФЗ-3

областях спектра. Для красителей красители ФЗ-8, ФЗ-14, ФЗ-15 максимумы располагаются при 250 нм, 320 нм и 350 нм, что указывает на $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы в ароматических системах. Зонды ФЗ-2, ФЗ-3, ФЗ-4, ФЗ-5 поглощают в области 260 нм и 410 нм, что свидетельствует о наличии протяженных π -сопряженных структур. Структуры с номерами ФЗ-11 и ФЗ-12 имеют максимумы при 310 нм, 370 нм, 470 нм и 500 нм, что может быть связано с внутримолекулярным переносом заряда (ICT). Краситель ФЗ-9 проявляет максимумы при 350 нм, 460 нм и 510 нм, что подтверждает его потенциал для применения в длинноволновой флуоресценции. Структуры, указанные под номерами ФЗ-6, ФЗ-7, ФЗ-10, ФЗ-13 также демонстрируют сложные спектры поглощения с максимумами в диапазоне 240–530 нм, что отражает влияние заместителей на электронную структуру молекул.

В продолжении исследований, нами были зарегистрированы спектры люминесценции всех полученных красителей. При возбуждении в ближней УФ-области все красители формировали максимум флуоресценции при 327 нм, что соответствует излучательным переходам с основного возбужденного состояния. Однако для большинства соединений зарегистрированы дополнительные максимумы испускания в видимой области: для красителей ФЗ-8 и ФЗ-13 – 480 нм; ФЗ-10, ФЗ-14, ФЗ-15 – 490 нм; ФЗ-2 – 510 нм; ФЗ-4 и ФЗ-7 – 515 нм; ФЗ-5 и ФЗ-6 – 530 нм; ФЗ-3 – 537 нм.

Наблюдаемый стоксов сдвиг может свидетельствовать о наличии релаксационных процессов в возбужденном состоянии, а различия в спектрах испускания могут быть обусловлены структурными особенностями молекул, такими как природа заместителей и степень сопряжения π -системы. Полученные данные свидетельствуют о широких возможностях тонкой настройки оптических свойств азолотриазиновых красителей за счет модификации их структуры и позволяют прогнозировать применение данных соединений в флуоресцентной микроскопии и спектроскопии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-16-00191, <https://rscf.ru/project/25-16-00191/>.

Список литературы / References:

1. Зайтов Р.И., Дохтукаева А.М. Синтез и применение флуоресцентных органических красителей для биологических исследований. *Вода: Химия и экология*, 2024, № 6, с. 67-73 [Zaitov R.I., Dokhtukaeva A.M. Synthesis and application of fluorescent organic dyes for biological research. *Water: Chemistry and Ecology*, 2024, no. 6, pp. 67-73 (In Russ.)].
2. Vandyshev D.Yu., Shikhaliev K.S., Prezent M.A., Kozaderov O.A., Ovchinnikov O.V., Smirnov M.S., Ilyinova T.N., Mangusheva D.A., Iminova R.R. Chetti. Analysis of the spectral-luminescence properties of imidazo[1,2-b]pyrido[4,3-e][1,2,4]triazin-6(7H)-ones. *Luminescence*, 2022, vol. 37, no. 10, pp. 1689-1700, doi: 10.1002/bio.4344.
3. Ledenyova I.V., Gracheva A.A., Shikhaliev K.S. Reactions of pyrazole-3(5)-diazonium salts with 4-hydroxy-2H-chromen-2-one and isochroman-1,3-dione. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2015, vol. 51, no. 8, pp. 734-737, doi: 10.1007/s10593-015-1766-6.
4. Rusinov V.L., Sapozhnikova I.M., Bliznik A.M., Oleg N., Chupakhin O.N., Charushin V. N. Synthesis and Evaluation of Novel [1,2,4]Triazolo[5,1-c][1,2,4]-triazines and Pyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazines as Potential Antidiabetic Agents. *Archiv der Pharmazie*, 2017, vol. 350, no. 5, pp. 1-15, doi: 10.1002/ardp.201600361.
5. Parkhamovich V.D., Fedotov V.V., Drokin R.A., Rusinov V.L., Ibragimova U.M., Valuisky N.V., Shushakova A.I., Litvinov R.A., Spasov A.A. Synthesis of 3-ethoxycarbonyl-4-hydroxy-1,4-dihydroazolo[5,1-c][1,2,4]triazines and study of antiglycation activity. *Chimica Techno Acta*, 2025, vol. 12, no. 2, doi: 10.15826/chimtech.2025.12.2.15.
6. Halim A.N.A., Ngaini Z. Review on the synthesis of thiourea-triazine hybrid derivatives and its applications primarily in biological context. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2025, vol. 200, no. 2, pp. 109-132, doi: 10.1080/10426507.2025.2457458.
7. Seyfi S., Salarinejad S., Moghimi S. et al. Synthesis, biological activities, and molecular docking studies of triazolo[4,3-b]triazine derivatives as a novel class of α -glucosidase and α -amylase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 2024, vol. 357, no. 7, doi: 10.1002/ardp.202300628.

DEVELOPMENT OF AZOLOTRIASINE-BASED FLUORESCENT DYES AND ASSESSMENT OF THEIR PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS**Chernykh Yu.A., Pleshkova M.N., Vandyshev D.Yu. Antipov S.S., Ledeneva I.V.**

Voronezh State University

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: che.julia1520@mail.ru

Received 07.08.2025

Abstract. The article presents the results of the development of new fluorescent dyes based on azolotriazines. The methods of synthesis of azolotriazine derivatives with various substituents that affect their luminescent properties are described. The structures of the obtained compounds were confirmed using NMR and HPLC/MS methods. The absorption spectra of the fluorescent dyes were recorded. It was shown that the studied dyes have characteristic absorption maxima in the UV and visible regions. The luminescence spectra of the fluorescent dyes were also recorded. It was found that when the fluorescence was excited in the near-UV region, all the dyes exhibited a maximum at 327 nm, which corresponds to the emission transitions from the ground state. Additionally, most of the compounds showed additional emission maxima in the visible region. These findings demonstrate the potential for the widespread use of the synthesized dyes in biophysical, biochemical, and biotechnological research. The results of the work open up prospects for the development of functional materials and test systems using azolotriazine dyes, and also indicate the possibility of their application for monitoring biological processes.

Key words: *fluorescent dyes, azolotriazines, synthesis, NMR, HPLC/MS.*

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОТЕСТЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Кратасюк В.А.^{1,2}, Есимбекова Е.Н.¹, Оюн А.М.¹, Колосова Е.М.², Чуяшенко Д.Е.¹,
Мучкина Е.Я.¹, Сутормин О.С.^{1,2}

¹ Сибирский федеральный университет
пр. Свободный, д. 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: valkrat@mail.ru

² Сургутский государственный университет
пр. Ленина, д. 1, г. Сургут, 628412, РФ
Поступила в редакцию 01.08.2025

Аннотация. Рассматриваются перспективы использования биолюминесцентных ферментативных биотестов для экспрессного экологического мониторинга водных экосистем, а также почвы и воздушной среды. Ферментативные биотесты позволяют обнаружить неизвестные токсичные соединения в окружающей среде, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов. Анализ состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на интенсивность свечения биферментной системы: NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза. Тест методически прост: в измерительной кювете смешивают ферменты и их субстраты и регистрируют на биолюминометре контрольную интенсивность свечения. Далее процедура повторяется в присутствии анализируемой пробы. Токсичность смеси определяют по изменению величины интенсивности биолюминесценции в присутствии пробы по сравнению с контролем. Биотесты были успешно использованы для анализа воды реки Енисей и её притоков, питьевой воды различных районов Красноярск и Алтайского края и других водных объектов. Получены данные, убедительно демонстрирующие возможности применения биолюминесцентных ферментных тестов для анализа токсичности не только воды, но и воздуха, снега и почвы при оценке загрязнения городских и сельскохозяйственных территорий. А также лесных экосистем. Для разработки новой методологии комплексного ферментативного биотеста, направленного на оценку токсикологических параметров при загрязнении почв нефтепродуктами, ключевым методологическим подходом является подбор оптимальных экстрагирующих веществ. Проведен сравнительный анализ органических растворителей (ДМСО, ацетон и др.) и показаны преимущества использования ДМСО для исследования воздействия нефтяного загрязнения на почвенную среду.

Ключевые слова: биолюминесценция, интенсивность свечения, ферментативные биотесты, экологический мониторинг, люцифераза, светящиеся бактерии.

Самым быстрым среди классических биотестов с использованием живых объектов (парameций, водорослей, дафний и т.п.), считается биотест на светящихся бактериях, который осуществляется в течение 30 минут. Однако, биотесты на светящихся бактериях имеют те же недостатки, что и классические биотесты с использованием живых объектов. Необходимость поддержания стабильной бактериальной культуры во время измерений и при хранении приводят к низкой точности измерения. При этом реакция бактерий на токсичные вещества неоднозначна и выражается как в уменьшении, так и в увеличении интенсивности светоизлучения, что часто затрудняет интерпретацию результатов. Для решения этих проблем разработаны ферментативные биотесты для экологического мониторинга. Методы ферментативного биотестирования позволяют решить проблему обнаружения комплексного загрязнения, в том числе химических соединений неизвестного состава в окружающей среде, и могут быть использованы для мониторинга водных экосистем, почвы и воздушной среды. Ферментативные биотесты дают интегральную оценку качества или загрязнения анализируемой среды и, также как классические биотесты, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов, но в качестве тест-объекта используют ферментативные реакции, отвечающие за эти функции, такие как светоизлучение, которое регистрируется с помощью оптических приборов – люминометров.

Предлагаемая технология состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции светящихся бактерий. В качестве тест-объектов выступают реакции, катализируемые биферментной системой НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Red + Luc).

Базовый метод биолюминесцентного ферментативного тестирования методически прост: в измерительной кювете смешивают ферменты и их субстраты и регистрируют на биолюминометре контрольную интенсивность свечения. Далее процедура повторяется в присутствии анализируемой пробы. Токсичность смеси определяют по изменению величины интенсивности биолюминесценции в присутствии пробы по сравнению с контролем. Количественная оценка степени влияния тестируемого образца на интенсивность свечения выражается в виде безразмерной величины – «индекса токсичности» (ИТ), определяемого по формуле:

$$\text{ИТ} = \left(\frac{I_k - I_0}{I_k} \right) * 100 \%, \quad (1)$$

где I_k – максимальная интенсивность свечения в контрольной пробе; I_o – максимальная интенсивность свечения в присутствии анализируемой пробы.

Критерием токсичности пробы является снижение на 20 % и более максимальной интенсивности свечения биферментной системы Red + Luc при добавлении анализируемого образца по сравнению с интенсивностью свечения в контрольной пробе. Проба считается нетоксичной, если значения интенсивности свечения реагента в анализируемой и контрольной пробах отличаются менее, чем на 20%. Если указанный показатель находится в диапазоне от 21 до 50% – проба считается умеренно токсичной, при значении показателя выше 50% – сильно токсичной. В последнем случае даются рекомендации для проведения дополнительных исследований для выявления причины загрязнения, например, с помощью более дорогих и длительных методов химического анализа, при этом источник загрязнения при необходимости можно перекрыть или ограничить к нему доступ до получения результатов развёрнутого анализа.

Используется также и обратная величина – остаточное свечение Т% показывающее отклонение сигнала исследуемого образца от контрольного (формула 2). В таком случае, чем меньше значение Т, тем больше разница между контролем и исследуемым образцом, и, следовательно, больший ингибирующий эффект оказывает проба (и растворенные в ней вещества) на протекание ферментативной реакции.

$$T = \frac{I_k}{I_o} * 100\% \quad (2)$$

Основными условиями для применения биOLUMИнесцентной тест-системы являются: наличие прибора (люминометр или флуориметр) и реактивов (препаратов ферментов и субстратов) для проведения измерений; чувствительность биOLUMИнесцентных реакций к компонентам анализируемого образца, достаточная для установления соответствия между степенью изменения параметров биOLUMИнесцентных реакций и токсичностью образца.

Применение биOLUMИнесцентного тестирования с использованием ферментов светящихся бактерий для экологического мониторинга водной среды описано во многих научных трудах [1-3]. Биотесты на основе биферментной системы Red + Luc были успешно использованы для анализа воды реки Енисей и её притоков, питьевой воды различных районов Красноярск и Алтайского края, соленого озера Шира (республика Хакасия), а также озера Байкал [4-7]. Получены данные, убедительно демонстрирующие возможности применения биOLUMИнесцентных ферментных тестов для анализа токсичности не только воды, но и воздуха [8,9] или почвы [10,11].

В случае адаптации ферментативного биотестирования для анализа воздуха, важным этапом являлся способ отбора воздуха и фиксация поллютантов. Отбор проб производится с помощью аспиратора, в качестве растворов-поглотителей исследовались дистиллированная вода, поглотительная среда на формальдегид, на диоксид азота [12], этанол или ацетон [13]. Определены условия отбора проб воздуха с помощью дистиллированной воды или 15%-ного раствора уксуснокислого аммония [8].

Отдельное исследование провели для разработки ферментативного биотеста для оценки загрязнения почвы. При переходе к исследованию от воды к водным растворам (например, водным вытяжкам из почв), необходимо дополнительно учитывать эффекты, которые могут оказывать растворенные вещества, в данном случае – почвенные компоненты. Для разработки теста оценивали влияние мутности раствора, pH, наличие органического вещества почвы, его взаимодействие с поллютантами. Показано, что спектры поглощения водных вытяжек из почв (различных по гранулометрическому составу и содержанию органического вещества) не перекрывают спектры биOLUMИнесценции и не вызывают ложноотрицательные результаты (рис. 1). Изменение pH раствора также не требуется [14]. Однако, на результат биотестирования оказывают влияние тип и разновидность почвы, а именно: содержание органического вещества и размер почвенных частиц. В частности, гуминовые вещества увеличивают скорость расходования эндогенного восстановителя реакции НАДН, за счёт чего снижается интенсивность биOLUMИнесценции, показывая ложное загрязнение [15-17].

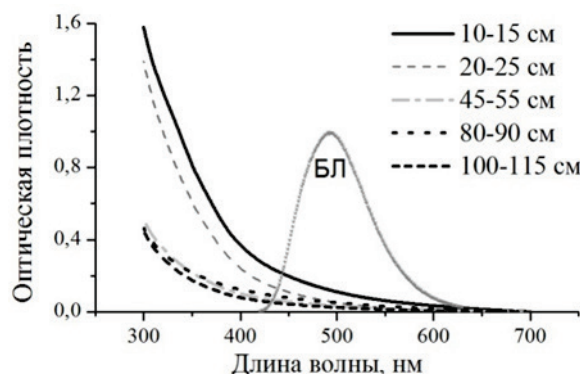


Рисунок 1. Спектры поглощения водных экстрактов из образцов, отобранных по всему почвенному профилю. Показано перекрытие поглощения со спектром бактериальной биOLUMИнесценции (БЛ)

Исходя из сложности объекта исследования был предложен методологический подход, который может быть экстраполирован и на другие анализируемые смеси сложного состава. Подход заключается в создании комплексного биотеста, в состав которого входит не только описанная выше биферментная система Red + Luc, но и другие полиферментные системы, в состав которых помимо Red + Luc входят ключевые ферменты других метаболических цепей. Примером такой системы является трехферментная НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + лактатдегидрогеназа. Были выбраны ферментативные системы для исследования загрязнения городских и сельскохозяйственных почв [10,11]. Показана принципиальная применимость методики для анализа почв во всему почвенному профилю [18]

Для учета собственного влияния почв была разработана программа, в которую были предварительно внесены сведения о 68 модельных почвенных грунтах, различающихся в широком диапазоне по гранулометрическому составу и содержанию гумуса. Программа разработана в двух вариантах: для работы на компьютере под управлением операционной системы Windows [19] и для работы в любом интернет-браузере независимо от используемой операционной системы и платформы [20]. На рисунке 2 показан внешний вид программы и пример ее работы. Подбор модельного грунта производится на основании измеренного содержания гумуса, % и гранулометрического состава исследуемой почвы, заносятся данные о результатах ферментативного биотестирования. При разработке приложения было принято решение о выборе трех наиболее репрезентативных ферментативных систем: моноферментная, катализируемая бутирилхолинэстеразой (RA, %), биферментная НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (T2, %) и трехферментная НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + лактатдегидрогеназа (T3, %). Именно эти три системы обладали чувствительностью к наибольшему числу классов загрязнителей.

Особое внимание следует уделять также и сопоставлению результатов химического и биологического метода анализа. Как известно, биотесты чувствительны только к определенной доле поллютантов, называемой биодоступной. В то время как химическими аналитическими методами определяют чаще всего валовое содержание химического вещества, и корреляции могут быть не обнаружены, что и было получено при разработке ферментативного метода для анализа загрязнения снежного покрова [21].

Пробы снега отбирались в пяти точках Красноярской агломерации в период введения режима неблагоприятных метеословесий, данный режим характеризуется накоплением загрязняющих веществ, выбрасываемых промышленными предприятиями, тепловыми станциями и автомобилями из-за отсутствия возможности их рассеивания в атмосфере. Отбор проб снега проводился в течение 19 дней с момента введения режима «черное небо» 10 февраля по 20 февраля 2023 года. Массовую концентрацию тяжелых металлов (мышьяк, кадмий, цинк, кобальт, ртуть и свинец) определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. Концентрация различных элементов изменялась по-разному в зависимости от места отбора пробы снега (рекреационная зона, жилая, промышленная), но абсолютно чистых зон не обнаружено. В результате ферментативного тестирования показано, что степень ингибирования росла в течение всего периода введения режима неблагоприятных метеословесий, что свидетельствует о накоплении поллютантов. Однако, при проведении корреляционного анализа значимая корреляционная связь с результатами биолуминесцентного ферментативного тестирования прослеживалась только для содержания кадмия ($r=-0,77$). Аналогичные результаты (неоднозначность интерпретации связи между концентрацией загрязняющих веществ и результатами биотестирования) были получены и при исследовании почв, отобранных с промышленных городских районов г. Красноярск [22].

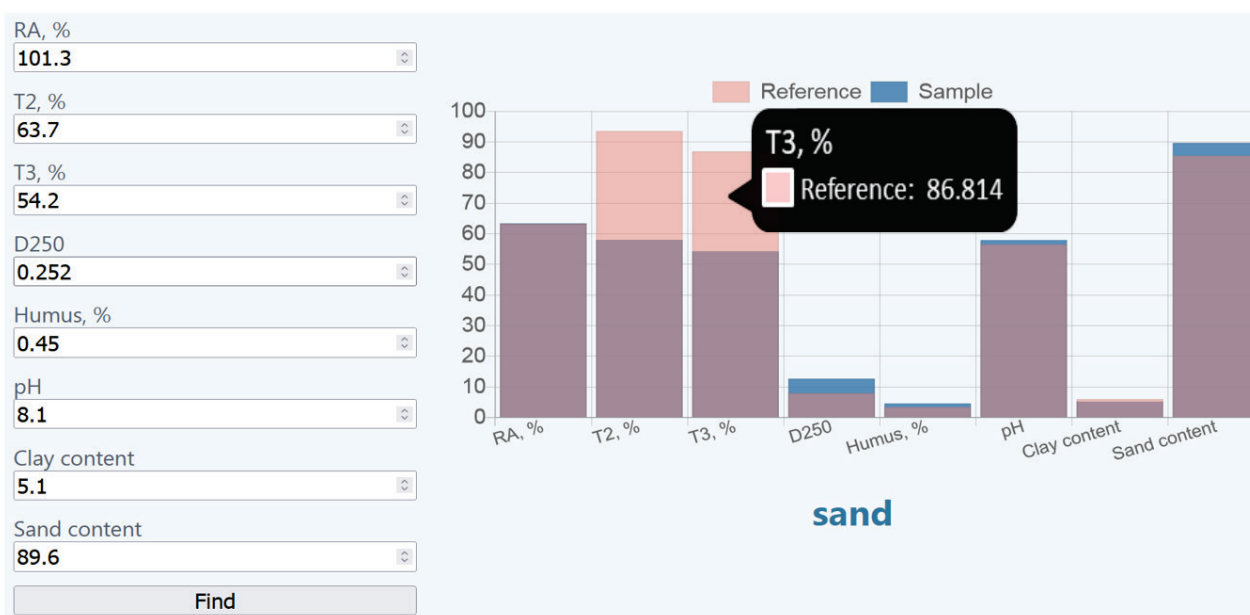


Рисунок 2. Внешний вид приложения при заполнении полей ввода и выборе подходящего стандартного грунта

Таким же образом, ключевым методологическим подходом для разработки ферментативного биотеста, направленного на оценку токсикологических параметров при загрязнении почв нефтепродуктами, является подбор оптимальных экстрагирующих веществ, так как растворимость нефти в воде очень низкая и составляет 10-50 мг/л [23]. В целом, биферментная система Red + Luc была чувствительна к загрязненным нефтью почвам при проведении стандартной процедуры пробоподготовки, но зависимости от концентрации не выявлено (исследованный диапазон 50-150 г/кг), вероятно данный эффект связан с ограниченной растворимостью нефти в воде. Кроме того, было обнаружено, что существует сильная корреляция между показателем билюминесценции и концентрацией окисленных форм углеводов в почвах ($r=-0,87$). Проблемы пробоподготовки образцов почвы. Загрязненных нефтепродуктами, связаны с тем, что традиционно для химических методов применяют такие растворители, как гексан и четыреххлористый углерод. Эти вещества являются высокотоксичными и не применимы для биологических методов анализа. В качестве альтернатив можно предложить ацетон, спирт (метиловый и этиловый), ПАВы (например, ТВИН-80), диметилсульфоксид. Показано, что в небольших концентрациях (не более 2% от объема реакционной смеси) ацетон и этиловый спирт могут быть применены в исследованиях с помощью биферментной билюминесцентной системы Red + Luc. Также исследовано влияние различных типов ПАВ на ферментативную систему в сравнение с бактериальным билюминесцентным биотестом [24].

В работе рассмотрена применимость методологии ферментативного биотестирования к анализу водных объектов, воздуха, снежного покрова и почв. Преимущества ферментативного биотестирования, такие как высокая чувствительность, повторяемость, простота проведения анализа, регистрация сигнала с помощью физического прибора, возможность подбора оптимального растворителя делают данный метод связующим звеном между биологическими и химическими методами анализа. А большое количество накопленных материалов свидетельствуют о перспективности включения данного метода в систему государственного экологического мониторинга.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20030.

Список литературы / References:

1. Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichek E.B., Kuznetsov A.M., Ivanova E.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems. *Chemosphere*, 2001, vol. 42, no. 8, pp. 909-915.
2. Vetrova E., Esimbekova E., Gitelson I., Rimmel N., Kotova S., Beloskov N., Kratasyuk V. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water. *Luminescence*, 2007, vol. 22, no. 3, pp. 206-214.
3. Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O. Application of enzyme bioluminescence in ecology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2014, vol. 144, pp. 67-109.
4. Кратасюк В.А., Кузнецов А.М., Родичева Э.К., Егорова О.И., Абакумова В.В., Грибовская И.В., Калачева Г.С. Проблемы и перспективы билюминесцентного биотестирования в экологическом мониторинге. *Сибирский экологический журнал*, 1996, т. 3, № 5, с. 397-403 [Kratasyuk V.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K., Egorova O.I., Abakumova V.V., Gribovskaya I.V., Kalacheva G.S. Problems and prospects of bioluminescent biotesting in environmental monitoring. *Sibirskij ekologicheskij zhurnal*, 1996, vol. 3, no. 5, pp. 397-403 (In Russ.)].
5. Kratasyuk V.A., Vetrova E.V., Kudryasheva N.S. bioluminescent water quality monitoring of salt lake Shira. *Luminescence*, 1999, vol. 14, no. 4, pp. 193-195.
6. Kudryasheva N., Shilova E., Khendogina E., Kratasyuk V. Lake Shira, a Siberian salt lake: ecosystem structure and function. 3. The use of bioluminescent biotests to monitor ecological status. *International Journal of Salt Lake Research*, 1999, vol. 8, no. 3, pp. 245-251.
7. Vetrova E., Kratasyuk V., Kudryasheva N. Bioluminescence characteristics of lake Shira water. *Aquatic Ecology*, 2002, vol. 36, no. 2, pp. 309-315.
8. Римацкая Н.В., Немцева Е.В., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А. Патент № 2734621. Российская Федерация, МПК C12Q 1/66 C12Q 1/24. *Ферментативный способ оценки интегральной токсичности воздушной среды*. 2019133261, 2019 [Rimatskaya N.V., Nemtseva E.V., Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A. Patent No. 2734621. Russian Federation, IPC C12Q 1/66 C12Q 1/24. *Enzymatic method for assessing the integral toxicity of the air environment*. 2019133261, 2019 (In Russ.)].
9. Rimatskaya N.V., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. Bioluminescent assays for monitoring of air pollution. *Luminescence*, 2012, vol. 27, no. 2, pp. 154-155.
10. Колосова Е.М., Сутормин О.С., Есимбекова Е.Н., Лоншакова-Мукина В.И., Кратасюк В.А. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы. *Доклады академии наук*, 2019, № 1, с. 103-107 [Kolossova E.M., Sutormin O.S., Esimbekova E.N., Lonshakova-Mukina V.I., Kratasyuk V.A. Complex enzymatic bioassay for assessing soil pollution. *Doklady akademii nauk*, 2019, № 1, с. 103-107 (In Russ.)].
11. Сутормин О.С., Колосова Е.М., Немцева Е.В., Искорнева О.В., Лисица А.Е., Матвиенко В.С., Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и триферментной систем. *Цитология*, 2018, № 10, с. 826-829 [Sutormin O.S., Kolossova E.M., Nemtseva E.V., Iskorneva O.V., Lisitsa A.E., Matvienko V.S., Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A. Enzymatic bioassay of soils: comparison of sensitivity to toxicants of mono-, bi- and trienzyme systems. *Citologiya*, 2018, no. 10, pp. 826-829 (In Russ.)].

12. Мельникова А.А., Римацкая Н.В., Кратасюк В.А. Биolumинесцентный метод оценки загрязнения воздушной среды. В сборнике: VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов. В 2-х томах. 2023, с. 99-100 [Melnikova A.A., Rimatskaya N.V., Kratasyuk V.A. *Bioluminescent method for assessing air pollution*. V sbornike: VII S"ezd biofizikov Rossii. Sbornik nauchnyh trudov. V 2-h tomah, 2023, pp. 99-100 (In Russ.)].
13. Есимбекова Е.Н., Римацкая Н.В., Суковатая И.Е., Кратасюк В.А. Биolumинесцентный экспресс-метод определения интегральной токсичности воды и загрязнения воздуха. *Вестник Оренбургского государственного университета*, 2013, № 10 (159), с. 122-127 [Esimbekova E.N., Rimatskaya N.V., Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A. *Bioluminescent express method for determining the integral toxicity of water and air pollution*. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2013, no. 10 (159), pp. 122-127 (In Russ.)].
14. Байгина Е.М., Римацкая Н.В., Степанова Л.В., Кратасюк В.А. Анализ возможности применения биolumинесцентных ферментативных биотестов для оценки загрязнения почвы (на примере почв г. Красноярск). *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*, 2017, т. 21, с. 21-30 [Baigina E.M., Rimatskaya N.V., Stepanova L.V., Kratasyuk V.A. *Analysis of the possibility of using bioluminescent enzymatic biotests to assess soil pollution (using the example of soils in Krasnoyarsk)*. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya*, 2017, vol. 21, pp. 21-30 (In Russ.)].
15. Тарасова А.С. Использование биolumинесцентных систем для изучения закономерностей детоксикации растворов модельных поллютантов гуминовыми веществами. Автореф. дис. канд. биол. наук, 2012, 22 с. [Tarasova A.S. *Use of bioluminescent systems for studying the patterns of detoxification of solutions of model pollutants by humic substances*. Author's abstract. diss. candidate of biological sciences, 2012, 22 p. (In Russ.)].
16. Tarasova A.S., Stom D.I., Kudryasheva N.S. Effect of humic substances on toxicity of inorganic oxidizer. *Bioluminescent monitoring. Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, vol. 30, no. 5, pp. 1013-1017.
17. Tarasova A.S., Kislun S.L., Fedorova E.S., Kuznetsov A.M., Mogilnaya O.A., Stom D.I., Kudryasheva N.S. Bioluminescence as a tool for studying detoxification processes in metal salt solutions involving humic substances. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2012, vol. 117, no. 5, pp. 164-170.
18. Kolosova E.M., Sutormin O.S., Shpedt A.A., Stepanova L.V., Kratasyuk V.A. Bioluminescent-Inhibition-Based Biosensor for Full-Profile Soil Contamination Assessment. *Biosensors*, 2022, vol. 12, p. 353.
19. Байгин М.М., Колосова Е.М. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021660358 Российская Федерация. Программное обеспечение для сопоставления стандартных результатов ферментативной активности сенсоров для анализа загрязнения почв. № 2021615905, заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ) [Baigin M.M., Kolosova E.M. Certificate of state registration of computer program no. 2021660358 Russian Federation. Software for comparison of standard results of enzymatic activity of sensors for soil pollution analysis, No. 2021615905, applicant Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Siberian Federal University" (SFU) (In Russ.)].
20. Kratasyuk V.A., Kolosova E.M., Sutormin O.S., Lonshakova-Mukina V.I., Baygin M.M., Rimatskaya N.V., Sukovataya I.E., Shpedt A.A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis. *Sensors*, 2021, vol. 21, no. 3, p. 1017.
21. Rimashevskaya A.A., Muchkina E.Y., Sutormin O.S., Chuyashenko D.E., Gareev A.R., Tikhnenko S.A., Rimatskaya N.V., Kratasyuk V.A. Bioluminescence Inhibition Bioassay for Estimation of Snow Cover in Urbanised Areas within Boreal Forests of Krasnoyarsk City. *Forests*, 2024, vol. 15, p. 1325.
22. Kolosova E.M., Sutormin O.S., Stepanova L.V., Shpedt A.A., Rimatskaya N.V., Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay for the prediction of toxicity of pollutants in urban soils. *Environmental Technology and Innovation*, 2021, vol. 24, p. 101842.
23. Некрасова Л.П., Каменецкая Д.Б. Нефтепродукты в объектах окружающей среды и методы их определения. *Научное обозрение. Медицинские науки*, 2024, № 4, с. 41-48 [Nekrasova L.P., Kamenetskaya D.B. *Oil products in environmental objects and methods for their determination*. *Nauchnoe obozrenie. Medicinskie nauki*, 2024, no. 4, pp. 41-48 (In Russ.)].
24. Sutormin O.S., Kolosova E.M., Torgashina I.G., Kratasyuk V.A., Kudryasheva N.S., Kinstler J.S., Stom D.I. Toxicity of different types of surfactants via cellular and enzymatic assay systems. *International journal of molecular sciences*, 2022, vol. 24, no. 1, p. 515.

BIOLUMINESCENT ENZYMATIC BIOASSAY FOR ENVIRONMENTAL MONITORING
**Kratasyuk V.A.^{1,2}, Esimbekova E.N.¹, Oyun A.M.¹, Kolosova E.M.², Chuyashenko D.E.¹, Muchkina E.Ya.¹,
Sutormin O.S.^{1,2}**

¹ Siberian Federal University

Svobodny ave., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: valkrat@mail.ru

² Surgut State University

Lenina ave., 1, Surgut, 628412, Russia

Received 01.08.2025

Abstract. The advantages of bioluminescent enzymatic biotests for rapid ecological monitoring of aquatic ecosystems, as well as soil and air environment are considered. Enzymatic bioassays make it possible to detect unknown toxic compounds in the environment, and show the effect of pollutants on the functions of living organisms. The analysis consists in detecting pollutants and toxic mixtures by their effect on the luminescence intensity of the bienzymatic system: NAD(P)H:FMN-oxidoreductase + luciferase. The test is methodically simple: enzymes and their substrates are mixed and the control luminescence intensity is recorded on a bioluminometer. The procedure is then repeated in the presence of the analyzed sample. The toxicity of the mixture is determined by the change in the light emission intensity in the presence of a sample compared with the control. Biotests have been successfully used to analyze the water of the Yenisei River and its tributaries, drinking water from various districts of Krasnoyarsk and Altai Krai, and other water ecosystems. Data have been obtained that convincingly demonstrate the possibilities of using bioluminescent enzyme tests to analyze the toxicity of not only water, but also air, snow, and soil when assessing pollution in urban and agricultural areas, as well as forest ecosystems. To develop a new methodology for a comprehensive enzymatic biotest aimed at assessing the toxicological parameters of soil contamination with petroleum products, a key methodological approach is the selection of optimal extractive substances. A comparative analysis of organic solvents (DMSO, acetone, etc.) has been carried out and the advantages of using DMSO for studying the effects of oil pollution on the soil environment have been shown.

Key words: *bioluminescence, luminescence intensity, enzymatic bioassay, environmental monitoring, luciferase, luminous bacteria.*

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ЛОВ МИКРОПЛАНКТОНА УСТРОЙСТВОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ «БОБРЁНОК»

Мишкин И.А.¹, Ахмеров Д.Н.², Мишкина А.А.¹, Богданович В.А.³, Кузнецов А.В.^{4,5}

¹ МОУ Гимназия №19

ул. Коммунистическая, 103, г. Саранск, 430005, РФ

² ГБОУ Билингвальная гимназия №2

просп. Октябрьской революции, 79, г. Севастополь, 299038, РФ

³ ГБОУ СОШ № 33 им. В.И. Герасимова

ул. Коммунаров, 2, г. Севастополь, 299043, РФ

⁴ Севастопольский государственный университет

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

⁵ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь

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

Поступила в редакцию 30.07.2025

Аннотация. Цель работы – оценить влияние скорости горизонтального движения устройства последовательной фильтрации "Бобрёнок", установленного на надувной сапборд (NIKS), на эффективность отбора поверхностного микропланктона. Методы: 1) численное моделирование 2-D ламинарного потока на Python (NumPy, Matplotlib) для выявления зон турбулентности вблизи преград-фильтров; 2) полевые эксперименты на траверзе пляжа «Альбатрос» (Севастополь) в июне-июле 2025 г. при скоростях 0,4 м/с (медленно) и 1 м/с (быстро); 3) подсчёт крупных динофлагеллят *Ceratium tripos* (фракция 112-210 мкм) в 200 мкл пробы; 4) статистический анализ данных в R (линейная и экспоненциальная регрессии, t-test). Результаты моделирования показали, что острые углы и щели между преградами вызывают локальную турбулентность и «выталкивают» часть потока наружу. В экспериментах показано, что линейная зависимость числа *C. tripos* от пройденного пути $y = 0,1084 \cdot x$ ($R^2 = 0,966$; $p < 10^{-18}$); при длине траверза > 1 км число морфотипов достигает асимптоты $\sim 16,6$ (модель $y = 16,6 \cdot (1 - e^{-(0,0053 \cdot x)})$). Снижение скорости с 1 до 0,4 м/с увеличило удельный улов *C. tripos* в 2 раза ($15,2 \pm 4,0$ против $31,4 \pm 2,7$; $p = 2 \times 10^{-5}$). Выводы: оптимальная скорость фильтрации $\leq 0,2-0,4$ м/с обеспечивает максимальную репрезентативность отбора; конструкция "Бобрёнка" пригодна для быстрого прибрежного мониторинга поверхностного микропланктона без использования судов.

Ключевые слова: горизонтальный лов микропланктона, устройство последовательной фильтрации "Бобрёнок", *Ceratium tripos*, численное моделирование, скорость фильтрации; мониторинг фитопланктона, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Мониторинг поверхностного микропланктона в прибрежной зоне Чёрного моря является обязательным компонентом оценки экологического состояния водной среды, раннего выявления «цветений» и прогноза биоресурсов [1-5]. Традиционные методы отбора проб с судов дорогостоящи и не всегда доступны в мелководных или каменистых районах, где использование малых плавучих средств, в том числе надувных сапбордов, становится всё более востребованным [6]. Однако скорость движения таких платформ может существенно влиять на эффективность фильтрации и полностью улавливания изучаемых видов/морфотипов, что до настоящего времени оставалось слабо исследованным [7-9].

В ряде работ показано, что при превышении критической скорости потока (0,5 м/с) через нейлоновые фильтры возникает турбулентный «прорыв» крупных микроорганизмов и уменьшается улов гидробионтов размером 100-200 мкм [10-11]. При этом современные исследования подтверждают, что при скоростях больше 0,5 м/с возникают не только турбулентный «прорыв» одиночных клеток сквозь поры фильтра, но и формирование вязкого пограничного слоя («снежного кома»), приводящего к отклонению частиц от сетки. Однако эти исследования выполнялись либо в стационарных лабораторных флаконах, либо на судовых трал-фильтрах, а данные по эффективности «горизонтального лова» на малых скоростях устройствами последовательной фильтрации в природных условиях отсутствуют. Кроме того, влияние геометрии входного сита и взаимного расположения фильтрующих элементов на характер обтекания водной массы не анализировалось.

Цель нашего исследования: определить, как скорость движения (0,4 м/с против 1 м/с) и расстояние траверза влияют на количественный улов динофлагелляты *Ceratium tripos* во фракции 112-210 мкм с помощью портативного устройства "Бобрёнок", установленного на сапборде, и численно смоделировать характер обтекания фильтров потоком воды. Решались следующие задачи: 1) смоделировать 2-D поток вокруг круглых и угловатых преград, имитирующих входное сито и фильтры "Бобрёнка"; 2) провести серию экспериментальных прогонов на дистанциях 0-1000 м и сравнить улов при двух скоростях; 3) выявить зависимости числа особей и биоразнообразия от расстояния и скорости; 4) разработать практические рекомендации по выбору оптимального режима фильтрации.

Научная новизна: 1) впервые получена количественная зависимость удельного улова *C. tripos* от скорости движения прибрежной сапборд-платформы; 2) показано, что уменьшение скорости до 0,4 м/с статистически достоверно ($p \approx 2 \times 10^{-5}$) увеличивает улов крупных форм во фракции 112-210 мкм; 3) использовано упрощённое численное моделирование для изучения геометрии входных элементов фильтра.

Теоретическая значимость – уточнение механизмов «прорыва» и «снежного кома» при фильтрации планктона на малых скоростях. Практическая значимость – разработка быстрого и дешёвого метода мониторинга динофитовых водорослей в прибрежной зоне без судовых съёмок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование. Для визуализации двумерного ламинарного потока использовалась программа, написанная на языке Python 3. Расчёты выполнялись с применением библиотеки NumPy (версии 1.24) для создания равномерной декартовой сетки и формирования компонент векторов скоростей. Визуализация поля скоростей осуществлялась средствами Matplotlib (модуль pyplot) функцией streamplot, позволяющей строить линии тока.

Физическая модель описывает идеализированный ламинарный поток жидкости без учёта вязких эффектов. Скорость жидкости задана постоянной по всей расчётной области и направлена строго вдоль оси Y (сверху вниз), тогда как горизонтальная компонента скорости U всюду равнялась нулю. Границы расчётной области выбирались прямоугольными с размером дискретизации 100×100 узлов (рис. 2а).

Алгоритм включал три последовательных этапа: 1) генерация координатной сетки функцией `np.meshgrid`; 2) явное присвоение компонентам вектора скорости постоянных значений, что соответствует решению уравнений Эйлера для однородного поля; 3) визуализация линий тока с сохранением пропорций осей (`aspect='equal'`) и наложением декартовой сетки для контроля масштаба.

В симуляцию помещали круг, квадрат или два квадрата. В последнем случае изучались разные скорости потока, равные половине и десятой доле исходной скорости жидкости.

Эксперименты. Передвижную установку для горизонтального лова микропланктона "Бобрёнок" тестировали на траверзе пляжа «Альбатрос» (г. Севастополь) в июне-июле 2025 г., где располагаются пять волноломов, расстояние между которыми по 100 м. Испытания проводили в тихую погоду. Устройство последовательной фильтрации состоит из трёх телескопических пластмассовых труб с диаметром 50 мм, между которыми прокладываются мелкие нейлоновые сетки (газ) с размером ячеек 210 и 120 мкм, а на входе размещено металлическое сито с отверстиями 2 мм. Устройство в сборе прикреплялось к днищу сапборда HIKS Inflatable ($305 \times 71 \times 10$ см) (рис. 1). Лов осуществляли на скоростях 0,4 м/с (медленно) и 1 м/с (быстро). Сетки после лова промывали 3 мл искусственной морской воды (18 ‰), аккуратно отбирали по 1,5 мл взвеси и фиксировали 2,5 % глутарового альдегида. Пробы доставляли в лабораторию и анализировали под микроскопом Микромед MC4 Zoom LED с видеоокуляром Микромед Эврика 1.3 MP при увеличении $\times 50$ раз. Планктонные организмы фотографировали и зарисовывали с экрана монитора. В пробах объёмом 200 мкл оценивали общее представительство планктонных морфотипов [5] и по пять раз подсчитывали на прозрачной плёнке в клеточку количество динофитовых водорослей *Ceratium tripos* (O.F.Müller) Nitzsch из размерной фракции 112-210 мкм. Статистическую обработку проводили в среде R

РЕЗУЛЬТАТЫ

Моделирование. Первоначально в двумерный ламинарный поток помещали круг или квадрат (рис. 2). Стрелки на рисунке 2а показывают направление и скорость ламинарного потока; поскольку горизонтальный

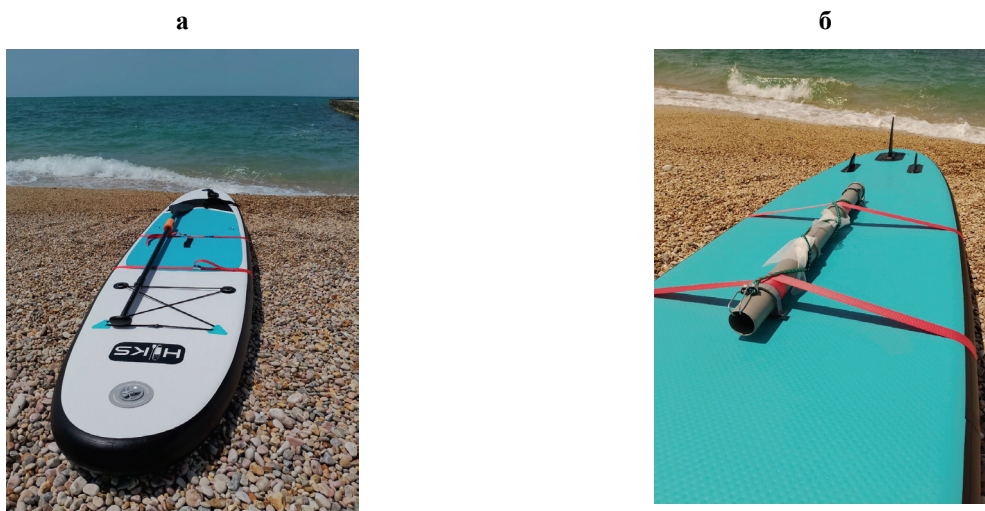


Рисунок 1. Сапборд HIKS Inflatable (а) с устройством последовательной фильтрации "Бобрёнок" (б) на днище (без входного сита)

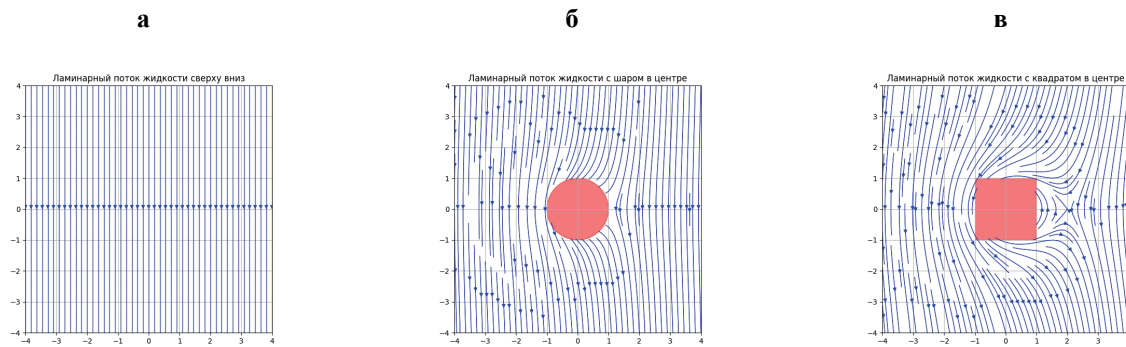


Рисунок 2. Двумерный ламинарный поток (а) и его искажение возле круга (б) и квадрата (в)

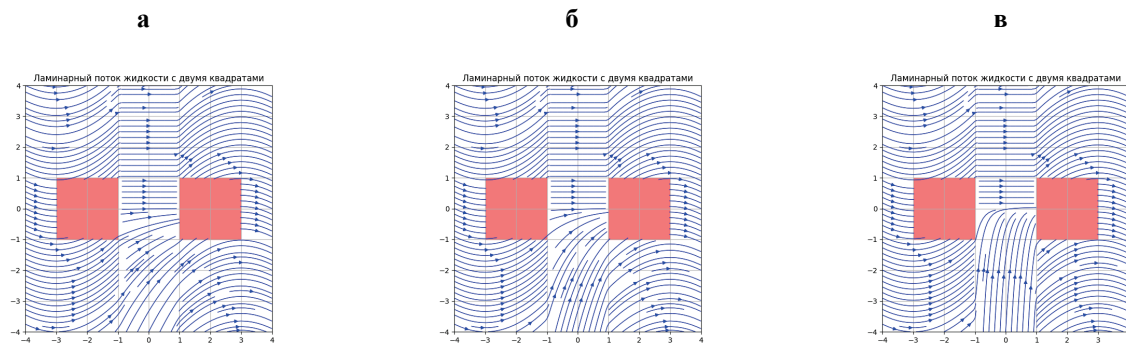


Рисунок 3. Разрушение ламинарного потока вблизи двух квадратов, исходная скорость потока (а), половина исходной скорости (б), десятая часть исходной скорости (в)

компонент скорости равен нулю, потоки направлены исключительно вниз. Появление круга в неустойчивом ламинарном потоке вызывало потерю симметрии и несимметричное обтекание поверхности с разными скоростями по краям обтекаемого объекта. На рисунке 2б можно видеть, как поток жидкой среды обтекает круг. Квадрат, который имеет угловатую форму, вызывал ещё большие возмущения в изначальном ламинарном потоке, что приводило к тотальной потере симметрии и появлению турбулентности с обратным направлением потока в локальных областях. Видно, как поток отклоняется от квадрата, находящегося в центре координатной системы: внутри квадрата поток отсутствует, а снаружи он обтекает квадрат, возмущаясь на углах (рис. 2в).

Два близкорасположенных квадрата в двумерном ламинарном потоке моделировали стенки трубы (рис. 3), что драматическим образом нарушало исходный ламинарный поток и кардинально изменяло направление течения жидкости. Наиболее интересной деталью является то, что поток жидкости не проходил между соседними квадратами, что соответствует ситуации, когда вода не протекает сквозь отверстие трубы, а, завихряясь, обтекает её снаружи.

Эксперименты. В размерных фракциях №1 (210-2000 мкм) и №2 (120-210 мкм) встречались обычные представители летнего черноморского планктона [12]: остатки макрофитов, мелкие веслоногие рачки *Oithona*, личинки копепод и представители одноклеточных водорослей, например, крупные динофлагелляты *Ceratium tripos*, одноклеточные динофитовые водоросли *Ceratium furca*, *Ceratium fusus* и самая крупная планктонная диатомовая водоросль Чёрного моря – псевдосоления птичья-шпора *Pseudosolenia calcar-avis* (рис. 4).

Эффективность горизонтального лова планктона с помощью установки "Бобрёнок" проверяли на скорости приблизительно 0,4 м/с. Подсчёт количества пойманных динофлагеллят *C. tripos* на разных дистанциях лова показал линейную зависимость числа *C. tripos* от пройденного пути (рис. 5а). Модель $y = 0,1084 \cdot x$ с $R^2 \approx 0,966$ и $p < 10^{-18}$ считается очень достоверной, где 96,6 % дисперсии количества *C. tripos* объясняется длиной пройденного пути, коэффициент наклона статистически значим ($p \approx 3,7 \cdot 10^{-19}$), среднеквадратичная ошибка RMSE $\approx 10,5$ шт, т.е. абсолютная погрешность находится на уровне «десяти особей», что при среднем значении ~ 47 шт даёт относительную ошибку ≈ 22 %. Таким образом, линейная регрессия без свободного члена корректно описывает экспериментальные данные.

Напротив, при увеличении дистанции лова число морфотипов достигало насыщения и приняло характерное для района станции «Альбатрос» значение числа морфотипов ≈ 17 шт. Экспериментальные данные описаны моделью экспоненциальной сходимости: $y = a \cdot (1 - \exp(-k \cdot x))$, где $a = 16,589$ со стандартной ошибкой 1,338. Значение a показывает, что асимптотическое значение числа морфотипов при бесконечном пути составляет около 16,6; $k = 0,00532$ со стандартной ошибкой 0,0014. Значение k определяет скорость сходимости к асимптоте. Значение p для параметра a равно 0,00113, что значительно меньше 0,05, а для параметра k равно 0,03195, что также значительно меньше 0,05. Это означает, что оба параметра модели a и k статистически значимы, а модель

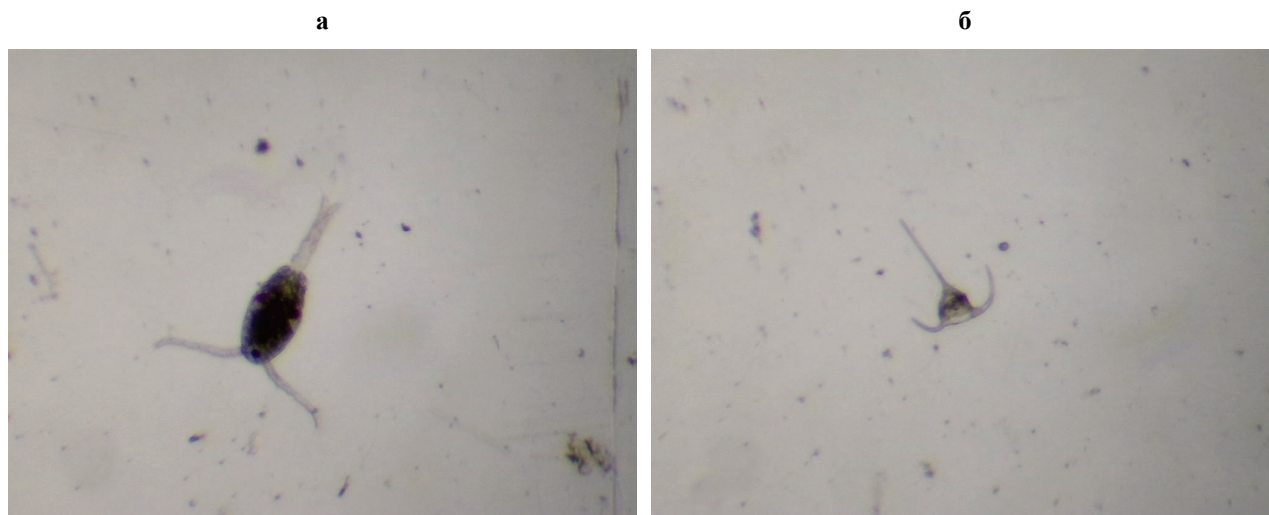


Рисунок 4. Микропланктонные организмы со станции «Альбатрос»: фракция № 1, циклоп – представитель отряда мелких ракообразных из подкласса веслоногих (Copepoda) (а); фракция № 2, тройной церациум – морская динофлагеллята *Ceratium tripos* (б), увеличение 50 раз

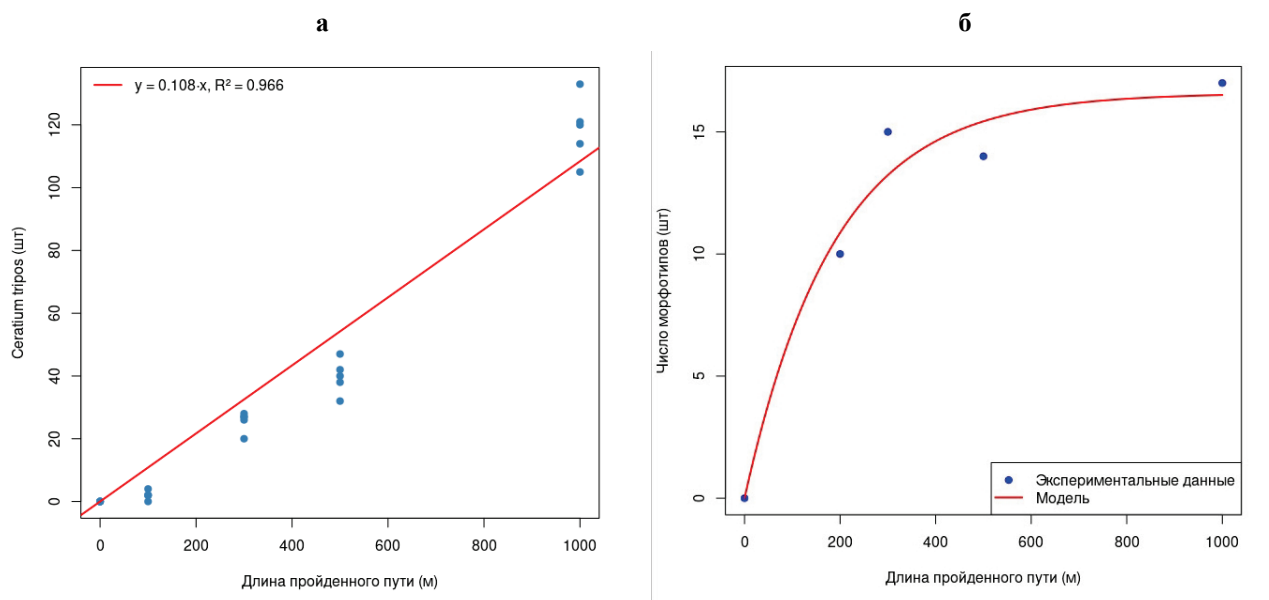


Рисунок 5. Эффективность горизонтального лова поверхностного планктона с помощью устройства последовательной фильтрации "Бобрёнок", установленного на сапборд НКС, подсчёт числа *C. tripos* (а), подсчёт числа морфотипов (б) в 200 мкл пробы

хорошо аппроксимирует данные. График показывает, что модель хорошо описывает тенденцию изменения данных, особенно в начале и в конце. Модель проходит через начальную точку (0,0) и асимптотически приближается к плато (рис. 5б).

Эффективность горизонтального лова *C. tripos* на разных скоростях: 1 м/с (быстро) и 0,4 м/с (медленно) представлена на рис. 6 в виде столбчатых диаграмм с усами. Тестирование проводилось на дистанции лова 400 м. Среднее значение для быстрого лова равно 15,2, а для медленного – 31,4; 95 % доверительные интервалы составили 9,3-21,1 и 26-36,8, соответственно. Значение p в тесте Стьюдента (t -test) равняется $2,3 \cdot 10^{-5}$, что значительно меньше 0,001, следовательно, различие статистически достоверно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты имитационного моделирования показали, как ламинарный поток теряет симметрию, обтекает плавно круг и завихряется возле углов квадрата (рис. 2), а также представили тревожный сценарий, когда вода в результате нарушения ламинарности потока не проходит через узкую трубу, а обтекает её снаружи (рис. 3). Упрощённая модель качественно объясняет эффекты, но не учитывает реальную турбулентность.

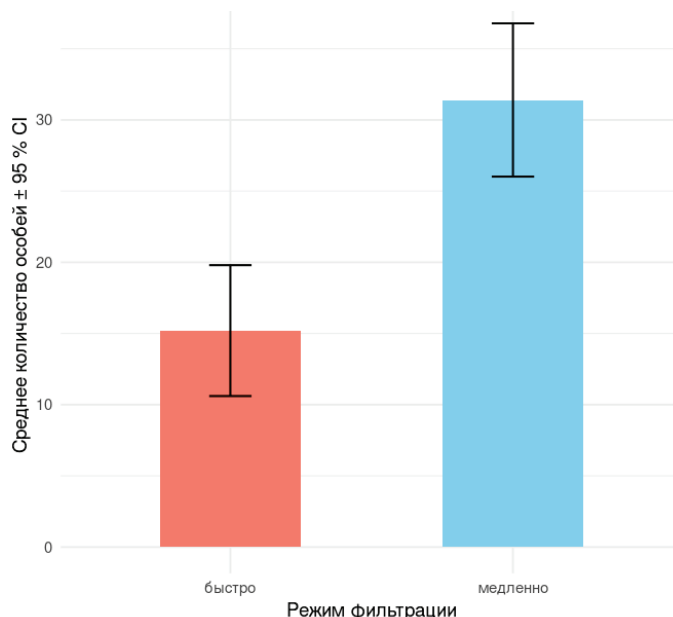


Рисунок 6. Столбчатые диаграммы эффективности лова при разных скоростях одноклеточной динофитовой водоросли *Ceratium tripos* из фракции 112-210 мкм, представлены столбцы с усами ($\pm 95\%$ доверительный интервал, CI), пояснения в тексте

В ходе летних ходовых испытаний устройства "Бобрёнок" были собраны представители 17 морфотипов, характерных для микропланктона на станции «Альбатрос» [4,12], некоторые особи из которых представлены на рисунке 4, что дополняет предсказания экспертов [13] и результаты собственного имитационного моделирования (рис. 2 и 3). Получается, что во время движения установки последовательной фильтрации "Бобрёнок" происходит эффективный забор воды в устройство и её фильтрация, в результате чего на ситах задерживается искомый поверхностный планктон (рис. 4 и 5). Имитационная модель продемонстрировала *риск* обводного эффекта, но реальная конструкция "Бобрёнка" (с телескопическими трубами и ситами) предотвращает этот эффект.

Динофлагеллята *Ceratium tripos* (рис. 4б) была выбрана для количественного подсчёта числа репрезентативных организмов в размерной фракции микропланктона № 2 (112-210 мкм) из-за её характерной «трёхргой» формы, которую трудно перепутать с другими морфотипами. Размеры типичных представителей *Ceratium tripos* находятся в следующих размерных пределах: длина 195-360 мкм, ширина 65-90 мкм [14], поэтому представительная часть этих организмов задерживалась ситом с размером ячеек 112 мкм, так как трёхмерная форма и ориентация клеток повышают эффективность улавливания.

Из литературных данных [10,11] следует, что при умеренных скоростях (0,1-0,3 м/с) мелкая сетка успевает «отсеивать» планктон, и выход в фракцию № 2 (112-210 мкм) высок. При избыточной скорости ($> 0,5$ м/с) возникают: 1) турбулентный «прорыв» организмов сквозь поры и 2) сжатие вязкого пласта (эффект «снежного кома»), когда частицы виляют и выходят в фильтрат. Как итог, чем выше скорость, тем выше потери крупных форм и тем меньше их собирается во фракции № 2. Наши данные (рис. 6) показали, что при сравнении двух выборок для разных скоростей движения установки последовательной фильтрации "Бобрёнок" значение $p \approx 2 \times 10^{-5}$, следовательно, – различие – статистически достоверно. То есть, уменьшение скорости фильтрации почти вдвое увеличило улов *Ceratium tripos* во фракции 112-210 мкм, а это полностью находится в рамках классических представлений [10,15]. Из результатов экспериментов следует, что: 1) для максимизации счёта крупных динофлагеллят оптимальна скорость потока $\leq 0,2$ м/с (режим «медленно»), 2) при быстрой гребле следует ожидать недоучёта до 50 % особей этого размера. Скорость $\leq 0,4$ м/с доказана экспериментально, а $\leq 0,2$ м/с рекомендована на основе экстраполяции и классических исследований [10,11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итог по моделированию потока. Упрощённая 2-D симуляция, реализованная в Python (NumPy и Matplotlib), показала, что: 1) идеальный ламинарный поток начинает разрушаться при обтекании круглых преград; 2) острые углы квадратов и узкие щели между двумя преградами приводят к локальной турбулентности и «вытеснению» части потока наружу. Это подтверждает, что геометрия входного сита и стенок корпуса «Бобрёнка» критически важна для предотвращения «обводного» эффекта и обеспечения полного прохода воды через фильтры. 2D-модель качественно описывает риски, но требует дополнения 3D-расчётами с учётом вязкости.

Итог по экспериментальным прогонам. 1) Калибровка сапбоарда HIKS Inflatable с установкой "Бобрёнок" в условиях пляжа «Альбатрос» позволила выловить 17 разных морфотипов летнего черноморского микропланктона. 2) Линейная регрессия без свободного члена ($R^2 = 0,966$, $p < 10^{-18}$) достоверно описывает рост числа *Ceratium tripos* во фракции 112-210 мкм с увеличением длины траверза. 3) Модель экспоненциального

насыщения ($a = 16,6$; $k = 0,0053$; $p < 0,05$) объясняет достижение плато $\sim 16-17$ морфотипов на дистанциях > 1 км. 4) Сравнение двух скоростей (0,4 м/с и 1 м/с) показало статистически значимое ($p \approx 2 \times 10^{-5}$) уменьшение удельного улова в 2 раза при высокой скорости, что согласуется с классическими представлениями о турбулентном «прорыве» и эффекте «снежного кома».

Практические рекомендации. 1) Для максимизации счёта крупных динофлагеллят рекомендуется поддерживать скорость движения установки $\leq 0,2$ м/с (режим «медленно»). 2) При быстрой гребле ($> 0,5$ м/с) следует ожидать потерь до 50 % особей размером 112-210 мкм. 3) Входное сито 2 мм и последовательные нейлоновые фильтры 210 и 120 мкм эффективно задерживают целевую фракцию при указанных скоростях.

Научная значимость. Впервые показано, что простая пилотная установка на сапборде позволяет получать репрезентативные количественные данные по микропланктону Чёрного моря при строгом контроле скорости фильтрации. Предложенный подход может быть использован для мониторинга фитопланктона в других прибрежных районах без привлечения крупных судов.

Благодарности. Работа выполнена за свой счёт по проектной задаче "Экология Гераклейского полуострова и его окрестностей" в рамках Всероссийской образовательной инициативы «Сириус.Лето: начни свой проект». Авторы благодарят сотрудников отдела планктона ИНБЮМ за помощь в оснастке устройств последовательной фильтрации, а также рецензентов за ценные замечания и предложения. Исследование соответствует госзаданиям № 124022400148-4 и 124022400152-1.

Список литературы / References:

1. Морозова-Водяницкая Н.В. Фитопланктон Черного моря. I. Фитопланктон в районе г. Севастополя и общий обзор фитопланктона Черного моря. *Труды Севастопольской биологической станции АН СССР*, 1948, т. 6, с. 39-172 [Morozova-Vodyanitskaya N.V. Phytoplankton of the Black Sea. I. Phytoplankton in the area of Sevastopol and a general review of the phytoplankton of the Black Sea. *Transactions of the Sevastopol Biological Station of the USSR Academy of Sciences*, 1948, vol. 6, pp. 39-172 (In Russ.)].
2. Bodeanu N., Ruta G., Popa L. Long-term evolution of the algal blooms in Romanian Black Sea waters. *Cercetari marine - Recherches marines*, 1998, vol. 30-31, pp. 37-55.
3. Стельмах Л.В., Губанов В.И., Бабич И.И. Сезонные изменения скорости роста и лимитирование фитопланктона питательными веществами в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя. *Морской экологический журнал*, 2004, т. 3, № 4, с. 55-73 [Stelmakh L.V., Gubanov V.I., Babich I.I. Seasonal changes in growth rate and phytoplankton limitation by nutrients in the coastal waters of the Black Sea near Sevastopol. *Marine Ecological Journal*, 2004, vol. 3, no. 4, pp. 55-73 (In Russ.)].
4. Уфимцева М.А., Кузнецов А.В. Экспресс-оценка размерных фракций планктона в акватории г. Севастополь зимой 2021-2022 гг: модельные исследования. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 4, с. 640-644 [Ufimtseva M.A., Kuznetsov A.V. Rapid assessment of plankton size fractions in the waters of Sevastopol in winter 2021-2022: model studies. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 4, pp. 640-644 (In Russ.)].
5. Шеметова Д.В., Савицкий М.А., Рождественская И.А., Брагина А.А., Кузнецов А.В. Сравнительное исследование планктона на станциях Альбатрос и Форос в Крыму в январе 2024 и 2025 гг. (последствия разлива мазута в Керченском проливе). *Экосистемы: экология и динамика*, 2025, № 1, с. 114-122 [Shemetova D.V., Savitsky M.A., Rozhdestvenskaya I.A., Bragina A.A., Kuznetsov A.V. Comparative study of plankton at the Albatros and Foros stations in Crimea in January 2024 and 2025 (consequences of the fuel oil spill in the Kerch Strait). *Ecosystems: Ecology and Dynamics*, 2025, no. 1, pp. 114-122 (In Russ.)].
6. Савицкий М.А., Кузнецов А.В. Фракционирование планктона с помощью последовательной фильтрации и построение пирамид биоразнообразия. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2023, т. 8, № 1, с. 99-110 [Savitsky M.A., Kuznetsov A.V. Fractionation of plankton using sequential filtration and construction of biodiversity pyramids. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2023, vol. 8, no. 1, pp. 99-110 (In Russ.)].
7. Bjorke H., Dragesund O., Ulltang O. *Efficiency Test on Four High-Speed Plankton Samplers*. In: Blaxter J.H.S. (eds) *The Early Life History of Fish*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1974.
8. Skjoldal H.R., Wiebe P.H., Postel L., Knutsen T., Kaartvedt S., Sameoto D.D. Intercomparison of zooplankton (net) sampling systems: Results from the ICES/GLOBEC sea-going workshop. *Progress in Oceanography*, 2013, vol. 108, pp. 1-42.
9. Gao S., Fan Zh., Mao J., Zheng M. Numerical Simulation and Design of a Shaftless Hollow Pump for Plankton Sampling. *J. Mar. Sci. Eng.*, 2024, vol. 12, no. 2, p. 284.
10. Tranter D.J., Smith P.E. *Filtration performance. Zooplankton sampling (Monographs on oceanographic methodology)*. Paris: UNESCO Press, 1968, pp. 27-56.
11. Киселев И.А. *Планктон морей и континентальных водоемов*. АН СССР. Зоол. Ин-т. - Ленинград: Наука. Ленингр. Отд-ние, 1969-1980 [Kiselev I.A. *Plankton of the seas and continental reservoirs*. Academy of Sciences of the USSR. Zool. Institute - Leningrad: Science. Leningr. Department, 1969-1980 (In Russ.)].
12. Гладыш М.А., Челябинина Н.С., Кузнецов А.В. Сообщество морского планктона как активная среда. *Биосфера*, 2025, т. 17, № 2, с. 83-107 [Gladyshev M.A., Chelyadina N.S., Kuznetsov A.V. Marine plankton community as an active environment. *Biosphere*, 2025, vol. 17, no. 2, pp. 83-107 (In Russ.)].

13. Lombard F., Boss E., Waite A.M. et al. Globally consistent quantitative observations of planktonic ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 2019, vol. 6, p. 196.
14. Коновалова Г.В. Динофлагелляты (*Dinophyta*) дальневосточных морей России и сопредельных акваторий Тихого океана. Владивосток: Дальнаука, 1998, 300 с. [Konovalova G.V. *Dinoflagellates (Dinophyta) of the Far Eastern Seas of Russia and Adjacent Waters of the Pacific Ocean*. Vladivostok: Dalnauka, 1998, 300 p. (In Russ.)].
15. Tzella A., Haynes P.H. Small-scale spatial structure in plankton distributions. *Biogeosciences*, 2007, vol. 4, p. 173-179.

HORIZONTAL SAMPLING OF MICROPLANKTON USING THE SEQUENTIAL FILTRATION DEVICE "BOBRYONOK"

Mishkin I.A.¹, Akhmerov D.N.², Mishkina A.A.¹, Bogdanovich V.A.³, Kuznetsov A.V.^{4,5}

¹ Gymnasium No. 19

Kommunisticheskaya str., 103, Saransk, 430005, Russia

² Bilingual Gymnasium No. 2

Oktyabrskoy revolyutsii ave., 79, Sevastopol, 299038, Russia

³ Secondary School No. 33 named after V.I. Gerasimov

Kommunarov str., 2, Sevastopol, 299043, Russia

⁴ Sevastopol State University, Sevastopol

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

⁵ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nakhimov ave., Sevastopol, 299011, Russia

Received 30.07.2025

Abstract. The aim of this work is to evaluate the effect of horizontal movement speed on the efficiency of surface microplankton sampling using the sequential filtration device "Bobryonok" mounted on an inflatable paddleboard (HKS). **Methods:** 1) Numerical simulation of 2D laminar flow in Python (NumPy, Matplotlib) to identify turbulence zones near filter barriers; 2) Field experiments along the Albatross Beach traverse (Sevastopol) in June-July 2025 at speeds of 0.4 m/s (slow) and 1 m/s (fast); 3) Counting large dinoflagellates *Ceratium tripos* (112-210 µm fraction) in 200 µL samples; 4) Statistical analysis in R (linear and exponential regression, t-test). **Results:** Simulations showed that sharp angles and gaps between barriers cause local turbulence and "push" part of the flow outward. Experiments revealed a linear dependence of *C. tripos* count on distance traveled: $y = 0.1084 \cdot x$ ($R^2 = 0.966$; $p < 10^{-18}$). At traverse lengths > 1 km, morphotype counts reached an asymptote of ~ 16.6 (model: $y = 16.6 \cdot (1 - e^{-0.0053 \cdot x})$). Reducing speed from 1 m/s to 0.4 m/s doubled the specific yield of *C. tripos* (15.2 ± 4.0 vs. 31.4 ± 2.7 ; $p = 2 \times 10^{-5}$). **Conclusions:** Optimal filtration speed (≤ 0.2 – 0.4 m/s) ensures maximum sampling representativeness. The "Bobryonok" design is suitable for rapid coastal monitoring of surface microplankton without vessels. **Key words:** horizontal microplankton sampling, sequential filtration device "Bobryonok", *Ceratium tripos*, numerical simulation, filtration speed, phytoplankton monitoring, Black Sea.