

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 10, № 4
2025**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 10, № 4
2025**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 10, No. 4, 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, №4, 2025

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

В.С. Ключкова, Д.Н. Чернышев, О.С. ЗавьяловаМодель спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* с дополнительным пиком в области 700 нм 241

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

**И.Н. Левченко, В.С. Панкратов, А.И. Бакаева, А.А. Левченко,
Е.В. Машковцева, Е.Ю. Макаренко, А.А. Липенгольц**

Разработка компьютерной программы для автоматизированного анализа научных статей при конструировании лекарственных препаратов..... 245

**И.Н. Левченко, В.С. Панкратов, Г.К. Владимиров, А.А. Левченко,
И.В. Володяев, Ю.А. Владимиров**Исследование структуры кардиолипина, акцильной цепи в составе гетерогенного катализатора активированной кумаринами S_{525} , S_{334} и S_{314} хемилюминесценции под действием цитохрома С с кардиолипином..... 251**А.Д. Дегтяр, М.П. Евстигнеев**

Механический аналог теории коррелированных состояний гидрофобного эффекта в водной среде 256

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Д.И. Медведева, Г.И. Морозова, Ю.П. Рыбаков

К механизму неспецифической стимуляции лимфоцитов: модель реакции тимоцитов на эритропоэтин с участием митохондриального электрокабеля..... 263

Х. Эрнандес Хименес, Э.Х. Кампос Кобос, А. Моралес Марко, Р. Агустин Серрано, Б. Зентено Матео, А.М. Сервантес Тавера, А.А. Эрнандес Сантьяго

Математическое моделирование процессов биоразложения в биореакторе: динамика стадий биопереваривания..... 273

Е.В. Назарьев, Б.А. Мишунин, И.Л. Пластун

Исследование межмолекулярного взаимодействия аминокислотных цепей рецептора и лиганда фактора некроза опухоли..... 277

А.С. Ботин, А.Ю. Аринбасарова, С.С. Антипов, Е.П. Грицай, А.В. Кордова-Торрес

Некоторые возможности синтетической биологии в конструировании новых штаммов микроорганизмов методами генетической инженерии для биотехнологии (миниобзор) ... 283

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ**С.И. Рубцова, Н.А. Андреева**

Санитарно-микробиологическое состояние поверхностных и питьевых вод и современные методы контроля (обзор).....290

Т.Я. Чурилова, Н.А. Моисеева, Е.Ю. Скороход, Т.Ю. Орлова, П.А. Салюк, А.В. Головин, А.С. БучельниковСпектры показателей поглощения света пигментами планктонных одноклеточных водорослей класса *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae*, *Raphidophyceae* и цианобактерий 300**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2025 ГОД.....305**

CONTENTS

Volume 10, No. 4, 2025

GENERAL BIOPHYSICS

V.S. Klochkova, D.N. Chernyshev, O.S. Zavialova

A model of the absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* culture with an additional peak in the 700 nm region 241

MOLECULAR BIOPHYSICS AND BIOINFORMATICS

I.N. Levchenko, V.S. Pankratov, A.I. Bakaeva, A.A. Levchenko,

E.V. Mashkovtseva, E.Yu. Makarenko, A.A. Lipengolts

Development of a computer program for automated analysis of scientific articles in the design of medicinal preparations..... 245

I.N. Levchenko, V.S. Pankratov, G.K. Vladimirov, A.A. Levchenko,

I.V. Volodyaev, Yu.A. Vladimirov

Study of the structure of cardiolipin, acyl chain in the heterogeneous catalyst, activated by coumarins C₅₂₅, C₃₃₄ and C₃₁₄ chemiluminescence under the action of cytochrome C with cardiolipin 251

A.D. Degtyar, M.P. Evstigneev

Mechanical analog of the theory of correlated states for hydrophobic effect in water environment..... 256

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

D.I. Medvedeva, G.I. Morozova, Yu.P. Rybakov

Towards the mechanism of nonspecific stimulation of lymphocytes: a model of thymocyte response to erythropoietin including the mitochondrial electric cable..... 263

H. Hernandez Jimenez, E.J. Campos Cobos, A. Morales Marco, R. Agustin Serrano, B. Zenteno Mateo, A.M. Cervantes Tavera, A.A. Hernandez Santiago

Mathematical modeling of biodegradation processes in a biodigester: biodigestion stages dynamics 273

E.V. Nazarev, B.A. Mishunin, I.L. Plastun

Investigation of the intermolecular interaction between amino acid chains of the tumor necrosis factor receptor and ligand..... 277

A.S. Botin, A.Yu. Arinbasarova, S.S. Antipov, E.P. Gritsai, A.V. Cordova-Torres

Some possibilities of synthetic biology in the construction of new strains of microorganisms by methods of genetic engineering for biotechnology (mini-review) 283

BIOPHYSICAL ECOLOGY**S.I. Rubtsova, N.A. Andreeva**

Sanitary and microbiological condition of surface and drinking water and modern control methods.....290

T.Ya. Churilova, N.A. Moiseeva, E.Yu. Skorokhod, T.Yu. Orlova, P.A. Salyuk, A.V. Golovin, A.S. Buchelnikov

Spectral light absorption coefficients of culture of microalgae belonging to classes bacillariophyceae, dinophyceae, raphidophyceae and cyanobacteria 300

INDEX OF ARTICLES PUBLISHED IN THE JOURNAL FOR 2025 305

МОДЕЛЬ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПИКОМ В ОБЛАСТИ 700 НМ

Клочкова В.С., Чернышев Д.Н., Завьялова О.С.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 05.08.2025

Аннотация. В работе было проведено усовершенствование модели культуры *Porphyridium purpureum*, что позволило более точно описать спектральные характеристики данной микроводоросли и повысить достоверность определения ее пигментного состава. В рамках данной модели был введен дополнительный пик поглощения в области 700 нм, который соответствует пигменту P_{700} , играющему важную роль в процессе фотосинтеза и вносящий вклад в спектр поглощения хлорофилла *a*. Поскольку структура пигмента P_{700} на сегодняшний день остаётся недостаточно изученной, для расчёта его содержания в культуре использовался литературный коэффициент экстинкции, равный 64 mM^{-1} . Этот коэффициент был затем пересчитан в массовый коэффициент экстинкции, который составил $35,8 \text{ л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$, что позволило более точно учитывать вклад P_{700} в спектр поглощения при анализе данных. Кроме того, в модель был добавлен пик в области около 400 нм, который соответствует “жёлтому” веществу — детриту, или растворённому органическому веществу. Результатом этих доработок стала более комплексная модель, которая теперь учитывает концентрацию не только хлорофилла *a* суммарных каротиноидов, В-фикоэритрина, R-фикоцианина и аллофикоцианина, а как же “жёлтого” вещества и пигмента P_{700} . Такой подход позволяет получать более точные оценки биохимического состава культуры *Porphyridium purpureum* по спектроскопическим данным различных условиях культивирования без разрушения клеток микроводоросли.

Ключевые слова: порфиридиум, пигменты, спектр поглощения, моделирование, P_{700} .

ВВЕДЕНИЕ

Красные водоросли, и в особенности культивируемый вид *Porphyridium purpureum*, представляют собой уникальную группу фотосинтезирующих организмов, заслуживающих пристального внимания. Эти одноклеточные эукариоты, населяющие преимущественно морские экосистемы, обладают сложной и высокоэффективной системой сбора световой энергии. Их пигментный состав включает: хлорофилл *a*, характерный для большинства фотосинтетиков, а также фикобилины (фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин) и каротиноиды, определяющие их адаптацию к специфическим условиям освещения [1]. В отличие от хлорофилла, фикобилины не являются компонентами реакционных центров фотосистем. Они организованы в крупные супрамолекулярные структуры, известные как фикобилисомы (ФБС), которые играют ключевую роль в расширении спектра поглощаемого света, эффективно улавливая фотоны в диапазонах, где хлорофилл *a* проявляет слабое поглощение [2]. Таким образом, красные водоросли используют ФБС для более полного использования доступного светового ресурса, оптимизируя процесс фотосинтеза.

Фотосистема I (ФС1) занимает центральное место в преобразовании энергии света в химическую энергию. Реакционный центр ФС1 содержит специализированный пигмент, обозначаемый как P_{700} . Этот сложный комплекс, состоящий из хлорофилла *a* и других пигментов, характеризуется пиком поглощения при длине волны около 700 нм в восстановленном состоянии [3].

Исследование окислительно-восстановительных свойств P_{700} имеет важное значение для оценки активности ФС1 и эффективности использования света в процессе фотосинтеза. Измерение скорости окисления и восстановления P_{700} позволяет получать ценную информацию о функциональном состоянии ФС1 и её роли в общем энергетическом балансе клетки. Более того, изучение P_{700} предоставляет возможность понять механизмы адаптации микроводорослей к меняющимся условиям окружающей среды, таким как интенсивность света, его спектральный состав и другие факторы стресса. Таким образом, исследование P_{700} является важным инструментом для понимания физиологии и экологии красных водорослей.

Из-за низкого содержания P_{700} в клетках для его анализа требуются высокочувствительные методы, которые, в свою очередь, очень время и ресурс затратные. В качестве альтернативы возможно использовать спектрофотометрические способы для оценки концентрации P_{700} . Ранее нами разработана модель разделения спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* [4]. В данной работе модель дополнена пиком в области 700 нм для оценки P_{700} .

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования использовали культуру красной морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross. Спектры записывались на спектрофотометре Shimadzu UV-2600i с интегрирующей сферой. Для определения истинного спектра поглощения использовали подход, предложенный в [5]. Ранее нами разработана модель культуры *Porphyridium purpureum* [4], которая содержит следующие пигменты: хлорофилл *a*, В-фикоэритрин, R-фикоцианин, аллофикоцианин и суммарные каротиноиды.

Спектры поглощения отдельных пигментов состоят из нескольких максимумов, каждый из которых определяется наличием хромофорных групп. Такие отдельные пики имеют симметричную форму распределения, относительно максимума. Это позволяет описать зависимость поглощения пигментов от длины волны в виде суммы спектров гауссиан.

Каждый отдельный пик был описан выражением:

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

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

Аппроксимация спектров поглощения культуры 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

Пример разделения спектра поглощения культуры представлен на рисунке 1.

В опубликованную ранее модель культуры *Porphyridium purpureum* [4] добавлен отдельный пик в области 700 нм, для расчёта концентрации пигмента Π_{700} , также в модель введён пик «жёлтого» вещества, с максимумом поглощения в области 400 нм. Значительным улучшением модели был ввод дополнительных коэффициентов уширения полуширин каждого пигмента, а также сдвиг максимумов поглощения. Так же в общую модель была включена коррекция рассеяния [6].

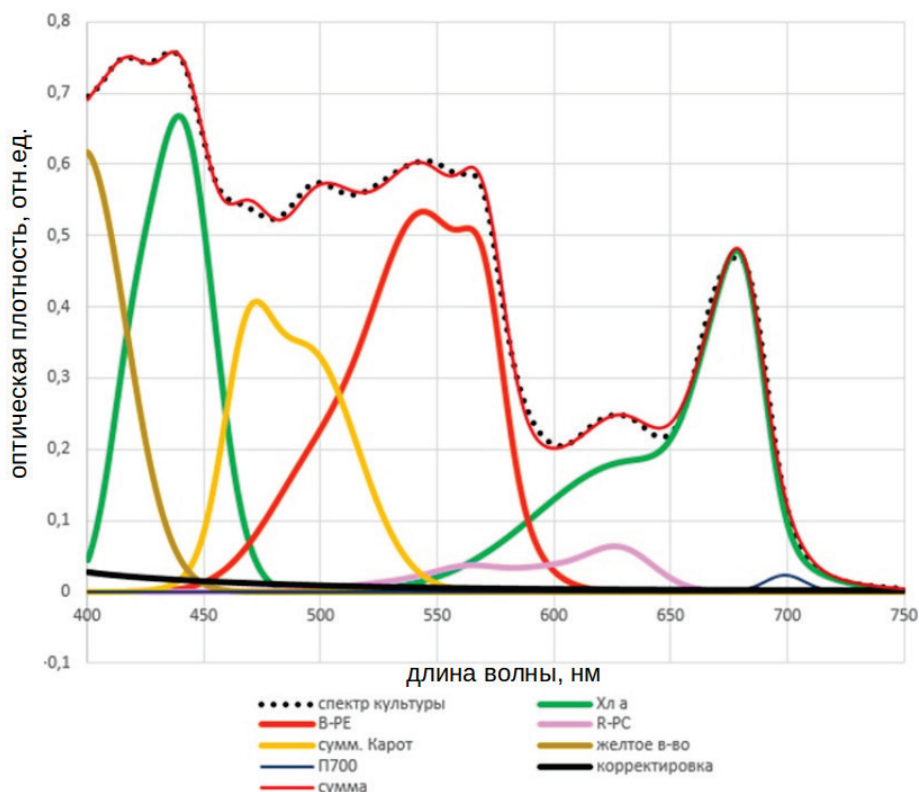


Рисунок 1. Декомпозиция спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum*

Таблица 1. Параметры модели P_{700}

Амплитуда	1
Полуширина	16,11
Максимум поглощения	701,6

Для расчёта концентрации любого пигмента с помощью модели необходимо знать коэффициенты экстинкции. Если для хлорофилла *a*, В-фикоэритрина, R-фикоцианина, аллофикоцианина и суммарных каротиноидов это известные величины [7,8], так как известна их химическая структура, то для P_{700} такой информации нет. Некоторые исследования показывают, что пигмент P_{700} имеет сложное строение, которое до сих пор не до конца не изучено, и может состоять из двух молекул хлорофилла *a* [9]. В работе [10] показано, что молярный коэффициент экстинкции P_{700} составляет 64 л моль⁻¹ см⁻¹ на 700 нм (или 64000 л моль⁻¹ см⁻¹). Исходя из вышесказанного, можно рассчитать молекулярную массу P_{700} , которая составляет 1787 г моль⁻¹. Учитывая это, получим массовый коэффициент экстинкции P_{700} , который равен 64000 / 1787 = 35,8 л г⁻¹ см⁻¹. Параметры модели P_{700} показаны в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модель была усовершенствована путём добавления пика для P_{700} , корректировки параметров пиков отдельных пигментов и включения компонентов, учитывающей рассеяния. Важно отметить, что используются стандартные коэффициенты экстинкции для каждого пигмента. Разработанная модель позволяет оценить содержание P_{700} , не используя сложных методов для разрушения клеток и вмешиваний в процессы роста культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum*. В дальнейшем будет возможно исследовать динамику P_{700} или соотношение хлорофилл *a*/ P_{700} при различных условиях культивирования.

Список литературы / References:

1. Шкреблик У.Д., Дмитриович Н.П. Накопление основных пигментов в клетках водоросли *Porphyridium purpureum* в зависимости от условий культивирования. *Инновационные технологии в промышленности и образовании: материалы I международной научной конференции*. Пинск: Изд-во ПолесГУ, 2023, с. 390-392 [Shkrebluk U.D., Dmitrovich N.P. Accumulation of basic pigments in the cells of *Porphyridium purpureum* algae depending on cultivation conditions. *Innovative technologies in industry and education: proceedings of the First International Scientific Conference*. Pinsk: PolesSU Publishing House, 2023, pp. 390-392 (In Russ.)].
2. Voerman S.E., Ruseckas A., Turnbull G.A., Samuel I.D.W., Burdett H.L. Red algae acclimate to low light by modifying phycobilisome composition to maintain efficient light harvesting. *BMC Biol*, 2022, vol. 20, DOI: 10.1186/s12915-022-01480-3.
3. Ильина М.Д., Борисов А.Ю. Фотоокисление P700 в препаратах фотосистемы 1 с разным содержанием антенного хлорофилла *a*. *Биохимия*, 1982, т. 47, вып. 12, с. 1954-1962 [Ilyina M.D., Borisov A.Yu. Photooxidation of P700 in photosystem 1 preparations with different levels of antenna chlorophyll A. *Biochemistry*, 1982, vol. 47, iss. 12, pp. 1954-1962 (In Russ.)].
4. 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 (In Russ.)].
5. Ключкова 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.)].
6. 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.
7. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *UNESCO*, 1997, 661 p.
8. Стадничук И.Н. *Фикобилипротеины*. М.: ВИНТИ, 1990, 193 с. [Stadnichuk I.N. *Phycobiliproteins*. Moscow: VINITI, 1990, 193 p. (In Russ.)].

9. Rutherford A.W., Heathcote P. Primary photochemistry in photosystem-I. *Photosynthesis research*, 1985, vol. 6., no. 4, pp. 295-316.
10. Clement-Metral J.D., Gantt E., Redlinger T. A photosystem II-phytyl preparation from the red alga, *Porphyridium cruentum*: oxygen evolution, ultrastructure, and polypeptide resolution. *Arch Biochem Biophys*, 1985, p. 10-17, DOI: 10.1016/0003-9861(85)90135-3.

A MODEL OF THE ABSORPTION SPECTRUM OF PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM CULTURE WITH AN ADDITIONAL PEAK IN THE 700 NM REGION

Klochkova V.S., Chernyshev D.N., Zavialova O.S.

Sevastopol State University

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

Received 05.08.2025

Abstract. In this work, the model of *Porphyridium purpureum* culture was improved, which made it possible to describe the spectral characteristics of this microalga more accurately and increase the reliability of determining its pigment composition. Within the framework of this model, an additional absorption peak in the region of 700 nm was introduced, which corresponds to the pigment P_{700} , which plays an important role in the process of photosynthesis and contributes to the absorption spectrum of chlorophyll *a*. Since the structure of the pigment P_{700} remains insufficiently studied to date, the literature extinction coefficient of 64 mM^{-1} was used to calculate its content in the culture. This coefficient was then recalculated into the mass extinction coefficient, which was $35.8 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, which made it possible to more accurately take into account the contribution of P_{700} to the absorption spectrum when analyzing the data. In addition, a peak in the region of about 400 nm was added to the model, which corresponds to the “yellow” substance – detritus, or dissolved organic matter. The result of these improvements was a more comprehensive model, which now takes into account the concentration of not only chlorophyll but also total carotenoids, B-phycoerythrin, R-phyocyanin and allophyocyanin, as well as the “yellow” substance and pigment P_{700} . This approach allows obtaining more accurate estimates of the biochemical composition of the *Porphyridium purpureum* culture based on spectroscopic data under various cultivation conditions without destroying the microalgae cells.

Key words: *Porphyridium*, pigments, absorption spectrum, modeling, P_{700} .

РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ ДЛЯ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА НАУЧНЫХ СТАТЕЙ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Левченко И.Н.^{1,4}, Панкратов В.С.², Бакаева А.И.¹, Левченко А.А.³, Машковцева Е.В.¹, Макаренко Е.Ю.¹, Липенгольц А.А.⁵

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
ул. Островитянова, д. 1, стр. 8, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

² Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана
ул. 2-я Бауманская ул., д.5, стр.1; г. Москва, 105005, РФ

³ Пермский национальный исследовательский политехнический университет
Комсомольский пр., 29; г. Пермь, 614990, РФ

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Колмогорова, д. 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ

⁵ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
Каширское шоссе, д. 23, г. Москва, 115522, РФ

Поступила в редакцию 15.08.2025

Аннотация. Разработана и апробирована программа для автоматизированного поиска показателей токсичности при анализе научных статей по необходимым параметрам радиофармпрепаратов при конструировании лекарственных средств. Поиск соединений, которые будут использоваться для моделирования (75%; 8994 химических вещества) и валидации (25%; 2895 химических веществ) по необходимым параметрам осуществлялся в виде заданий автоматического анализа текста, поиска и оптимизации информации из научных статей в интернете, которые определялись по DOI. Нужные параметры токсичности предполагались заданными и описанными в уже опубликованных научных статьях, которые есть в открытом доступе. В итоге все найденные параметры токсичности в статьях вносились в таблицу автоматически при помощи этой же обученной нами нейросети, которая не только указывала все параметры токсичности радиофармпрепаратов подразделяя на классы, но и вносила название статьи и ее авторов.

Ключевые слова: Датасет, Программный продукт, Радиофармпрепараты, показатели токсичности, автоматический поиск, нейросеть

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные для формирования датасета. Для построения и обучения модели прогнозирования токсичности использовался открытый датасет, загруженный с платформы TOXRIC (Toxicity Reference Integrated Compilation) [1,2].

В рамках данной работы для обучения модели был выбран поднабор данных, содержащий информацию об острой системной токсичности при внутрибрюшинном введении у крыс с указанием значения LD50. Этот маршрут введения широко применяется в доклинических исследованиях и обеспечивает быстрое системное распределение вещества.

Каждая запись в выбранном поднаборе включала следующие параметры [3]:

1. Уникальный идентификатор соединения.
2. Название соединения.
3. Идентификатор из номенклатуры Международного союза теоретической и прикладной химии.
4. Идентификатор соединения из базы PubChem.
5. Международный текстовый химический идентификатор.
6. Химическая структура соединения в виде SMILES-формата
7. Значение LD50 (в мг/кг массы тела)

Список радиофармпрепаратов был сформирован вручную на основе поиска в базе PubChem [4], где с использованием ключевых слов, таких как:

- “radiopharmaceutical”,
- “PET tracer”,
- “theranostic agent”
- и названий радионуклидов (например, ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, ²²⁵Ac)

были отобраны соединения, относящиеся к диагностическим и терапевтическим агентам, применяемым в ядерной медицине. Поиск проводился среди зарегистрированных веществ с известной структурой [5,6].

Сведения о токсичности радиофармпрепаратов [7] (включая значение LD, вид животного, способ введения и молекулярную структуру) извлекались вручную из публикаций в рецензируемых журналах, индексируемых в базах PubMed, Scopus, Google Scholar и Web of Science [8].

Для извлечения использовались поисковые запросы вида:

- “LD50 AND [название радиофармпрепарата]”,
- “acute toxicity of [название радиофармпрепарата] in rat”,
- “preclinical evaluation of [название радиофармпрепарата]”

и аналогичные.

Химические структуры радиофармпрепаратов (SMILES или InChI) были получены через поисковые системы PubChem, DrugBank, ChEMBL[9,7].

Данные для проверки результатов работы программного продукта. Отбор веществ проходил по следующим критериям:

1. Известная структура вещества.
2. Рассчитан показатель LD50 для различных видов животных и путей введения.
3. Большое количество научных публикаций по исследованию препарата.

Методы структуризации и формализации данных. Список использованных методов:

1. Нормализация параметров - процесс приведения разноформатных, разнородных и неунифицированных числовых и категориальных значений к единому стандарту, обеспечивающему их корректное использование в анализе, машинном обучении и моделировании [10].
2. Логическая формализация - процесс приведения исходной информации (как числовой, так и категориальной) к однозначной логической структуре, позволяющей использовать данные в логических выводах, правилах, экспертных системах и моделях принятия решений [11]

Поиск слов по тексту. Регулярные выражения. Регулярные выражения представляют собой формальный язык, предназначенный для описания и поиска шаблонов в строковых данных. Регулярные выражения поддерживаются большинством языков программирования (Python, Perl, Java, R, JavaScript и др.), а также реализованы в инструментах UNIX/Linux (grep, sed, awk) [12] и специализированных библиотеках. Они позволяют находить как простые текстовые совпадения, так и более сложные конструкции: числовые значения, даты, наименования, сокращения, медицинские термины и т.д.

Каждое регулярное выражение состоит из последовательности символов, часть из которых – литералы, а часть – метасимволы, задающие логику сопоставления. Структура регулярного выражения может включать простые элементы (например, символы алфавита) и сложные конструкции (например, группы, квантификаторы, классы символов и логические операторы).

1. Литералы. Литералы - это обычные символы, которые соответствуют самим себе. Например, шаблон “rat” соответствует только строке “rat”.
2. Классы символов. Классы символов используются для указания набора допустимых символов в позиции:
 - [abc] - соответствует символу a, b или c;
 - [a-z] - соответствует любой строчной букве латиницы;

Таблица 1. Список предоставленных для проверки радиофармпрепаратов

Название вещества (рус)	Название вещества (англ)	Торговое название	CAS
Борфенилаланин (БФА) L-пара-боронофенилаланин	Boron phenylalanine (BPA) Boronphenylalanine Boronophenylalanine 4-Borono-L-phenylalanine	Стеборонин Steboronin Steboronine Borofaran	76410-58-7
Боркаптат натрия Меркапто-клозо-додекаборат Меркаптододекаборат Тиол-додекаборат	Borocaptate sodium Sodium mercaptododecaborate	-	12448-24-7
Гадодиамид	Gadodiamide	Омнискан Omniscan	122795-43-1 131410-48-5
Гадобутрол	Gadobutrol	Гадовист Gadovist	770691-21-9
Гадоксетовая кислота Гадоксетат динатрия	Gadoxetic acid Gadoxetate Gadoxetate disodium Gd-EOB-DTPA Acidum gadoxeticum	Примовист Primovist	135326-11-3

- $[\wedge 0-9]$ - отрицание: любой символ, кроме цифр

Также существуют предопределенные классы:

- $\backslash d$ - любая цифра;
- $\backslash w$ - любая буква, цифра или подчеркивание;
- $\backslash s$ - пробельный символ (включая пробел, табуляцию и перевод строки).

3. Квантификаторы. Квантификаторы указывают, сколько раз должен повторяться элемент:

- $*$ - 0 или более раз;
- $+$ - 1 или более раз;
- $?$ - 0 или 1 раз;
- $\{n\}$ - ровно n повторений;
- $\{n,\}$ - не менее n повторений;
- $\{n,m\}$ - от n до m повторений.

4. Группировка и подвыражения. Скобки $()$ используются для группировки частей выражения или создания подшаблонов. Это необходимо, если квантификатор или логическая операция должны применяться к целой группе символов.

5. Логическая операция ИЛИ. Символ $|$ обозначает логическую операцию ИЛИ, позволяя указать альтернативы.

6. Границы строки или слова:

- $^$ - начало строки;
- $\$$ - конец строки;
- $\backslash b$ - граница слова (например, перед или после пробела/знака препинания);
- $\backslash B$ - не граница слова.

Методы QSAR-моделирования. Согласованный случайный лес /случайный лес в регрессии.

Согласованный случайный лес – это модификация классического случайного леса, направленная на получение теоретических гарантий сходимости оценок к истинной функции регрессии при росте объема данных [6]. Для достижения согласованности в алгоритме случайного леса могут использоваться:

- Оптимизация параметров роста деревьев (например, максимальная глубина, минимальное количество объектов в листе);
- Более строгие правила выбора разбиений и контроль сложности дерева;
- Использование специализированных процедур усреднения и отбора подвыборок.

Для этих методов структурные отпечатки пальцев для конкретных соединений рассчитываются с помощью инструментария Индиго, разработанного КНАЙМ [13].

Идентификаторы молекул считались в каждом соединении программным обеспечением ДРАГОН [14,16].

Метод количественного соотношения структура–активность на основе искусственного интеллекта.

Это современный подход к построению моделей количественного соотношения структура–активность с использованием методов искусственного интеллекта (ИИ), включая машинное обучение и глубокое обучение [4].

В основе метода лежит предположение, что свойства и биологическая активность молекул тесно связаны с их структурной близостью, поэтому анализ сходных соединений позволяет получить более релевантные и интерпретируемые модели.

Рабочий процесс метода количественного соотношения структура–активность на основе искусственного интеллекта. Для выбора структурно схожих соединений использовался коэффициент Танимото, рассчитываемый на основе сравнения молекулярных отпечатков пальцев «PubChem» и «Extended». Такой подход реализован в R-пакете “rcdk” [6,16].

При формировании локальных групп для построения моделей было выбрано от минимум 20 до максимум 50 ближайших по сходству соединений. В первую очередь отбирались комплексы соединений, соответствующие определенным пороговым значениям коэффициентов Танимото: для отпечатков «PubChem» – не менее 0,800, а для «Extended» – не менее 0,700. Если по этим критериям число соединений было недостаточным, применялся дополнительный анализ ранжирования.

Для построения математических моделей применялись различные алгоритмы, реализованные в R-пакете “caret”. Каждая локальная модель строилась на подмножестве соседних структур и использовалась для прогнозирования свойств конкретного целевого соединения.

Результаты прогнозов объединялись в единое значение для каждого соединения. В случае регрессии итоговым прогнозом становилось среднее значение предсказаний от всех моделей. При этом исключались прогнозы, выходящие за пределы экспериментального диапазона обучающего набора более чем на 10%. Для классификационных задач применялся метод большинства голосов. В случае равного количества голосов предпочтение отдавалось классу, менее представленному в обучающем наборе. Идентификаторы молекул считывались при помощи ПО ДРАГОН.

Случайный лес с настройкой гиперпараметров. Для достижения максимальной эффективности модели случайного леса важна правильная настройка её гиперпараметров – параметров, которые задаются до обучения и не меняются во время построения модели. Ключевыми гиперпараметрами случайного леса являются:

- Количество деревьев – число деревьев в ансамбле. Увеличение этого параметра обычно улучшает качество модели, но увеличивает вычислительные затраты.

- Максимальная глубина дерева – ограничивает глубину каждого дерева, что помогает контролировать переобучение.
- Минимальное количество объектов в листе – задает минимальное число примеров, необходимых для формирования листового узла.
- Максимальное количество признаков для разбиения – определяет число случайно выбираемых признаков при выборе оптимального разбиения в узле.

Для моделирования использовались данные из всего тестового набора.

Расчет эффективности моделей для прогнозирования единичной точки LD50. Для количественной оценки точности регрессионных моделей, построенных в рамках подхода QSAR, применялись стандартные статистические метрики:

1. Коэффициент детерминации (R^2)

Коэффициент детерминации характеризует долю дисперсии экспериментальных данных. Он определяется по формуле:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (1)$$

где:

y_i - Истинные значения LD₅₀,

$\hat{y}_i$ - предсказанные моделью значения

$\bar{y}$ - среднее значение по всем наблюдениям

n – число наблюдений

Значение коэффициента детерминации варьируется от 0 до 1, где 1 означает идеальное соответствие модели и данных, а 0 – полное отсутствие объясняющей способности. R^2 показывает, насколько хорошо модель «подгоняет» данные, но может быть завышен при наличии переобучения.

2. Средняя абсолютная ошибка

Это среднее арифметическое абсолютных отклонений предсказанных значений от фактических. Формула:

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i| \quad (2)$$

Показатель средней абсолютной ошибки выражается в тех же единицах, что и предсказываемая величина (в нашем случае – мг/кг) и дает представление о среднем масштабе ошибок модели, без акцента на их знак или величину квадрата.

3. Среднеквадратичная ошибка

Это корень из средней суммы квадратов ошибок. Формула:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3)$$

Данный показатель более чувствителен к выбросам, чем средняя абсолютная ошибка, поскольку квадрат отклонения увеличивает вклад больших ошибок. Он позволяет выявить случаи, когда модель существенно промахивается при предсказании отдельных соединений.

4. Процент данных в пределах области применимости модели (%AD)

Процент объектов в области применимости (%AD) отражает долю химических соединений, для которых модель формально считается применимой. Расчёт области применимости основан на расстоянии между вектором дескрипторов изучаемого соединения и распределением обучающей выборки. Если соединение выходит за пределы допустимого пространства признаков, оно считается вне области применимости, и его предсказание не может быть интерпретировано с высокой достоверностью.

Формула:

$$\%AD = \frac{n_{\text{внутри}}}{n_{\text{всего}}} \cdot 100\% \quad (4)$$

Данный показатель особенно важен в контексте оценки моделей QSAR, поскольку надёжными считаются только те предсказания, которые находятся в пределах области применимости модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате для нейросети был выделен формализм записи параметра, встречающийся в большинстве статей с упоминаниями значения LD50.

1. Стандартное обозначение – LD50, полное обозначение – median lethal dose или lethal dose 50.

2. Величина и единицы измерения: единицы измерения – mg/kg, mcg/kg, g/kg; числовое значение может быть представлено в виде целого числа, числа с десятичной точкой, числа с разделителем «запятая», диапазона значений.

3. Путь введения вещества: oral, intraperitoneal (i.p.), subcutaneous (s.c.), intravenous (i.v.).

4. Вид животного и его характеристики: генетическая линия, иногда также указывается пол и возраст.

Для эффективной работы программы и создания архитектуры системы был разработан алгоритм для сбора данных о параметре LD50 из научных статей.

1. Ввод пользователем исходных параметров

Алгоритм работы нейросети начинается с того, что пользователь вводит наименование вещества или препарата, по которому необходимо получить токсикологические данные. Кроме названия вещества, указывается также целевой параметр – в данном случае это LD50.

2. Поиск научных публикаций

На этом этапе нейросеть формирует поисковый запрос и обращается к научным базам данных, таким как PubMed, Semantic Scholar, Europe PMC или CrossRef. Запрос формируется таким образом, чтобы извлекались только те публикации, в названии или аннотации которых упоминается заданное вещество. Это позволяет сразу отсеять явно нерелевантные источники и сосредоточиться на научной литературе, в которой с высокой вероятностью может быть указано интересующее значение.

3. Фильтрация и проверка достоверности источников

После того как программа получает список статей, начинается этап проверки достоверности источников. Основным критерием здесь служит наличие уникального идентификатора публикации - DOI (Digital Object Identifier). Если статья не имеет DOI, она автоматически исключается из дальнейшего анализа. Наличие DOI подтверждает, что статья была опубликована в научном издании и прошла хотя бы минимальную редакционную или рецензионную обработку.

Поиск DOI реализован через регулярное выражение. Паттерны для поиска: `r"(doi|DOI)\s\d+"` и `r"\S+(doi|DOI)\S+\S+"`.

4. Извлечение текста статьи и поиск целевого параметра

Если источник прошёл проверку, программа переходит к этапу извлечения текста. При наличии открытого доступа к полному тексту публикации нейросеть анализирует именно его. Если доступ к полному тексту отсутствует, она работает с аннотацией. С помощью методов обработки естественного языка (NLP) и регулярных выражений нейросеть обрабатывает текст и ищет фрагменты, содержащие значение LD50. Параметр обычно выражается как числовое значение с единицами измерения – чаще всего в миллиграммах или граммах на килограмм массы тела.

Для повышения точности извлекаемых данных программа была обучена на “положительных” и “отрицательных” примерах отображения параметра LD50 в тексте.

1. Варианты “положительных” примеров:

- LD50 oral in rats: 500 mg/kg,
- The lethal dose (LD50) was 250 mg/kg,
- LD50 value is 350-400 mg/kg in mice,
- Median lethal dose: 50 g/kg body weight.

2. Варианты “отрицательных” примеров:

- The chemical formula is C₆H₁₂O₆,
- CAS number: 50-78-2,
- Molecular weight: 180.16 g/mol,
- This compound is soluble in water.

5. Валидация параметра.

После того как потенциальные значения LD50 найдены, проводится их валидация. Кроме самого значения, нейросеть может извлечь дополнительную информацию, такую как вид животного, на котором проводилось исследование (например, крысы или мыши), путь введения вещества (оральный, внутривенный и т. д.), а также название статьи и ее авторов.

6. Запись результата в базу данных

В случае успешного извлечения параметра, нейросеть переходит к этапу структурирования и сохранения данных. Результаты записываются в таблицу базы данных. Каждая запись содержит наименование вещества, числовое значение LD50 с единицей измерения, вид животного, путь введения, DOI источника, название статьи и, при необходимости, текстовый фрагмент, откуда было извлечено значение. Это позволяет в будущем не только быстро находить нужные данные, но и при необходимости вернуться к первоисточнику для перепроверки.

Для проверки работоспособности нейросети была протестирована на списке из 5 наиболее известных радиофармпрепаратов. Заданные целевые параметры для поиска: значение LD50 (mg/kg), источник информации (Source), тип животного (Animal), путь введения препарата (Route).

ВЫВОДЫ

Решение нашей задачи по автоматизации было необходимо для снятия существенного ограничения машинных систем – способности функционировать только в узкой предметной фармацевтической области. Облегчив при этом работу поиска параметров токсичности радиофармпрепаратов.

Список литературы / References:

1. Walum E. Acute oral toxicity. *Environ Health Perspect*, 1998, vol. 106, suppl. 2, p. 497.
2. Ruiz P., Begluitti G., Tincher T., Wheeler J., Mumtaz M. Prediction of acute mammalian toxicity using QSAR methods: a case study of sulfur mustard and its breakdown products. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 8, pp. 8982-9001.

3. Goldman L.R. *Chapter 17: toxic chemicals and pesticides*. In: Dernbach JC (ed) *Stumbling toward sustainability*. Environmental Law Institute, Washington, D.C, 2002.
4. Devillers J. Prediction of mammalian toxicity of organophosphorus pesticides from QSTR modeling. *SAR QSAR Environ Res*, 2004, vol. 15, no. 5-6, pp. 501-510.
5. Kennedy G.L. Jr., Graepel G.J. Acute toxicity in the rat following either oral or inhalation exposure. *Toxicol Lett*, 1991, vol. 56, no. 3, pp. 317-326.
6. Devillers J., Devillers H. Prediction of acute mammalian toxicity from QSARs and interspecies correlations. *SAR QSAR Environ Res*, 2009, vol. 20, no. 5-6, pp. 467-500.
7. Tsakovska I., Lessigiarska I., Netzeva T., Worth A.P. A mini review of mammalian toxicity (Q) SAR models. *QSAR Comb Sci*, 2008, vol. 27, no. 1, pp. 41-48.
8. Balls M. Why modification of the LD50 test will not be enough. *Lab Anim*, 1991, vol. 25, no. 3, pp. 198-206.
9. *OECD Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4*. OECD Publishing, Paris, 2008.
10. Lu F., Kacew S. *Basic toxicology*. Fundamentals, target organs, and risk assessment. Taylor & Francis, New York, 2002.
11. European Community. *Fifth report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union*. COMM, 675 final, European Community, Brussels, 2007.
12. Worth A.P., Bassan A., De Bruijn J., Gallegos Saliner A., Netzeva T., Pavan M., Patlewicz G., Tsakovska I., Eisenreich S. The role of the European Chemicals Bureau in promoting the regulatory use of (Q) SAR methods. *SAR QSAR Environ Res*, 2007, vol. 18, no. 1-2, pp. 111-125.
13. Schrage A., Hempel K., Schulz M., Kolle S.N., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data. *Alt Lab Anim*, 2011, vol. 39, no. 3, p. 273.
14. Hengstler J.G., Foth H., Kahl R., Kramer P.J., Lilienblum W., Schulz T., Schweinfurth H. The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicology*, 2006, vol. 220, no. 2-3, pp. 232-239.
15. Fiedler H., Hutzinger O., Giesy J.P. Utility of the QSAR modeling system for predicting the toxicity of substances on the European inventory of existing commercial chemicals. *Toxicol Environ Chem*, 1990, vol. 28, no. 2-3, pp. 167-188.
16. Gonella D.R., Manganelli S., Esposito A., Roncaglioni A., Manganaro A., Benfenati E. Comparison of in silico tools for evaluating rat oral acute toxicity. *SAR QSAR Environ Res*, 2015, vol. 26, no. 1, pp. 1-27.

DEVELOPMENT OF A COMPUTER PROGRAM FOR AUTOMATED ANALYSIS OF SCIENTIFIC ARTICLES IN THE DESIGN OF MEDICINAL PREPARATIONS

Levchenko I.N.^{1,4}, Pankratov V.S.², Bakaeva A.I.¹, Levchenko A.A.³, Mashkovtseva E.V.¹, Makarenko E.Yu.¹,
Lipengolts A.A.⁵

¹ Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovityanova str. 1/8, Moscow, 117997, Russia; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

² Moscow State Technical University named after N.E. Bauman
2nd Baumanskaya str. 5/1, Moscow, 105005, Russia

³ Perm National Research Polytechnic University
Komsomolsky ave., 29, Perm, 614990, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University
Kolmogorova str. 1/2, Moscow, 119234, Russia

⁵ Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of
Health of the Russian Federation

Kashirskoe ave., 23, Moscow, 115522, Russia

Received 15.08.2025

Abstract. A program has been developed and tested for automated search of toxicity indicators when analyzing scientific articles on the necessary parameters of radiopharmaceuticals when designing medicines. The search for compounds to be used for modeling (75%; 8994 chemicals) and validation (25%; 2895 chemicals) according to the required parameters was carried out in the form of tasks of automatic text analysis, search and optimization of information from scientific articles on the Internet, which were determined by DOI. The required toxicity parameters were assumed to be specified and described in already published scientific articles that are publicly available. As a result, all toxicity parameters found in the articles were entered into the table automatically using the same neural network we trained, which not only indicated all the toxicity parameters of radiopharmaceuticals by dividing them into classes, but also entered the title of the article and its authors.

Key words: Dataset, Software product, Radiopharmaceuticals, toxicity indicators, automatic search, neural network

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КАРДИОЛИПИНА, АКЦИЛЬНОЙ ЦЕПИ В СОСТАВЕ ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗАТОРА АКТИВИРОВАННОЙ КУМАРИНАМИ C_{525} , C_{334} и C_{314} ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИТОХРОМА C С КАРДИОЛИПИНОМ

Левченко И.Н.^{1,5}, Панкратов В.С.², Владимиров Г.К.³, Левченко А.А.⁴, Володяев И.В.⁵, Владимиров Ю.А.⁵

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
ул. Островитянова д. 1, стр. 8, г. Москва, 117997, РФ; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

² Московский государственный технический университет им. Н. Э. Баумана
ул. 2-я Бауманская ул., д.5, стр.1; г. Москва, 105005, РФ

³ Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
ул. Трубецкая 8, г. Москва 119192, РФ

⁴ Пермский национальный исследовательский политехнический Университет
Комсомольский пр., 29; г. Пермь, 614990, РФ

⁵ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
ул. Колмогорова 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ

Поступила в редакцию 15.08.2025

Аннотация. Применение сенсibilизаторов, который являются физическими активаторами процессов химических реакций на клеточном уровне, способствует усилению интенсивности свечения самой клетки на 2–3 порядка выше, не оказывая прямого влияния на любые химические процессы, проходящие в системе химических реакций внутри нами выбранной случайным образом клетки. Рассмотренные нами в работе сенсibilизаторы, которые являются физическими активаторами краситель-кумарин C_{525} , краситель-кумарин C_{314} и краситель-кумарин C_{334} перехватывают возбуждение у триплетное-возбужденных кетонов образующихся во время перераспределения гидропероксильных или пероксильных радикалов, описываемых механизмом Рассела, имеют основные характеристики, параметры и свойства флуоресцентных зондов. Нам получены и представлены к рассмотрению в нашей статье следующие результаты: 1) Математическое моделирование димерной структуры кардиолипина в составе каталитического комплекса гетерогенного катализатора цитохрома C с кардиолипином в присутствии сенсibilизаторов физического активатора красителя имеющего природную основу кумарина C_{314} и физического активатора красителя имеющего природную основу кумарина C_{334} и физического активатора красителя имеющего природную основу кумарина C_{525} 2) Выявление особенностей одной из четырех ацильных цепей каталитического комплекса гетерогенного катализатора цитохрома C с кардиолипином. 3) Уточнение всех общих и локальных параметров протонной ловушки, которой является кардиолипин в составе каталитического комплекса гетерогенного катализатора цитохрома C с кардиолипином.

Ключевые слова: хемилюминесценция, сенсibilизаторы, цитохром C , кардиолипин, акцильная цепь, протонная ловушка, природный краситель, кумарин C_{525} , кумарин C_{314} , кумарин C_{334} .

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром C – значимый элемент дыхательной цепи митохондрий, переносящий электроны с комплекса 3 на комплекс 4, отличный антиоксидант [1] и один из главных биорегуляторов апоптоза по митохондриальному пути [2], участвующий в нижеперечисленной системе процессов:

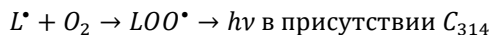
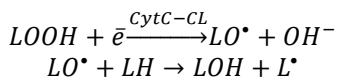
- образование комплекса цитохрома C с кардиолипином внутренних мембран митохондрий; приобретение им ферментативной активности [3];
- активация процессов перекисного окисления липидов мембран за счет ферментативной активности цитохрома C и кардиолипина;
- эволюция состояния и проницаемости митохондриальных мембран за счет процессов перекисного окисления липидов; образование крупных пор; набухание матрикса митохондрий [4];
- выходы комплекса цитохрома C и кардиолипина в цитоплазму. Это приводит к активации каскада ферментативных реакций, что заканчивается апоптозом [5,6].

Образование комплекса цитохрома C и кардиолипина и приобретение им ферментативной активности рассмотрены в работах [7,8].

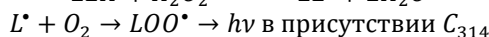
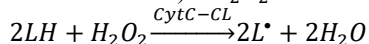
Комплекс образует наночастицы диаметром 8–11 нм, которые освобождаются центрифугированием, имеют стандартный размер и структуру, а также является гетерогенным катализатором.

Наша группа изучила и описала образование липидных радикалов в двух реакциях, катализируемых $CytC$ – CL в присутствии C_{314} :

1. Восстановление гидроперекисей липидов ($LOOH$) содержащиеся в природных CL :

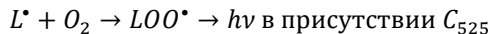
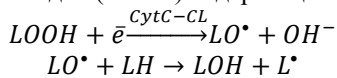


2. CL пероксидазные реакции (обозначается как LH) с H_2O_2 :

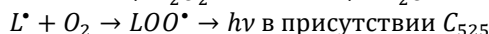
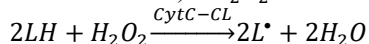


Аналогично, при C_{525} :

1. Восстановление гидроперекисей липидов (LOOH) содержащиеся в природных CL:

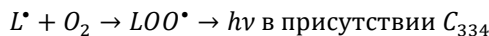
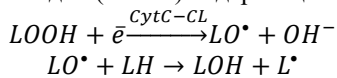


2. CL пероксидазные реакции (обозначается как LH) с H_2O_2 :

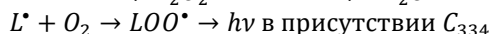
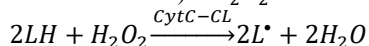


Аналогично, при C_{334} :

1. Восстановление гидроперекисей липидов (LOOH) содержащиеся в природных CL:



2. CL пероксидазные реакции (обозначается как LH) с H_2O_2 :



Опубликованные научные статьи говорят нам о следующих описанных результатах:

- появление лиофобных нано частиц конкретной формы с определенной пропорцией показателя численности каталитического комплекса, показывающей процесс возникновения изучаемого нами катализатора, который имеет уточненную по размерам форму и структурные особенности [9];

- наличие изменения конформаций самого ЦитохромаС пропорционально нативной форме ,т.к размеры его гранулы увеличиваются внутри каталитического комплекса, дистанцирование гма от остатков тирозина и триптофана , распад связей $Fe(heme)-S(Met80)$; увеличение достигаемости гема для молекул малых размеров,которое необходимо при течении изучаемых липопероксидазной и липоксигеназной реакций [2].

Наша статья о моделировании димерного строения кардиолипина с связке с ЦитохромомС, детализация особенности одной из четырех ацильных цепей кардиолипина в каталитическом комплексе в процессе ПОЛ в присутствии изучаемых нами природных сенсibilizаторов кумарина C_{314} и кумарина C_{334} ,и кумарина C_{525} ,и параметров кардиолипина, который является протонной ловушкой. Построение строго обозначенной в процессе моделирования модели с точки зрения математики дает нам возможность воспользоваться методикой ХЛ одновременно с методикой МД для выверенного анализа как структур, так и размера каталитического комплекса и при этом решения поставленной задачи, что даст нам возможности в дальнейшем изучить все его функциональные особенности при разных краевых параметрах.

Процессы перекисного окисления липидов включают в себя десятки различных реакций, группирующиеся в стадии иницирования, продолжения, разветвления цепи и ее обрыва. Спонтанная хемилюминесценция сопровождает реакции рекомбинации перекисных радикалов и некоторые другие, более специфические процессы с их участием. Использование физических активаторов, таких как кумарин C_{525} так же, как кумарин C_{314} или как кумарин C_{334} позволяет усилить это свечение на 2–3 порядка без изменения химических процессов, протекающих в системе.

Природный краситель кумарин C_{525} , так же как природный краситель C_{314} или как природный краситель C_{334} перехватывает возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов по механизму Рассела и, при этом, имеет квантовые выходы хемилюминесценции на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны [1]. Таким образом, хемилюминесценция, активированная природным красителем кумарином C_{525} , так же как и при природном красителе кумарине C_{314} или при природном красителе кумарине C_{334} имеет интенсивность выше, чем спонтанная хемилюминесценция липидов, но при этом не отличается от нее по кинетическим кривым в математической модели эталонов и, соответственно, может быть использована при моделировании димерной структуры кардиолипина в составе катализатора в окружении кумаринов C_{314} или C_{525} или C_{334} при выявлении особенностей ацильной цепи и уточнении параметров протонной ловушки.

Надежность решения определялась наличием кардиолипина для стабилизации pH, гашением Fe^{2+} и наличием физических активаторов кумарина C_{525} или кумарина C_{314} , а так же кумарина C_{334} . Среди факторов, которые могут искажать значение, можно выделить не достаточное добавление пероксида водорода [10], избыточное количество азота (II) [11], метанола, денатурация белка [6,7], изменение конформации цитохрома С в комплексе цитохрома С и кардиолипина [12].

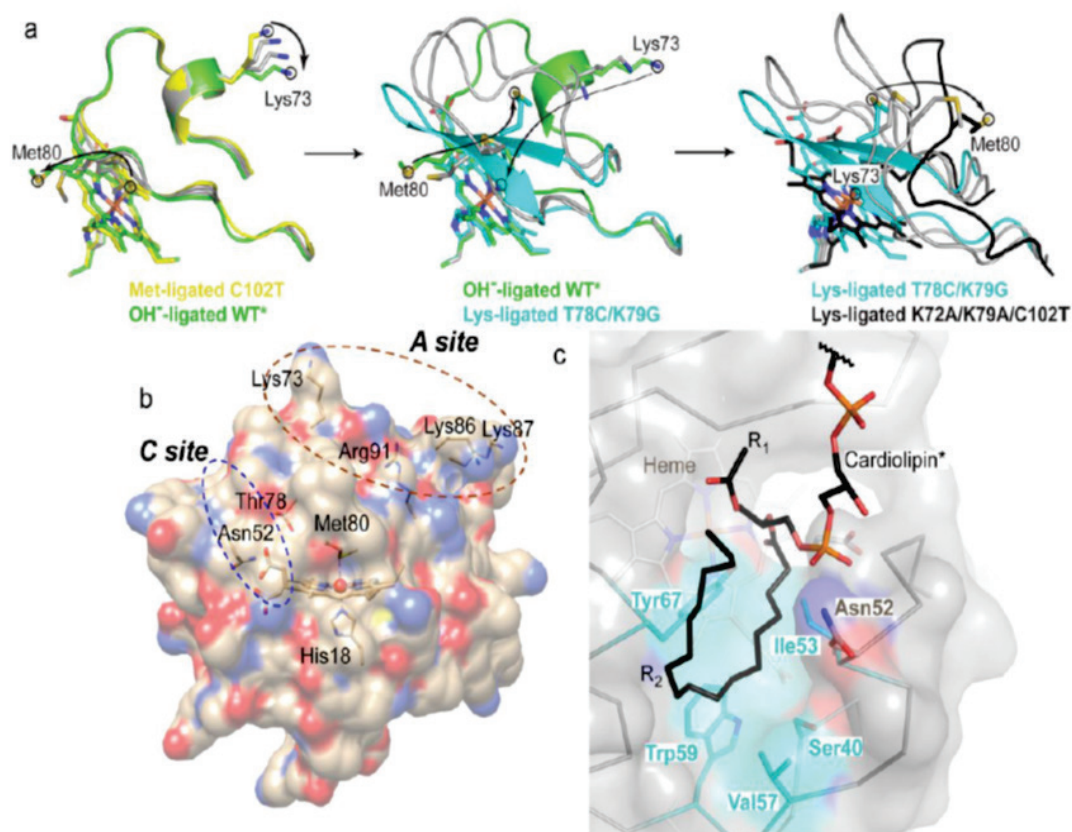


Рисунок 1. Структурный переход от Met80–Fe к Lys73–Fe в каталитическом комплексе. а – паттерн при переходе от Met– к Lys–связанному гему был построен при применении мутанта, который представляет некоторое количество промежуточного конформера, в том числе гидроксид-связанный гем. Изменения конформации в грануле, сопровождающиеся начальными и конечными лигированными состояниями, обозначены стрелочками; б – Сайты связывания кардиолипина А и С показаны пунктирными кругами. Указаны критические поверхностные остатки, необходимые для образования водородных связей и введения ацила; в – уточнены размеры предложенного «кармана» связывания кардиолипина, выделен черными линиями сам «карман», отмечены связи между остатками, так же местоположение кардиолипина

Наши исследования подтвердили, что используя анализ структуры каталитического комплекса, сенсibilизатора C_{525} , сенсibilизатора C_{314} , сенсibilизатора C_{334} , HRP и люминола, оценены возможные параметры флуоресцентных свойств сенсibilизатора C_{525} , сенсibilизатора C_{314} и сенсibilизатора C_{334} , как физических активаторов [9,13], с целью уточнения величины протонной ловушки, которой является кардиолипин, димерной структуры гетерогенного катализатора и особенностей акцильных цепей.

Наша группа получила значимый результат, который может быть фундаментом при конструировании лекарств новейшего уровня, производные которых элементы клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наша группа моделируя димерную структуру кардиолипина, уточнила его местоположение (обозначено на рисунке 1), численный размер, выделила как протонную ловушку, а также проанализировала особенности одной из четырех акцильных цепей и функций в каталитическом комплексе активированной изучаемыми в исследовании сенсibilизаторами ХЛ под действием катализатора при этом был выверен результат полученный ранее в экспериментальных данных для активации апоптоза [9].

Нами изучен комплекс реакции: липопероксидазная и липоксигеназная.

При анализе калибровочной зависимости поглощений при длине волн нами показано, ранее опубликовано, что параметр флуоресценции тирозиновых и триптофановых остатков зависит от концентраций и конформаций молекулы цитохромов C в растворах. При частичном изменении нативной конформации цитохрома C наблюдается дистанцирование тирозиновых и триптофановых остатков при атоме Fe , происходит энергетическая миграция на сопряженные связи гема. При нативной конформации гема остатки тирозин и триптофан имеют положение очень близкое к гему, при этом возникает среда, в которой легко происходит индуктивно-резонансный перенос энергий. Частичная или полная изменение нативной формы (при экспериментальном воздействии и при натуральном каталитическом комплексе и кардиолипине) препятствует условию энергетической миграции на гем с тирозиновых и с триптофановых остатков и способствует проявлению свойства флуоресценции.

Так же при частичной изменении нативной формы цитохрома *C* наблюдается нарушение связей Fe(heme)·S(Met80) и цитохрома *C* приобретают ферментативную активность (в нативной форме ее нет). Ферментативная активность выражена в гетерогенном катализаторе.

Каталитический комплекс имеет отличие от нативного цитохрома *C* по нижеследующим характеристикам: (1). Имеют флуоресценцию тирозина и триптофана; (2). Теряет поглощение в полосе *Soret* (405–410 нм) в результате разрыва координационной связи железа гема с серой Met(80) в цитохроме *C*; (3). Имеют ферментативную активность. (4). Катализирует появление липидных радикалов в мембране при сенсibilизаторах, изучаемых нами кумаринов; (5). Ферментативная активность определяется концентрацией каталитического комплекса и соотношением, показывающего процентное отношение денатурированных форм цитохрома *C*; (6). Микровязкости структур при сенсibilизаторах имеют разный коэффициент поляризации; (7). При нейтральном pH гем в цитохроме *C* существует в низко-спиновой конфигурации, и Fe-центр шестиугольно координирован пирролическими азотами из порфиринового кольца и аксиальными лигандами Met(80) и His(18) апопротеина; (8). При образовании перекиси водорода в мембранном белке происходит удаление ацильной цепи, несущей перекисную группу.

ВЫВОДЫ

Моделирование димерной структуры фермента – кардиолипина, катализирующей образование пероксида водорода кардиолипина, показало, что следствием его являются: (1). Конформационные изменения последнего. (2). Перемещение его на внешнюю митохондриальную мембрану. (3). Образованию поры, через которую выходит цитохром *C* в цитозоль.

Кардиолипин является «двойным» глицерофосфолипидом. Обладает иммунными свойствами.

Полученные нами результаты могут стать основой для создания лекарственных препаратов нового образца, которые, являясь элементами клетки, соответственно, влияют на раковые клетки и нечувствительны к синтетическим препаратам.

Список литературы / References:

1. Skulachev V.P. Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 1998, vol. 423, no. 3, pp. 275-280.
2. Vladimirov I.A., Sherstnev M.P., Azimbaev T.K. Chemiluminescence of low density lipoproteins activated by coumarin in the presence of divalent iron ions. *Biofizika*, 1995, vol. 40, no. 2, pp. 323-327.
3. Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznichenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*, 1995, vol. 18, no. 4, pp. 739-745.
4. Skulachev V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett*, 1996, vol. 397, no. 1, pp. 7-10.
5. Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y.A., Maeda A., Weitz A.A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V.E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome *c*/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1808, no. 9, pp. 2147-2155.
6. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu A. Activation of Fe²⁺-induced chemiluminescence in human blood low density lipoproteins by the fluorescent dye C-525. *Biofizika*, 1995, vol. 40, no. 2, pp. 428-433.
7. Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V.E. Designing inhibitors of cytochrome *c*/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids. *Free radical biology & medicine*, 2014, vol. 71, pp. 221-230.
8. Vladimirov I.A., Sherstnev M.P., Azimbaev T.K. Chemiluminescence of low density lipoproteins activated by coumarin in the presence of divalent iron ions. *Biofizika*, 1995, vol. 40, no. 2, pp. 323-327.
9. Владимиров Г.К. Дисс. ... канд. биол. наук. Москва: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 2018 [Vladimirov G.K. Diss. ...cand. biol. Sci. Moscow: Moscow State University named after M.V. Lomonosov, 2018 (In Russ.)].
10. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е. Кардиолипин активирует пероксидазную активность цитохрома *c*, потому что увеличивает доступность железа гема для H₂O₂. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 9, с. 1225-1233 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichkin A.V., Osipov A.N., Kagan V.E. Cardiolipin activates the peroxidase activity of cytochrome *c* because it increases the availability of heme iron for H₂O₂. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 9, pp. 1225-1233 (In Russ.)].
11. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома *c* с помощью оксида азота и лазерного излучения. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 10, с. 1392-1398 [Osipov A.N., Stepanov G.O., Vladimirov Yu.A., Kozlov A.V., Kagan V.E. Regulatsiya peroksidaznoi aktivnosti tsitokhroma *c* s pomoshchyu oksida azota i lazernogo izlucheniya. *Biokhimiya*, 2006, vol. 71, no. 10, pp. 1392-1398 (In Russ.)].

12. Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 15, pp. 4998-5009.
13. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. Образование липопероксидных радикалов при окислении кардиолипина в комплексе с цитохромом С. *Биологические Мембраны*, 2009, т. 26, № 6, с. 493-504 [Vladimirov Yu.A., Demin E.M., Proskurnina E.V., Osipov A.N. Formation of lipid peroxide radicals during the oxidation of cardiolipin in complex with cytochrome C. *Biological Membranes*, 2009, vol. 26, no. 6, pp. 493-504 (In Russ.)].
14. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах. *БЭБиМ*, 2007, т. 144, № 3, с. 390-396 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu. Chemiluminescence as a method for detecting and studying free radicals in biological systems. *BEBiM*, 2007, vol. 144, no. 3, pp. 390-396 (In Russ.)].
15. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Казан В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 9, с. 1215-1224 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichkin A.A., Osipov A.N., Kagan V.E. Mechanism of activation of peroxidase activity of cytochrome c cardiolipin. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 9, pp. 1215-1224 (In Russ.)].
16. Владимиров Ю.А., Гутенев П.И., Кузнецов П.И. Математическое моделирование кинетики цепного окисления липидов биомембран в присутствии ионов Fe^{2+} . *Биофизика*, 1973, т. 18, № 6, с. 1024-1029 [Vladimirov Yu.A., Gutenev P.I., Kuznetsov P.I. Mathematical modeling of the kinetics of chain oxidation of lipids of biomembranes in the presence of Fe^{2+} ions. *Biophysics*, 1973, vol. 18, no. 6, pp. 1024-1029 (In Russ.)].
17. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. Effect of antioxidants on the kinetics of chain lipid peroxidation in liposomes. *Membrane & cell biology*, 1998, vol. 12, no. 2, pp. 223-231.

STUDY OF THE STRUCTURE OF CARDIOLIPIN, ACYL CHAIN IN THE HETEROGENEOUS CATALYST, ACTIVATED BY COUMARINS C₅₂₅, C₃₃₄ and C₃₁₄ CHEMILUMINESCENCE UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C WITH CARDIOLIPIN

Levchenko I.N.^{1,5}, Pankratov V.S.², Vladimirov G.K.³, Levchenko A.A.⁴, Volodyaev I.V.⁵, Vladimirov Yu.A.⁵

¹ Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovityanova str. 1/8, Moscow, 117997, Russia; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

² Moscow State Technical University named after N. E. Bauman
Baumanskaya str. 5/1, Moscow, 105005, Russia

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Trubetskoy str. 8, Moscow, 119192, Russia

⁴ Perm National Research Polytechnic University
Komsomolsky ave., 29, Perm, 614990, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University
Kolmogorova str. 1/2, Moscow, 119234, Russia

Received 15.08.2025

Abstract. The use of sensitizers, which are physical activators, carries out the process of increase at the cellular level, providing an increase in the frequency of cell luminescence by 2-3 orders of magnitude higher, without providing a direct cycle on any chemical processes continuing in the system of sequences inside the random cell we have chosen. The sensitizers we considered in this paper, which are physical activators of dye-coumarin C₅₂₅, dye-coumarin C₃₁₄ and dye-coumarin C₃₃₄, intercept the excitation of triplet-excited ketones formed during the redistribution of hydroperoxyl or peroxy radicals described by the Russell mechanism, have the main characteristics, parameters and properties of fluorescent probes. We have received and presented the following results for consideration in our article: 1) Mathematical modeling of the dimeric structure of cardiolipin as part of a catalytic complex of a heterogeneous cytochrome C catalyst with cardiolipin in the presence of sensitizers, a physical activator of a dye having a natural base of coumarin C₃₁₄ and a physical activator of a dye having a natural base of coumarin C₃₃₄ and a physical activator of a dye having a natural base of coumarin C₅₂₅. 2) Identification of the manifestation of one of the four acyl chains of the catalytic complex of the heterogeneous catalyst cytochrome C with cardiolipin. 3) Clarification of all collected and local parameters of the proton trap, which is cardiolipin in the catalytic complex of the heterogeneous catalyst cytochrome C with cardiolipin.

Key words: chemiluminescence, sensitizers, cytochrome C, cardiolipin, acyl chain, proton trap, natural dye, coumarin C₅₂₅, coumarin C₃₁₄, coumarin C₃₃₄.

МЕХАНИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ТЕОРИИ КОРРЕЛИРОВАННЫХ СОСТОЯНИЙ ГИДРОФОБНОГО ЭФФЕКТА В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Дегтяр А.Д., Евстигнеев М.П.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию 31.08.2025

Аннотация. В статье представлен механический аналог теории коррелированных состояний (CST-теории), разработанной для объяснения природы гидрофобного эффекта. Согласно этому подходу, ключевую роль играет образование коррелированных пар между неполярным растворенным веществом и молекулами воды его гидратной оболочки. Основная идея заключается в том, что ван-дер-ваальсовы взаимодействия порождают два типа согласованных движений в таких парах: поступательные и ориентационные колебания. Главным результатом работы является вывод простого и физически обоснованного соотношения, которое связывает изменение теплоемкости при гидратации с площадью неполярной поверхности молекулы. Рассчитанный на основе модели коэффициент пропорциональности хорошо согласуется с экспериментальными данными, что подтверждает ее адекватность. Это также позволяет объяснить положительный вклад в теплоемкость как следствие возникновения новых колебательных степеней свободы. Кроме того, в рамках модели проведена оценка энергии образования молекулярной пары. Показано, что данный механический подход предоставляет теоретическое обоснование для популярных эмпирических моделей, широко используемых в вычислительной химии и биологии для предсказания термодинамических параметров. Полученные результаты углубляют понимание фундаментальной роли гидрофобного эффекта в процессах самосборки и стабилизации биологических макромолекул.
Ключевые слова: гидрофобный эффект, коррелированные состояния, гидрофобное растворение, теплоемкость.

ВВЕДЕНИЕ

Гидрофобный эффект представляет собой фундаментальное физико-химическое явление, играющее ключевую роль в организации и функционировании биологических систем. Его сущность заключается в стремлении неполярных молекул или молекулярных фрагментов минимизировать контакт с полярной водной средой, что сопровождается перестройкой водородных связей и снижением энтропии системы [1,2]. Этот процесс лежит в основе самоорганизации важнейших биомолекул, включая белки, липидные мембраны и нуклеиновые кислоты, определяя их структуру и функциональную активность.

Одним из наиболее значимых проявлений гидрофобного эффекта является его влияние на формирование третичной структуры белков. Гидрофобные аминокислотные остатки стремятся скрыться внутри белковой глобулы, тогда как гидрофильные группы остаются на поверхности, обеспечивая растворимость и стабильность молекулы [3]. Подобная организация критически важна для выполнения белками их биологических функций, таких как ферментативный катализ, транспорт веществ и передача сигналов. Аналогичным образом гидрофобные взаимодействия определяют структуру клеточных мембран, где липидные бислои формируются благодаря агрегации гидрофобных хвостов и экспозиции полярных концов в свободный растворитель [4]. Этот принцип обеспечивает избирательную проницаемость мембран и их механическую устойчивость. Кроме того, гидрофобные силы играют ключевую роль в стабилизации двойной спирали ДНК и РНК за счет взаимодействия между ароматическими основаниями [5].

Современные исследования гидрофобного эффекта имеют важное прикладное значение, особенно в области молекулярного дизайна лекарственных препаратов и биотехнологии. Компьютерное моделирование (*in silico*) позволяет детально изучать гидрофобные взаимодействия на атомарном уровне, что открывает новые возможности для разработки терапевтических средств [6]. Таким образом, углубленное понимание природы гидрофобного эффекта остается одной из ключевых задач междисциплинарной науки.

Ранее нами была представлена новая теория гидрофобного эффекта – теория коррелированных состояний (CST-теория) [7] – предполагающая, что в основе гидрофобного эффекта лежат коррелированные движения растворенного вещества совместно с гидратной оболочкой, и продемонстрировавшая согласие с экспериментальными значениями термодинамических функций гидрофобного растворения в широком интервале температур и для различного набора неполярных молекул. Более важным является то, что CST-теория формирует новый подход к интерпретации основных экспериментальных проявлений гидрофобного эффекта, и, в связи с этим дает новый взгляд на понимание взаимодействия биологически водных молекул с водной средой. Теория имеет статистико-термодинамический базис, однако упрощенное понимание ее сути также возможно в рамках механической модели. В настоящей работе рассмотрим механический аналог CST-теории.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физические основы гидрофобного эффекта в CST-теории. В основе CST-теории лежит представление о гидрофобной гидратации/сольватации, в которой ключевую роль играют взаимодействия растворенного вещества с водой (т.н. sw-пары). Рассмотрим каким образом эти взаимодействия могут быть имплементированы в расчет термодинамических функций на примере изменения энтропии при гидрофобном растворении неполярного соединения [8,9].

Для большого числа молекул N , находящихся в термодинамическом равновесии, классическая каноническая статистическая сумма многоатомной жидкости в заданном объеме V и при температуре T записывается следующим образом:

$$Q = \frac{1}{h^{sN} N! \sigma^N} \int \exp(-\beta H_N) d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N, \quad (1)$$

где h – постоянная Планка, $s=5$ для линейных и 6 для нелинейных молекул, σ – число симметрии для вращения молекулы относительно центра масс (равно 2 для молекулы воды), H_N – гамильтониан системы, $\beta = (k_B T)^{-1}$, k_B – постоянная Больцмана, $\mathbf{r}^N$ – декартовы координаты N молекул, $\mathbf{p}^N$ – линейные импульсы, $\boldsymbol{\omega}^N$ – углы Эйлера, $\mathbf{J}^N$ – угловые моменты.

Уравнение (1) позволяет записать безразмерную каноническую функцию распределения вероятности P_N и функцию распределения вероятности обнаружения любой различимой конфигурации f_N как

$$P_N = \frac{\exp(-\beta H_N)}{Q}, \quad f_N = \frac{P_N}{h^{sN}} \quad (2)$$

Из (2) вытекает общее выражение для энтропии такой системы

$$S_N = -\frac{k}{h^{sN} N! \sigma^N} \int P_N \ln(P_N) d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N = -\frac{k}{N! \sigma^N} \int f_N \ln(h^{sN} f_N) d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \quad (3)$$

Рассмотрим далее каким образом энтропию (3) можно представить в виде одно-, двух- и много-частичных взаимодействий (корреляций). Для этого введем n -частичную функцию распределения $f_N^{(n)}$, отражающую свойства подгруппы из n частиц в рамках большой системы из N частиц. Интегрирование полной функции распределения (2) по оставшимся $(N-n)$ частицам дает:

$$f_N^{(n)} = \frac{1}{(N-n)! \sigma^{N-n}} \int f_N d\mathbf{r}^{N-n} d\mathbf{p}^{N-n} d\boldsymbol{\omega}^{N-n} d\mathbf{J}^{N-n} \quad (4)$$

n -частичное распределение (4) может быть далее факторизовано через произведение одно-частичных функций распределения и n -частичной корреляционной функции $g^{(n)}(\mathbf{r}^n, \boldsymbol{\omega}^n)$, зависящей только от положений и ориентаций молекул

$$f_N^{(n)} = f_N^{(1)}(1) f_N^{(1)}(2) \dots f_N^{(1)}(n) g^{(n)}(\mathbf{r}^n, \boldsymbol{\omega}^n) \quad (5)$$

где $f_N^{(1)}(i) = f_N^{(1)}(\mathbf{r}_i, \mathbf{p}_i, \boldsymbol{\omega}_i, \mathbf{J}_i)$.

Таким образом, с учетом (5) энтропия N -молекулярной жидкости (3) может быть переопределена через величину N -частичной корреляционной функции.

Процесс гидрофобного растворения обычно рассматривается как перенос исследуемого неполярного соединения 's' из идеальной газообразной фазы в водную среду 'w' с образованием идеально разбавленного раствора 'sw'. Изменение энтропии в таком процессе гидратации задается как

$$\Delta S_{hyd} = S_{sw} - S_s - S_w \quad (6)$$

где энтропии расписываются по форме выражения (3) с включением многочастичных корреляций $g_{sw}^{(2)}, g_{ss}^{(2)}, g_{ww}^{(2)}, g_{sww}^{(3)}$... из (5). Дальнейшее преобразование (6) с учетом (4), (5) и допущением значимости лишь двухчастичных корреляций $g_{sw}^{(2)}$ (корреляционная функция любой отдельно взятой пары «растворенное вещество-молекула воды» ближайшей гидратной оболочки, далее – «sw-пара») приводит к выражению [9]

$$\Delta S_{hyd} = -\frac{k_B(N-1)}{V\Omega} \int g_{sw}^{(2)} \ln g_{sw}^{(2)} d\mathbf{r}_1 d\boldsymbol{\omega}_1 - \frac{1}{2} k_B, \quad (7)$$

где Ω определяется из условия нормировки $\int g_{sw}^{(2)} d\mathbf{r}_1 d\boldsymbol{\omega}_1 = V\Omega$.

Допуская далее некоррелированность позиционных векторов $\mathbf{r}_1$ и $\boldsymbol{\omega}_1$ в (7), корреляционная функция $g_{sw}^{(2)}$ может быть представлена в виде произведения ориентационно-осредненной по $\boldsymbol{\omega}$ трансляционной $g_{sw}(r)$ и ориентационной $g(\theta, \chi)$ функций в пределах первой гидратной оболочки. Для любой отдельно взятой sw-пары r определяется как расстояние между атомом кислорода воды и растворённым веществом. Ориентация молекулы воды задается углами: θ (угол между вектором дипольного момента воды и осью «растворённое вещество–кислород воды») и χ (угол между вектором Н–Н и нормалью к плоскости, образованной осью r и направлением дипольного момента воды):

$$g_{sw}^{(2)}(r, \theta, \chi) = g_{sw}(r) \cdot g(\theta, \chi) \quad (8)$$

В окончательном виде выражение (7) с учетом (8) может быть представлено как сумма вкладов от трансляционной и ориентационной корреляционных функций sw-пары:

$$\Delta S_{hyd} = -\frac{k_B(N-1)}{V} \int g_{sw} \ln g_{sw} d\mathbf{r}_1 - \frac{1}{2} k_B - \frac{k_B(N-1)V_i}{V\Omega} \int g(\theta, \chi) \ln g(\theta, \chi) d\boldsymbol{\omega}_1 \quad (9)$$

где $V_1 = \int g_{sw} d\mathbf{r}_1$.

Таким образом, краткий анализ, проведенный выше, показывает, что в пределе бесконечного разбавления энтропия гидрофобного растворения может быть выражена через пространственное интегрирование двухчастичной корреляционной функции $g_{sw}^{(2)}$, факторизованной на трансляционные и ориентационные вклады. Это дает основание для последующего детального рассмотрения взаимосвязи корреляционной функции с механическими движениями sw-пары.

Связь корреляционной функции $g_{sw}^{(2)}$ с механическим колебательным движением sw-пары. В статистической механике жидкостей хорошо известна фундаментальная взаимосвязь парной корреляционной функции $g^{(2)}(r)$ с макроскопическими термодинамическими свойствами исследуемой системы, проявляющаяся через интегрирование $g^{(2)}(r)$ в изотермическую сжимаемость κ_T [10]:

$$\rho k_B T \kappa_T = 1 + \rho \int [g^{(2)}(r) - 1] d\mathbf{r}, \quad (10)$$

где ρ – плотность жидкости. Далее функция $g^{(2)}(r)$ допускает разложение на т.н. структурную ($g_q^{(2)}$) и колебательную ($\Delta g^{(2)}$) компоненты [9]:

$$\rho k_B T \kappa_T = 1 + \rho \int [g_q^{(2)}(r) - 1] d\mathbf{r} + \rho \int \Delta g^{(2)}(r) d\mathbf{r}, \quad (11)$$

Структурная часть $g_q^{(2)}(r)$ описывает упорядочение молекул воды вокруг растворенного вещества и выражается через координационные числа Z_v и расстояния r_v :

$$g_q^{(2)}(r) = (4\pi\rho)^{-1} \sum_{v=1}^{\infty} Z_v r_v^{-2} \delta(r - r_v), \quad (12)$$

Колебательный член $\Delta g^{(2)}(r)$ отражает отклонения молекул в паре от равновесных положений и связан с нормальными модами колебаний:

$$\int \exp(-\alpha r^2) \Delta g^{(2)}(r) d\mathbf{r} = \sum_{\mu} C_{\mu}(\alpha) \langle a_{\mu}^2 \rangle \quad (13)$$

где a_{μ}^2 – амплитуды колебаний, α – параметр, вводимый для обеспечения сходимости интегралов в уравнении (11).

Уравнение (13) устанавливает фундаментальную взаимосвязь между парной корреляционной функцией $g^{(2)}(r)$ и колебательными движениями растворенного вещества и окружающей его гидратной оболочки. Поскольку, как было показано выше, парная корреляционная функция предусматривает ее разложение на две составляющие – трансляционные и ориентационные корреляции, – следовательно, корреляционное движение любой отдельно взятой sw-пары эквивалентно суперпозиции трансляционных и ориентационных колебательных движений молекул в паре. А это, в свою очередь, означает, что любая термодинамическая функция гидрофобного растворения может быть, в принципе, представлена как суперпозиция трансляционных и ориентационных колебательных движений sw-пар, формирующих систему «растворенное вещество–гидратная оболочка». Эта гипотеза лежит в основе представлений о механическом аналоге CST-теории.

Механический аналог CST-теории. В основу предлагаемой механической модели гидрофобного эффекта положено сформулированное выше представление о коррелированном движении молекул воды в гидратной оболочке когерентно с молекулой растворенного вещества. Это движение включает два основных типа механических колебаний: трансляционные колебания пары «растворенное вещество – молекула воды» (sw-пара) и ориентационные колебания молекул воды относительно линии, соединяющей центры масс. Эти колебания происходят в силовом поле, создаваемом Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями между неполярным

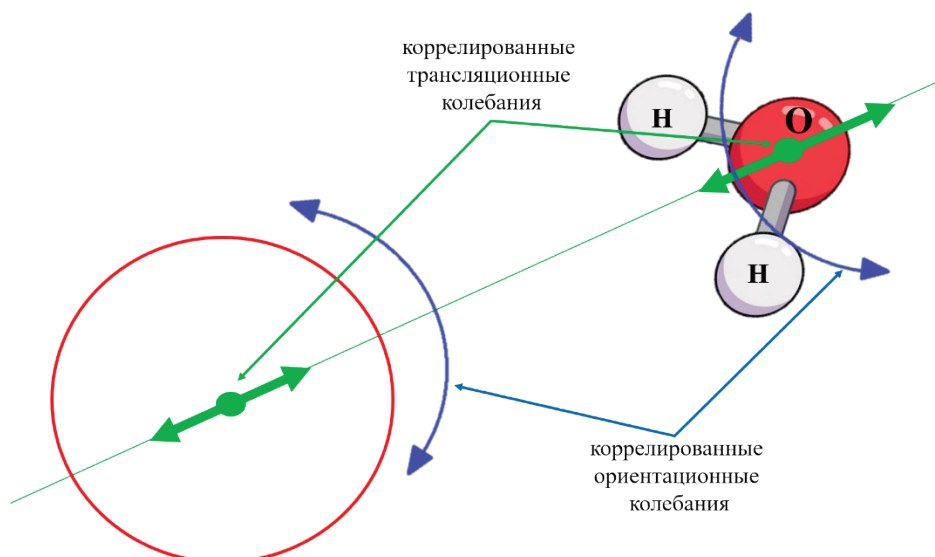


Рисунок 1. Схематическое изображение трансляционных и ориентационных коррелированных колебаний пары «растворенное вещество – молекула воды» (sw-пара) в силовом поле Ван-дер-Ваальса

растворенным веществом и окружающими его молекулами воды. На рисунке 1 схематично изображены трансляционные колебания (вдоль оси sw) и ориентационные колебания молекулы воды относительно оси sw. Такая механическая модель имеет два основных следствия.

Следствие 1. Возникновение новых колебательных мод приводит к увеличению теплоемкости системы: $\Delta C_{P(hyd)} > 0$, что может быть выражено как сумма вкладов от каждого типа колебаний для всех молекул воды в ближайшей гидратной оболочке:

$$\Delta C_{P(hyd)} = \sum_{hydration\ shell} (\Delta C_{P(tr)}^{sw} + \Delta C_{P(orient)}^{sw}) \quad (14)$$

По своей сути выражение (14) описывает природу теплоемкости, возникающей при гидрофобной растворении (гидрофобном эффекте), и объясняет ее положительный знак. Проанализируем далее выражение (14).

Поскольку модель на рисунке 1 фокусируется исключительно на парных взаимодействиях растворенное вещество-вода (корреляции вода-вода и корреляции высокого порядка, включающие более двух молекул воды, считаются пренебрежимо малыми, см. анализ выше), тогда обе компоненты ΔC_P^{sw} в (14) одинаковы для всех молекул воды в гидратной оболочке и суммирование в (14) сводится к умножению на их число N_w :

$$N_w \approx \frac{A_{np}}{a_w} \quad (15)$$

где A_{np} – доступная площадь поверхности растворенного вещества, $a_w \approx d_w^2 d_w = 2,82 \text{ \AA}$ – площадь, занимаемая одной молекулой воды. Подстановка в (14) дает:

$$\Delta C_{P(hyd)} = \frac{(\Delta C_{P(tr)}^{sw} + \Delta C_{P(orient)}^{sw})}{a_w} A_{np} \quad (16)$$

Теплоемкость трансляционных колебаний $\Delta C_{P(tr)}^{sw}$ в (16) может быть записана через стандартную сумму колебательных мод:

$$\Delta C_{P(tr)}^{sw} = R \left(\frac{h\nu}{k_B T} \right)^2 \frac{e^{h\nu/k_B T}}{(e^{h\nu/k_B T} - 1)^2} \quad (17)$$

где R – газовая постоянная, ν – классическая частота колебаний.

Классическая частота трансляционных колебаний в sw-паре может быть определена как $\nu_{tr} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_{tr}}{\mu}}$, где k_{tr} – силовая константа в поле Ван-дер-Ваальса и $\mu = \frac{M_s m_w}{M_s + m_w}$ – приведенная масса, учитывающая массы молекул растворенного вещества M_s и воды m_w . Соответственно, верхняя граница частоты трансляционных колебаний достигается при условии $M_s \approx m_w$:

$$v_{tr} \leq \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2k_{tr}}{m_w}} \quad (18)$$

где $m_w = 18 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$. При этом как силовая константа k_{tr} , так и масса воды m_w выражены в молярных единицах.

Силовую константу определим следующим образом. Колебания sw-пары происходят в силовом поле Ван-дер-Ваальса, заданном стандартным потенциалом Леннарда-Джонса с параметрами ε_{sw} и σ_{sw} :

$$U^{sw} = 4\varepsilon_{sw} \left[\left(\frac{\sigma_{sw}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{sw}}{r} \right)^6 \right], \quad (19)$$

Равновесное состояние пары соответствует минимуму энергии $U^{sw} = -\varepsilon_{sw}$ и достигается при $r_0 = 2^{1/6} \sigma_{sw}$. Наиболее распространенной моделью гидратации неполярного вещества является граница раздела алкан-вода, соответствующая параметрам Леннарда-Джонса: $\sigma_{sw} = 3,47 \text{ Å}$, $\varepsilon_{sw} = 0,88 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ [11]. С учетом этого с помощью уравнения (19) можно окончательно определить силовую константу k_{tr} как:

$$k_{tr} = \left[\frac{\partial^2 U^{sw}}{\partial r^2} \right]_{r=r_0} = \frac{72}{2^{1/3}} \frac{\varepsilon_{sw}}{\sigma_{sw}^2} \quad (20)$$

Оценка частоты трансляционных колебаний из (18) дает величину порядка 10 ГГц, что соответствует классическому режиму колебаний при нормальных температурах в (17): $h\nu/k_B T \ll 1$. Для ориентационных колебаний sw-пары ситуация оказывается аналогичной: трансляционные смещения центров масс взаимодействующих ван-дер-ваальсовых молекул индуцирует их маятниковые движения, сопровождающиеся появлением дополнительной полосы поглощения с частотой, близкой к трансляционной $v_{tr} \sim v_{orient}$ [12,13]. Это позволяет аппроксимировать трансляционные и ориентационные движения в sw-паре классическим колебательным режимом, считая их эквивалентными с точки зрения теплоемкости:

$$\Delta C_{P(tr)}^{sw} \approx R, \quad \Delta C_{P(orient)}^{sw} \approx R, \quad (21)$$

что из (14) приводит к простому соотношению:

$$\Delta C_{P(hyd)} = \frac{2R}{a_w} A_{np} \approx 2,09 \cdot A_{np} \quad (22)$$

где $\Delta C_{P(hyd)}$ выражена в $\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$, неполярная поверхность A_{np} представлена в Å^2 .

Уравнение (22) устанавливает прямую зависимость между изменением теплоемкости при гидрофобной гидратации неполярного соединения и площадью его неполярной поверхности, доступной для растворителя. Полученное значение коэффициента пропорциональности $\gamma_{np} = \frac{2R}{a_w} = 2,09 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ в (22) попадает в экспериментальный диапазон $0,70\text{--}2,10 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$, известный из работ по термодинамике гидрофобного растворения малых неполярных молекул и процессов сворачивания белков [14,15]. Это доказывает физическую адекватность использованной механической модели гидрофобного эффекта и позволяет записать стандартные соотношения для остальных термодинамических функций путем интегрирования (22) по температуре относительно референтной температуры T_0 :

$$\begin{cases} \Delta H_{hyd} = \Delta H_{hyd}(T_0) + \Delta C_{P(hyd)}(T - T_0) \\ \Delta S_{hyd} = \Delta S_{hyd}(T_0) + \Delta C_{P(hyd)} \ln(T/T_0) \\ \Delta G_{hyd} = \Delta H_{hyd}(T_0) - T \Delta S_{hyd}(T_0) + \Delta C_{P(hyd)}(T - T_0 - T \ln(T/T_0)) \end{cases} \quad (23)$$

Другим важным выводом из уравнения (22) является факт прямой пропорциональности $\Delta C_{P(hyd)}$ и A_{np} , что доказывает справедливость т.н. эмпирических моделей SASA (Solvent Accessible Surface Area), активно используемых в вычислительной термодинамике уже несколько десятилетий [6,16,17].

Следствие 2. Если формирование sw-пар происходит в поле Ван-дер-Ваальса, и два основных типа коррелированного движения – трансляционное и ориентационное – в механической модели тождественны трансляционным и ориентационным колебаниям в паре, то тогда существует возможность оценки из механической модели потенциальной энергии образования sw-пары ΔU^{sw} . В качестве нулевого уровня потенциальной энергии будет рассматривать ситуацию полного отсутствия взаимодействий в sw-паре, которые могут приводить к коррелированным движениям. С учетом этого, а также учитывая близость по величине теплоемкостей обоих типов колебаний (выражение (21)), энергию коррелированной sw-пары можно рассчитать как сумму классической энергии Ван-дер-Ваальсового атом-атомного взаимодействия ΔU_{vdw} и энергий трансляционного и ориентационного колебаний, каждая из которых равна RT_0 , фиксируя в качестве референтной температуры $T_0 = 298 \text{ К}$:

$$|\Delta U^{sw}| = |\Delta U_{vdW}| + 2RT_0 \quad (24)$$

Энергию ΔU_{vdW} можно оценить из выражения, часто используемого для расчета вклада Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий в воде: $\Delta U_{vdW} = \gamma_{vdW} \cdot A_{np}$, где $\gamma_{vdW} = -163,4 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ – значение, получаемое из данных эксперимента по испарению жидкости [17]. Следовательно, для каждой молекулы воды в гидратной оболочке $\Delta U_{vdW} = \gamma_{vdW} \cdot a_w \approx -1,30 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, и полная энергия sw-пары из (24) может быть оценена как $\Delta U^{sw} \approx -6,30 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. Это достаточно важный результат, позволяющий использовать оценку ΔU^{sw} в CST-теории для описания экспериментальных данных по гидрофобному растворению различных неполярных соединений.

Заключение. В настоящей работе рассмотрен механический аналог теории гидрофобного эффекта – теории коррелированных состояний (CST-теория). В рамках этой теории гидрофобная гидратация/сольватация рассматривается как следствие образования коррелированных трансляционных и ориентационных движений в молекулярных парах «растворенное вещество – молекула воды» (sw-пара) ближайшей гидратной оболочки, индуцированных взаимодействиями Ван-дер-Ваальса при помещении исследуемого вещества в воду. При этом предполагается, что любая sw-пара может находиться в двух состояниях – коррелированном и некоррелированном, – переход между которыми инициируется тепловыми флуктуациями.

Нами показано, что два основных типа коррелированного движения – трансляционное и ориентационное – в механической модели тождественны трансляционным и ориентационным колебаниям в sw-паре, протекающим в классическом режиме колебательного процесса. Такой подход позволяет рассматривать суммарное изменение теплоемкости при гидрофобном растворении как сумму теплоемкостей трансляционных и ориентационных колебаний, что приводит к выражению (22), хорошо согласующемуся с экспериментом. Этот результат дает основание для интерпретации природы и положительного знака избыточной теплоемкости, регистрируемой в эксперименте по гидрофобному растворению (гидрофобном эффекте), как следствие возникновения новых трансляционных и ориентационных колебательных мод в sw-парах.

В целом, полученные результаты углубляют представления о гидрофобном эффекте, играющем фундаментальную роль в функционировании биологически важных молекулярных систем.

Работа поддержана грантом РФФ №25-22-00085.

Список литературы / References:

1. Ball P. Water as an active constituent in cell biology. *Chemical reviews*, 2008, vol. 108, no. 1, pp. 74-108, doi: 10.1021/cr068037a.
2. Rego N.B., Patel A.J. Understanding hydrophobic effects: Insights from water density fluctuations. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 2022, vol. 13, no. 1, pp. 303-324, doi: 10.1146/annurev-conmatphys-040220-045516.
3. Dill K.A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, no. 31, pp. 7133-7155, doi: 10.1021/bi00483a001.
4. Lazaridis T. Solvent size vs cohesive energy as the origin of hydrophobicity. *Accounts of Chemical Research*, 2001, vol. 34, no. 12, pp. 931-937, doi: 10.1021/ar010058y.
5. Nicolson G. L., Ferreira de Mattos G. A brief introduction to some aspects of the fluid-mosaic model of cell membrane structure and its importance in membrane lipid replacement. *Membranes*, 2021, vol. 11, no. 12, p. 947, doi: 10.3390/membranes11120947.
6. Kostjukov V.V., Evstigneev M.P. The energetics of small molecules binding with nucleic acids. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2019, vol. 139, p. 105887, doi: 10.1016/j.jct.2019.105887.
7. Evstigneev M.P., Degtyar A.D., Lantushenko A.O. The Correlated States Theory of the Hydrophobic Effect. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2025, vol. 129, no. 21, pp. 5245-5267, doi: 10.1021/acs.jpcc.5c0121.
8. Lazaridis T., Paulaitis M.E. The Molecular Origin of the Large Entropies of Hydrophobic Hydration. Boston, MA: Springer US. *Statistical Mechanics, Protein Structure, and Protein Substrate Interactions*, 1994, pp. 87-101.
9. Lazaridis T., Paulaitis M.E. Entropy of hydrophobic hydration: a new statistical mechanical formulation. *The Journal of Physical Chemistry*, 1992, vol. 96, no. 9, pp. 3847-3855, doi: 10.1021/j100188a051.
10. Stillinger F.H., Debenedetti P.G., Sastry S. Resolving vibrational and structural contributions to isothermal compressibility. *The Journal of chemical physics*, 1998, vol. 109, no. 10, pp. 3983-3988.
11. Huang D.M., Chandler D. The hydrophobic effect and the influence of solute-solvent attractions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, vol. 106, no. 8, pp. 2047-2053, doi: 10.1021/jp013289v.
12. Ewing G.E. Structure and properties of van der Waals molecules. *Accounts of Chemical Research*, 1975, vol. 8, no. 6, pp. 185-192, doi: 10.1021/ar50090a001.
13. Cohen R.C., Busarow K.L., Lee Y.T., Saykally R.J. Tunable far infrared laser spectroscopy of van der waals bonds: the intermolecular stretching vibration and effective radial potentials for Ar-H₂O. *The Journal of chemical physics*, 1990, vol. 92, no. 1, pp. 169-177, doi: 10.1063/1.458459.
14. Prabhu N.V., Sharp K.A. Heat capacity in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2005, vol. 56, no. 1, pp. 521-548, doi: 10.1146/annurev.physchem.56.092503.141202.
15. Ren J., Jenkins T.C., Chaires J.B. Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, no. 29, pp. 8439-8447, doi: 10.1021/bi000474a.

16. Siebenmorgen T., Zacharias M. Computational prediction of protein–protein binding affinities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2020, vol. 10, no. 3, e1448, doi: 10.1002/wcms.1448.
17. Jayaram B., McConnell K., Dixit S.B., Das A., Beveridge D.L. Free-energy component analysis of 40 protein–DNA complexes: A consensus view on the thermodynamics of binding at the molecular level. *Journal of computational chemistry*, 2002, vol. 23, no. 1, pp. 1–14, doi: 10.1002/jcc.10009.

MECHANICAL ANALOG OF THE THEORY OF CORRELATED STATES FOR HYDROPHOBIC EFFECT IN WATER ENVIRONMENT

Degtyar A.D., Evstigneev M.P.

Sevastopol State University

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

Received 31.08.2025

Abstract. The article presents a mechanical analog of the theory of correlated states (CST theory), developed to explain the nature of the hydrophobic effect. According to this approach, the formation of correlated pairs between a nonpolar solute and the water molecules of its hydration shell plays a key role. The main idea is that van der Waals interactions generate two types of concerted motions in such pairs: translational and orientational oscillations. The key result of this work is the derivation of a simple and physically justified relation that connects the change in heat capacity upon hydration with the nonpolar surface area of the molecule. The proportionality coefficient calculated based on the model shows good agreement with experimental data, confirming its adequacy. This also makes it possible to explain the positive contribution to the heat capacity as a consequence of the emergence of new vibrational degrees of freedom. Furthermore, within the framework of the model, an estimate of the molecular pair formation energy was made. It is shown that this mechanical approach provides a theoretical basis for popular empirical models widely used in computational chemistry and biology to predict thermodynamic parameters. The obtained results deepen the understanding of the fundamental role of the hydrophobic effect in the processes of self-assembly and stabilization of biological macromolecules.

Key words: *Hydrophobic Effect, Correlated States, Hydrophobic Solvation, Heat Capacity.*

К МЕХАНИЗМУ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ: МОДЕЛЬ РЕАКЦИИ ТИМОЦИТОВ НА ЭРИТРОПОЭТИН С УЧАСТИЕМ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОКАБЕЛЯ

Медведева Д.И., Морозова Г.И., Рыбаков Ю.П.

Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ, e-mail: gimorozova@mail.ru

Поступила в редакцию 16.08.2025

Аннотация. В связи с наличием побочных эффектов тканеспецифических гормонов, пептидов, актуально исследование механизмов их неспецифического действия на лимфоциты. Данная работа посвящена моделированию неспецифической реакции лимфоцитов (из тимуса крыс) на гормон эритропоэтин (ЭПО) в зависимости от изменения протонного потенциала (ПП), генерируемого на мембранах митохондрий в системе митохондриального электрокабеля (МЭК). Тем самым происходит транспортировка энергии АТФ к местам её потребления. В работе предлагается модель электро-механо-энергетического сопряжения в ЭПО-стимулированном Т-лимфоците, связанного с сокращениями микрофиламентов цитоскелета клетки, автоволновой характер которых обеспечивает периодическая волна изменения ПП в МЭК синхронно с перераспределением кальция между эндоплазмой и митохондриями в лимфоците. На основе решения телеграфного уравнения оценены показатели затухания волны ПП при заданных параметрах митохондрий в Т-лимфоците. Из наших оценок на базе экспериментальных данных, полученных ранее с потенциал-чувствительным флуоресцентным зондом-катионом ДСМ, следует, что для запуска волны сокращений после ЭПО-сигнала в Т-лимфоците необходимо наличие хотя бы двух контактных митохондрий вблизи рецепторной зоны внешней мембраны, а также системы МЭК из 6 митохондрий с суммарной энергией порядка 102 кДж/моль. Примерно, такая энергия АТФ требуется для активации двух кальциевых насосов в мембране. Отмечается существенная зависимость ЭПО-эффектов лимфоцитов от исходного энергетического статуса тимомы и тимуса.

Ключевые слова: неспецифическая гормональная стимуляция, эритропоэтин, Т-лимфоцит, тимомы, митохондриальный электрокабель, распространение протонного потенциала, телеграфное уравнение, модель электро-механо-энергетического сопряжения, свободная энергия клетки, ионные насосы.

ВВЕДЕНИЕ

Тканеспецифические гормоны могут обладать побочным действием, проявляя неспецифическое стимулирующее действие в отношении клеток, не связываясь с конкретными антигенами, в том числе гормон эритропоэтин (ЭПО) [1-7]. При этом они могут влиять на активность клеток, изменяя способность митохондрий вырабатывать энергию. В соответствии с хемиосмотической концепцией энергия окисления дыхательных субстратов в значительной степени запасается в виде разности электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий [8,9]. По данным электронной и люминесцентной микроскопии дифференцированные клетки отличаются характерным распределением в них основного пула митохондрий, сопряженным с типом функциональной активности этих клеток [10-12]. Так, в мышечных клетках митохондрии образуют длинные цепи, переходящие из одной клетки в другую вдоль миофибрилл, в гепатоцитах митохондрии образуют упорядоченные комплексы около ферментных гранул. Известна высокая реактивность митохондриального ретикула в ответ на различные воздействия. При этом может меняться не только характер распределения и форма митохондрий в клетках, но и их энергетическая активность, сопряженная с изменением протонного потенциала (ПП) на мембранах митохондрий [9,12-17].

Согласно экспериментальным данным митохондрии в клетках могут соединяться фактически в митохондриальный электрокабель (МЭК) через межмитохондриальные контакты (ММК) высокой проводимости [12-14]. Так, в экспериментах на нитчатых митохондриях (НМ) по изменению флуоресценции катионного зонда родамина в НМ установлено, что точечный пробой мембраны при облучении лазером выбранной митохондрии приводит к снятию разности потенциала не только в точке пробоя, но и по всей длине НМ, которая представляет собой проводник с эквипотенциальной поверхностью [13]. Концепция о наличии МЭК в мышечных и в других клетках, выдвинутая Бубенцером (1966) была далее развита и обоснована группой российских ученых во главе со Скулачевым В.П. [9-13]. Теория функционирования протяженных митохондриальных структур, как внутриклеточных МЭК, предполагает, что митохондрии обеспечивают быструю доставку электрической энергии по объему клетки с последующим использованием этой энергии для синтеза АТФ. При этом следует отметить важную роль цитоскелета (ЦС) для обеспечения движения митохондрий по микротрубочкам к энергопотребляющим участкам в клетках, а также для образования контактных митохондриальных комплексов [18,19]. Таким образом, в свете современных данных организация митохондрий в систему МЭК играет ключевую роль в обеспечении транспорта энергии, запасенной в форме ПП в митохондриях клетки, в том числе в

обеспечении дистанционного распространения энергии в ответ на локальный стимул, что наиболее исследовано для мышечных клеток, прежде всего кардиомиоцитов [12-16].

Однако, до сих пор не уделяли достаточного внимания исследованию динамики и роли МЭК в реакциях иммунных клетках, в частности, в лимфоцитах, хотя изучали перестройку микротрубочек при их антигенной стимуляции [20].

Ранее в наших экспериментах при микроскопии витальных мазков крови в свете флуоресценции потенциал-чувствительного зонда-катиона 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) были обнаружены лимфоциты с митохондриями в виде цепочек [21,22]. Причём, при наблюдении за живыми лимфоцитами в крови на термостатированном столике (37°C) наблюдали эффекты активации движения Т-лимфоцитов и синхронное распространение волн колебаний желтой флуоресценции зонда в цепи митохондрий. При снижении температуры до 20° С движение клеток, требующее повышенный расход энергии, прекращается, и все митохондрии в цепи возгораются, снова аккумулируя ДСМ по отрицательному градиенту электрического поля на их мембране. С другой стороны, в серии наших экспериментов [4] исследовали воздействие рекомбинантного ЭПО на тимоциты, выделенные из тимусов крыс. Обнаружено, что в образцах тимоцитов из разных тимусов в присутствии ЭПО происходит увеличение уровня флуоресцентного сигнала ДСМ внутри митохондрий клеток при добавлении в среду зонда в витальной концентрации. Важно, что наибольший эффект энергизации митохондрий в суспензии тимоцитов проявляется у 25% клеток, как известно, относящихся к субпопуляции зрелых Т-хелперов в тимусе [20,23]. Рекомбинантный ЭПО человека представляет собой очищенный гликопротеин, который стимулирует эритропоэз, избирательно воздействуя на митоз и дифференцировку клеток-предшественников эритроцитов, не влияя существенно на лейкопоэз. ЭПО связывается со специфическим рецептором (ЕpoR) на поверхности предшественников красных кровяных клеток, активируя при этом сигнальный каскад [24,25]. Установлено, что ЭПО - рецепторные взаимодействия носят строго специфический характер. По мере приближения клеток к терминальным стадиям эритроидной дифференцировки снижается их чувствительность к гормону, что свидетельствует о том, что ЭПО выступает в роли триггера, запускающего процесс дифференцировки. Результаты применения ЭПО в клинике и опыты не дают однозначного ответа о супрессорном или стимулирующем эффекте ЭПО на лимфоциты [7,26-29]. Однако, обнаружены его антиоксидантные свойства, обеспечивающие защиту митохондрий, торможение апоптозных повреждений [28], поэтому ЭПО иногда используют как допинг.

ЭПО не является специфическим гормоном для лимфоцитов. В то же время известно, что действие неспецифических гормонов через активацию перераспределения кальция в клетке часто сочетается с использованием в качестве посредника производных фосфатидилинозитола [30-34]. В свете современных представлений о внутриклеточной сигнализации можно полагать, что наблюдаемые ЭПО-эффекты в тимоцитах сопряжены с возбуждением мембранной поверхности клеток после связывания ЭПО с неспецифическим рецептором, содержащим комплекс с G-белком [4,33], вследствие чего изменяется проницаемость ионных каналов мембраны для натрия и кальция, что может вызвать изменение протонного потенциала (ПП) в митохондриях, контактирующих с плазматической мембраной в зоне рецептора. При этом освобожденная энергия АТФ может быть использовано для сокращения элементов цитоскелета, сопряженного с перераспределением кальция, а также с синхронным возбуждением микроворсинок на мембранной поверхности лимфоцитов, что может обеспечивать подвижность и циркуляцию их в крови.

В связи с этим в данной работе решается актуальная задача моделирования процесса неспецифической ЭПО-стимуляции тимоцитов (крыс) в зависимости от исходного уровня ПП и его изменения в системе МЭК клетки. Ранее нами была предложена модель автоволнового процесса в мышечных волокнах с учётом распространения ПП в МЭК кардиомиоцитов [15]. Целью данной работы является моделирование изменения ПП в МЭК тимоцита на основе процесса электро-механо-энергетического сопряжения как неспецифической реакции клетки на ЭПО-стимул.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Данная работа опирается, в основном, на результаты предыдущих наших исследований изменения энергетического статуса митохондрий под влиянием ЭПО в тимоцитах крыс [4]: для оценки энергии тимоцитов до и после воздействия ЭПО мы использовали статистические данные микроцитотометрии тимоцитов в серии опытов с применением витального флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда-катиона ДСМ.

Неспецифическая ЭПО-стимуляция лимфоцитов сопряжена с изменением состояния митохондрий, способных генерировать отрицательный ПП в сети МЭК и транспортировать его энергию в виде АТФ к местам потребления (к ионным насосам, ЭПР и к сократительным структурам ЦС). Исходя из этого, в предлагаемой нами обобщённой модели ЭПО-стимуляции тимоцита, учитывается принцип цикличности в распределении кальция внутри лимфоцита в соответствии с популяционной кинетической моделью [30-33].

Для оценки некоторых морфологических параметров МЭК тимоцитов в данной работе получены их фотоизображения в свете флуоресценции зонда ДСМ. Тимоциты выделяли из тимуса белых беспородных крыс, суспензию этих клеток инкубировали с ДСМ в течение 15 мин при 37°C, затем каплю окрашенной суспензии клеток микропипеткой наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом, помещали полученный препарат на столик люминесцентного микроскопа Люам И2 (ЛЮМО), использовали объектив 90^x МИ и

фотографировали клетки с помощью цифровой камеры Sony, установленной на тубусе микроскопа в режимах возбуждения и наблюдения флуоресценции ДСМ в митохондриях клеток, описанных ранее в работах [4,35,36].

Из теории и экспериментов следует, что чем больше в клетке активных митохондрий, и чем выше их исходный ПП, тем больше их способность синтезировать АТФ, соответственно выше энергетическая активность клетки [4,7,12,35,36]. Пороговый уровень свободной энергии тимocyта, запускающий ЭПО-стимуляцию митохондрий в МЭК, определяли на основе термодинамической теории Планка-Нернста [39-41], используя стационарные уравнения распределения катионов ДСМ в клетке [36], а также экспериментальные данные оценки изменения свободной энергии тимocyта по изменению флуоресценции ДСМ в митохондриях методом, рассмотренного в работах [35,41].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Моделирование изменения протонного потенциала в цепи митохондрий тимocyта при ЭПО – воздействии. Несмотря на то, что тимocyты не относятся к возбудимым клеткам типа мышечных или нервных, однако, как отмечали выше, при определённых воздействиях они могут приобретать подвижность, сопряжённую с волновыми процессами на внешней мембране и с сокращением элементов цитоскелета (ЦС).

В свете представления о роли МЭК волну изменение ПП в цепи митохондрий тимocyта будем моделировать с использованием телеграфного уравнения [38] по аналогии с таким подходом для кардиомиоцита в предыдущей работе [15].

Рассмотрим цепочку из митохондрий как электрический кабель, а именно, коаксиальный, так как митохондрии имеют округлую форму и сопротивление сред по обеим сторонам митохондриальной мембраны значительно меньше сопротивления самой мембраны. При этом считаем место контакта ближайшей митохондрии с мембраной началом МЭК. Тогда изменение свойств внешней мембраны после связывания с ЭПО влияет и на проницаемость мембраны краевой митохондрий для протонов и других ионов.

Для такого электрического кабеля справедливы следующие телеграфные уравнения:

$$\begin{aligned} \frac{\partial i}{\partial x} + C \frac{\partial u}{\partial t} + Gu &= 0 \\ \frac{\partial u}{\partial x} + L \frac{\partial i}{\partial t} + Ri &= 0 \end{aligned} \quad (1)$$

где x – координата, отсчитываемая вдоль провода, t – время,
откуда можно вывести телеграфные уравнения второго порядка:

$$-\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + LC \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + (RC + GL) \frac{\partial u}{\partial t} + RGU = 0 \quad (2)$$

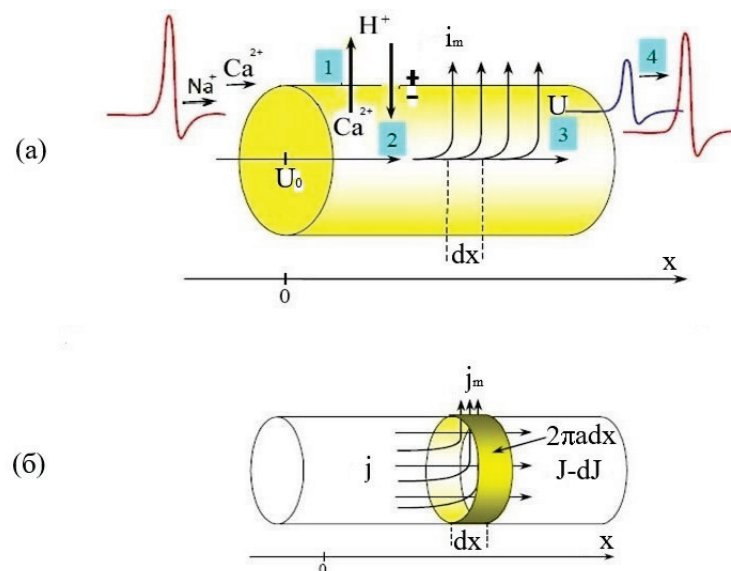


Рисунок 1. Затухание волны протонного потенциала (U) в митохондрии вблизи ЭПО-возбужденной внешней мембраны тимocyта. (а) - изменение $U(x)$ вдоль мембраны митохондрии как части МЭК (снижение); (б) – ионный ток (J), где J_m – ток утечки; 1 – частичная деполяризация мембраны митохондрий, контактирующих с внешней мембраной (вследствие обмена Ca^{2+} на 2H^+). При $x = 0$, $U = U_0$, 2 – под действием возникшей продольной разности потенциалов вдоль мембраны митохондрий начинает протекать ток J (со стороны матрикса), 3 – это приводит к снижению протонного потенциала (U) на мембране митохондрии на величину соответствующую $dU = U_0 - U(x)$

Условие, при котором существует неискаженная волна (форма волны сохраняется, а амплитуда изменяется):

$$\sqrt{\frac{L}{C}} = \sqrt{\frac{R}{G}} - \text{волновое сопротивление МЭК}$$

и где C , G , L и R – коэффициенты ёмкости, утечки тока, индуктивности, сопротивления в МЭК, рассчитанные на единицу длины.

На рисунке 1 представлена схема процессов в МЭК, которые при этих условиях происходят.

Оценим эффект затухания волны распространения ПП (U) в МЭК с помощью телеграфного уравнения (2). Телеграфное уравнение позволяет рассчитать расстояние от участка возбуждения мембраны, на котором произойдёт затухание волны, связанной с изменением ПП в митохондриях после установления стационарного режима, когда при $t \rightarrow \infty$, $\frac{\partial u}{\partial t} = 0$ в каждой точке x . При этих условиях телеграфное уравнение упрощается:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} = RG U \quad (3)$$

Обозначим $\lambda = \sqrt{\frac{1}{RG}}$, тогда решение данного уравнения дает выражение:

$$U(x) = U_0 e^{-\lambda x} \quad (4)$$

Ясно, что $U_0 = U$, при $x = 0$ и λ – длина митохондриального ретикулума, при которой первоначальный электрохимический потенциал снизится в e раз.

$G = \frac{1}{R_m}$ – коэффициент утечки продольного тока через мембрану, где R_m – сопротивление продольному току.

Выразим R через удельное сопротивление матрикса (ρ) и R_m через удельное сопротивление мембраны (ρ_m):

$$R = \rho \frac{dx}{\pi a^2}, R_m = \rho_m \frac{\delta}{2\pi a dx}, \quad (5)$$

где a – радиус, δ – толщина митохондриального ретикулума, тогда

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{R}} = \sqrt{\frac{a \rho_m \delta}{2\rho}} \quad (6)$$

При $a = 0,4 \text{ мкм} = 4 \times 10^{-5} \text{ см}$

$$\rho_m = 10^6 \text{ Ом} \times \text{см}, \rho = 10^3 \text{ Ом} \times \text{см}, \delta = 10 \text{ нм} = 10^{-6} \text{ см}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{4 \cdot 10^{-5} \text{ см} \cdot 10^6 \text{ Ом} \times \text{см} \cdot 10^{-6} \text{ см}}{2 \cdot 10^3 \text{ Ом} \times \text{см}}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ см} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ м} = 1 \text{ мкм}$$

Полученная величина λ означает, что волна изменения ПП вдоль МЭК снижается по амплитуде в e раз на расстоянии, равном, примерно, длине *двух митохондрий*. Следовательно, именно это количество митохондрий необходимо для обеспечения энергией АТФ одного сократительного элемента в ЦС в течение периода его сокращения и расслабления.

Из анализа серии данных предыдущих экспериментов [4], следует, что ЭПО – эффект стимуляции энергетики наблюдается именно в зрелых тимоцитах типа Т-хелперов [20], имеющих цепочечные структуры митохондрий, которые отчётливо видны на фотоизображении клеток на рисунке 2а. Такая цепочечная система МЭК может эффективно транспортировать энергию АТФ через распространение волны изменения ПП, что периодически поддерживает волну механических сокращений филаментов в ЦС, в свою очередь связанными с возбуждением колебаний на мембранной поверхности.

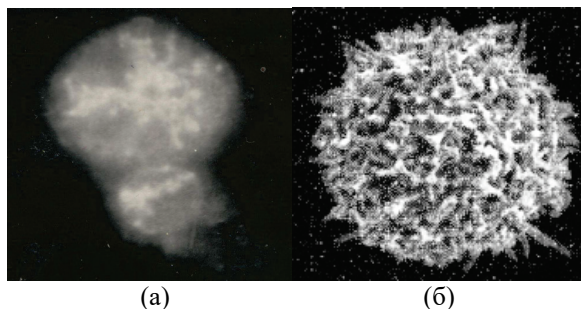


Рисунок 2. Микроизображения Т-лимфоцитов: (а) – тимоциты с цепочками активных митохондрий в свете флуоресценции ДСМ (фото получено в нашем эксперименте, люминесцентная микроскопия; объектив 90^x МИ); ув.×2000; (б) – поверхность Т-лимфоцита крови, реальное ув.×250000 (получено с помощью сканирующего электронного микроскопа по данным NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases)

Исходя из наших наблюдений, можно предположить, что в результате ЭПО-стимуляции на поверхности тимоицита могут возникать микроволны, которые сопряжены с сокращением микротрубочек и филаментов ЦС, обеспечивающих движение микроворсинок и псевдоподий на поверхности клетки, которые видны на электронном изображении (рис. 26).

2. Обобщённая модель электро-механо-энергетического сопряжения в процессе ЭПО-стимуляции тимоицита. Согласно нашему представлению, основанному на некоторых данных о реакции лимфоцитов на разные стимулы [20-22], при связывании ЭПО с неспецифическим рецептором на поверхности лимфоцита может возникать и двигаться, как волна, локальная деформация в зоне рецепции, где мембрана меняет свои характеристики: микровязкость, поверхностное натяжение, проницаемость для ионов. При этом разные мембранные белки реагируют на такую волну по-разному: на одни она никак не влияет, а другие захватываются волной и движутся вместе с ней по направлению к областям скопления примембранных филаментов. Можно предполагать, что имеет место определённая согласованность изменения волны ПП в МЭК с возбуждением поверхности мембраны и волной механического сокращения филаментов ЦС.

Из предыдущего изложения следует, что неспецифический механизм стимуляции тимоицитов ЭПО при 37°C может быть обусловлен активацией ионных насосов на плазматической мембране после присоединения ЭПО к рецептору и быстрого входа ионов Na^{2+} , вызывающего процесс деполяризации внешней мембраны, и медленного входа ионов Ca^{2+} [34,38], что может приводить к частичной деполяризации митохондрии, контактирующей с внешней мембраной. Но при этом затухающая волна ПП распространяется далее в цепи МЭК, фактически освобождая энергию АТФ, запасённую в ПП для обеспечения сократительных процессов филаментов вблизи МЭК. В результате в клетке запускается процесс сокращения-расслабления филаментов ЦС, а также ЭПР, связанный с синхронным периодическим перераспределением кальция внутри клетки между митохондриями, ЦС и цитозолем по аналогии с [32-34].

Исходя из сопоставления разных моделей внутриклеточной сигнализации при воздействии гормональных стимулов, а также данных исследований энергетических реакций Т-лимфоцитов в крови и тимоицитов на ЭПО-воздействие, в данной работе предлагаем обобщённую модель-схему электро-механо-энергетического сопряжения для описания процесса ЭПО-стимуляции Т-лимфоцитов, которая представлена на рисунке 3.

В соответствии с нашей моделью связывание ЭПО с неспецифическим рецептором (Р) вызывает деформацию локальной зоны на мембране, изменение проницаемости ионных каналов, что приводит к возникновению трёх сопряжённых волновых процессов соответственно этапам (1-6), а именно:

(1) волны возбуждения электрического потенциала действия (ПД) на внешней мембране тимоицита при связывании ЭПО с рецептором (Р), изменяющим её проницаемость для катионов Na^{+} (время активации каналов порядка мс),

(2) при этом открываются потенциал-зависимые медленные кальциевые каналы (время жизни сотни мс), и ионы Ca^{2+} поступают из внеклеточной среды внутрь клетки;

(3) энергораспределяющей волны в цепи МЭК, сопряженной с синтезом АТФ в митохондриях и гидролизом АТФ в зонах потребления энергии при сокращении филаментов; при этом в митохондриях (МХ) ионы кальция обмениваются на H^{+} и ПП восстанавливается, затем всё повторяется в автоволновом режиме;

(4) механической волны сокращения и расслабления филаментов ЦС и ЭПР, сопряженной с перераспределением кальция внутри клетки: ионы Ca^{2+} из митохондрий и ЭПР поступают в кальмодулированный комплекс в филаментах ЦС, что вызывает сокращение белков в активных центрах и дальнейшее развитие силы и укорочения филаментов аналогично [18], приводящие к автоволновому процессу, в том числе на мембранной поверхности лимфоцита; после окончания процесса сокращения ионы Ca^{2+} с помощью кальциевых насосов активно закачиваются внутрь депо ЭПР, а в митохондрии в обмен на протоны.

(5) ионы K^{+} пассивно выходит из клетки, вызывая реполяризацию внешней мембраны;

(6) ионы Ca^{2+} активно выводятся во внеклеточную среду с помощью кальциевых насосов (АТФ-аз); затрачивая энергию, получаемую при гидролизе АТФ.

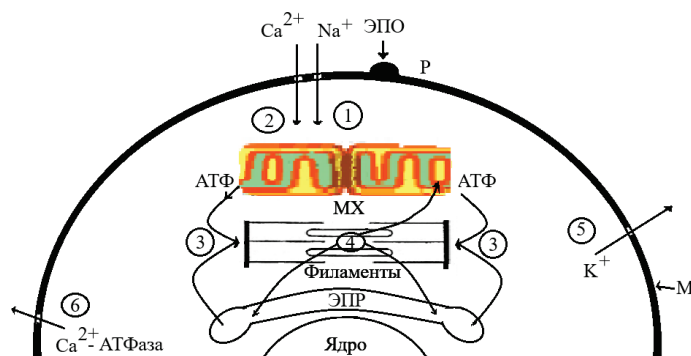


Рисунок 3. Модель электро-механо-энергетического сопряжения (ЭМЭС) ионных и волновых процессов после связывании эритропоэтина (ЭПО) с неспецифическим рецептором (Р) на мембране (М) тимоицита с участием МЭК (МХ). (1 – 6) – этапы процесса (объяснение в тексте), стрелки 1, 2, 5, 6 – направления обменных потоков в ионных каналах натрия (Na^{+}), кальция (Ca^{2+}), ионов калия (K^{+}) и активного транспорта Ca^{2+} в обратимом цикле

Представленная на рисунке 3 модель сопряжения (ЭМЭС) включает автоволновой процесс сокращений разных элементов цитоскелета в тимоците, что может обеспечить синхронные колебания микропсевдоподий на поверхности лимфоцита. Наблюдаемая ранее в наших экспериментах остановка движения Т-лимфоцитов в крови при снижении температуры до 20°C, по-видимому, влияет на состояние поверхности клетки, снижая потребление АТФ, стабилизируя соответственно уровень ПП в митохондриях [21]. Эта энергия, запасённая в ПП, затрачивается в итоге на аккумуляцию катионов ДСМ в митохондриях, что проявляется в равномерном возгорании яркой желтой флуоресценции зонда по всей сети МЭК клетки.

Исходя из данных предыдущих экспериментов [4], полагаем, что ЭПО-эффект наблюдается именно в зрелых тимоцитах типа Т-хелперов, имеющих отчётливые цепочечные структуры митохондрий, которые могут энергетически поддерживать волну механических сокращений на мембранной поверхности и в объёме клетки в процессе распространения ПП в МЭК. Для обеспечения этого процесса, по-видимому, необходим определённый критический уровень АТФ, который зависит в свою очередь от исходной митохондриальной активности тимоцита.

3. Оценка порогового уровня энергии тимоцита для обеспечения ЭПО-стимуляции. Оценить уровень минимальной энергии АТФ, необходимой для запуска ЭПО-стимуляции тимоцита можно теоретически, подсчитав баланс энергии на всех этапах в системе сопряжения ЭМЭС. С этой целью используем статистические данные серии наших экспериментов по исследованию аккумуляции катионов ДСМ в митохондриях тимоцитов из разных тимусов до и после воздействия на них ЭПО *in vitro* [4].

Лимфоцит (timoцит) с митохондриями представим как "мембранные везикулы внутри везикулы". Активные митохондрии – основные везикулы, аккумулирующие катионы ДСМ по градиенту отрицательного электрического поля [7,8,42]. Интенсивность флуоресценции зонда-катиона ДСМ в митохондриях является ключевым индикатором энергетического состояния тимоцитов, в которых энергетические ресурсы обеспечиваются за счёт работы митохондрий, поскольку в тимоцитах практически нет гликолиза [37]. Микрофлуорометрический способ оценки величины суммы ТМП на внешней и митохондриальной мембранах ($\Delta\varphi_n + \Delta\varphi_m$) в интактном лимфоците основан на теории Нернста и на регистрации интенсивности флуоресценции ДСМ в митохондриальных областях клетки [35,36], кроме того можно подсчитать количество активных (с яркой флуоресценцией ДСМ) митохондрий на клетку в разных оптических срезах [4]. Этим способом в экспериментах с ЭПО была определена оптимальная концентрация зонда ДСМ во внешней среде ($C_0 = 0,15$ мкМ), насыщающая митохондрии до предела растворимости ДСМ в их внутренней среде: $C_m = 1,5$ мкМ.

Используя равновесные уравнения Нернста и данные экспериментов на тимоцитах с ДСМ [4,35,36], оценим максимальную энергию, запасённую в суммарном ТМП тимоцита в расчёте на одну митохондрию:

$$\text{ТМП} = \Delta\varphi_n + \Delta\varphi_m = -\left(\frac{RT}{F_m}\right) \ln \left[\frac{(C_m)_{\text{макс}}}{(C_0)_{\text{макс}}} \right] = -230 \pm 10 \text{ (мВ)} \quad (7)$$

Согласно теории Планка-Нернста эта величина соответствует свободной энергии аккумуляции (ΔG) катионов ДСМ в митохондриях [40,41] и может служить мерой для оценки суммарного ТМП на внешней ($\Delta\varphi_n$) и митохондриальной ($\Delta\varphi_m$) мембранах:

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{C_m}{C_0} \right) = 23 \pm 8 \left(\frac{\text{кДж}}{\text{моль}} \right) \quad (8)$$

В предыдущих экспериментах с тимоцитами и ДСМ (при замене натрия на калий в среде) был определён мембранный потенциал покоя на внешней мембране лимфоцита: ($\Delta\varphi_n$) = – 60 мВ [35]. Тогда отрицательный ПП в митохондриях тимоцита ($\Delta\varphi_m$) = – (175 ± 5) мВ, что соответствует запасу свободной энергии, запасённой в одной митохондрии:

$$\Delta G_m = (17,5 \pm 0,5) \text{ кДж/моль.}$$

Как уже отмечалось, суммарная энергетическая активность лимфоцита определяется числом активных митохондрий (n_m), и уровнем их ПП ($\Delta\varphi_m$). Анализ результатов цитофлуориметрии [4] показывает, что разброс данных в опытах на суспензии лимфоцитов из 12 тимусов существенно больше при инкубации тимоцитов с ЭПО по сравнению с контрольными данными. Важно, что в контрольных образцах флуоресцентный сигнал от клетки прямо коррелирует с числом флуоресцирующих (энергизированных) митохондрий (n_m), а при добавлении к клеткам ЭПО эта связь нарушается (нелинейный эффект). Из результатов этих экспериментов следует, что чем выше исходная способность тимоцита накапливать катионы ДСМ в митохондриях, тем сильнее стимулирующий эффект ЭПО: увеличение числа энергизированных митохондрий на клетку.

Если после предварительной инкубации тимоцитов с ЭПО в клетках возрастает число ярко-флуоресцирующих митохондрий (при одинаковой внешней концентрации ДСМ), то соответственно увеличилась суммарная свободная энергия (ΔG), запасаемая в ПП на мембранах митохондрий. Используя данные, полученные в опытах с ДСМ на тимоцитах из 12 тимусов [4], определили, что среднестатистическое число n_m увеличилось на 10 митохондрий после инкубации этих клеток с ЭПО. Следовательно, средняя ΔG_k на клетку возрастает до значений:

$$\Delta G_k = (275 \pm 5) \text{ кДж/моль.}$$

С другой стороны, работа кальциевых насосов на мембранах клетки требует определённой энергии, митохондрий, которая выделяется в результате обратимой реакции гидролиза АТФ до АДФ и фосфата (Φ_H):



В работе [43] показано, что при активации кальциевого насоса (переноса двух ионов кальция в цитоплазму) необходима энергия порядка 47,5 кДж/моль, однако, после деактивации АТФ-аз обратно возвращается энергия порядка 17 кДж/моль, которая затем может использоваться в следующем цикле транспорта кальция, в том числе в процессе его перераспределения в клетке. Отсюда следует, что для последующей активации одного кальциевого насоса в тимоците достаточно 42 кДж/моль, т.е. энергии, выделяемой при гидролизе макроэргической фосфатной связи одной молекулы АТФ. В то же время согласно нашей модели необходимо наличие МЭК из нескольких митохондрий, в котором может происходить согласованное перераспределение энергии АТФ и кальция в процессе сокращения элементов ЦС в клетке.

Известно, что зрелые малые Т-лимфоциты имеют определённый размер диаметром порядка 7 мкм [20,37]. В таком лимфоците в цепочке активных митохондрий, расположенной на половине меридиана клетки, может уместиться 10-14 митохондрий размером 0,5 мкм каждая. Как видно на экспериментальном фотоизображении тимоцитов (рис. 2а), в цепи МЭК, соединяющей полюса нижнего малого тимоцита, содержится, примерно, 12 активных митохондрий.

Из полученного выше решения телеграфного уравнения (2) следует, что для поддержки автоволнового сокращения филаментов ЦС после ЭПО-сигнала достаточно двух связанных митохондрий вблизи мембранной поверхности, которые обеспечивают включение МЭК. Из расчёта энергий согласно опытным данным получим, что увеличение средней энергии митохондрий на клетку будет следующее:

$$\Delta G_{\text{ЭПО}} - \Delta G_k = (N_{\text{ЭПО}} - N_k) \Delta G = (16 - 6) 17 = 170 \text{ (кДж/моль)}, \quad (10)$$

При этом полагаем, что ПП быстро выравнивается между мембранами митохондрий в МЭК [13].

Суммарный потенциал энергии, необходимый для запуска волнового процесса при ЭПО-стимуляции Т-лимфоцита можно оценить исходя из данных таблицы, полученных в экспериментах на тимоцитах в работе [4]. Согласно этим данным, в контрольных тимоцитах исходный МЭК должен иметь не менее 6 митохондрий на клетку с рабочим уровнем ПП для запуска ЭПО-стимуляции. Используя формулу (8), при заданной рабочей концентрации ДСМ получим необходимую свободную энергию, запасённую в минимальном МЭК тимоцита:

$$\Delta G_{\text{min}} = (17 \times 6) = 102 \text{ (кДж/моль)}$$

Полученная оценка нижнего порога энергии оказалась порядка величины энергии, выделяемой при гидролизе трёх молекул АТФ и необходимой для активации двух кальциевых насосов и одного акта элементарного сокращения.

Таким образом, энергия ПП в МЭК, преобразованная в АТФ, тратится на сократительные процессы в клетке, сопряженные с работой кальциевых насосов. Из данных других исследователей следует, что один элементарный акт сокращения использует свободную энергию гидролиза молекулы АТФ, преобразуя её энергию упругой деформации белка в филаменте [42]. В этом акте стационарная скорость энергопродукции будет:

$$\frac{dG}{dt} = \epsilon k_2 m_{\text{ст}}, \quad (11)$$

где m – число тормозящих мостиков, k_2 – константа скорости распада тормозящих мостиков, β – длина зоны, в которой мостик развивает тянущую силу, f – сила мостика, причём, $f\beta \approx \epsilon$, где ϵ – энергия гидролиза одной молекулы АТФ в одном элементарном цикле.

В клетке тяжи цитоскелета построены в основном из тонких (диаметром 7 нм) актиновых филаментов и длинных, толстых (диаметром 25 нм) микротрубочек, состоящих из α - и β -тубулина; белки цитоскелета принимают деятельное участие в движении клетки, поскольку для его осуществления требуется постоянное изменение ее форм [19,42]. Однако, на сегодня неизвестно какие именно сократительные белки могут участвовать в связывании с комплексом кальций-кальмодулин при стимуляции лимфоцитов гормоном ЭПО. Известно, что филаменты ЦС лимфоцита содержат актин, уже фосфорилированный миозин и тропонин, поэтому предполагается, что процесс сокращения - расслабления филаментов в этих зонах тимоцита идёт путём скольжения по типу замыкания - размыкания мостиков как в мышечных клетках) [42].

Как следует из экспериментальных кривых доза-эффекта, полученных в предыдущей работе [4], при росте дозы ЭПО выше $C_{\text{ЭПО}} > 20$ ед/мл происходит снижение эффективности стимуляции митохондрий или даже инверсия его. Это может быть обусловлено двумя механизмами:

- токсичной концентрацией кальция, которая возникает из-за гиперактивации работы кальциевых насосов в активных клетках и может повредить часть митохондрий с потерей ПП и с нарушением контактов между митохондриями в МЭК;

- непосредственным повреждением внешней мембраны и кальциевых каналов высокой дозой гормона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из сопоставления результатов опытов с ЭПО следует, что для индивидуальных тимусов исходная митохондриальная активность тимоцитов может сильно различаться, что отражается на эффективности их ЭПО-стимуляции [4,5]. В свете нашего моделирования и экспериментальных данных о реакциях тимоцитов на ЭПО, можно заключить, что именно исходный уровень митохондриальной активности и наличие контактов в МЭК предопределяет результат развития ЭПО-эффекта в тимоците: чем больше исходный запас энергии в МЭК в клетке, тем больше работы (механической и химической) она способна выполнить. Причем, возможно, что от исходного уровня этой энергии может зависеть и пролонгированная активация клеточного митоза, как это показано в исследовании методом оценки митотической активности стволовых клеток с помощью аналога флуоресцентного зонда ДСМ [44].

Таким образом, согласно нашей модели ЭПО-сигнал включает в тимоците волну изменения ПП в МЭК, сопряжённую с перераспределением кальция между сократительными структурами в клетке, что влияет на подвижность клеток в течение первой фазы до 60 минут, при этом не исключено, что возможен и внутриклеточный каскад реакций, вызывающий изменение проницаемости ядерной мембраны для кальция, активацию ядерных процессов и синтез специфических белков (типа лимфокинов), что реализуется в последующих фазах, которые здесь, однако, не рассматриваются.

Известно, что повышенное содержание некоторых гормонов в крови может вызывать аллергическую реакцию, а в свете наших данных это может быть сопряжено с повышением интенсивности и частоты колебаний ПП в МЭК и с активацией подвижности Т-хелперов. Имеются клинические данные, указывающие на то, что при некоторых патологических состояниях ЭПО повышает выход в кровь макрофагов, лимфоцитов, усиливая их миграцию [7,29]. Эти факты находятся в согласии с нашей моделью неспецифической ЭПО-стимуляции Т-лимфоцитов с участием МЭК в распространении энергии протонного потенциала по объёму лимфоцита, которая обеспечивает сократительные процессы внутри клетки и на её мембранной поверхности. Следует отметить, что на основе такого энергетического подхода можно рассмотреть неспецифические эффекты и некоторых других гормонов в иммунных клетках.

Список литературы / References:

1. Корнеева Е.А., Шхинек Э.К. *Гормоны и иммунная система*. Л.: 1988, 250 с. [Korneeva E.A., Shkhinek E.K. *Hormones and the immune system*. L.: 1988, 250 p. (In Russ.)].
2. Власов Г.П. Пептидные гормоны: успехи, проблемы, перспективы. *Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева*, 2005, т. 49, с. 11-33 [Vlasov G.P. Peptide hormones: achievements, problems, prospects. *J. of the Russian Chemical Society named after D.I. Mendeleev*, 2005, vol. 49, pp. 11-33 (In Russ.)].
3. Gu-Jiun Lin. Modulation by Melatonin of the Pathogenesis of Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, vol. 14, no. 6, pp. 11742-11766, doi: 10.3390/ijms140611742.
4. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating effect of erythropoietin on thy timocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. *Biochem. Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.
5. Parkhomenko T.V., Morozova G.I., Klytsenko O.A., Tomson V.V. Evaluation of restoring erythropoietin (EPO) effect on rat T-lymphocytes after their treatment with some inhibitors in vitro. *Annals of Hematology*, 2003, vol. 82, no. 6, p. 114.
6. Панков Ю.А. Новые системы проведения сигналов в механизмах гормональной регуляции. *Проблемы эндокринологии*, 2000, т. 46, № 2, с. 3-8 [Pankov Yu.A. New signaling systems in hormonal regulation mechanisms. *Problems of Endocrinology*, 2000, vol 46, no. 2, pp. 3-8, DOI: 10.14341/probl11837 (In Russ.)].
7. Варламова О.Н., Червяковская О.Д. Эритропоэтин и его биологическая роль. *Медицина: теория и практика*, 2019 т. 4, № 3, 61-69 [Varlamova O.N., Chervyakovskaya O.D. Erythropoietin and its biological role. *Medicine: theory and practice*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 61-69 (In Russ.)].
8. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 2011, vol.1807, pp. 1507-1538, doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.09.018.
9. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V.P. Energy of biological membranes. M.: Nauka, 1989, 123 p. (In Russ.)].
10. Ченцов Ю.С. *Общая цитология*. М.: МГУ, 1995 [Chentsov Yu.S. *General cytology*. M: Moscow State University, 1995 (In Russ.)].
11. Bakeeva L.E., Chentsov Y.S., Skulachev V.P. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1978, no. 501, pp. 349-369, DOI: 10.1016/0005-2728(78)90104-4.
12. Арамичева П.А., Андрианова Н.В., Бабенко В.А., Зорова Л.Д., Зоров С.Д., Певзнер И.Б., Попков В.А., Сухих Г.Т., Зоров Д.Б. и др. Митохондриальная сеть: электрический кабель и многое другое. *Биохимия*, 2023, т. 88, № 10, с. 1926-1939 [Aramicheva P.A., Andrianova N.V., Babenko V.A., Zorova L.D., Zorov S.D., Pevzner I.B., Popkov V.A., Sukhikh G.T., Zorov D.B. et al. Mitochondrial network: electrical cable and much more. *Biochemistry*, 2023, vol. 88, no. 10, pp. 1926-1939, doi: 10.31857/S0320972523100147 (In Russ.)].
13. Кучеренко Н.Е., Войницкий В.М. *Биоэнергетика*. Киев: КГУ, 1982, 270 с. [Kucherenko N.E., Voinitsky V.M. *Bioenergetics*. Kyiv: KSU, 1982, 270 p. (In Russ.)].

14. Morozova G.I., Kamyshev A.N., Frolova E.V., Gyrlin A.V. Changes of cell energetics and membrane potentials at the animal organ surfaces during ischemia, revealed by the method of fluorescent probes. *Abstracts constituent congress International society for pathophysiology*, 1991, p. 55.
15. Рамазанова Ж.А., Морозова Г.И. Моделирование автоволнового процесса на поверхности сердца с учётом митохондриальных электрокабелей. М.: РУДН. *Труды XLVI Всероссийской конференции по проблемам математики, физики, химии*, 2010, т. 13 [Ramazanova Z.A., Morozova G.I. Modeling of autowave process on the heart surface taking into account mitochondrial electric cables. M.: RUDN. *Proceedings of the XLVI All-Russian Conference on Problems of Mathematics, Physics, Chemistry*, 2010, vol. 13 (In Russ.)].
16. Parkhomenko T.V., Klytsenko O.A., Tomson V.V. Erythropoietin stimulates aerobic and anaerobic processes in rat cardiomyocyte. *Focus uni-luebeck.*, 2012, p. 37.
17. Solaini G., Sgarbi G., Lenaz G., Baracca A. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci. Rep.*, 2007, vol. 27, no. 1-3, pp. 11-21, doi: 10.1007/s10540-007-9033-4.
18. Афонькин С.Ю., Пинаев Г.П. Цитоскелет сигнализирует. *Биология*, 2000, № 22 [Afonkin S.Yu., Pinaev G.P. The cytoskeleton signals. *Biology*, 2000, no. 22 (In Russ.)].
19. Футолон А. *Цитоскелет. Архитектура и хореография клеток*. М.: Мир, 1987, 120 с. [Futolon A. *Cytoskeleton. Architecture and choreography of cells*. M.: Mir, 1987, 120 p. (In Russ.)].
20. Ляшенко В.А., Дроженников В.А., Молотковская И.М. *Механизмы активации иммунокомпетентных клеток*. М.: Наука, 1988, 240 с. [Lyashenko V.A., Drozhennikov V.A., Molotkovskaya I.M. *Mechanisms of activation of immunocompetent cells*. M.: Science, 1988, 240 p. (In Russ.)].
21. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г., Коробкова Е.Н., Полосин В.О., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ (в эксперименте и клинике). *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, 43-47 [Morozova G.I., Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Bazyeva F.H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematol. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, p. 43-47 (In Russ.)].
22. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424 [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-sensitive fluorescent probe. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424 (In Russ.)].
23. Van den Broek T., Borghans J.A.M., van Wijk F. *The full spectrum of human naive T cells*. *Nature Reviews. Immunology*, 2018, vol. 18, no. 6, pp. 363-373, DOI: 10.1038/s41577-018-0001-y.
24. Сараева Н.О. Использование рекомбинантного эритропоэтина в гематологической практике. *Сибир. мед. журн.*, 2006, т. 64, № 6, 5-10 [Saraeva N.O. Use of recombinant erythropoietin in hematological practice. *Sibir. med. zhurn.*, 2006, vol. 64, no. 6, 5-10 (In Russ.)].
25. Livnah O., Johnson D.L., Stura E.A., Farrell F.X., Barbon F.P., You Y, Liu K.D., Goldsmith M.A., He W., Krause C.D., Pestka S., Jolliffe L.K., Wilson I.A. An antagonist peptide-EPO receptorcomplex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1998, vol. 5, no. 11, pp. 993-1004, doi: 10.1038/2965.
26. Todosenko N.M., Shmarov V.A., Malashchenko V.V. et al. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, no. 36, pp. 277-281, doi: 10.1016/j.intimp.2016.05.006.
27. Cooper A.C., Breen C.P., Vyas B., Kemeny D.M., Mac-dougall I.C. Altered lymphocyte phenotypes in erythropoietin resistant haemodialysis. *Ann. Hematol.*, 2000, B-8, suppl. vol. 79, abstr. 30.
28. Wang S., Zhang C., Li J., Niyazi S., Zheng L., Xu M., Rong R., Yang C., Zhu T. Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization. *Cell Death Dis.*, 2017, vol. 8, no. 4, e2725, DOI: 10.1038/cddis.2017.104.
29. Осиков Т.В., Симонян Е.В., Сاعدгалина О.Т., Федосов А.А. Механизм влияния эритропоэтина на количественный состав лимфоцитов крови при экспериментальной термической травме. *Современные проблемы науки и образования*, 2016, № 2 [Osikov T.V., Simonyan E.V., Saedgalina O.T., Fedosov A.A. The mechanism of the effect of erythropoietin on the quantitative composition of blood lymphocytes in experimental thermal injury. *Modern problems of science and education*, 2016, no. 2 (In Russ.)].
30. Акопова О.В. *Обратимость энергозависимого накопления кальция в митохондриях*. Киев: Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Укр., 2008 [Akopova O.V. *Reversibility of energy-dependent calcium accumulation in mitochondria*. Kyiv: Physiology Institute im. A.A. Bogomolets NAS Ukr., 2008 (In Russ.)].
31. Лычковская Е.В., Труфанова Л.В., Белова О.А., Семенчуков А.А., Герцог Г.Е. Роль митохондрий в регуляции кальциевой сигнализации лимфоцитов. *Сибирское медицинское обозрение*, 2016, № 5, с. 5-14 [Lychkovskaya E.V., Trufanova L.V., Belova O.A., Semenchukov A.A., Gertsog G.E. The role of mitochondria in the regulation of calcium signaling of lymphocytes. *Siberian Medical Review*, 2016, no. 5, pp. 5-14 (In Russ.)].

32. Dupont G., Goldbetter A. *Theoretical Insights into the Origin of Signal-Induced Calcium Oscillations: From Experiments to Theoretical Models*. London: Academic Press, 1989.
33. Зинченко В.П., Долгачева Л.П. *Внутриклеточная сигнализация*. 2003 [Zinchenko V.P., Dolgacheva L.P. *Intracellular signaling*, 2003 (In Russ.)].
34. Костюк П.Г. *Кальций и клеточная возбудимость*. М.: Наука, 1986, 255 с. [Kostyuk P.G. *Calcium and cellular excitability*. M: Nauka, 1986, 255 p. (In Russ.)].
35. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273 [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu.A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266 -273 (In Russ.)].
36. Морозова Г.И. *Трансмембранные потенциалы и митохондриальная активность клеток*. М.: РУДН, 2013, 21 с. [Morozova G.I. *Transmembrane potentials and mitochondrial activity of cells*. M: RUDN, 2013, 21 p. (In Russ.)].
37. Робинсон М.В., Топоркова Л.Б., Труфакин В.А. *Морфология и метаболизм лимфоцитов*. Новосибирск: Наука, 1986, 126 с. [Robinson M.V., Toporkova L.B., Trufakin V.A. *Morphology and metabolism of lymphocytes*. Novosibirsk: Nauka, 1986, 126 p. (In Russ.)].
38. Маркин В.С., Чизмаджев. Ю.А. *Индукцированный ионный транспорт*. М.: Наука, 1974, 251с. [Markin V.S., Chizmadzhev Yu.A. *Induced ion transport*. M.: Nauka, 1974, 251 p. (In Russ.)].
39. Геннис Р., Биомембраны. *Молекулярная структура и функции*. М: Мир, 1997, 624 с. [Gennis R., Biomembranes. *Molecular structure and functions*. M: Mir, 1997, 624 p. (In Russ.)].
40. Веренинов А.А., Малахова И.И. *Транспорт ионов у клеток в культуре*. Л: Наука, 1986, 292 с. [Vereninov A.A., Malakhova I.I. *Ion transport in cells in culture*. L: Nauka, 1986, 292 p. (In Russ.)].
41. Добрецов Г.Е., Морозова Г.И., Баренбойм Г.М. Свободная энергия аккумуляции флуоресцентного зонда-катиона ДСМ в митохондриях живого лимфоцита. *Биофизика*, 1985, т. 30, с. 833-836 [Dobretsov G.E., Morozova G.I., Barenboim G.M. Free energy of accumulation of the fluorescent probe-cation DSM in mitochondria of a living lymphocyte. *Biophysics*, 1985, vol. 30, pp. 833-836 (In Russ.)].
42. Дещеревский А.В. *Математические модели мышечного сокращения*. М.: Наука, 1977, 160 с. [Deshcherevsky A.V. *Mathematical models of muscle contraction*. Moscow: Nauka, 1977, 160 p. (In Russ.)].
43. Владимиров Ю.В. Кальциевые насосы живой клетки. *Соросовский образовательный журнал*, 1998, № 3, с. 20-27 [Vladimirov Yu.V. Calcium pumps of a living cell. *Sorocovskij obrazovatelnyj zhurnal*, 1998, no. 3, pp. 20-27 (In Russ.)].
44. Parkhomenko T.V., Galibin O.V., Verbitskaya E.V., Tomson V.V. Evaluation of energy potential of fresh and stored bone marrow cells using a fluorescent potential-sensitive probe. *Cell Ther, Transplant*, 2016, vol. 5, no. 2, pp. 60-65, doi: 10.18620/18668836-2016-5-2-60-66.

TOWARDS THE MECHANISM OF NONSPECIFIC STIMULATION OF LYMPHOCYTES: A MODEL OF THYMOCYTE RESPONSE TO ERYTHROPOIETIN INCLUDING THE MITOCHONDRIAL ELECTRIC CABLE

Medvedeva D.I., Morozova G.I., Rybakov Yu.P.

Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba
Miklukho-Maklaya str., 6, Moscow, 117198, Russia, e-mail: gimorozova@mail.ru
Received 16.08.2025

Abstract. Due to the presence of side effects of tissue-specific hormones and proteins, it is important to study the mechanisms of their non-specific action on lymphocytes. This work is devoted to modeling the non-specific reaction of lymphocytes (from the thymus of rats) to erythropoietin depending on the change in the proton potential (PP) generated on the membranes of mitochondria in the mitochondrial electric cable (MEC) system. Thus, the transport of ATP energy to the places of its consumption is carried out. The work proposes a model of electro-mechanical-energetic coupling in an EPO-stimulated T-lymphocyte associated with contractions of the cell cytoskeleton microfilaments, the autowave nature of which is provided by a periodic wave of PP change in the MEC, synchronous with the redistribution of calcium between the endoplasm and mitochondria of the lymphocyte. Based on the solution of the telegraph equation, the attenuation indices of the PP wave for the specified parameters of the T-lymphocyte mitochondria are estimated. Our estimates, based on experimental data obtained previously using the potential-sensitive fluorescent cation probe DSM, show that initiation of the contraction wave after the EPO signal in a T-lymphocyte requires the presence of at least two contact mitochondria near the receptor zone of the outer membrane, as well as an MEC system of 6 mitochondria with a total energy of about 102 kJ/mol. Approximately this amount of ATP energy is required to activate two calcium pumps in the membrane. A significant dependence of the EPO effects on lymphocytes on the initial energy status of thymocytes is noted.

Key words: nonspecific hormonal stimulation, erythropoietin, T-lymphocyte, thymocyte, mitochondrial electric cable, proton potential, telegraph equation, model of electromechanical-energetic coupling, free cell energy, calcium pumps.

MATHEMATICAL MODELING OF BIODEGRADATION PROCESSES IN A BIODIGESTER: BIODIGESTION STAGES DYNAMICS

Hernandez Jimenez H., Campos Cobos E.J., Morales Marco A., Agustin Serrano R., Zenteno Mateo B., Cervantes Tavera A.M., Hernandez Santiago A. A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

Ciudad Universitaria CU, San Claudio S/N. C.P 72570, Puebla, Pue., Mexico

Received 16.08.2025

Abstract. The study of biodigesters for biogas production is a viable and inexpensive alternative to contribute to reducing environmental pollution and supporting energy production. This research presents the stages of biodegradation that a biodigester undergoes to produce methane from organic waste of animal origin. The result of this research on static and dynamic biodigestion models is the proposal of a new mathematical model based on bacterial dynamics to produce biol, a biodegradable product in liquid phase that can be used as organic fertilizer. A mathematical analysis of the proposed mathematical model is the subject of future studies and promises applicability in the design and optimization of biodigesters.

Key words: *biodigestion, biogas, bacteria, biol.*

1. Introduction. Today, the study and construction of biodigesters is very important, as they allow us to solve the problem of organic waste and soil contamination by feces. For example, the organic waste from a country's pet population. Mexico is one of the Latin American countries with the highest number of pets (canines), with an estimated 19 million animals (according to 2025 data from the National Institute of Geography and Statistics (Instituto Nacional de Estadística y Geografía – INEGI). According to data from the National Autonomous University of Mexico (Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM), an average dog weighing 15 kg defecates about 600 grams of feces daily. This generates tons of invisible organic waste that can become a public health problem. Transforming the biomass of this type of organic waste into biofuel, using a biodigester, could be an environmentally friendly solution. Biol is a product composed of nutrients such as nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), and sulfur (S), and a biofertilizer that can be used for plant production. Furthermore, this potential solution reduces soil pollution and eliminates unpleasant odors in the environment.

It is well known that dog excrement contains an average of 0.7% nitrogen, 0.25% P_2O_3 and 0.02% K_2O (fresh weight); in comparison, fresh cattle manure contains 40% more nitrogen, the same amount of P_2O_3 and one twentieth of the amount of K_2O [1,2]. This material contains an excess of total nitrogen (TN) with respect to total organic carbon (TOC), so aerobic or anaerobic self-degradation will not occur autonomously, and it is necessary to mix with other carbon-rich waste in co-composting or co-digestion processes [3,4]. These conditions of transformation of biomass to Biol, show the complexity of the problem and its multi-variable approach.

Our research aims to address the complexity of transforming organic waste into biofuel from a mathematical modeling perspective. A brief review of the models established over the past decades is provided. In this initial approach to solving the problem, a new mathematical model is proposed by identifying key control variables and parameters for the biomass transformation process.

2. Biological background. The bio digestion process of organic waste biomass into biogas is well known to be a process linked to other subprocesses. The subprocesses involved in a biodigester are defined below. Anaerobic digestion is the transformation process by which we obtain biogas from feces, based on four stages [5–12]:

Hydrolytic stage: Complex organic compounds are depolymerized by the action of hydrolytic enzymes into soluble and easily degradable molecules. This is an extracellular enzymatic process.

Acidogenic: The soluble compounds obtained from the previous stage are transformed into short-chain fatty acids (volatile fatty acids), namely, acetic, propionic, butyric, and valeric acids, mainly.

Acetogenic: The third phase, acetogenesis, involves the metabolism and transformation of organic acids (propionic, butyric, and pentatonic acids) and alcohols into acetate. This stage produces digestates: the solid and liquid residues remain after the organic matter has been decomposed. Biol: refers to the liquid fraction of digestate, which is used as a biofertilizer and is a rich source of nitrogen, phosphorus, potassium, and sulfur, as well as various micronutrients and organic matter. The proportion of ammonium ion (NH_4^+) is generally higher in the digestate than in the organic substrate entering the AD process [13].

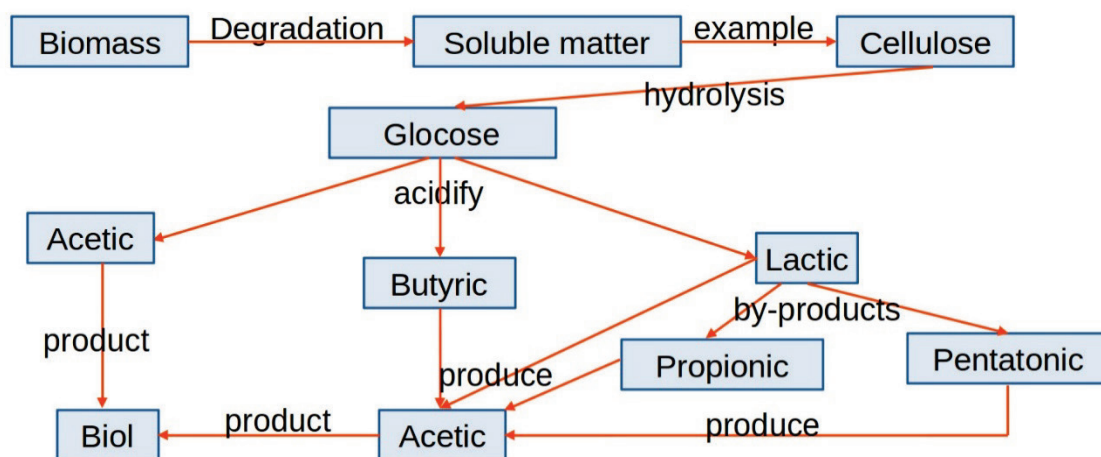
Methanogenic: A process stage in which acetic acid converts hydrogen and carbon dioxide into methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2).

The most important reactions carried out in each stage of bio-digestion process are presented in Table 1.

It is important to mention that Biol is obtained in the acetogenic stage under conditions to produce acetate-derived products. The focus of our research is on this stage. Therefore, it is important that the mathematical model considers the subprocesses prior to the acetogenic stage.

Table 1. Information from a bio digestion stages in the process of biodegradation [5–15]

Stages	Reactions	Microorganism	Products
Hydrolytic	$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow n(C_6H_{12}O_6) + nH_2$	Hydrolytic bacteria	soluble compounds: glucose
Acidogenic	$C_6H_{10}O_6 \leftrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$ $C_6H_{10}O_5 + 2H_2 \leftrightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$ $C_6H_{10}O_6 \rightarrow 3CH_3COOH$	Acidogenic bacteria	Acids as: acetic, propionic, butyric, pentatonic acids
Acetogenic	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+ + HCO_3^- + 3H_2$ $C_6H_{10}O_6 + 2H_2O \leftrightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$ $CH_3CH_2OH + 2H_2O \leftrightarrow CH_3COO^- + 3H_2 + H^+$	Methanogenic acetoclastic and homo-acetogenic bacteria	Biol: N, P, K and S, various micronutrients and organic matter
Methanogenic	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$ $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ $2CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COOH$	Methanogenic acetoclastic and hydrogenophilic methanogenic bacteria	methane and carbon dioxide

**Figure 1.** By-products, products of organic waste biomass for stage each in a bio-digester process [2,3]

3. Mathematical Biological of biodigester process. The model to describe considers the chemical reactions more important defined in Table 1, for stage each. Also, the main products obtained from biodegradation by stage are considered by the model and are presented as a mind map in Figure 1.

The dynamics variables considered by mathematical model are: b_{AB} is endogenous respiration rate, Z_{AD} is acidogenic biomass concentration, $[product]$ represents chemical concentration of “product”, X_G =concentration of glucose fermenters, X_p =chemical concentration of the Biol.

$$\frac{dX_G}{dt} = Y'_{acetic} \cdot \frac{d[acetic]}{dt} + Y'_{propionic} \cdot \frac{d[propionic]}{dt} + Y'_{butyric} \cdot \frac{d[butyric]}{dt} - X_G \cdot b_{AB} \quad (1)$$

$$\frac{d[acetic]}{dt} = \frac{2R_G}{\left(1 + \frac{[N_{ADH}]}{[N_{AD^+}]}\right)^2} - \frac{2R_G}{\left(1 + \frac{[N_{ADH}]}{[N_{AD^+}]}\right)^2 \left(1 + \left(\frac{[N_{ADH}]}{[N_{AD^+}]}\right)^{-1}\right)} \quad (2)$$

$$\frac{d[propionic]}{dt} = \frac{R_P}{1 + \frac{[N_{ADH}]}{[N_{AD^+}]}} \quad R_P = \frac{k_P X_P [propionic]}{(K_P + [propionic])} \quad (3)$$

$$\frac{db_{AB}}{dt} = r_h = \frac{K_M S_{bp}/Z_{AD}}{[K_S + (S_{bp}/Z_{AD})]} Z_{AD}, \quad \frac{dZ_{AD}}{dt} = Y_{AD} r_h - b_{AB} Z_{AD}, \quad (4)$$

where:

$$S_{bp} = \frac{S_{bpi}}{\left\{1 + \frac{Y_{AD} K_M + \left(\frac{1}{R} + b_{AB}\right) [1 + b_{AB} R (1 - Y_{AD})]}{Y_{AD} K_G \left(\frac{1}{R} + b_{AB}\right)}\right\}}, Z_{AD} = \frac{Y_{AD} (S_{bpi} - S_{bp})}{[1 + b_{AD} R (1 - Y_{AD})]} \quad (5)$$

$$\frac{dX_P}{dt} = Y_P \cdot \frac{d[\text{propionic}]}{dt} - X_P \cdot b_{AB} \quad (6)$$

And control parameters: $K_M=5.27$, $R=8.314$, $K_S=7.98$, S_{bp} , S_{bpi} , Y_{name} , Y_{AD} , K_G , Y_P , $[N_{AD}H]$ and $[N_{AD}^+]$. The rest of the values of the control parameters can be consulted in Refs. [5–15], except for the initial chemical concentrations: $[N_{AD}H]$ and $[N_{AD}^+]$ that can be proposed as initial conditions of the proposed mathematical model. So, the model considers that the hydrolysis sub-process generates glucose, which is a byproduct of cellulose or one of its derivatives. It also considers the byproducts of glucose produced through the sub-process acidification, whose derivatives are acetic, propionic, butyric and pentatonic acid (see second and third equations). Finally, the model considers that the dynamics of endogenous biomass respiration b_{AB} depend on the acidification mechanism Z_{AB} , as well as biodegradable biomass particles S_{bp} . Furthermore, the dynamics of acidogenic biomass concentration are determined by a feedback process with endogenous respiration (see equations 4 and 5). The equations for S_{bp} and Z_{AD} are initial condition equations for solving the dynamic system described above. The last of the dynamic equations allows the chemical concentration of Biol X_P to be obtained from the chemical concentration of propionic acid $[\text{propionic}]$ and the endogenous respiration ratio b_{AB} .

4. Conclusions. The proposed mathematical model considers the variables and control parameters necessary for the transformation of organic waste into biofuel, depending on the amount of nutrients such as N, P, K, and S present in these wastes. The proposed mathematical model is a nonlinear dynamic system of six equations, two auxiliary equations for initial conditions, nine control parameters, and mixed boundary conditions. This research motivates future studies on the stability analysis of the mathematical model and its numerical solution. The numerical solution will allow for the study of the dynamics of the organic waste biomass transformation process into biofuel. Finally, the model does not consider the equations corresponding to the dynamics of methanogenesis, since the objective of the model is to establish the dynamics of the conditions necessary to obtain Biol, but not methane. However, if the reader wishes, they can add the equations proposed in the literature corresponding to this final stage.

References:

1. Nemiroff L., Patterson J. Design, testing and implementation of a large-scale urban dog waste composting program. *Compost science & utilization*, 2007, vol. 15, no. 4, pp. 237-242.
2. Gavala Hariklia N. Angelidaki Irini, Ahring Birgitte K. Kinetics and Modeling of Anaerobic Digestion Process. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 2003, vol. 81.
3. Martinez-Sabater E., Garcia-Munoz M., Bonete P., Rodrigue M., Sanchez-Garcia F.B., Purez-Murcia M.D., Moral R. Comprehensive management of dog faeces: Composting versus anaerobic digestion. *Journal of environmental management*, 2019, vol. 250, p. 109437.
4. Okoroigwe E.C., Ibeto C.N., Okpara C.G. Comparative study of the potential of dog waste for biogas production. *Trends in applied sciences research*, 2010, vol. 5, no. 1, pp. 71-77.
5. Sotemann S.W., Ristow N.E., Wentzel M.C., Ekama G.A. A steady state model for anaerobic digestion of sewage sludges. *Water SA*, 2005, vol. 31, no. 4, pp. 511-528.
6. Sotemann S.W., Musvoto E.V., Wentzel M.C., Ekama G.A. Integrated biological, chemical and physical processes kinetic modelling: part 1-anoxic-aerobic C and N removal in the activated sludge system. *Water Sa*, 2005, vol. 31, no. 4, pp. 529-544.
7. Sotemann S.W., Van Rensburg P., Ristow N.E., Wentzel M.C., Loewenthal R.E., Ekama G.A. Integrated chemical/physical and biological processes modelling: part 2-anaerobic digestion of sewage sludges. *Water Sa*, 2005, vol. 31, no. 4, pp. 545-568.
8. Shively J.E., Conrad H.E. *Stoichiometry of the Nitrous Acid Deaminative Cleavage of Model Amino Sugar Glycosides and Glycosaminoglycuronans*. 1970, vol. 9, no. 1.
9. Liang Y., Christian W.P., Jingwei M., Shulin C. Mathematical Modeling in Anaerobic Digestion (AD). *Journal of Bioremediation & Biodegradation. Department of Biological Systems Engineering, Washington State University*, 2013.
10. Mo R., Guo W., Batstone D., Makinia J., Li Y. Modifications to the anaerobic digestion model no. 1 (ADM1) for enhanced understanding and application of the anaerobic treatment processes—A comprehensive review. *Water research*, 2023, vol. 244, p. 120504.
11. Moller Kurt, Moller Torsten. *Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review*. Institute of Crop Science, Fertilisation & Soil Matter Dynamics, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany, 2012.
12. Zirkler D., Peters A., Kaupenjohann M. Elemental composition of biogas residues: Variability and alteration during anaerobic digestion. *Biomass and bioenergy*, 2014, vol. 67, pp. 89-98.
13. Poinapen J., Wentzel M.C., Ekama G.E. Biological sulphate reduction with primary sewage sludge in an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor-Part 1: Feasibility study. *Water SA*, 2009, vol. 35, no. 5.
14. Arthurson V. Closing the global energy and nutrient cycles through application of biogas residue to agricultural land—potential benefits and drawbacks. *Energies*, 2009, vol. 2, no. 2, pp. 226-242.

15. Anukam A., Mohammadi A., Naqvi M., Granstrom K. A review of the chemistry of anaerobic digestion: Methods of accelerating and optimizing process efficiency. *Processes*, 2019, vol. 7, no. 8, p. 504.

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОРАЗЛОЖЕНИЯ В БИОРЕАКТОРЕ:
ДИНАМИКА СТАДИЙ БИОПЕРЕВАРИВАНИЯ**

**Эрнандес Хименес Х., Кампос Кобос Э.Х., Моралес Марко А., Агустин Серрано Р., Зентено Матео Б.,
Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А.**

Заслуженный автономный университет Пуэбла

г. Пуэбла, Мексика

Поступила в редакцию 16.08.2025

Аннотация. Исследование биореакторов для производства биогаза является жизнеспособной и недорогой альтернативой, способствующей снижению загрязнения окружающей среды и поддержке производства энергии. В данном исследовании представлены стадии биodeградации, которые биореактор проходит для получения метана из органических отходов животного происхождения. Результатом данного исследования статических и динамических моделей биodeградации является предложение новой математической модели, основанной на динамике бактерий, для получения биола – биоразлагаемого продукта в жидкой фазе, который может быть использован в качестве органического удобрения. Математический анализ предлагаемой математической модели является предметом будущих исследований и обещает возможность её применения при проектировании и оптимизации биodeградаторов.

Ключевые слова: биodeградация, биогаз, бактерии, биол.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЦЕПЕЙ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ

Назарьев Е.В., Мишунин Б.А., Пластун И.Л.

Саратовский государственный технический университет им. Ю.А. Гагарина
Ул. Политехническая 77, г. Саратов, 410054, РФ; e-mail: bogdan.mishunin@gmail.com
Поступила в редакцию 29.08.2025

Аннотация. Используя метод теории функционала плоскости, было проведено моделирование и анализ межмолекулярного взаимодействия аминокислотных цепей рецептора и лигандов А и С фактора некроза опухоли (ФНО). Основой для исследования послужила диаграмма связывания, описывающая последовательности аминокислот в цепях и связи между цепями. Были выбраны различные фрагменты цепей, принадлежащих рецептору и лигандам, и рассчитано межмолекулярное взаимодействие аминокислот в отдельной цепи и в присутствии обеих цепей. Расчёты проводились с использованием программных комплексов Gaussian и Orca, а в качестве визуализаторов молекулярных структур применялись GaussView и Avogadro. Для каждого исследуемого комплекса были построены структуры и ИК-спектры, отражающие колебания связей. Чтобы исключить влияние гармонического приближения, используемого для расчетов этими программными комплексами, в работе было выполнено масштабирование частот. Для определения степени комплексообразования оценивались параметры водородных связей, образующихся между аминокислотными остатками молекул, принадлежащих разным цепям, такие как длина водородной связи, длина водородного мостика, частотный сдвиг, энергия и интенсивность связи. Показано, что по мере увеличения числа взаимодействующих фрагментов усиливаются водородные связи, поскольку наблюдается сдвиг колебаний в низкочастотную область.

Ключевые слова: теория функционала плотности, молекулярные структуры, ИК-спектры, водородные связи, моделирование.

Фактор некроза опухоли (ФНО), или tumor necrosis factor (TNF), представляет собой внеклеточный белок, относящийся к цитокинам, регулирующим межклеточные и межсистемные взаимодействия. Этот белок вырабатывается клетками крови при опухолях и воспалении и обеспечивает согласованность действия нервной, иммунной и эндокринной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [1,2]. Главной особенностью TNF является способность оказывать цитотоксическое действие на некоторые опухолевые клетки, вызывая их геморрагический некроз в условиях *in vivo*, при этом не повреждая здоровые клетки.

Основой биологического действия TNF является взаимодействие двух крупных белковых структур – рецептора и лиганда. Фрагмент рецептора, представляющий собой сильно вытянутую сборку из четырёх доменов со сходной укладкой, связывается в борозде между двумя соседними субъединицами TNF β . Структура комплекса определяет ориентацию лиганда относительно клеточной мембраны и предоставляет модель для понимания активации рецептора TNF. В статье [3] подробно рассмотрено межмолекулярное взаимодействие между белковыми структурами, входящими в состав TNF рецептором и лигандом А и С. В статье приведена диаграмма связывания (рис. 1).

В данной работе представлено моделирование этого взаимодействия и оценка степени комплексообразования. Для исследования взаимодействия будем брать по фрагменту из каждой цепи аминокислот, в которых хотя бы по одному аминокислотному остатку взаимодействуют с аминокислотным остатком другой цепи. Сперва рассчитаем взаимодействие между молекулами в каждом отдельном фрагменте, а затем оценим силу взаимодействия между фрагментами и как оно влияет на комплексообразования участков цепи.

Для оценки степени комплексообразования будем рассматривать водородные связи как один из основных показателей межмолекулярного взаимодействия. Классификация производилась по таблице 2, приведенной в [4]. Она основывается на длине водородного мостика и энергии связи.

Молекулярное моделирование комплексообразования аминокислот, включая расчёт структур и ИК-спектров молекул и их комплексов, проводилось на основе метода теории функционала плотности (ТФП) [5] с использованием функционала B3LYP и базисного набора 6-31G(d) [6] в программных пакетах Gaussian и Orca. Для визуализации молекулярных структур использовались программы Avogadro и GaussView.

Для минимизации расхождения между расчётными и экспериментальными частотами, вызванными влиянием гармонического приближения при расчете в используемых программах, в работе выполнено масштабирование частот. Это позволяет приблизить расчётные данные к эксперименту. На основе сравнения расчётных ИК-спектров с экспериментальными данными были выведены и использованы следующие масштабные коэффициенты: 0,987 (диапазон 0–1000 см⁻¹); 0,961 (диапазон 1000–2000 см⁻¹); 0,948 (диапазон выше 2000 см⁻¹). Эти диапазоны выбраны на основании того, что эффект ангармоничности в низкочастотной области спектра

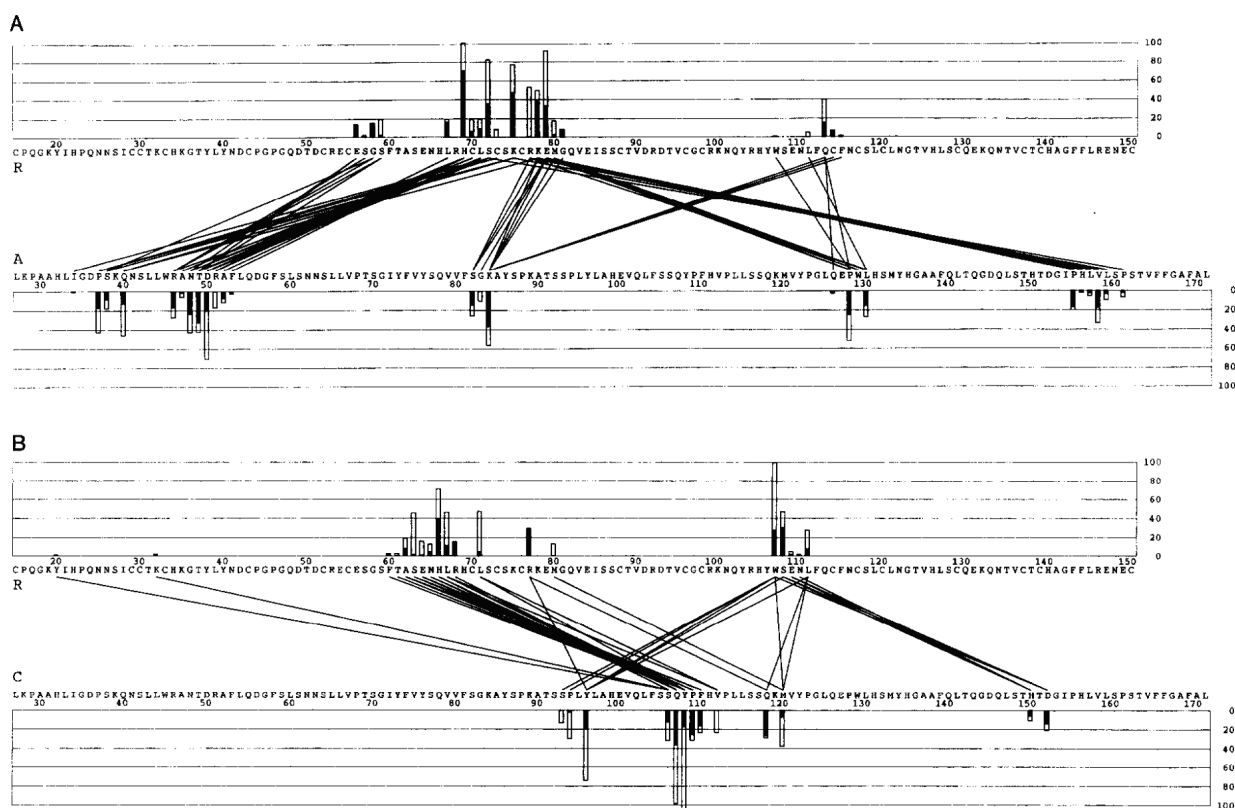


Рисунок 1. Диаграмма связывания рецептора и лиганда

Таблица 1. Классификация водородных связей

	Энергия связи, ΔH , ккал/моль	Длина водородного мостика, R_b , Å
Слабые	$< 2,87$	3,2 – 4,0
Средние	3,82 – 14,43	2,5 – 3,2
Сильные	14,34 – 28,65	2,2 – 2,5

минимален, так как это центр молекулы, и связи колеблются равномерно. Диапазон $1000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ соответствует середине молекулы, где отклонение увеличивается. Максимальное отклонение наблюдается на периферии молекулы (выше 2000 cm^{-1}), что видно на спектрах.

Степень комплексообразования исследовалась путём анализа параметров водородных связей. Энергия водородных связей рассчитывалась с использованием программного обеспечения Gaussian и эмпирической формулы Иогансена [7]:

$$-\Delta H = 0,3 \cdot \sqrt{\Delta \nu - 40}, \quad (1)$$

где $\Delta \nu$ – величина сдвига частоты для валентных колебаний связей О-Н.

Рассмотрим фрагмент аминокислотной цепи фенилаланин(F)-глутамин(Q), принадлежащий рецептору, и глутамин(Q)-глутаминовая кислота(E), принадлежащий А лиганду (рис. 2 и 3).

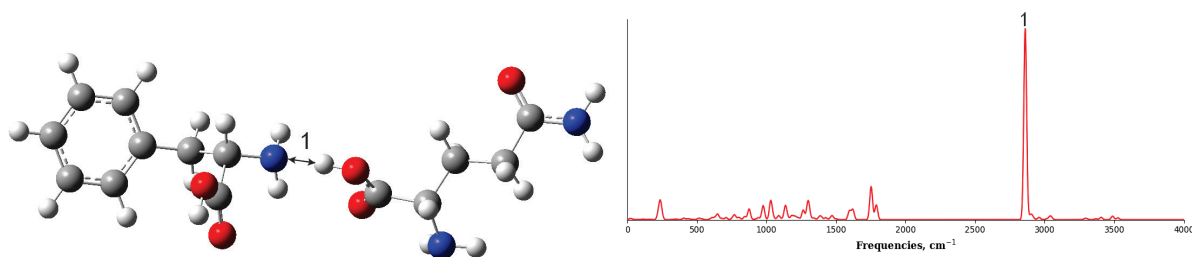


Рисунок 2. Рассчитанная структура и ИК-спектр участка аминокислотной цепи фенилаланин(F)-глутамин(Q). Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи между молекулами на структурах и соответствующие им пики на ИК-спектрах

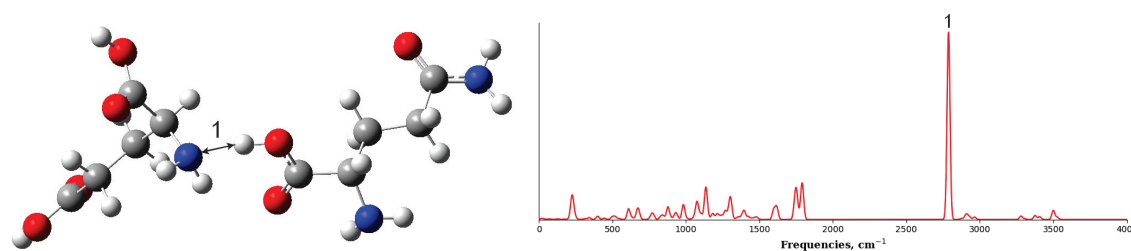


Рисунок 3. Рассчитанная структура и ИК-спектр участка аминокислотной цепи глутамин(Q)-глутаминовая кислота(E). Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи между молекулами на структурах и соответствующие им пики на ИК-спектрах

Аналогичным образом рассмотрим фрагменты цепей триптофан(W)-серин(S)-тирозин(Y), принадлежащий рецептору, и серин(S)-пролин(P) (рис. 4) и фрагменты цепей глутамин(Q)-лизин(K)-метианин(M), принадлежащий рецептору, и лейцин(L), принадлежащих С лиганду (рис. 5).

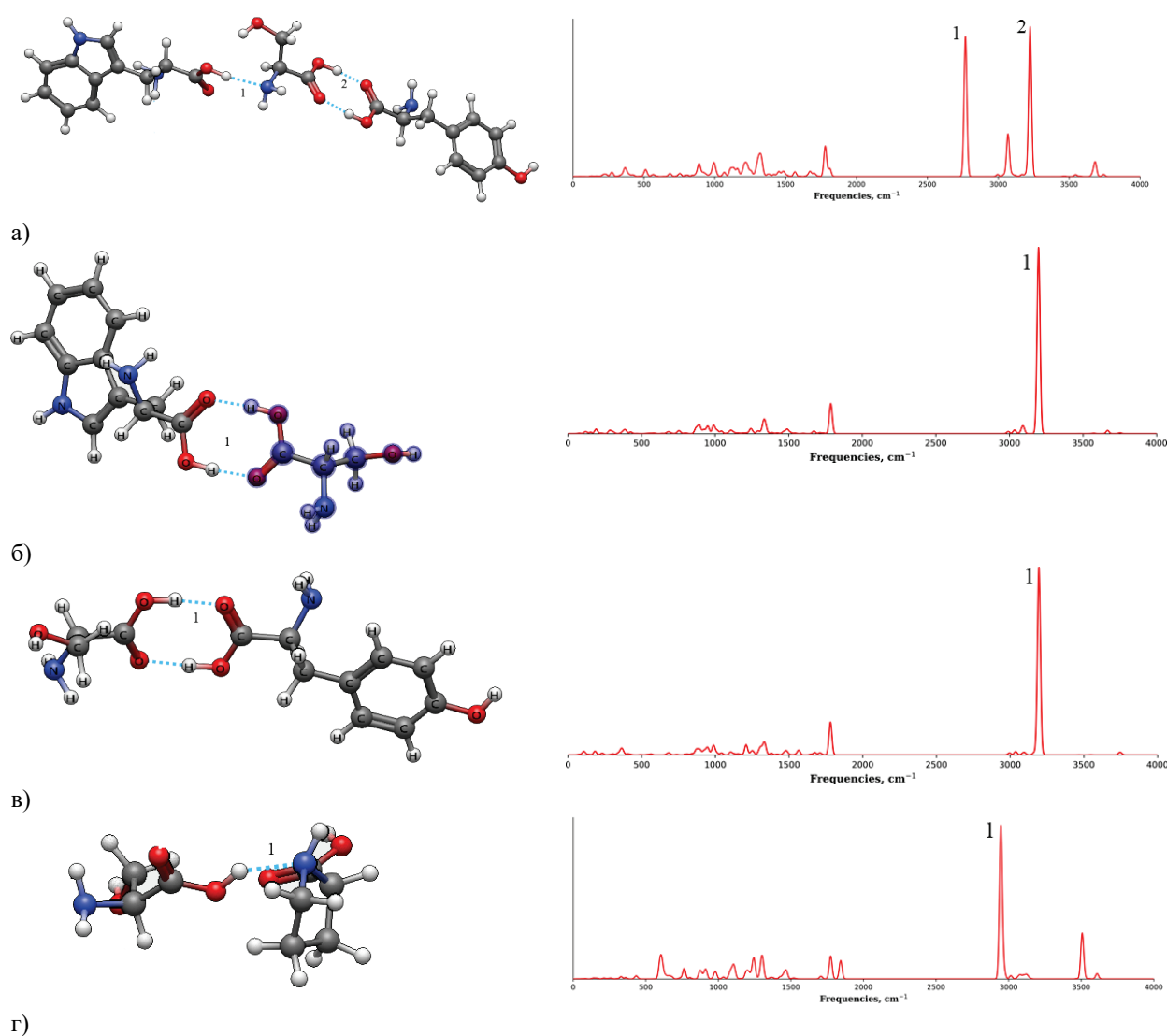


Рисунок 4. Рассчитанные структуры и ИК-спектры участков аминокислотных цепей глутамин(Q)-лизин(K)-метианин(M). Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи между молекулами на структурах и соответствующие им пики на ИК-спектрах

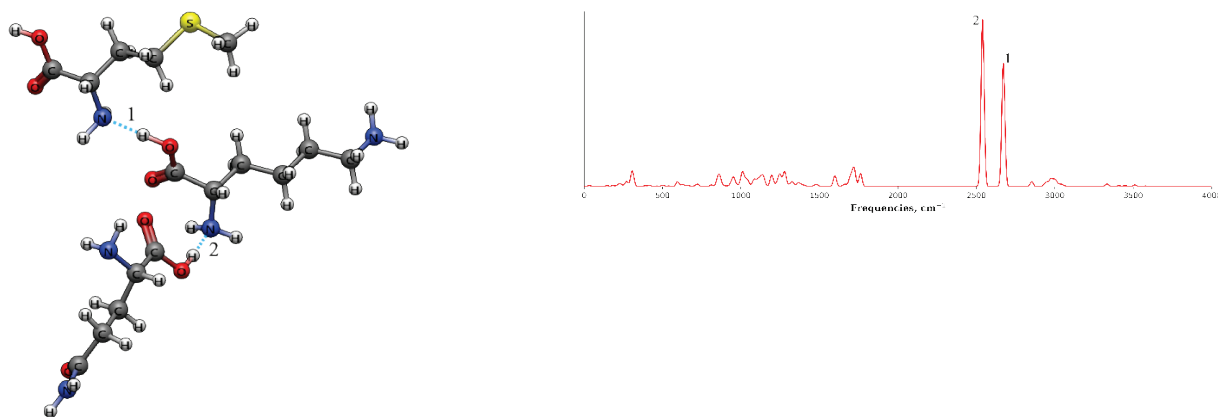


Рисунок 5. Рассчитанные структуры и комплексы участков аминокислотных комплексов триптофан(W)-серин(S) (б), серин(S)-тирозин(Y) (в) и рассматриваемых цепей триптофан(W)-серин(S)-тирозин(Y) (а) и серин(S)-пролин(P) (г). Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи между молекулами на структурах и соответствующие им пики на ИК-спектрах

Далее, в соответствии со схемой, приведенной в [3], соединим эти фрагменты цепей в молекулярные комплексы (рис. 6).

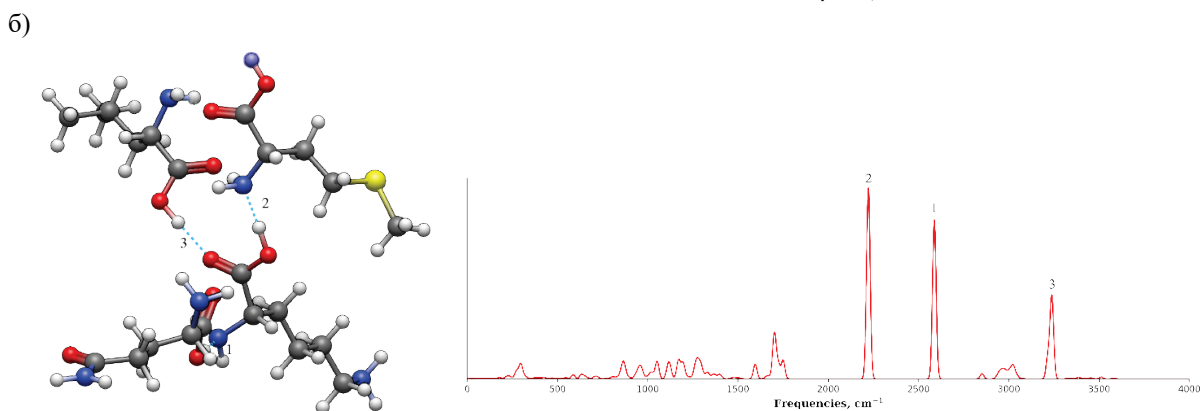
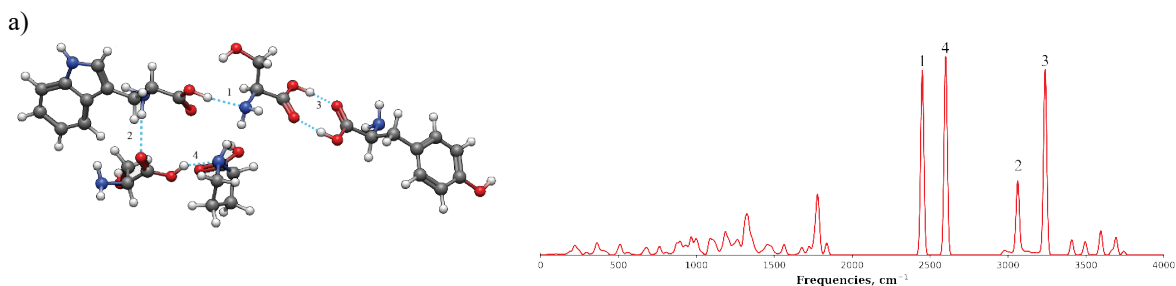
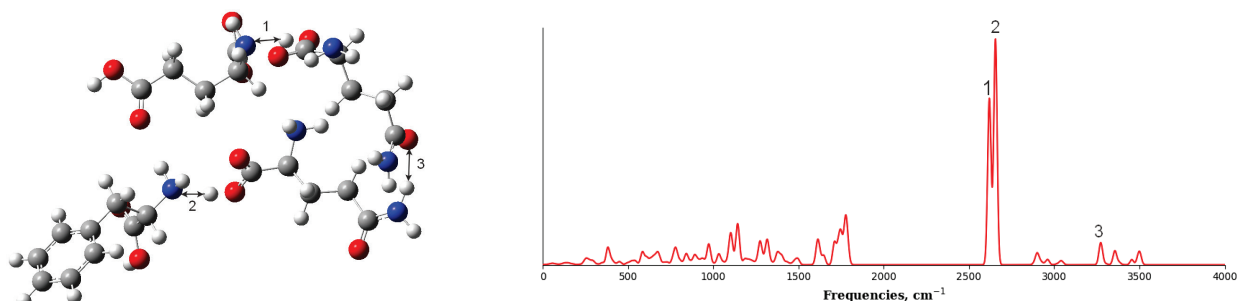


Рисунок 6. Рассчитанные структуры и ИК-спектры молекулярных комплексов фенилаланин(F)-глутамин(Q)+глутамин(Q)-глутаминовая кислота(E) (а), триптофан(W)-серин(S)-тирозин(Y) и серин(S)-пролин(P) (б), глутамин(Q)-лизин(K)-метианин(M) и лейцин(L) (в). Цифрами обозначены образовавшиеся водородные связи между молекулами на структурах и соответствующие им пики на ИК-спектрах

Таблица 2. Параметры водородных связей

Комплекс	Тип связи	Длина Н-связи R, Å	Длина водородного мостика R _b , Å	Частота ν , см ⁻¹	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, см ⁻¹	Энергия связи ΔH , ккал/моль	Интенсивность I _{IR} , км/моль	Тип связывания
F-Q	O-H...N	1,76	2,77	2860	636	7,3	2584	I
Q-E	O-H...N	1,73	2,75	2786	710	7,8	2227	II
F-Q+Q-E(1)	O-H...N	1,69	2,72	2619	877	8,7	2277	II
F-Q+Q-E(2)	O-H...N	1,70	2,72	2655	841	8,5	3091	I
F-Q+Q-E(3)	N-H...O	2,00	3,02	3271	138	3,0	210	M
W-S-Y	N-H...O	1,71	2,65	2768	902	8,8	3122	III
S-P	N-H...O	1,72	2,65	2946	808	8,3	1794	IV
W-S-Y+S-P(1)	N-H...O	1,70	2,75	2450	1220	10,3	3008	III
W-S-Y+S-P(2)	O-H...N	1,72	2,73	3062	602	7,1	1149	M
W-S-Y+S-P(3)	O-H...O	1,73	2,85	3238	432	5,9	3023	M
W-S-Y+S-P(4)	N-H...O	1,83	2,65	2600	1070	9,6	3236	IV
Q-K-M	N-H...O	1,74	2,65	2540	923	8,9	2863	V
Q-K-M+L(1)	N-H...O	1,73	2,65	2587	1084	9,7	2560	V
Q-K-M+L(2)	N-H...O	1,73	2,73	2221	1450	11,2	3078	M
Q-K-M+L(3)	O-H...N	1,83	2,75	3238	433	5,9	1317	M

Римскими цифрами обозначены различные типы водородного связывания в разных комплексах:

- I – связь фенилаланин(F)-глутамин(Q);
 II – связь глутамин(Q)-глутаминовая кислота(E);
 III – связь триптофан(W)-серин(S);
 IV – связь серин(S)-пролин(P);
 V – связь глутамин(Q)-лизин(K);
 M – связи между цепями

Как видно на рисунке 6, спектральные пики, соответствующие колебаниям водородных связей внутри молекулярных цепей, сместились влево. Это свидетельствует об усилении степени комплексообразования во всех рассмотренных случаях. Параметры этих связей, а также связей, образовавшихся между двумя цепями, приведены в таблице 2.

На основании данных, приведенных в таблице 2, можно сделать вывод о том, что при взаимодействии аминокислотных цепей друг с другом наблюдается более сильное взаимодействие внутри цепей по сравнению с тем, которое проявляется в обособленной цепи. При этом степень комплексообразования становится тем выше, чем больше молекул участвует во взаимодействии.

Наиболее сильными оказались N-H...O связи в комплексе триптофан(W)-серин(S)-тирозин(Y) + серин(S)-пролин(P) под номерами 1 и 2. Частотный сдвиг в этих связях составил 1220 см⁻¹ и 1070 см⁻¹ соответственно, а энергия связи – 10,3 ккал/моль и 9,6 ккал/моль. Примерно такая же по силе степень взаимодействия наблюдается в комплексе глутамин(Q)-лизин(K)-метианин(M) + лейцин(L) в связи под номером 1. Её частотный сдвиг составил 1084 см⁻¹, а энергия связи – 9,7 ккал/моль. Эти связи можно отнести к средним близким к сильным.

Связи между цепями (не обозначены римскими цифрами в таблице) чаще всего оказывались слабее связей внутри цепей. Однако такая связь в комплексе глутамин(Q)-лизин(K)-метианин(M) + лейцин(L) под номером 2. Её частотный сдвиг и энергия связи составили 1450 см⁻¹ и 11,2 ккал/моль соответственно, что делает эту связь сильнее, чем связи внутри цепей.

Проведенный сравнительный анализ параметров водородных связей, представленных в таблице 2, позволяет сформулировать согласованную картину структурно-энергетических закономерностей в исследованных комплексах. Прежде всего, усиление водородных связей взаимосвязано с ростом количества атомов в комплексе: по мере увеличения числа взаимодействующих фрагментов наблюдается сдвиг колебаний в низкочастотную область, увеличение частотного сдвига $\Delta\nu$ и рост энергии связи ΔH . В соответствии с классификацией, приведенной в [4], такая совокупность признаков указывает на усиление водородной связи в комплексах.

Список литературы / References:

1. Aggarwal B. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 2003, vol. 3, pp. 745-756, doi: 10.1038/nri1184.
2. Wingfield P., Pain R. H., Craig S. Tumour necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Letters*, 1987, vol. 211, iss. 2, pp. 179-184, doi: 10.1016/0014-5793(87)81432-1.
3. Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, 1993, vol. 73, no. 3, pp. 431-445, DOI: 10.1016/0092-8674(93)90132-a.

4. Steed J.W., Atwood J.L. *Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons, 2013, vol. 479.
5. Kohn W. *Reviews of Modern Physics*, 2002, vol. 172, no. 3, pp. 336-348, doi: 10.3367/UFNr.0172.200203e.0336.
6. Becke A.D. *Journal of Chemical Physics*, 1993, vol. 98, no. 7, pp. 5648-5652.

INVESTIGATION OF THE INTERMOLECULAR INTERACTION BETWEEN AMINO ACID CHAINS OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR AND LIGAND

Nazarev E.V., Mishunin B.A., Plastun I.L.

Yuri Gagarin State Technical University

Polytechnicheskaya str. 77, Saratov, 410054, Russia; e-mail: agexxecute@gmail.com

Abstract. Using the density functional theory method, we performed modeling and analysis of intermolecular interactions between amino acid chains of the tumor necrosis factor (TNF) receptor and ligands A and C. The study was based on a binding diagram describing the amino acid sequences within the chains and the interchain contacts. Various chain fragments belonging to the receptor and ligands were selected, and intermolecular interactions were computed both for amino acids within an isolated chain and in the presence of both interacting chains. Calculations were carried out with the Gaussian and ORCA software packages, and molecular structures were visualized using GaussView and Avogadro. For each complex investigated, optimized geometries and IR spectra were obtained, reflecting vibrational modes of the bonds. To mitigate the influence of the harmonic approximation employed by these programs, vibrational frequencies were scaled. The degree of complex formation was assessed via parameters of hydrogen bonds formed between amino acid residues from different chains, including hydrogen-bond length, H-bond bridge length, frequency shift, bond energy, and intensity. It is shown that as the number of interacting fragments increases, hydrogen bonds are strengthened, as evidenced by a shift of vibrational bands to lower frequencies.

Key words: *density functional theory, molecular structures, IR spectra, hydrogen bonds, modeling.*

НЕКОТОРЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ В КОНСТРУИРОВАНИИ НОВЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ (МИНИОБЗОР)

Ботин А.С.^{1,2,3}, Аринбасарова А.Ю.⁴, Антипов С.С.⁵, Грицай Е.П.¹, Кордова-Торрес А.В.¹

¹ Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Институт фармации и биотехнологии

ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: botin-as@rudn.ru

² ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»

Большая Сухаревская площадь, 3, г. Москва, 129090, РФ

³ Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)

Проспект Науки, 3, г. Пушкино, г.о. Серпухов, Московская область, 142290, РФ

⁴ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

Проспект Науки, 5, г. Пушкино, г.о. Серпухов, Московская область, 142290, РФ

⁵ ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет

Университетская площадь, 1, г. Воронеж, 394018, РФ

Поступила в редакцию 08.09.2025

Аннотация. Актуальность проблемы. Прогресс современной генетики микроорганизмов на рубеже столетий стимулировал бурное развитие нового направления – молекулярной генетики, которое стало основой генетической инженерии. Генетическая инженерия привнесла принципиально новые идеи и методы в технологии производства широкого спектра биологически активных веществ природного происхождения. Открывшиеся возможности использования микроорганизмов, стали основой для возникновения новых научных направлений, таких как молекулярная биология, молекулярная биотехнология, молекулярная вирусология, белковая инженерия и т.д. В данной работе анализируются и теоретически обосновываются некоторые возможности использования методов генетической инженерии при конструировании новых штаммов микроорганизмов. В частности, сделан вывод, что у всех вирусных векторных систем есть свои недостатки и свои преимущества в зависимости от выбираемых клеток-мишеней и специфики каждой задачи. А именно, преимущества рекомбинантных аденоассоциированных векторов выделяют их среди остальных вирусных векторов и делают эти векторы популярным и универсальным инструментом для доставки гена *in vitro* и *in vivo*. Важным является тот факт, что CRISPR и CRISPR-ассоциированные гены (Cas) имеют большое значение в адаптивном иммунитете многих бактерий и архей, позволяя микроорганизмам реагировать на чужеродный генетический материал и устранять его. Техника генной инженерии является не только инструментом для практического «улучшения» штаммов, но это ещё и мощный способ познания механизмов биосинтеза и регуляции метаболизма микроорганизмов. Дальнейшие успехи в конструировании высокопродуктивных штаммов микроорганизмов зависят от совместной работы микробиологов, генетиков, биохимиков и генных инженеров.

Ключевые слова: конструирование микроорганизмов, штаммы, генетическая инженерия, CRISPR-технологии, синтетическая биология.

Введение. Современные достижения в области биотехнологий предоставляют уникальные возможности для создания микроорганизмов с заданными свойствами. Генетическое конструирование позволяет направленно изменять геномы микроорганизмов, что расширяет перспективы для их использования в промышленности, медицине, экологии и ряда новых, ранее не свойственных отраслях, например, энергетика или микроэлектроника [1,2]. В условиях растущего спроса на высокоэффективные биологические продукты, такие как белки и их надмолекулярные комплексы, необходимость разработки новых подходов в данной области становится особенно актуальной.

В рамках настоящего аналитического исследования изучается возможность разработки и внедрения методов генетического конструирования микроорганизмов, например, для эффективного биосинтеза белков с заданными свойствами. Для достижения понимания принципов и подходов при реализации таких технологий необходимо: создание штаммов с улучшенными характеристиками, их оптимизация для повышения продуктивности, а также оценка устойчивости к использованию в промышленных условиях. Особое внимание уделяется применению современных технологий, таких как CRISPR, для достижения поставленных целей.

Современные подходы к генетическому конструированию микроорганизмов. Методы синтетической биологии. Синтетическая биология представляет собой междисциплинарную область, сфокусированную на проектировании и конструировании живых систем на разных уровнях их организации, и объединяет прикладные исследования в области биологии, химии, биофизики и информатики и использовании инженерных подходов, для создания новых биологических систем с заданными функциями [3]. «Синтетическая биология – новое научное направление в биологии, занимающееся проектированием и созданием биологических систем с заданными свойствами и функциями, которые не имеют аналогов в природе» [4]. Основополагающими

принципами этой области являются модульность и стандартизация, что позволяет разрабатывать биологические конструкции на основе стандартных элементов. Универсальные модули, такие как BioBricks [5], обеспечивают предсказуемость и воспроизводимость созданных систем, позволяя их использовать для сборки генетических последовательностей. Эти подходы открывают широкие перспективы в биотехнологии и медицине, включая проектирование микроорганизмов для выполнения конкретных задач, таких как производство лекарств или биотоплива.

Применение подходов синтетической биологии в генетическом конструировании микроорганизмов демонстрирует её потенциал для создания инновационных решений для глобальных задач. Синтетическая биология «направлена на проектирование, дизайн и разработку биологических компонентов, новых устройств и систем, а также изменение существующих естественных биологических систем и представляет симбиоз биологических и инженерных подходов к изучению, модификации и созданию живых организмов [6,7]. К примеру, с использованием методов синтетической биологии были разработаны штаммы *Escherichia coli*, способные синтезировать бутанол – перспективное биотопливо, которое может заменить традиционные углеводородные источники энергии. Этот и другие случаи иллюстрируют, как синтетическая биология позволяет модифицировать микроорганизмы для выполнения специфических функций, что делает её важным инструментом в разработке устойчивых технологий (рис. 1) [8].

Роль CRISPR-технологий в биосинтезе белков. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) представляет собой адаптивную иммунную систему бактерий, впервые описанную японскими учеными Ёсизаки и Накатани в 1987 году. Эта система позволяет микроорганизмам защищаться от вирусов-фагов, распознавая и разрезая их ДНК. Основное применение CRISPR-Cas9 в генетике связано с его способностью точно разрезать ДНК в заданных местах, что используется для редактирования генома, включая вставку, удаление или модификацию генов. С момента внедрения CRISPR-технологий в 2012 году они стали наиболее популярным инструментом для редактирования генома благодаря своей точности, простоте и низкой стоимости по сравнению с предыдущими методами, такими как TALEN и ZFN. Отмечают, что «в мире имеет место настоящий бум вокруг CRISPR/Cas технологии, с помощью которой стало более доступным и эффективным геномное редактирование» [9,10]. Это делает CRISPR незаменимым инструментом для генетического конструирования микроорганизмов.

Применение CRISPR в биосинтезе белков демонстрирует его значительные преимущества. Например, технология CRISPR-Cas9 использовалась для модификации штаммов *Escherichia coli* с целью увеличения производства инсулина, что позволило повысить эффективность биосинтеза на 30%. В 2015 году с использованием CRISPR был создан штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способный производить артемизинин – важное лекарство для лечения малярии, что значительно снизило его стоимость. Также исследования показали, что редактирование генов с помощью CRISPR в микроорганизмах, таких как *Pseudomonas putida*, может увеличить производство биопластиков на основе полиоксибутирата. Эти примеры подчеркивают универсальность CRISPR в оптимизации метаболических путей микроорганизмов для производства ценных соединений.

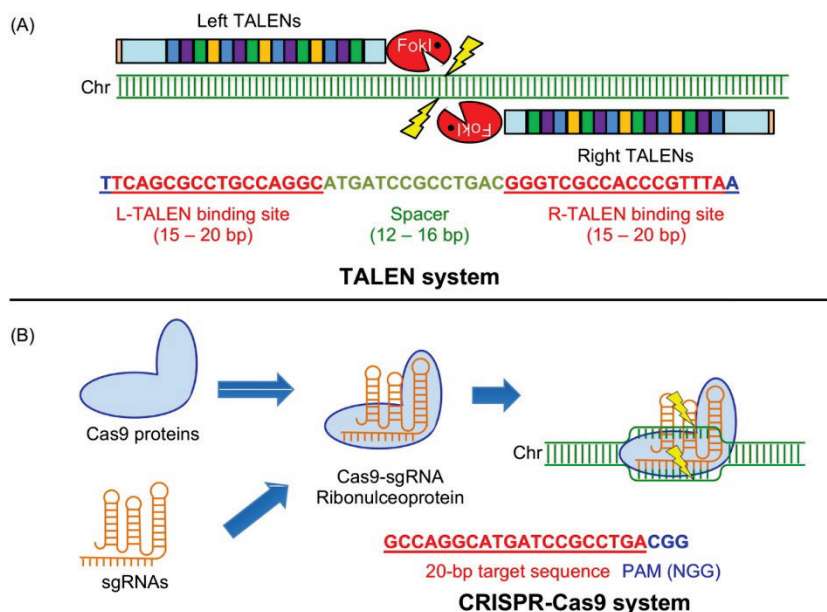


Рисунок 1. Системы редактирования генома у видов *Nannochloropsis*. (A) Здесь показаны иллюстрации и последовательности целевых участков системы нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALE) (TALEN). (B) Здесь показаны иллюстрации и последовательности целевых участков системы кластеризованных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (CRISPR) – ассоциированного с CRISPR белка 9 (Cas9). sgPHK: одиночные направляющие PHK; Chr: хромосомы; PAM: примыкающий к протоспейсеру мотив; FokI: FokI нуклеазный домен [7]

Проблемы и ограничения существующих подходов. Воспроизводимость результатов генетического конструирования в различных лабораторных условиях остается низкой, что связано с вариабельностью лабораторного оборудования, различиями в условиях культивирования микроорганизмов, а иногда и уровнем подготовки исследователей. Пока относительно низкая воспроизводимость затрудняет стандартизацию методов и замедляет процесс разработки новых генетических конструкций. В связи с этим необходимо активное движение в направлении унификации и стандартизации подходов. «На всех уровнях – от подготовки специалистов до использования научных разработок в микробиологическом производстве. Также предусматривается создание системы координации биологических исследований, которая должна усилить взаимодействие между научными организациями, вузами и предприятиями» [10].

Разработка и оптимизация генетических конструкций. Проектирование генетических последовательностей для белкового синтеза. Выбор целевых генов для генетического конструирования микроорганизмов является ключевым этапом, определяющим эффективность последующей экспрессии белков. Ген *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу, часто используется в качестве репортерного гена в исследованиях экспрессии благодаря своей высокой активности и легкости определения продукции фермента, что делает его идеальным инструментом для оценки эффективности генетических конструкций. Анализ таких генов включает изучение их структуры, регуляторных элементов и требований к экспрессии в различных микроорганизмах. Важность клеток, как биологических элементов, в этом контексте подчеркивается тем, что «клетка представляет собой единственную известную нам материальную систему, обладающую всей полнотой свойств жизни. Она несёт в себе запись генетической информации, представляющей итог эволюционного развития вида и основу всей будущей эволюции» [11].

Оптимизация последовательностей генов для их экспрессии в микроорганизмах является важным шагом в генетическом конструировании. Одним из ключевых подходов является оптимизация кодонов, что подразумевает использование кодонов, предпочитаемых конкретным организмом-хозяином, таким как *Escherichia coli*. Исследования показывают, что такая оптимизация может увеличить уровень экспрессии белка до 50%, что значительно повышает продуктивность системы. Этот процесс включает анализ частоты использования кодонов и адаптацию последовательности к предпочтениям организма, что в свою очередь способствует улучшению трансляции и стабильности мРНК [12]. Отмечается, что «в коммерческий вектор вставляют изучаемую последовательность ДНК, и её внедряют в клетки специального лабораторного штамма кишечной палочки».

Методы внедрения конструкций в геном микроорганизмов. Внедрение генетических конструкций в геном микроорганизмов представляет собой ключевой этап генетического конструирования, обеспечивая стабильное наследование и экспрессию целевых генов. Среди наиболее распространённых методов выделяются плазмидные векторы, которые переносят генетический материал в клетку. Эти векторы вводят в микроорганизмы с помощью трансформации, трансдукции и конъюгации. Например, электропорация – метод, при котором с помощью электрических импульсов в мембранах клеток временно образуются микроканалы. Электропорация широко используется для эффективного введения ДНК в клетки бактерий, таких как *Escherichia coli*, что делает этот метод стандартным подходом в молекулярной биологии. При этом важно отметить, что «РНК-праймер (затравка) служит затравочным фрагментом в процессе репликации ДНК-полимеразы» [13] (рис. 2) при этом необходимо подчеркнуть значимость правильного выбора компонентов в генетическом конструировании, что влияет на успешность всего процесса.

Эффективность методов внедрения генетических конструкций зависит от используемой техники и типа микроорганизма. Электропорация, например, демонстрирует высокую эффективность трансформации, достигая порядка 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) на микрограмм ДНК для *Escherichia coli*, что делает её предпочтительным выбором для лабораторных исследований. Тем не менее, данный метод требует специального оборудования, что может ограничивать его применение в определённых условиях. В то же время, химическая трансформация, являясь более доступным методом, показывает меньшую эффективность – порядка 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) на микрограмм ДНК. Это подчеркивает важность выбора подходящего метода в зависимости от целей и условий эксперимента. Кроме того, следует отметить, что «кислотно-альдегидный цикл АТФ (Цикл ААА) содержит минимальный набор ферментов и не требует мембранного разделения зарядов» [14]. Это свойство делает цикл потенциально удобным для применения в различных методах трансформации, что также необходимо учитывать при планировании экспериментов [15] и проектировании технологических процессов.

Оптимизация штаммов для повышения продуктивности. Методы повышения продуктивности штаммов микроорганизмов играют ключевую роль в биотехнологии, поскольку они позволяют значительно улучшить выход целевых продуктов. Одним из таких методов является направленная эволюция, которая представляет собой процесс последовательного отбора и модификации микроорганизмов для увеличения их эффективности. Например, в промышленном производстве аминокислот применение направленной эволюции позволило повысить продуктивность метаболитов до 20 - 30% [16]. Этот подход включает в себя создание множества вариантов генетических последовательностей и отбор наиболее продуктивных из них, что обеспечивает адаптацию штаммов к специфическим условиям производства. Таким образом, использование направленной эволюции и других методов адаптации штаммов является важным инструментом для достижения высоких показателей продуктивности в биотехнологических процессах.

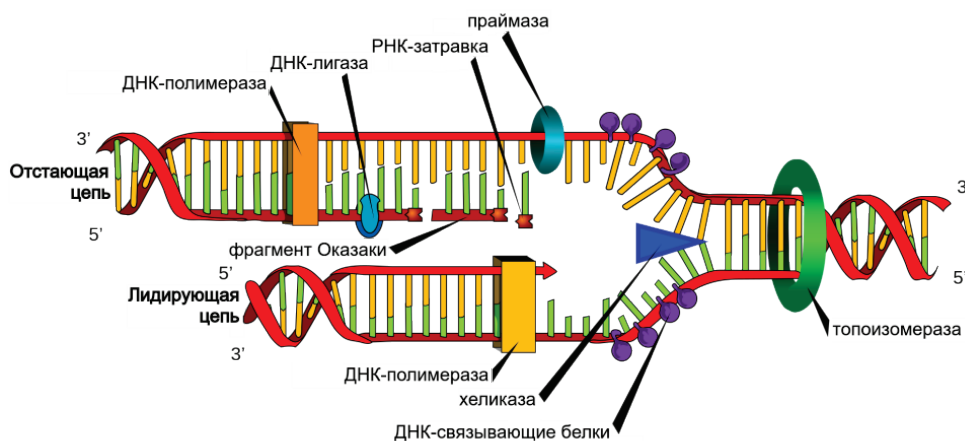


Рисунок 2. Репликация эукариот. РНК-праймер (затравка) служит затравочным фрагментом в процессе репликации ДНК-полимеразы. ДНК-зависимая ДНК полимераз (сверху) – синтез отстающей цепи вырезает РНК праймеры перед собой; ДНК-зависимая ДНК полимераз (снизу) – синтез лидирующей цепи; хеликаза – расплетание цепи; топоизомераза убирает сверхспирализацию; лигаза – сшивание однонитиевого разрыва; ДНК-связывающие белки – поддерживают однонитиевое состояние; праймаза – прикрепление РНК праймера к отстающей цепи [10]. Видно, что, кроме ДНК-полимераз, в репликации участвуют белки, раскручивающие ДНК и удерживающие ее в раскрученном состоянии, создающие затравку для новой цепи и другие - всего несколько десятков белков. Очевидно, что в таком сложном, многоступенчатом, затратном процессе копирования информации не может не быть ошибок

Оценка характеристик созданных штаммов. Продуктивность в лабораторных условиях. Для оценки продуктивности созданных генетически модифицированных штаммов в лабораторных условиях были применены современные методы молекулярной биологии и биоинженерии. Технология CRISPR-Cas9 позволила точно модифицировать гены микроорганизмов, что значительно повысило их эффективность. «Всего за несколько лет редактирование генома с помощью CRISPR-систем изменило подход к различным биологическим исследованиям и практическим применениям» [17]. В 2020 году исследование продемонстрировало, что генетически модифицированные штаммы *Escherichia coli* увеличили скорость синтеза целевых белков на 35% по сравнению с немодифицированными штаммами. Этот результат подчеркивает значительный потенциал применения таких технологий для повышения продуктивности, учитывая, что генетическая модификация может влиять на различные аспекты метаболизма микроорганизмов.

Устойчивость к промышленным условиям. Промышленные условия производства характеризуются воздействием большого числа физических, химических и факторов микроокружения, наиболее значимыми из которых являются такие как, температура, pH среды, давление и солевой состав. Эти параметры играют ключевую роль в жизнедеятельности микроорганизмов, способности к синтезу целевых продуктов и формированию их конечных характеристик. Температура, например, оказывает значительное влияние на эффективность ферментативных процессов, так как большинство микроорганизмов оптимально функционируют в диапазоне 30–40°C. Отклонения от этих значений могут приводить к снижению активности ферментов и продуктивности клеток, а также приводить к активации кассеты генов теплового или холодцового стресса [18]. Аналогично, pH среды является критическим фактором, определяющим активность ферментов и стабильность клеточных структур. Большинство промышленных процессов требуют стабилизации значения pH в диапазоне 6–8, однако существуют микроорганизмы, способные адаптироваться к более экстремальным значениям [19]. Давление в биореакторах обычно поддерживается близким к атмосферному, но в некоторых случаях, например, при анаэробной ферментации, может применяться избыточное давление для повышения растворимости газов и улучшения метаболической активности.

Для обеспечения устойчивости микроорганизмов к экстремальным условиям промышленного производства применяются различные стратегии. Одним из подходов является постепенное культивирование штаммов в условиях, имитирующих повышенные температуры или изменённый pH среды. Это способствует отбору клеток с повышенной устойчивостью. Кроме того, современные методы генной инженерии, в том числе основанные на использовании систем CRISPR/Cas9, позволяют целенаправленно изменять гены, связанные с адаптацией к неблагоприятным условиям. Примером может служить модификация генов, ответственных за устойчивость к высоким температурам или окислительному стрессу. Также существуют микроорганизмы, такие как *Deinococcus radiodurans*, которые демонстрируют естественную устойчивость к экстремальным условиям, включая воздействие радиации. Изучение таких природных механизмов позволяет разрабатывать более эффективные подходы к созданию устойчивых штаммов для промышленного использования, например, основанную на специализированной упаковке бактериального нуклеотида и его окружения, в том числе белков семейства ферритины.

Перспективы и вызовы в применении новых штаммов. Потенциальные области применения. Генетически модифицированные микроорганизмы играют ключевую роль в современной медицине, особенно в

производстве жизненно важных препаратов. Например, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* используются для биосинтеза инсулина – гормона, необходимого для лечения диабета. Этот метод производства позволяет получать препарат в больших объемах и с высокой степенью чистоты, что делает его доступным для пациентов по всему миру. Кроме того, модифицированные микроорганизмы применяются в создании вакцин и диагностических средств, что открывает новые возможности для борьбы с инфекционными заболеваниями.

В сельском хозяйстве генетически модифицированные микроорганизмы находят применение как биологические удобрения и средства защиты растений. Например, бактерии рода *Rhizobium*, модифицированные для повышения способности фиксировать азот, способствуют улучшению роста сельскохозяйственных культур, обеспечивая их необходимыми питательными веществами [20]. Это позволяет значительно снизить использование химических удобрений, что, в свою очередь, уменьшает нагрузку на окружающую среду и повышает устойчивость сельскохозяйственных систем. Кроме того, отдельные колонии бифидобактерий штамма *B.bifidum* ЛВА-3, при росте на печеночной среде Блаурокка, принимают форму мелких "гвоздей" белого цвета, образующих крошковатую массу при встряхивании. Эти микроорганизмы могут также быть использованы для улучшения почвенного плодородия и защиты растений от болезней, что подчеркивает разнообразие их применения в агрономии.

Генетически сконструированные микроорганизмы также играют важную роль в решении экологических проблем. Например, штаммы бактерий *Pseudomonas putida* используются для биодegradации нефтяных загрязнений. Эти микроорганизмы способны разлагать сложные органические соединения, что делает их эффективным инструментом для очистки почвы и воды от токсичных веществ. Таким образом, они способствуют восстановлению экологического баланса и снижению вреда, наносимого окружающей среде.

В промышленности генетически модифицированные микроорганизмы активно используются для производства инновационных материалов и источников энергии. Например, бактерии *Escherichia coli*, модифицированные для синтеза биопластиков, представляют собой перспективную альтернативу традиционным пластиковым изделиям. Такие разработки не только способствуют снижению зависимости от нефти, но и уменьшают углеродный след, что создает более экологически устойчивые производственные процессы. Роль биотехнологий в этом контексте становится особенно значимой: конструирование нужных генов методами геномной и клеточной инженерии позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов и создавать организмы с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе [20]. Это подчеркивает их вклад в решение глобальных экологических проблем.

Этические и экологические аспекты. Экологические последствия применения ГМО микроорганизмов вызывают значительный интерес и обсуждаются на различных уровнях и социальных слоях. Работа посвящена проблеме использования генетически модифицированных организмов (ГМО) и включает анализ зарубежных и российских исследований, в котором рассматриваются как положительные, так и отрицательные свойства ГМО [21]. Исследование [22] о влиянии выращивания и использования ГМО в качестве корма и продуктов питания на окружающую среду, экосистему, биоразнообразие и здоровье, опубликованное в 2017 году, выявило, что подавляющее большинство опрошенных респондентов в мире обеспокоены потенциальным воздействием ГМО на окружающую среду. Поэтому немаловажную роль играет мониторинг оказываемого влияния на биоразнообразие, поскольку внедрение модифицированных организмов может существенно изменить сами экосистемы, а также широкое и квалифицированное информирование общественности.

Направления дальнейших исследований. Развитие технологий генетического конструирования микроорганизмов требует постоянного внедрения и тестирования новых методов. В 2015 - 2020 годах был доработан метод на основе конструкции CRISPR-Cas9, который значительно повысил точность редактирования геномов. Эта технология открыла возможности для более детального изучения генетических механизмов и повышения эффективности модификаций. Это, в свою очередь, способствует решению этических проблем и вопросов биобезопасности, возникающих в ходе генно-инженерных исследований. Отмечается, что основные молекулярно-генетические методы получения рекомбинантных ДНК и практические аспекты применения методов геномной инженерии в современной биотехнологии, медицине и сельском хозяйстве освещают этические проблемы и проблемы биобезопасности при проведении генно-инженерных исследований. В дальнейшем исследования должны быть направлены на усовершенствование этого метода, чтобы еще больше увеличить его точность, требуемую в промышленном производстве [23,24].

Закключение. Анализ существующих методов генетического конструирования микроорганизмов показал значительные успехи в применении синтетической биологии и CRISPR-технологий. Эти подходы позволили не только улучшить точность редактирования генома, но и расширить возможности создания микроорганизмов с заданными характеристиками. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, остаются определенные ограничения, такие как вероятность непредвиденных мутаций и трудности в адаптации штаммов к промышленным условиям.

Разработанные в ходе исследования методы генетического конструирования позволили создать микроорганизмы, отличающиеся высокой продуктивностью и устойчивостью. Использование CRISPR-технологий и оптимизация генетических последовательностей значительно повысили эффективность синтеза белков. Эти достижения подчеркивают важность комплексного подхода, включающего проектирование последовательностей, внедрение конструкций и адаптацию штаммов к различным условиям.

Применение созданных штаммов открывает перспективы в медицине, сельском хозяйстве, промышленности и экологии. Однако, для успешного внедрения этих технологий необходимо учитывать этические и экологические аспекты, а также продолжать исследования в области оптимизации методов

генетического конструирования. Таким образом, дальнейшие разработки могут способствовать решению текущих проблем и расширению областей применения генетически модифицированных микроорганизмов.

Список литературы / References:

1. Паринова Е.В., Антипов С.С., Беликов Е.А., Чуvenкова О.А., Какулия Ю.С., Коюда Д.А., Требунских С.Ю., Скоробогатов М.С., Чумаков Р.Г., Лебедев А.М., Синельников А.А., Артюхов В.Г., Овчинников О.В., Смирнов М.С., Турищев С.Ю. Исследования био-наногибридного материала на основе бактериального ферритин-подобного белка Dps методами ПЭМ и РФЭС. *Конденсированные среды и межфазные границы*, 2022, т. 24, № 2, с. 265-272 [Parinova E.V., Antipov S.S., Belikov E.A., Chuvenkova O.A., Kakulia Yu.S., Koyuda D.A., Trebunskikh S.Yu., Skorobogatov M.S., Chumakov R.G., Lebedev A.M., Sinelnikov A.A., Artyukhov V.G., Ovchinnikov O.V., Smirnov M.S., Turishchev S.Yu. Studies of a bio-nanohybrid material based on the bacterial ferritin-like protein Dps using TEM and XPS methods. *Condensed matter and interphase boundaries*, 2022, vol. 24, no. 2, pp. 265-272 (In Russ.)].
2. Parinova E.V., Antipov S.S., Belikov E.A., Kakuliia I.S., Trebunskikh S.Y., Turishchev S.Y., Sivakov V. Localization of Dps protein in porous silicon nanowires matrix. *Results in Physics*, 2022, vol. 35, p. 105348.
3. Патрушев М.В., Борисова А.А., Намсараев З.Б. Синтетическая биология: основные характеристики направления. Российские нанотехнологии, 2023, т. 18, № 3, с. 311-319 [Patrushev M.V., Borisova A.A., Namsaraev Z.B. Synthetic biology: main characteristics of the field. *Russian nanotechnologies*, 2023, vol. 18, no. 3, pp. 311-319 (In Russ.)].
4. Пинчукова А.И. *Синтетическая биология. Основные направления. Опыты вентера*. Актуальные проблемы современной медицины и фармации. Ред. А.В. Сикорского, О.К. Дорониной. Минск: БГМУ, 2018, 659 с. [Pinchukova A.I. *Synthetic biology. Main directions. Venter's experiments*. Actual problems of modern medicine and pharmacy. Ed. A.V. Sikorsky, O.K. Minsk: Bashkir State Medical University, 2018, 659 p. (In Russ.)].
5. Patel V.K., Das A., Kumari R., Kajla S. Recent progress and challenges in CRISPR-Cas9 engineered algae and cyanobacteria. *Algal Research*, 2023, vol. 71, doi: 10.1016/j.algal.2023.103068.
6. Княгинин В.Н., Липецкая М.С., Санатов Д.В., Тибина Е.Ю., Пургин А.С., Губин С.В., Петухова Н.К. *Источники новых индустрий. Выпуск 2. Синтетическая биология*. Экспертно-аналитический доклад. Серия «Источники новых индустрий», Санкт-Петербург, 2022, 78 с. [Knyagin V.N., Lipetskaya M.S., Sanatov D.V., Tibina E.Yu., Purgin A.S., Gubin S.V., Petukhova N.K. *Sources of new industries. Issue 2. Synthetic biology*. Expert-analytical report. Series "Sources of new industries", St. Petersburg, 2022, 78 p. (In Russ.)].
7. Алмагамбетов К.Х. *Биотехнология микроорганизмов: научное издание*. Астана, 2008, 244 с. [Almagambetov K.Kh. *Biotechnology of microorganisms: scientific publication*. Astana, 2008, 244 p. (In Russ.)].
8. Kurita T., Iwai M., Ohta H., Sakuma T., Yamamoto T. Genome editing for biodiesel production in oleaginous microalga, *Nannochloropsis* species. *Gene and Genome Editing*, 2023, vol. 6, doi: 10.1016/j.ggedit.2023.100027.
9. Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A. et al. CRISPR/Cas genome editing of plants. *Biomics*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 155-182.
10. *Прогноз научно-технологического развития России: 2030 Биотехнологии*. Под ред. Л.М. Гохберга, М.П. Кирпичникова. Москва: Министерство образования и науки Российской Федерации, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 2014, 48 с. [Forecast of Scientific and Technological Development of Russia: 2030 Biotechnology. Ed. by L.M. Gokhberg, M.P. Kirpichnikov. Moscow: Ministry of Education and Science of the Russian Federation, National Research University Higher School of Economics, 2014, 48 p. (In Russ.)].
11. Вельков В.В. Оценка риска при интродукции генетически модифицированных микроорганизмов в окружающую среду. *Агрохимия*, 2000, № 8, с. 76-86 [Velkov V.V. Risk assessment during the introduction of genetically modified microorganisms into the environment. *Agrochemistry*, 2000, no. 8, pp. 76-86 (In Russ.)].
12. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Перепрограммирование и редактирование генома клетки. *Вестник Витебского государственного университета*, 2020, № 4, с. 28-33 [Chirkin A.A., Danchenko E.O. Reprogramming and editing of the cellular genome. *Bulletin of Vitebsk State University*, 2020, no. 4, pp. 28-33 (In Russ.)].
13. Zenkin N., Naryshkina T., Kuznedelov K., Severinov K. The mechanism of DNA replication primer synthesis by RNA polymerase. *Nature*, 2006, vol. 439, no. 7076, pp. 617-620, doi: 10.1038/nature04337.
14. Яненко А.С. *Индукционная реконструкция генома и развитие промышленной биотехнологии*. Доклад на Научно-практической конференции с международным участием «Редактирование генома: теория и практика», МГУ, Москва, 21 ноября 2023 года [Yanenko A.S. *Induced Genome Reconstruction and the Development of Industrial Biotechnology*. Presentation at the International Scientific and Practical Conference "Genome Editing: Theory and Practice," Moscow State University, Moscow, November 21, 2023 (In Russ.)].
15. Novikov A.D., Yanenko A.S. et.al. Complete Genome Sequence of *Rhodococcus* sp. Strain M8, a Platform Strain for Acrylic Monomer Production. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, vol. 10, no. 10.
16. Becker J., Wittmann Ch. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production—The heartbeat of industrial strain development. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 5, pp. 718-726, doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.025.
17. *Методы редактирования генов и геномов*. Под редакцией С.М. Закияна, С.П. Медведева, Е.В. Дементьевой, В.В. Власов, Новосибирск, изд-во СО РАН, 2020 [Gene and Genome Editing Methods. Edited by S.M. Zakian, S.P. Medvedev, E.V. Dementyeva, and V.V. Vlasov. Novosibirsk, SB RAS Press, 2020 (In Russ.)].

18. Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Экспрессия генов SOXRS-регулона в клетках бактерий, подвергнутых действию различных стресс-факторов. *Acta Biomedica Scientifica*, 2023, т. 8, № 2, с. 117-123 [Akhoval A.V., Tkachenko A.G. Expression of SOXRS regulon genes in bacterial cells exposed to various stress factors. *Acta Biomedica Scientifica*, 2023, vol. 8, no. 2, pp. 117-123 (In Russ.)].
19. Гаврилов С.Н., Барашкова А.С., Чердынцева Т.А., Прокофьева М.И., Тресвятский О.В., Лукьянов Д.А., Никандрова А.А., Эртле Т., Меркель А.Ю., Бонч-Осмоловская Е.А., Рогожин Е.А. Поиск новых галофильных и галотолерантных продуцентов антимикробных соединений в различных экстремальных экосистемах. *Микробиология*, 2023, т. 92, № 3, с. 261-278 [Gavrilov S.N., Barashkova A.S., Cherdyntseva T.A., Prokofieva M.I., Tresvyatsky O.V., Lukyanov D.A., Nikandrova A.A., Ertle T., Merkel A.Yu., Bonch-Osmolovskaya E.A., Rogozhin E.A. Search for new halophilic and halotolerant producers of antimicrobial compounds in various extreme ecosystems. *Microbiology*, 2023, vol. 92, no. 3, pp. 261-278 (In Russ.)].
20. Гуреева М.В., Грабович М.Ю. *Почвенный микробиом: Учебное пособие*. Воронежский государственный университет. Воронеж, 2024 [Gureeva M.V., Grabovich M.Yu. *Soil Microbiome: A Textbook*. Voronezh State University. Voronezh, 2024 (In Russ.)].
21. Баймиев А.Х., Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Михайлова Е.В., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов (растений) и общество. *Биомика*, 2017, т. 9, № 3, с. 183-202 [Baymiev A.Kh., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A., Rozhnova N.A., Gerashchenkov G.A., Mikhailova E.V., Baymiev A.Kh., Chemeris A.V. CRISPR/Cas genome editing (plants) and society. *Biomics*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 183-202 (In Russ.)].
22. Tsatsakis A.M., Nawaz M.A., Tutelyan V.A., Golokhvast K.S., Kalantzi O.I., Chung D.H., Kang S.J., Coleman M.D., Tyshko N., Yang S.H., Chung G.; Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, vol. 107, pt. A, pp. 108-121, doi: 10.1016/j.fct.2017.06.033.
23. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Гумерова Г.Р., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов. *Биомика*, 2017, т. 9, с. 245-270 [Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Knyazev A.V., Gumerova G.R., Baymiev A.Kh., Chemeris A.V. Evolution of genome editing methods. *Biomics*, 2017, vol. 9, pp. 245-270 (In Russ.)].
24. Кригер О.В. *Основы генетической инженерии: учебное пособие*. Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2023 [Krieger, O.V. *Fundamentals of Genetic Engineering: A Tutorial*. St. Petersburg: ITMO University, 2023 (In Russ.)].

SOME POSSIBILITIES OF SYNTHETIC BIOLOGY IN THE CONSTRUCTION OF NEW STRAINS OF MICROORGANISMS BY METHODS OF GENETIC ENGINEERING FOR BIOTECHNOLOGY (MINI-REVIEW)

Botin A.S.^{1,2,3}, Arinbasarova A.Yu.⁴, Antipov S.S.⁵, Gritsai E.P.¹, Cordova-Torres A.V.¹

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

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

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

⁴ Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of RAS
Prospect of Science 5, Pushchino, Serpukhov, Moscow region, 142290, Russia

⁵ Voronezh State University
University sq., 1, Voronezh, 394018, Russia

Received 08.09.2025

Abstract. The relevance of the problem. The progress of modern microbial genetics at the turn of the century stimulated the rapid development of a new field – molecular genetics, which became the basis of genetic engineering. Genetic engineering has introduced fundamentally new ideas and methods in the production technology of a wide range of biologically active substances. The possibilities of using microorganisms have become the basis for the emergence of new scientific fields such as molecular biology, molecular biotechnology, molecular virology, protein engineering, etc. This paper analyzes and theoretically substantiates some of the possibilities of using genetic engineering methods in the design of new strains of microorganisms. In particular, it is concluded that all viral vector systems have their disadvantages and advantages, depending on the target cells selected and the specifics of each task. Namely, the advantages of recombinant adeno-associated vectors distinguish them from other viral vectors and make these vectors a popular and versatile tool for in vitro and in vivo gene delivery. It is important that CRISPR and CRISPR-associated genes (Cas) are of great importance in the adaptive immunity of many bacteria and archaea, allowing microorganisms to react to and eliminate foreign genetic material. The technique of genetic engineering is not only a tool for practical "improvement" of strains, but it is also a powerful way to understand the mechanisms of biosynthesis and regulation of metabolism of microorganisms. Further success in the design of highly productive strains of microorganisms depends on the collaboration of microbiologists, geneticists, biochemists and genetic engineers.

Key words: microbial engineering, strains, genetic engineering, CRISPR technologies, synthetic biology.

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ПИТЬЕВЫХ ВОД И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ (ОБЗОР)

Рубцова С.И.¹, Андреева Н.А.^{1,2}

¹ Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: rsi1976@mail.ru

² ФГБНУ «Институт природно-технических систем»

ул. Ленина, 28, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию 15.08.2025

Аннотация. В результате проведенного анализа актуальных данных о санитарном состоянии и санитарно-значимой микрофлоре, присутствующей в источниках водоснабжения, в том числе, в питьевой воде, установлено, что единые нормативные санитарные показатели на сегодняшний день всё ещё не выработаны. Современные данные позволяют расширить представления о количественном и качественном составе микроорганизмов в поверхностных и питьевых водах, однако это пока не является основанием для пересмотра санитарных нормативов. Бактериологические методы контроля являются основными при оценке микробиологического состояния водных экосистем, в то же время внедрение современных высокотехнологичных технологий оценки загрязнения не обеспечивает полной гарантии безопасности питьевой воды. В связи с этим большой интерес представляют предложения по комбинированному использованию качественных и количественных показателей, что может способствовать более точному мониторингу и эффективному контролю за качеством водоснабжения. Внедрение новых инструментальных методов исследований санитарно-микробиологического состояния поверхностных и питьевых вод, безусловно, внесет значительный вклад в решение вопроса качества водопользования населения.

Ключевые слова: санитарно-микробиологические показатели, условно-патогенные микроорганизмы, бактерии группы кишечной палочки, природные водоемы, питьевая вода, общие колиформные бактерии (ОКБ), фекальное загрязнение, биопленки, общее микробное число (ОМЧ).

Все живые организмы на Земле, в том числе и человек, не могут существовать без воды. С позиций таких медицинских дисциплин, как физиология, гигиена и санитарная микробиология, вода, используемая человеком, рассматривается не как однородный элемент окружающей среды, а как совокупность различных типов водных объектов, для каждого из которых действуют специфические требования, обусловленные характером их применения. Независимо от функционального назначения, все эти объекты должны соответствовать критерию эпидемиологической безопасности.

С целью контроля за качеством воды были разработаны соответствующие нормативные документы [1]. Настоящие методические рекомендации определяют подходы к санитарно-вирусологическому контролю качества воды различных категорий в зависимости от характера водопользования и степени загрязненности. Основное внимание уделяется обеспечению эпидемиологической безопасности воды на основании санитарно-вирусологических критериев, предусмотренных действующими нормативными документами, включая: СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» [2]; СанПиН 2.1.5.980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод» [3]; СанПиН 2.1.4.1175-02 «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников» [4]; СанПиН 2.1.2.1188-03 «Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества»; СанПиН 2.1.4.1116-02 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству расфасованной воды. Контроль качества» [5].

Обеспечение доступа к чистым питьевой и поверхностным водам является общемировой задачей, которая давно привлекает пристальное внимание международного сообщества и формирует международную политику [6].

Изучением проблем чистой воды, а также разработкой методов и средств очистки питьевых и сточных вод занимается санитарная гидробиология. В последние годы санитарная гидробиология утвердилась как прикладное направление общей гидробиологии, став её неотъемлемой частью. Последующее развитие санитарной микробиологии было обусловлено прежде всего необходимостью оценки качества питьевой воды в связи с увеличением масштабов водопользования в хозяйственных и промышленных целях, расширением сети водопроводных систем. Все эти процессы, к сожалению, развивались в условиях недооценивания воды как ценного природного ресурса, воспринимаемого зачастую как неограниченно доступного. Быстрый рост городского населения, а также развитие промышленности и социальной инфраструктуры во многих случаях начали ограничиваться дефицитом чистой воды. [7].

По оценкам многих специалистов, нарастающее увеличение антропогенного воздействия, рост численности населения и изменения климата способствуют деградации водных ресурсов. Исходя из современных данных, в

том числе данных ООН, каждый девятый человек в мире вынужден пить воду, которая не соответствует санитарным нормам [8]. Вопрос обеспечения качественной питьевой воды остаётся остро актуальным для стран с различным уровнем экономического развития. Так, по данным за 2016 год, в ряде государств Африки дефицит безопасной воды и неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия стали причиной 829 тысяч смертей, связанных с инфекциями желудочно-кишечного тракта. От диарейных заболеваний, по оценкам ученых, каждый год умирает около 350 тыс. детей возрастом до пяти лет [9,10].

Значение санитарной безопасности водопроводной воды возрастает, в связи с тем, что качество воды, используемой для питьевых, хозяйственно-бытовых нужд и рекреационных целей, влияет на здоровье человека. Одной из ключевых задач является обеспечение микробиологической безопасности воды. Некоторые исследователи подчеркивают, что даже при эффективной водоподготовке риск попадания патогенов в водопроводную сеть сохраняется [8,11].

Обычная схема питьевого водоснабжения начинается с забора воды из источника, затем вода проходит через комплекс водоподготовительных мероприятий и, наконец, по сети трубопроводов поступает к конечному потребителю. Важно отметить, что на протяжении всего этого пути происходит активное перемещение микробных сообществ, которые неизбежно присутствуют как в природных экосистемах, так и в водопроводных сетях [12].

Последствия антропогенного загрязнения водных экосистем выражаются в эвтрофикации водоёмов, загрязнении тяжёлыми металлами, кислотными дождями, радиоактивным, тепловым, механическим, бактериальным загрязнением. Само по себе ухудшение экологического состояния водных экосистем привело к снижению биологического разнообразия гидробиоценозов на одну треть, но в отдельных случаях к полной деградации источников водоснабжения, ухудшению качества воды [8,13]. В этих условиях питьевая вода приобретает значение стратегического ресурса, а обеспечение её качества становится первостепенной задачей. Для надёжного водоснабжения критически важно понимание процессов миграции микробных сообществ и воздействующих на них факторов на всех этапах – от источника до конечного потребителя. Анализ качества воды служит основой при принятии решений о модернизации водной инфраструктуры, выборе методов очистки и профилактики заболеваний, передающихся через воду.

Оценка санитарного состояния питьевой воды традиционно включает микробиологические параметры, выявление которых служит индикатором потенциальной угрозы для здоровья населения. Наличие водных патогенов свидетельствует об эпидемиологической небезопасности, при этом современные технологии очистки не всегда эффективно устраняют условно-патогенные микроорганизмы, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, микобактерии, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter* spp., способные размножаться в сетях водоснабжения даже при ограниченном количестве органических веществ [8,14]. Также известно, что в распределительных системах, кроме псевдомонад, также способны выживать и развиваться нетуберкулёзные микобактерии и колиформные бактерии. Некоторые простейшие организмы, включая *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, а также их цисты, представляют опасность как самостоятельные возбудители, так и в качестве переносчиков патогенных бактерий, таких как *Legionella pneumophila* [15].

На международном уровне с целью выявления патогенных микроорганизмов делаются шаги по систематизированию и унификации методов отбора и анализа проб воды. Однако значительная часть водных патогенов по-прежнему трудно поддаётся выявлению из-за ограничений существующих аналитических подходов: низкой чувствительности, длительности процедур и необходимости больших объёмов проб [16]. Дополнительные сложности обусловлены малой концентрацией микроорганизмов, наличием ингибирующих веществ, а также способностью бактерий переходить в некультивируемое состояние, что может приводить к недостоверным результатам [17].

В соответствии с санитарными регламентами разных стран, микробиологический мониторинг воды часто базируется на косвенных признаках фекального загрязнения. В их число входят показатели общего микробного числа (ОМЧ), колиформных бактерий, а также фекальных энтерококков и стрептококков [8,18].

При анализе современной литературы выявлено несоответствие между количественными нормативами и фактическим микробиологическим составом. Метод посева проб на мясопептонный агар позволяет выявить лишь культивируемые микроорганизмы, которые составляют менее 1% от общей микробиоты воды. Именно по этой причине активизировались исследования по выявлению альтернативных критериев оценки микробиологического качества питьевой воды [8,19,20].

Одновременно изучаются структура и динамика микробных сообществ водных источников, а также влияние на них различных биотических и абиотических факторов, что приобретает всё большее значение в контексте оценки и контроля водоснабжения [21]. Сформировавшееся в водной среде сообщество микроорганизмов предлагается рассматривать как микробиоту питьевой воды или как микробиом – в случае анализа на уровне генетической информации.

Благодаря прогрессу в области молекулярно-генетических методов, в частности высокопроизводительному секвенированию, удалось существенно расширить представления о микробной составляющей питьевой воды. Так, метаанализ данных Illumina 16S рРНК, полученных из различных звеньев системы водоснабжения (источники, очистка, распределение), позволил идентифицировать более 22 000 уникальных таксонов [22].

Ряд ученых отмечают, что вне зависимости от происхождения воды и наличия остаточных дезинфектантов её микробиом преимущественно представлен *Proteobacteria* [8, 23, 24]. Другие исследователи подчёркивают,

что *Proteobacteria* сохраняет доминирующее положение на всех этапах водоснабжения, в то время как в обработанной воде часто присутствуют типичные для речной среды представители *Bacteroidota*, *Actinobacteria* и *Verrucomicrobiota* [25]. Также имеются данные, подтверждающие преобладание *Proteobacteria* и *Bacteroidota* в исходной речной воде и в процессе её обработки; однако заключительный этап – хлорирование – приводит к снижению видового разнообразия, создавая условия для преимущественного развития цианобактерий [26].

Согласно последним аналитическим обзорам, состав микробных сообществ в природных источниках варьирует, что, в свою очередь, формирует разнообразные типы микробиоты в производимой питьевой воде. Так, между пробами, отобранными из поверхностных и подземных источников, выявлены значительные различия. Например, в подземных водах присутствуют представители группы *Candidate Phyla Radiation* и ультрамалые бактерии [27], которые практически не встречаются в поверхностных водоисточниках. При этом такие таксоны, как цианобактерии, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, выявляются в обеих категориях вод. Также установлено, что уровень микробного разнообразия снижается в условиях сильного антропогенного загрязнения: при высоком содержании фекальных примесей бактериальное сообщество оказывается заметно обеднённым [28].

Таким образом, несмотря на накопленные данные, современная картина микробного состава питьевой воды остаётся неоднородной и требует дальнейших комплексных исследований с использованием высокоточных методов.

Несмотря на наличие разночтений в отдельных исследованиях, большинство учёных признают, что состав микробного сообщества в питьевой воде определяется целым рядом факторов, включая характеристики водоисточника, материалы и техническое состояние водопроводных систем, температурные условия и используемые методы дезинфекции [29]. Одним из основных ключевых элементов санитарного надзора остаётся определение фекального загрязнения природных и питьевых водах. Уровень такого загрязнения оценивается, в том числе, по присутствию общих колиформных бактерий (ОКБ), представляющих собой неспорообразующие грамотрицательные палочки, способные сбраживать лактозу с образованием газа и кислоты при температуре $37 \pm 0,5$ °C в течение 24–48 часов [8].

Однако практика применения этого индикатора выявила его ограниченность в обеспечении надёжной эпидемиологической безопасности. Согласно данным официальных Государственных докладов о санитарно-эпидемиологическом благополучии населения Российской Федерации за 2001–2019 гг. [30,31], (хотя) доля неудовлетворительных проб по микробиологическим показателям снизилась с 9,4% до 5,1% в период 2001–2010 гг., в то же время число проб, в которых были выявлены возбудители инфекционных заболеваний, напротив, удвоилось [32].

Согласно уточненной современной терминологии, понятие «общие колиформные бактерии» было уточнено как «обобщённые колиформные бактерии». Абревиатура ОКБ была сохранена. Обобщённые колиформные бактерии (ОКБ) - представители семейства *Enterobacteriaceae* – грамотрицательные, оооксидазотрицательные палочки, не образующие спор, способные расти на дифференциальных лактозных средах при температуре (37 ± 1) °C в течение (21 ± 3) ч., лактозоположительные и лактозотрицательные бактерии [8]. В новом подходе предполагается вести учёт всех грамотрицательных, оксидазотрицательных колоний, сбраживающих глюкозу до газа и кислоты, выросших на селективной питательной среде. Предполагается, что это позволит более эффективно выявлять фекальные колиформные бактерии, включая потенциально патогенные штаммы, и тем самым повысить надёжность оценки эпидемически опасного загрязнения. Однако эффективность этого метода пока остаётся предметом обсуждения и требует дополнительной верификации.

Наряду с колиформными бактериями в качестве маркеров фекального загрязнения часто используются кишечные стрептококки, а также спорообразующие микроорганизмы, например, *Clostridium perfringens*. В ряде современных исследований акцент сделан на поиске наиболее чувствительных и специфичных микробиологических индикаторов, способных адекватно отражать присутствие патогенов в пресноводных системах. При этом учитываются такие критерии, как специфичность к источнику загрязнения, устойчивость во внешней среде и связь с фекальным происхождением [33]. Однако, результаты подобных исследований демонстрируют то, что традиционные методы культивирования могут недооценивать реальный уровень угрозы для здоровья человека.

В рамках собственных исследований были предложены новые параметры, описывающие стабильные черты микробной составляющей воды, которые подробно рассмотрены в соответствующей публикации [34]. Полученные данные свидетельствуют, что ключевым фактором, определяющим устойчивость микробных сообществ, является способность микроорганизмов к выживанию в стрессовых условиях, а также к сохранению функциональной активности на всех этапах водоподготовки. Эти свойства обеспечиваются сложными формами взаимодействия с другими представителями микробиоты, водорослями и простейшими [35]. Такой уровень адаптивности может быть использован в качестве дополнительного критерия оценки эффективности очистки и общей безопасности питьевой воды, дополняя количественные показатели.

Отдельный интерес представляют исследования, в которых используются технологии искусственного интеллекта для анализа микробиологических данных в реальном времени. Метагеномные подходы в сочетании с алгоритмами машинного обучения позволяют не только более точно описывать динамику микробных сообществ, но и разрабатывать прогностические модели, применимые к процессам очистки, подготовки и транспортировки воды по распределительным сетям. Эти разработки открывают новые перспективы в обеспечении микробиологической безопасности водоснабжения [36].

Способность микроорганизмов формировать биопленки является предметом пристального внимания многих ученых [37,38]. Выделяю несколько причин. Во-первых, биоплёнки служат естественной формой существования микробов; во-вторых, биоплёнкообразование присуще массе патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; в-третьих, биоплёнки предоставляют бактериям преимущества в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина; биоплёнки играют важную роль в возникновении и развитии заболеваний; в-четвертых, наличие биоплёнок является одним из главных факторов развития антибиотикорезистентности; в-пятых, биопленки могут быть одним из препятствий, неблагоприятно сказывающихся на безопасности питьевого водоснабжения. Эти биопленки значительно искажают структуру микробного сообщества в воде, затрудняя точное определение количественного соотношения основных таксонов микробиома. Современные исследования демонстрируют, что биопленки присутствуют в системах распределения питьевой воды, несмотря на постоянное обеззараживание [37]. Следует подчеркнуть, что биопленки продолжают играть ключевую роль в выживании множества кишечных патогенов в системах водоснабжения, вызывая бактериологическое загрязнение питьевой воды [38].

В настоящее время в мире широко применяются современные методы контроля биопленок, включая проточную цитометрию и генетические методы, что позволяет оценить степень адаптации биопленок к меняющимся условиям окружающей среды, в том числе температура, загрязняющие вещества, гидрологические и биохимические условия. К сожалению, на сегодняшний день не существует средств, обеспечивающих прямое и полное уничтожение биоплёнок. Однако ведутся исследования, направленные на разработку подходов по предотвращению образования, контролю роста и разрушению биоплёнок, это прежде всего использование бактериофагов; применение ферментов; использование наночастиц; применение поверхностных акустических волн низкой энергии; использование липосом [39].

Исключительно важную роль в эпидемиологии многих инфекционных заболеваний играют поверхностные воды открытых водоемов [40], куда вместе со стоками могут поступать возбудители, выделяемые с испражнениями от больных и носителей.

Как уже упоминалось выше, основной задачей санитарно-микробиологических исследований воды является установление факта наличия или отсутствия в ней патогенных микроорганизмов [41]. Этот подход основывается на предположении, что основными источниками возбудителей инфекционных заболеваний выступают человек и теплокровные животные, выделяющие патогенные агенты в окружающую среду, преимущественно с фекалиями. Соответственно, чем выше степень фекального загрязнения, тем выше вероятность присутствия в воде опасных патогенов. Нахождение в водной пробе представителей кишечной микробиоты рассматривается как прямое свидетельство фекального происхождения загрязнения и сигнализирует о потенциальной угрозе появления возбудителей кишечных инфекций – таких как холера, брюшной тиф и др.

Микроорганизмы, отражающие санитарное состояние водной среды, принято называть санитарно-показательными. Наиболее распространенным и признанным на международном уровне индикатором загрязнения поверхностных вод являются бактерии группы кишечной палочки (БГКП), к которым относятся представители семейства *Enterobacteriaceae* – родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, а также лактозоположительные штаммы *Escherichia coli*. Помимо БГКП, в качестве дополнительных показателей используют энтерококки (*Streptococcus faecalis*), споровые формы *Clostridium perfringens*, бактерии рода *Proteus* и колифаги.

Преимуществом бактерий группы кишечной палочки как санитарных индикаторов является их количественное преобладание в загрязнённой среде по сравнению с другими микроорганизмами, а также высокая чувствительность при выявлении даже незначительных источников загрязнения. Эти свойства делают их полезными не только для диагностики, но и для оценки процессов микробного самоочищения водной среды [42].

Для установления причин и источников бактериального загрязнения, а также оценки его давности и прогнозирования санитарного состояния водоёма необходимо учитывать количественные соотношения между различными микробиологическими индикаторами. Такая интерпретация становится особенно эффективной при сопоставлении с данными санитарно-химических анализов и результатами санитарного обследования территории [43].

При проведении микробиологических исследований воды из бассейнов и прибрежной морской акватории особое значение приобретает определение патогенных стафилококков. Их присутствие свидетельствует о поступлении загрязнений с кожных покровов и верхних дыхательных путей человека и животных (например, морских млекопитающих, таких как дельфины) [44].

Одним из ключевых аспектов санитарно-бактериологических наблюдений является изучение устойчивости санитарно-показательных микроорганизмов во внешней среде. Как правило, большинство патогенных бактерий имеют ограниченную способность к выживанию в водных экосистемах, поскольку подвергаются воздействию различных абиотических и биотических факторов, включая конкуренцию со стороны аборигенной микробиоты. Однако известно, что некоторые патогены способны длительное время сохраняться в донных отложениях [45]. Например, в прибрежных зонах с низкой аэрацией придонных слоёв отмечается накопление аммонийного азота, формирующего восстановительную среду, благоприятную для выживания патогенных форм [46].

Исследования также показали, что микроорганизмы, попадая в водоём, распределяются по разным типам осадков определённым образом. Наибольшее их накопление фиксируется именно в донных отложениях, где численность бактерий, в том числе фекальных колиформ и стрептококков, может превышать показатели в воде

в 10–100 раз [47]. Жизнеспособность этих микроорганизмов сохраняется дольше в осадках, тогда как в толще воды их выживание зависит от содержания взвешенных частиц.

Было также установлено, что отдельные бактериальные формы обладают различной устойчивостью: так, цитратположительные представители рода *Citrobacter* демонстрируют большую выживаемость по сравнению с *Escherichia coli*, последняя же служит индикатором свежего фекального загрязнения [48].

Некоторые исследования [49,50] зафиксировали случаи, когда результаты колиметрического анализа не совпадали с выявлением сальмонелл или энтеровирусов в пробах. Это объясняется тем, что кишечные палочки постоянно поступают в окружающую среду, тогда как сальмонеллы и вирусы выделяются эпизодически – преимущественно во время активной фазы заболевания или в период носительства человека или животного, находящегося в воде.

В рамках текущего санитарно-микробиологического мониторинга, помимо прямого выявления патогенных микроорганизмов, используются косвенные методы. Основу этих подходов составляет определение уровня фекального загрязнения на основе санитарно-показательных бактерий и общего количества сапрофитной микрофлоры [51]. Установленные нормативные значения косвенных микробиологических показателей отражены в документах санитарного регулирования – ГОСТах, санитарных правилах и методических рекомендациях, и служат ориентиром для принятия профилактических мер.

В морской воде при санитарной оценке эпидемиологической безопасности определяются два основных показателя: индекс лактозоположительной кишечной палочки (ЛКП) и общее микробное число (ОМЧ), включающее мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФА). Исследование проводится титрационным методом.

ОМЧ – один из наиболее распространённых санитарных индикаторов качества воды. Он включает число микроорганизмов, образующих колонии на плотных питательных средах при инкубации при температуре 37 °С в условиях, подходящих для роста аэробных и факультативно-анаэробных форм. Эти микроорганизмы относятся к сапрофитной микрофлоре и играют важную роль в процессах самоочищения воды и донных осадков. Они также участвуют в биодеструкции органических веществ и проявляют антагонистическую активность по отношению к патогенам [52]. ОМЧ определяют методом глубинного посева 1 мл воды на мясо-пептонный агар, с последующей инкубацией в течение 48 часов. Результаты выражаются в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл воды.

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП), определяются двухэтапным титрационным методом брожения. Он отличается высокой точностью и стабильностью результатов. Выражение результатов осуществляется в виде коли-индекса – количества (бактерий) БГКП в 1 литре воды.

Для отбора проб применяется пробоотборник со стерильной ёмкостью объёмом 0,5 л. Из проб готовят разведения (обычно 4–5), которые засеваются в стерильные пробирки с лактозо-пептонной средой (ЛПС) и инкубируются при 37 °С в течение 18–24 часов. При отсутствии признаков роста (помутнение, газ, кислота) анализ считается отрицательным. При наличии положительной реакции выполняют пересев на чашки с питательной средой Эндо. Рост тёмно-красных колоний с металлическим блеском интерпретируется как признак наличия БГКП. Последующее подтверждение включает окраску по Грамму и тест на оксидазную активность. Наличие грамтрицательных, оксидазоотрицательных палочек подтверждает положительный результат. Коли-индекс рассчитывают по специальным таблицам [53].

В случаях, когда уровень коли-индекса превышает допустимые значения, проводят расширенное исследование, включающее определение *E. coli*, энтерококков, стафилококков, колифагов, а также бактерий рода *Salmonella*, *Shigella* и других.

В последние годы, на фоне роста антропогенного воздействия, глобального потепления, изменений в рационе питания и расширения географии импорта пищевых продуктов, отмечается утрата ряда фенотипических признаков у микроорганизмов. Кроме того, широкое и зачастую бесконтрольное применение антибиотиков способствует изменению свойств бактериальной флоры. В этих условиях термин «общие колиформные бактерии» был заменён на «обобщённые колиформные бактерии», что указывалось ранее – данный термин принят для всех типов водных объектов [54].

Для оценки качества горячей воды из централизованных систем водоснабжения, а также воды в бассейнах и аквапарках, впервые был введён норматив по содержанию *Legionella pneumophila* – не более 100 КОЕ/дм³. Это стало важным шагом в профилактике легионеллёза среди населения.

Качество сточных вод обычно оценивается с помощью физических, химических и микробиологических тестов, которые не подходят для онлайн-мониторинга, дают ненадежные результаты или используют опасные химикаты. Следовательно, существует острая необходимость в поиске быстрого и эффективного метода оценки качества воды в природных и инженерных системах и для раннего предупреждения загрязнения. Для обнаружения сточных вод и других антропогенных загрязнителей в поверхностных водах сейчас все чаще используется флуоресцентная спектроскопия. Этот метод положительно зарекомендовал себя для отслеживания источников загрязнения и мониторинга сточных вод, а также в очистных сооружениях для контроля и оптимизации процесса. [55]

Триптофан-подобная флуоресценция (TLF) является индикатором влияния человека на качество воды, поскольку пики TLF связаны с поступлением лабильного органического углерода (например, сточных вод или сельскохозяйственных отходов) и его микробным распадом. [56]

Недавние достижения в области полевых технологий обнаружения открывают возможности для исследования как пространственной, так и временной динамики микробного загрязнения более определенным и экономически эффективным способом. Были обобщены исследования по использованию флуоресцентной спектроскопии для количественной оценки микробного загрязнения и обсуждены различные подходы (и ограничения) для соотнесения необработанного сигнала флуоресценции с подсчетами *E. coli*. [57].

Высокоразрешающая флуоресцентная спектроскопия использовалась для характеристики растворенного органического вещества (РОВ) в концентрированных и неконцентрированных образцах воды из самых разных пресноводных, прибрежных и морских сред. Наблюдалось несколько типов флуоресцентных сигналов, включая гуминовые, тирозиновые и триптофановые [58-60].

Использование портативных и погружаемых триптофановых и гуминовых флуоресцентных датчиков, которые предоставляют данные флуоресценции в определенной паре длин волн или диапазоне, все чаще используется на месте для мгновенного обнаружения изменений в РОВ в различных водных средах [61]. Например, анализ флуоресценции позволяет определить источник растворенного органического вещества и, следовательно, имеет значение для понимания его судьбы в эстуариях и океане. [62,63]

Группой авторов оценивалось использование флуоресцентного растворенного органического вещества на длинах волн возбуждения-эмиссии 280 нм и 360 нм, называемого триптофан-подобной флуоресценцией (TLF), в качестве индикатора фекально загрязненной питьевой воды [64]. В результате была разработана значимая модель логистической регрессии с использованием TLF в качестве предиктора термотолерантных колиформных бактерий (ТТС) с использованием данных из источников питьевой воды, полученной из грунтовых и поверхностных вод, а также триптофан-подобный флуоресцентный датчик, который соединили с моделью машинного обучения для прогнозирования фекального загрязнения воды с высоким риском (>10 колониеобразующих единиц (КОЕ)/100 мл *E. coli*). [65]

Заключение. Вопрос доступности безопасных поверхностных и питьевых вод в мире становится все более острым, что обуславливает возрастающую актуальность поиска эффективных стратегий для поддержания их санитарного благополучия. Качество воды, которую мы используем, неразрывно связано с экологическим состоянием природных водоемов. Отсюда следует, что обеспечение высокого качества воды требует постоянной модернизации законодательной базы и совершенствования управленческих механизмов по охране и рациональному использованию природных и питьевых вод.

Несмотря на возрастающий интерес в области изучения микробного состава воды и систем водоснабжения, единые нормативные санитарные показатели на сегодняшний день всё ещё не выработаны. Традиционные культуральные методы лабораторного анализа сохраняют свою значимость и продолжают широко применяться на практике. Однако даже самые современные технологии, обеспечивающие количественную оценку загрязнённости воды, не могут полностью гарантировать её эпидемиологическую безопасность. Поэтому, перспективным направлением для более эффективного контроля качества питьевой воды представляется использование качественных показателей наряду с количественными. На международном уровне предпринимаются попытки по унификации методов отбора и анализа проб воды для выявления широкого спектра патогенных микроорганизмов. Однако значительная часть водных патогенов по-прежнему трудно поддаётся выявлению из-за ограничений существующих аналитических подходов.

Анализ имеющихся данных показывает, что для эффективной борьбы с биопленками в системах водоснабжения, несмотря на значительный прогресс в их изучении, необходимо более глубокое понимание как внешних и внутренних факторов, влияющих на их развитие, так и молекулярных процессов, происходящих внутри этих сложных микробных сообществ.

При проведении микробиологических исследований воды из бассейнов и прибрежной морской акватории особое значение приобретает определение патогенных стафилококков. Их присутствие свидетельствует о поступлении загрязнений с кожных покровов и верхних дыхательных путей человека и животных. Большинство патогенных бактерий имеют ограниченную способность к выживанию в водных экосистемах, поскольку подвергаются воздействию различных абиотических и биотических факторов, включая конкуренцию со стороны аборигенной микробиоты. Однако известно, что некоторые патогены способны длительное время сохраняться в донных отложениях.

Таким образом, внедрение новых методов микробиологической оценки поверхностных и питьевых вод на основе экологического подхода, включающего комплексный анализ взаимодействующих друг с другом микроорганизмов, связанных друг с другом трофическими сетями, безусловно, станет ценным вкладом в решение проблем качества водоснабжения.

Для обнаружения сточных вод и других антропогенных загрязнителей в поверхностных водах сейчас все чаще используется флуоресцентная спектроскопия. Недавние достижения в области полевых технологий обнаружения открывают возможности для исследования как пространственной, так и временной динамики микробного загрязнения более определенным и экономически эффективным способом.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института природно-технических систем (№ госрегистрации 124013000609-2).

Список литературы / References:

1. МУК 4.2.2029-05. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Санитарно-вирусологический контроль водных объектов. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 18.11.2005) [MUK 4.2.2029-05. 4.2 Control methods. Biological and microbiological factors. Sanitary and virological control of water bodies. Methodological guidelines (approved by Rospotrebnadzor on 18.11.2005) (In Russ.)].
2. СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества [SanPiN 2.1.4.1074-01 Drinking water. Hygienic requirements for the quality of water in centralized drinking water supply systems. Quality control (In Russ.)].
3. СанПиН 2.1.5.980-00 Гигиенические требования к охране поверхностных вод [SanPiN 2.1.5.980-00 Hygienic requirements for the protection of surface waters (In Russ.)].
4. СанПиН 2.1.4.1175-02 Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников [SanPiN 2.1.4.1175-02 Hygienic requirements for the quality of water from non-centralized water supply. Sanitary protection of sources (In Russ.)].
5. СанПиН 2.1.2.1188-03 Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества [SanPiN 2.1.2.1188-03 Swimming pools. Hygienic requirements for the device, operation and quality of water. Quality control (In Russ.)].
6. Немцева Н.Е. Микробные сообщества и проблема качества природных и питьевых вод. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*, 2023, № 3 [Nemtseva N.E. Microbial communities and the problem of quality of natural and drinking waters. *Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2023, no. 3 (In Russ.)].
7. Семерной В.П. *Санитарная гидробиология*. Учеб. пособие по гидробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. Яросл. гос. ун-т. Ярославль, 2002, 147 с. [Semernoy V.P. *Sanitary hydrobiology*. Textbook on hydrobiology. 2nd ed., revised and enlarged. Yaroslavl state university. Yaroslavl, 2002, 147 p. (In Russ.)].
8. *The United Nations world water development report 2021: valuing water*. UNESCO: Printed by UNESCO, Paris. 2021, 187 p.
9. Прогресс в области питьевой воды, санитарии и гигиены: обновление и исходные данные для целей устойчивого развития. *WHO and UNICEF*, Женева, 2017 [Progress on drinking water, sanitation and hygiene: update and baseline for the Sustainable Development Goals. *WHO and UNICEF*, Geneva, 2017 (In Russ.)].
10. Коллиер С. *Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC)* [Collier S. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*. (In Russ.)].
11. Ebacher G., Besner M.C., Clement B., Prevost M. Sensitivity analysis of some critical factors affecting simulated intrusion volumes during a low pressure transient event in a full-scale water distribution System. *Water Res.*, 2012, vol. 46, no. 13, pp. 4017-4030.
12. Thom C., Smith C.J., Moore G., Weir P., Ijaz U.Z. Microbiomes in drinking water treatment and distribution: A meta-analysis from source to tap. *Water Res.*, 2022, vol. 212, p. 118106.
13. du Plessis A. Persistent degradation: Global water quality challenges and required actions. *One earth*, 2022, vol. 5, no. 2, pp. 129-131.
14. Wang H., Edwards M.A., Falkinham J.O.III, Pruden A. Probiotic approach to patho-gen control in premise plumbing systems? *Areview. Environ. Sci. Technol.*, 2013, vol. 47, pp. 10117-10128.
15. Thomas J.M., Ashbolt N.J. Do free-living Amoebae in treated drinking water systems pre-sent an emerging health risk? *Environ. Sci. Technol.*, 2011, vol. 45, pp. 860-869.
16. Ramirez-Castillo F.Y., Loera-Muro A., Jacques M., Garneau P., Avelar-Gonzalez F.J., Harel J., Guerrero-Barrera A.L. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*, 2015, vol. 4, pp. 307-334.
17. Hayward C., Ross K.E., Brown M.H., Bentham R., Whitley H. The Presence of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens in Residential Buildings: A Literature Review. *Water*, 2022, vol. 14, p. 1129.
18. *Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition*. World Health Organization Guide-lines for Drinking Water Quality. WHO, Geneva, Switzerland, 2019.
19. Farhat N., Kim L.H., Vrouwenvelde J.S. Online characterization of bacterial processes in drinking water systems. *Clean Water*, 2020, vol. 3, no. 1, p. 16.
20. Liu S., Gunawan C., Barraud N., Rice S.A., Harry E.J., Amal R. Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environmental Science & Technology*, 2016, vol. 50, no. 17, pp. 8954-8976.
21. Bruno A., Agostinetto G., Fumagalli S., Ghisleni G., Sandionigi A. It's a Long Way to the Tap: Microbiome and DNA-Based Omics at the Core of Drinking Water Quality. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, vol. 19, no. 13, p. 7940.
22. Thom C., Smith C.J., Moore G., Weir P., Ijaz U.Z. Microbiomes in drinking water treatment and distribution: A meta-analysis from source to tap. *Water Res.*, 2022, vol. 212, p. 118106.
23. Revetta R.P., Pemberton A., Lamendella R., Iker B., Santo Domingo J.W. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. *Water research*, 2010, vol. 44, pp. 1353-1360.
24. Zhang Y., Liu W.-T. The application of molecular tools to study the drinking water micro-biome – Current understanding and future needs. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2019, vol. 49, no. 13, pp. 1188-1235.

25. Vargha M., Roka E., Erdelyi N., Nemeth K., Nagy-Kovacs Z., Kos P.B., Engloner A.I. From Source to Tap: Tracking Microbial Diversity in a Riverbank Filtration-Based Drinking Water Supply System under Changing Hydrological Regimes. *Diversity*, 2023, vol. 15, no. 5, p. 621.
26. Pinar-Mendez A., Wangenstein O.S., Prabel K., Galofre B., Mendez J., Blanch A.R., Garcia-Aljaro C. Monitoring Bacterial Community Dynamics in a Drinking Water Treatment Plant: An Integrative Approach Using Metabarcoding and Microbial Indicators in Large Water Volumes. *Water*, 2022, vol. 14, p. 1435.
27. Luef B., Frischkorn K.R., Wrighton K.C., Holman H.Y.N., Birarda G., Thomas B.C., Singh A., Williams K.H., Siegerist C.E., Tringe S.G. et al. Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6, p. 6372.
28. Sun H., He X., Ye L., Zhang X.X., Wu B., Ren H. Diversity, abundance, and possible sources of fecal bacteria in the Yangtze River. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 101, pp. 2143-2152.
29. Prest E.I., Hammes F., van Loosdrecht M.C., Vrouwenvelder J.S. Biological Stability of Drink-ing Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges. *Front Microbiol.*, 2016, vol. 1, no. 7, p. 45.
30. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2014 году. Государственный доклад, 2015 [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population of the Russian Federation in 2014. State report, 2015 (In Russ.)].
31. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2017 году. Государственный доклад, 2017 [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population of the Russian Federation in 2017. State report, 2017 (In Russ.)].
32. Загайнова А.В., Трухина Г.М., Рахманин Ю.А., Артемова Т.З., Сухина М.А. Обоснование введения индикаторных показателей «Обобщённые колиформные бактерии» и «Escherichia coli» в систему санитарно-эпидемиологического контроля безопасности питьевой воды. *Гигиена и санитария*, 2020, т. 99, № 12, с. 1353-1359 [Zagainova A.V., Trukhina G.M., Rakhmanin Yu.A., Artemova T.Z., Sukhina M.A. Justification for the introduction of indicator indicators "Generalized coliform bacteria" and "Escherichia coli" in the system of sanitary and epidemiological control of drinking water safety. *Hygiene and Sanitation*, 2020, vol. 99, no. 12, pp. 1353-1359 (In Russ.)].
33. Li E., Saleem F., Edge T.A., Schellhorn H.E. Biological Indicators for Fecal Pollution Detection and Source Tracking: A Review. *Processes*, 2021, vol. 9, p. 2058.
34. Бухарин О.В., Немцева Н.В. *Микробиология биоценозов природных водоемов*. Екатеринбург: УрО РАН, 2008, 156 с. [Bukharin O.V., Nemtseva N.V. *Microbiology of biocenoses of natural reservoirs*. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2008, 156 p. (In Russ.)].
35. Немцева Н.В., Бухарин О.В. Биоленкообразование и антилизоцимная активность микроорганизмов для оценки качества природных и питьевых вод. *ВОДА Magazine*, 2018, т. 128, № 4, с. 34-37 [Nemtseva N.V., Bukharin O.V. Biofilm formation and antilysozyme activity of microorganisms for assessing the quality of natural and drinking waters. *VODA Magazine*, 2018, vol. 128, no. 4, pp. 34-37 (In Russ.)].
36. Mahajna A., Dinkla I.J.T., Euverink G.J.W., Keesman K.J. and Jayawardhana B. Clean and Safe Drinking Water Systems via Metagenomics Data and Artificial Intelligence: State-of-the-Art and Future Perspective. *Front. Microbiol.*, 2022, vol. 13, p. 832452.
37. Fish K.E., Boxall J.B. Biofilm Microbiome (Re)Growth Dynamics in Drinking Water Distribution Systems Are Impacted by Chlorine Concentration. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, p. 2519.
38. Saxena P., Joshi Y., Rawat K., Bisht R. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol.*, 2019, vol. 59, no. 1, pp. 3-12.
39. Duong H., Park J.W., Kim S.-Y., Maeng S.K. Advanced biomass formation potential of pipe materials for drinking water distribution systems: A semi-automated biomass formation potential. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 417, p. 138004.
40. Стожаров А.Н. *Медицинская экология*. Минск: Высшая школа, 2007, с. 182 [Stozharov A.N. *Medical ecology*. Minsk: Higher school, 2007, p. 182 (In Russ.)].
41. Коротяев А.И., Бабичев С.А. *Медицинская микробиология, иммунология и вирусология*. С.-П.: СпецЛит, 2000, 591 с. [Korotyaev A.I., Babichev S.A. *Medical microbiology, immunology and virology*. St. Petersburg: SpetsLit, 2000, 591 p. (In Russ.)].
42. Артемова Т.З., Корш Л.Е., Маликова Р.Т. Оценка общей микробной загрязненности воды методом флуорохромирования в объеме пробы. Под ред. Г.И. Сидоренко. *Гигиена воды и санитарная охрана водоемов*, 1973, с. 111-114 [Artemova T.Z., Korsh L.E., Malikova R.T. Assessment of total microbial contamination of water by the fluorochromization method in the sample volume. Ed. G.I. Sidorenko. *Hygiene of water and sanitary protection of reservoirs*, 1973, pp. 111-114 (In Russ.)].
43. Корш Л.Е., Артемова Т.З. *Ускоренные методы санитарно-бактериологического исследования воды*. М.: Медицина, 1978, 272 с. [Korsh L.E., Artemova T.Z. *Accelerated methods of sanitary and bacteriological examination of water*. Moscow: Medicine, 1978, 272 p. (In Russ.)].
44. Корш Л.Е., Артемова Т.З. *Ускоренные методы санитарно-бактериологического исследования воды*. М.: Медицина, 1978, 272 с. [Korsh L.E., Artemova T.Z. *Accelerated methods of sanitary and bacteriological examination of water*. Moscow: Medicine, 1978, 272 p. (In Russ.)].
45. Келлер А.А. *Медицинская экология*. СПб.: "Петроградский и К°", 1999, с. 96-109 [Keller A.A. *Medical ecology*. St. Petersburg: "Petrogradsky i K°", 1999, pp. 96-109 (In Russ.)].

46. Кисленко В.Н. *Общая и ветеринарная экология*. Киев: Колос, 2006, 344 с. [Kislenko V.N. *General and veterinary ecology*. Kyiv: Kolos, 2006, 344 p. (In Russ.)].
47. Le Guyader F., Cormier M. Suivi des echages eau sediment en modele experimental. *Oceanis*, 1988, 14, no. 1, pp. 97-107.
48. Zieminska S., Swidorska H. Zastosowanie immunofluorescencji w mikrobiologii wody na przykladzie wybranych chlorobotworczych szczepow *Escherichia coli*. *Rocz.n.Zak.Hig. (Warsz.)*, 1973, vol. 24, pp. 253-266.
49. Багдасарян Г.А., Ловцевич Е.А. *Индикация и инактивация кишечных вирусов в объектах окружающей среды*. М.: Медицина, 1972, 115 с. [Bagdasaryan G.A., Lovtsevich E.A. *Indication and inactivation of intestinal viruses in environmental objects*. Moscow: Medicine, 1972, 115 p. (In Russ.)].
50. Gordon R., Feters M., Bissonnette G. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl.Microbiol.*, 1974, vol. 27, pp. 823-829.
51. Корш Л.Е. *Ускоренные методы санитарно-бактериологического исследования воды*. М.: Медицина, 1978, 272 с. [Korsh L.E. *Accelerated methods of sanitary and bacteriological examination of water*. Moscow: Medicine, 1978, 272 p. (In Russ.)].
52. Емельяненко П.А. *Ветеринарная микробиология*. Киев: Колос, 1982, 304 с. [Emelyanenko P.A. *Veterinary microbiology*. Kyiv: Kolos, 1982, 304 p. (In Russ.)].
53. Трухина Г.М., Ярославцева М.А., Дмитриева Н.А. Современные тенденции санитарной микробиологии в реализации санитарно-эпидемиологического надзора за безопасностью водных объектов. *Здоровье населения и среда обитания*, 2022, т. 30, № 10, с. 16-24 [Trukhina G.M., Yaroslavtseva M.A., Dmitrieva N.A. Modern trends in sanitary microbiology in the implementation of sanitary and epidemiological supervision of the safety of water bodies. *Population Health and Habitat*, 2022, vol. 30, no. 10, pp. 16-24, doi: 10.35627/2219-5238/2022-30-10-16-24 (In Russ.)].
54. *Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу воды поверхностных водоемов*, 1981 [Guidelines for sanitary and microbiological analysis of surface water, 1981 (In Russ.)].
55. Carstea E.M., Bridgeman J., Baker A., Reynolds D.M. Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: a review. *Water Research*, 2016, doi: 10.1016/j.watres.2016.03.021.
56. Khamis K., Sorensen J.P.R., Bradley C., Hannah D.M., Lapworth D.J., Stevens R. In situ tryptophan-like fluorometers: assessing turbidity and temperature effects for freshwater applications. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2015, vol. 17, pp. 740-752, doi: 10.1039/c5em00030k.
57. Gunter H., Bradley C., Hannah D.M., Manaseki-Holland S., Stevens R., Khamis K. Advances in quantifying microbial contamination in potable water: Potential of fluorescence-based sensor technology. *WIREs Water*, 2023, vol. 10, p. e1622, doi: 10.1002/wat2.1622.
58. Coble P.G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.*, 1996, vol. 51, no. 4, pp. 325-346, doi: 10.1016/03044203(95)000623.
59. Fellman J.B., Hood E., Spencer R.G.M. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: a review. *Limnol. Oceanogr.*, 2010, vol. 55, no. 6, pp. 2452-2462, doi: 10.4319/lo.2010.55.6.2452.
60. Hudson N., Baker A., Reynolds D. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - a review. *River Res. Appl.*, 2007, vol. 23, no. 6, pp. 631-649, doi: 10.1002/rra.1005.
61. Mendoza L.M., Mladenov N., Kinoshita A.M., Pinongcos F., Verbyla M.E., Gersberg R. Fluorescence-based monitoring of anthropogenic pollutant inputs to an urban stream in Southern California, USA. *Science of the Total Environment*, 2020, vol. 718, p. 137206.
62. Baker A., Spencer R.G.M. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Sci Total Environ.*, 2004, vol. 15, no. 333 (1-3), pp. 217-232, doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.04.013.
63. Carstea E.M., Baker A., Bieroza M., Reynolds D. Continuous fluorescence excitation-emission matrix monitoring of river organic matter. *Water Res.*, 2010, vol. 44, no. 18, pp. 5356-5366, doi: 10.1016/j.watres.2010.06.036.
64. Sorensen J.P.R., Baker A., Cumberland S.A., Lapworth D.J., MacDonald A.M., Pedley S., Taylor R.G., Ward J.S.T. Real-time detection of faecally contaminated drinking water with tryptophan-like fluorescence: defining threshold values. *The Science of The Total Environment*, 2018, no. 622-623, pp. 1250-1257, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.162.
65. Bedell E., Harmon O., Fankhauser K., Shivers Z., Thomas E. A continuous, in-situ, near-time fluorescence sensor coupled with a machine learning model for detection of fecal contamination risk in drinking water: Design, characterization and field validation. *Water Research*, 2022, no. 220, p. 118644.

SANITARY AND MICROBIOLOGICAL CONDITION OF SURFACE AND DRINKING WATER AND
MODERN CONTROL METHODSRubtsova S.I.¹, Andreeva N.A.^{1,2}¹ Sevastopol State University*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: rsi1976@mail.ru*² Institute of Natural and Technical Systems*Lenin str., 28, Sevastopol 299011, Russia*

Received 15.08.2025

Abstract. As a result of the analysis of current data on the sanitary condition and sanitary-significant microflora present in water sources, including drinking water, it has been established that unified sanitary standards have not yet been developed. Modern data allows us to expand our understanding of the quantitative and qualitative composition of microorganisms in surface and drinking water, but this is not yet a basis for revising sanitary standards. Bacteriological control methods are the main ones used to assess the microbiological state of aquatic ecosystems, but the use of modern high-tech pollution assessment technologies does not provide a complete guarantee of the safety of drinking water. In this regard, proposals for the combined use of qualitative and quantitative indicators are of particular interest, as they can contribute to more accurate monitoring and effective control of water quality. The introduction of new instrumental methods for studying the sanitary and microbiological state of surface and drinking water will undoubtedly make a significant contribution to improving the quality of water use for the population.

Key words: *sanitary and microbiological indicators, opportunistic pathogens, E. coli bacteria, natural water bodies, drinking water, total coliform bacteria (TCB), fecal contamination, biofilms, and total microbial count (TMC).*

СПЕКТРЫ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА ПИГМЕНТАМИ ПЛАНКТОННЫХ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ КЛАССА *BACILLARIOPHYCEAE*, *DINOPHYCEAE*, *RAPHIDOPHYCEAE* И ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Чурилова Т.Я.¹, Моисеева Н.А.¹, Скороход Е.Ю.¹, Орлова Т.Ю.², Салюк П.А.³,
Головин А.В.^{1,4}, Бучельников А.С.^{1,4}

¹ Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН
проспект Нахимова д. 2, г. Севастополь 299011, РФ; e-mail: tanya.churilova@gmail.com

² Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН
ул. Пальчевского 17, г. Владивосток, 690041, РФ

³ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН
ул. Балтийская, 43, г. Владивосток, 690041, РФ

⁴ Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, 299053, г. Севастополь, РФ

Поступила в редакцию 26.08.2025

Аннотация. В связи с вероятными негативными последствиями цветения вод в результате интенсивного роста отдельных видов фитопланктона и, в частности, потенциально токсичных видов актуальна организация оперативного слежения за развитием цветения и прогнозирования этого явления на основе данных дистанционного зондирования Земли из космоса. С целью выявления характерных видовых отличий в спектральных показателях поглощения света пигментами планктонных водорослей проводили сравнение оптических спектральных характеристик пяти культур микроводорослей разной таксономической принадлежности – *Thalassiosira nordenskioeldii* (класс *Bacillariophyceae*), *Skeletonema marinoi* / *Skeletonema sp* (класс *Bacillariophyceae*), *Alexandrium ARTU-15* / *Alexandrium catenella* (класс *Dinophyceae*), *Heterosigma akashiwo* (класс *Raphidophyceae*) и цианобактерии *Leptolyngbya minuta*. Оптические измерения проводили на современном методологическом и технологическом уровне. Используя отношения показателей поглощения света на отдельных длинах волн показано, что виды, относящиеся к разным таксономическим классам, не имеют значительных различий в форме спектров показателей поглощения света. Установлено, что культуры водорослей, выращиваемые в накопительном режиме при идентичных световых и температурных условиях, могут значительно различаться по спектральным характеристикам в связи с разной плотностью клеток и внутриклеточной концентрацией пигментов.

Ключевые слова: культура, микроводоросли, цианобактерии, спектральные показатели поглощения света.

Цветение фитопланктона часто приводит к экологической катастрофе в связи с формированием зон гипоксии и заморных явлений [1,2]. Цветение ядовитых видов фитопланктона представляет угрозу не только для биоты, но также и для человека. В связи с этим особую актуальность представляет развитие оперативного прогнозирования цветения фитопланктона, в том числе и идентификацию видов, вызвавших цветение моря. Идентификация видов на основе спектральных характеристик восходящего из водной толщи излучения, регистрируемых дистанционными оптическими сканерами, требует выявления характерных для вида отличий в спектральных показателях поглощения света пигментами.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в сравнении формы спектров показателей поглощения света пигментами планктонных одноклеточных водорослей класса *Bacillariophyceae*, *Raphidophyceae*, *Dinophyceae*, в том числе ядовитого вида *Alexandrium catenella* и цианобактериями.

Методы. Пробы культур фильтровали через стекловолоконные фильтры Whatman GF/F (диаметр 25 мм, размер пор 0,7 мкм) при слабом вакууме (<0,2 атм).

Поглощение света пигментами фитопланктона ($a_{ph}(\lambda)$) определяли по методике «количественного определения на увлажненных фильтрах» в соответствии с протоколом NASA [3]. Измерения проводили сразу после фильтрации в диапазоне от 350 до 750 нм с шагом в 1 нм на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV 2600, оснащенный интегрирующей сферой. Значения измеренной оптической плотности корректировали (β -correction) в соответствии с работой [4].

Концентрацию пигментов в пробе культуры определяли спектрофотометрическим методом [5,6]. Пробу на фильтре экстрагировали 90% раствором ацетона (5 мл), используя двухступенчатую экстракцию (+5 мл ацетона). Для полной экстракции пигментов использовали виброгомогенизацию. Экстракты осветляли (осаждали взвесь) центрифугированием в течение 5 минут (при центробежном ускорении 5000 g). Оптическую плотность экстракта пигментов измеряли в диапазоне от 350 до 750 нм с шагом в 1 нм на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV 2600.

Результаты и обсуждение. Проводили оптические измерения пяти культур: *Thalassiosira nordenskioeldii* (*Bacillariophyceae*), *Skeletonema marinoi* / *Skeletonema sp* (*Bacillariophyceae*), *Alexandrium ARTU-15* / *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*), *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) и *Leptolyngbya minuta* (cyanobacteria). Полный комплекс измерений, который включал определение спектрального показателя поглощения света пигментами

фитопланктона ($a_{ph}(\lambda)$, м^{-1}) и концентрацию хлорофилла a в культуре (Chl- a , $\text{мг} \cdot \text{м}^{-3}$), смогли выполнить для четырех культур. Для цианобактерии *Leptolyngbya minuta* получили экстракт пигментов с оптической плотностью, недостаточной для измерения. По этой причине для культуры цианобактерии *Leptolyngbya minuta* нет данных по концентрации пигментов. В культуре *Leptolyngbya minuta* содержание пигментов значительно меньше, чем в других культурах. Для *Leptolyngbya minuta* получили значения $a_{ph}(\lambda)$ почти на два порядка ниже значений этого параметра, измеренных для других культур. Спектр $a_{ph}(\lambda)$ *Leptolyngbya minuta* сливается с осью абсцисс и только в логарифмической шкале можно увидеть спектры для всех пяти культур (рис. 1). Относительно низкое содержание пигментов в пробе культуры *Leptolyngbya minuta* привело к тому, что спектр $a_{ph}(\lambda)$ записан с видимым шумом (рис. 1).

Все спектры имеют два основных пика: в синей области спектра на длине волны 438 нм и в красной области на длине волны 675 нм (рис. 1). Значения удельных показателей поглощения света пигментами фитопланктона ($a_{ph}^*(\lambda) = a_{ph}(\lambda)/\text{Chl-}a$, $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$) различаются между культурами водорослей (рис. 2).

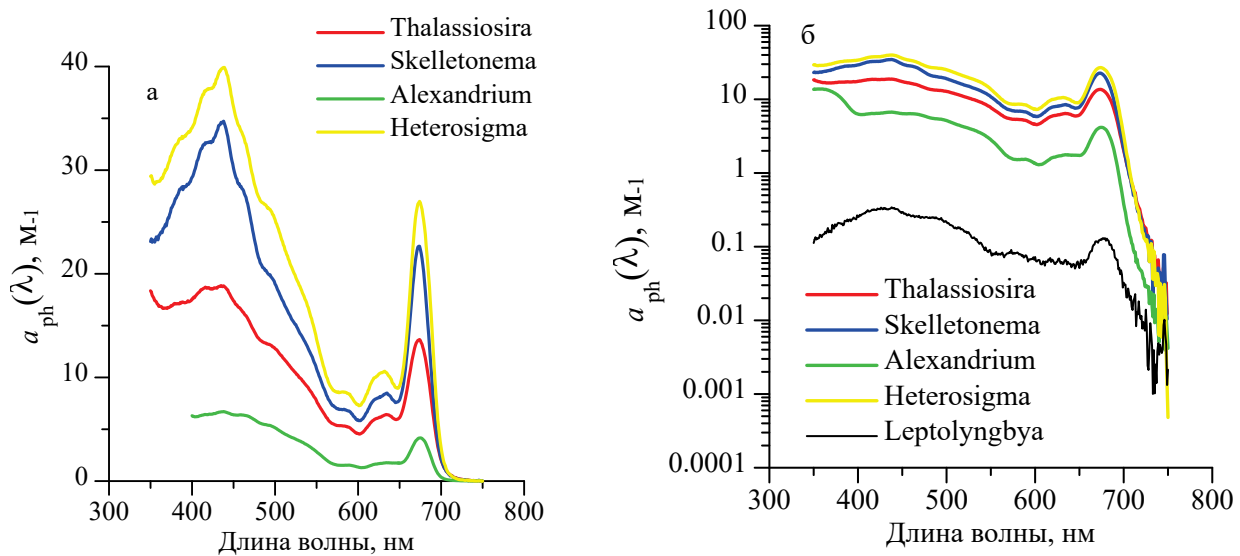


Рисунок 1. Спектры показателей поглощения света пигментами фитопланктона ($a_{ph}(\lambda)$, м^{-1}) в линейной шкале (а) и логарифмической (б)

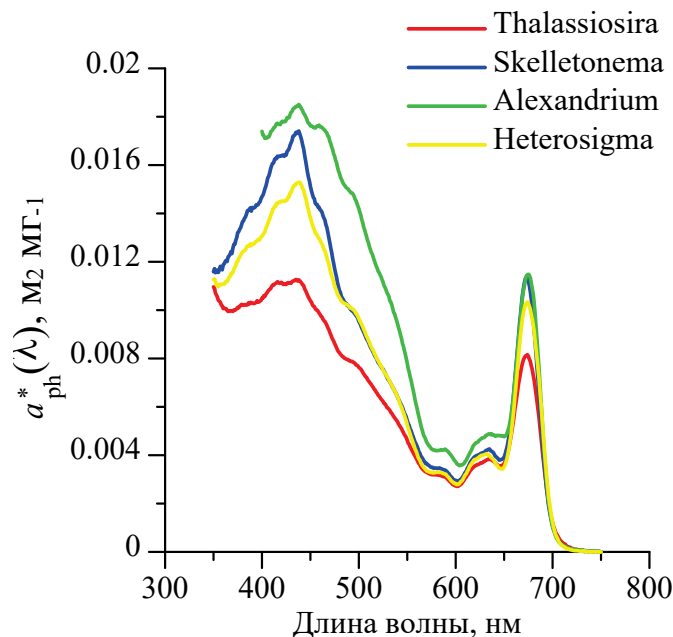


Рисунок 2. Спектры удельных (нормированных на концентрацию хлорофилла a – Chl- a) показателей поглощения света пигментами культур микроводорослей ($a_{ph}^*(\lambda) = a_{ph}(\lambda)/\text{Chl-}a$, $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$)

Наибольшие значения $a_{ph}^*(\lambda)$ получены для вида *Alexandrium catenella*: значения $a_{ph}^*(\lambda)$ в пиках спектра составляли $0,019 \text{ м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ (на 438 нм) и $0,011 \text{ м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ (на 675 нм) (рис. 2, таблица 1). Наименьшие значения $a_{ph}^*(\lambda)$ были получены для вида *Thalassiosira nordenskiöldii*: значения $a_{ph}^*(\lambda)$ в пиках спектра составляли $0,011 \text{ м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ (на 438 нм) и $0,008 \text{ м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ (на 675 нм).

С целью сравнения формы спектров $a_{ph}(\lambda)$ выполнили нормирование $a_{ph}(\lambda)$ на значение этого показателя в красном пике спектра (на 675 нм) (рис. 3). Очевидно, что культуры отличаются по соотношению показателей $a_{ph}(\lambda)$ в пиках спектра ($R = a_{ph}(438)/a_{ph}(675)$) (рис. 3). Для культуры *Leptolyngbya minuta* получено значение R (2,6), которое значительно превышало значения, отмеченные для остальных культур (1,4–1,6). Отмеченное различие культур по значениям $a_{ph}(\lambda)$ и R (рис. 2, 3, табл. 1) связано с влиянием «эффекта упаковки» пигментов в клетках микроводорослей, который обусловлен составом и концентрацией пигментов в клетках, а также размером клеток [7]. Внутриклеточная концентрация пигментов изменяет в результате адаптации водорослей (и цианобактерий) к условиям среды – свету, биогенной обеспеченности и температуре [8,9].

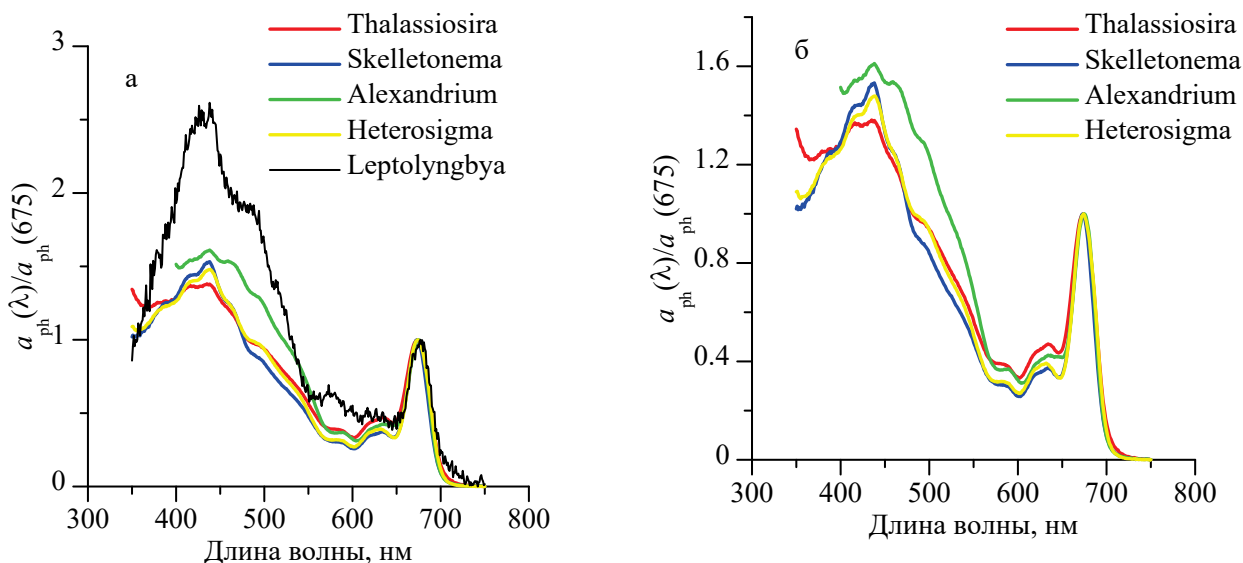


Рисунок 3. Спектры относительных показателей поглощения света пигментами фитопланктона ($a_{ph}(\lambda)/a_{ph}(675)$)

Таблица 1. Численность клеток (N , кл·мл⁻¹) и концентрация хлорофилла a (Chl- a , мг·м⁻³) и соотношение между каротиноидами (C_{car} , мг·м⁻³) и Chl- a ($C_{car}/\text{Chl-}a$) в культуре водорослей и цианобактерий, внутриклеточное содержание хлорофилла a (Chl_{cell} 10⁶, мг·кл⁻¹), отношение показателей поглощения света пигментами фитопланктона $a_{ph}(\lambda)$ на длинах волн 438 и 490 нм ($a_{ph}(438)/a_{ph}(490)$) и на длинах волн 438 и 675 нм ($R = a_{ph}(438)/a_{ph}(675)$), показатель $a_{ph}(\lambda)$, нормированный на Chl- a , на длине волны 675 нм ($a_{ph}^*(675)$, м²·мг⁻¹)

Культура	N , кл·мл ⁻¹	Chl- a , мг·м ⁻³	$C_{car}/$ Chl- a	Chl _{cell} , мг·кл ⁻¹ (×10 ⁶)	$a_{ph}(438)/$ $a_{ph}(490)$	R	$a_{ph}^*(675)$
<i>Thalassiosira nordenskiöldii</i>	59900	1670	0,40	0,0280	1,4	1,4	0,008
<i>Skeletonema marinoi</i>	286000	2000	0,40	0,0070	1,7	1,5	0,011
<i>Alexandrium catenella</i>	8330	363	0,53	0,044	1,2	1,6	0,011
<i>Heterosigma akashiwo</i>	209000	2610	0,38	0,013	1,5	1,5	0,010
<i>Leptolyngbya minuta</i>	—	—	—	—	1,4	2,6	—

Работа проводилась с культурами, которые содержались в боксах при одинаковой температуре и выращивались на питательных средах, сбалансированных по биогенному составу. Единственный фактор, который мог различаться между культурами, это плотность светового потока, падающая на поверхность клеток водорослей, которая зависит от интенсивности света, падающего на склянку с культурой, и от плотности клеток в склянке. Следует отметить, что $\text{Chl-}a$ и содержание хлорофилла «а» в клетках ($\text{Chl-}a_{\text{cell}}$) различались значительно между видами (табл. 1). Следовательно, отмеченное различие по значениям $a_{ph}(\lambda)$ и R (рис. 2, 3, табл. 1) между водорослями связано с разной плотностью клеток в культурах (табл. 1), так как световые условия в боксе были идентичные.

Относительно большое значение R у культуры цианобактерий *Leptolyngbya minuta*, вероятно, связано с большей интенсивностью света в боксе выращивания (цианобактерии культивируются в отдельном боксе), а также в связи с большим разведением этой культуры (пигментов в пробе было недостаточно, чтобы измерять оптическую плотность ацетонового экстракта на спектрофотометре).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что культуры видов, относящихся к разным таксономическим классам *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae*, *Raphidophyceae*, не проявляют значительных различий в форме спектров показателей поглощения света, что обусловлено совпадением/перекрытием полос поглощения света вспомогательными пигментами и в том числе пигментами-маркерами таксона [10]. Показано, что культуры водорослей, выращиваемые в накопительном режиме в идентичных условиях в боксе, могут различаться по спектральным характеристикам в связи с разной плотностью клеток и внутриклеточной концентрации пигментов.

Работа выполнена в рамках государственного задания №124030100106-2 «Исследование региональных особенностей биооптических показателей водоемов как основы дешифрования данных дистанционного зондирования для оценки мультимасштабной изменчивости первично продукционных характеристик пелагических экосистем» (проведение оптических измерений) и проекта № FZNS-2024-0037 «Комплексный экологический мониторинг прибрежных морских и наземных экосистем Камчатки» (анализ экспериментальных данных).

Список литературы / References:

1. Berthold M., Karsten U., von Weber M., Bachor A., Schumann R. Phytoplankton can bypass nutrient reductions in eutrophic coastal water bodies. *Ambio*, 2018, vol. 47, pp. 146-158, doi: 10.1007/s13280-017-0980-0.
2. Lemley D.A., Adams J.B. Eutrophication. *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)*, 2019, vol. 1, pp. 86-90, doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.10957-1.
3. Inherent Optical Property Measurements and Protocols: Absorption Coefficient (v1.0). Eds. Neeley A.R., Mannino A. Dartmouth: Bounty Print, 2018, 83 p.
4. Stramski D., Reynolds R.A., Kaczmarek S., Uitz J., Zheng G. Correction of pathlength amplification in the filter-pad technique for measurements of particulate absorption coefficient in the visible spectral region. *Appl. Opt.*, 2015, vol. 54, no. 22, pp. 6763-6782, doi: 10.1364/AO.54.006763.
5. Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a , b , c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 1975, vol. 167, no. 2, pp. 191-194, doi: 10.1016/S0015-3796(17)30778-3.
6. Lorenzen C.J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 1967, vol. 12, no. 2, pp. 343-346, doi: 10.4319/lo.1967.12.2.0343.
7. Morel A., Bricaud A. Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep-Sea Res., Part A*, 1981, vol. 28, no. 11, pp. 1375-1393, doi: 10.1016/0198-0149(81)90039-X.
8. Geider R.J., MacIntyre H.L., Kana T.M. A dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of the balanced growth rate and chlorophyll a : carbon ratio to light, nutrient limitation and temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1997, vol. 148, pp. 187-200.
9. MacIntyre H.L., Kana T.M., Anning J., Geider R. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.*, 2002, vol. 38, no. 1, pp. 17-38, doi: 10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x.
10. Jeffrey S., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Method*. Paris: UNESCO Publishing, 1997, 661 p.

SPECTRAL LIGHT ABSORPTION COEFFICIENTS OF CULTURE OF MICROALGAE BELONGING TO CLASSES *BACILLARIOPHYCEAE*, *DINOPHYCEAE*, *RAPHIDOPHYCEAE* AND CYANOBACTERIAChurilova T.Ya.¹, Moiseeva N.A.¹, Skorokhod E.Yu.¹, Orlova T.Yu.², Salyuk P.A.³, Golovin A.V.^{1,4}, Buchelnikov A.S.^{1,4}¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nakhimova ave. 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: tanya.churilova@gmail.com² A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology of FEB RAS

Palchevskogo str. 17, Vladivostok, 690041, Russia

³ V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute of FEB RAS

Baltiyskaya str. 43, Vladivostok, 690041, Russia

⁴ Sevastopol State University

Universitetskaya str. 33, Sevastopol, 299053, Russia

Received 26.08.2025

Abstract. In connection with the probable negative consequences of water blooms caused by the intensive development of certain types of phytoplankton, and in particular harmful species, it is important to organize operational monitoring of bloom development and forecast this phenomenon based on remote sensing data. In order to identify species differences in the spectral coefficients of light absorption by pigments of planktonic algae, optical spectral characteristics of five microalgae cultures of different taxonomic types was compared. The cultures of *Thalassiosira nordenskioeldii* (class *Bacillariophyceae*), *Skeletonema marinoi* / *Skeletonema sp* (class *Bacillariophyceae*), *Alexandrium ARTU-15* / *Alexandrium catenella* (class *Dinophyceae*), *Heterosigma akashiwo* (class *Raphidophyceae*) and cyanobacterium *Leptolyngbya minuta* were used in this study. Optical measurements were carried out at a modern methodological and technological level. Using the ratios of light absorption coefficients at particular wavelengths, it was shown that the shape of the spectra differed insignificantly between species belonging to different taxonomic classes. It was revealed that batch cultures of algae grown under the same light intensity and temperature differed in spectral characteristics more significantly due to different cell density and intracellular pigment concentration.

Key words: culture, microalgae, cyanobacteria, spectral light absorption coefficient.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ ЗА 2025 ГОД

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- Клочкова В.С., Чернышев Д.Н., Завьялова О.С. Модель спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* с дополнительным пиком в области 700 нм № 4, с. 241-244
- Подгурская А.Д., Балакина А.А., Мищенко Д.В., Блохина С.В., Агладзе К.И. Выделение первичных кардиомиоцитов неонатальных мышей ферментативным методом № 3, с. 175-179
- Рощина В.В., Богун С.А., Абушин А.А. Применение спектральных методов для поиска азуклен-содержащих растений аридной зоны № 1, с. 7-14
- Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Новикова Т.М. Декомпозиция спектра поглощения криптофитовой водоросли *Rhodomonas salina* № 3, с. 169-174
- Чернышев Д.Н., Осокин А.Р., Веляев Ю.О., Дегтяр И.В., Лантушенко А.О. Применение математического моделирования для дополнительной идентификации пигментов, разделённых методом ВЭЖХ-ФЛД № 2, с. 101-105
- Шупова Е.В. Взаимодействие антибиотика норфлоксацина с полимерной ДНК в присутствии профлавина № 1, с. 15-23

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

- Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Молекулярное моделирование конформационного поведения и электронной структуры антимикробного тетрапептида WRWR № 1, с. 34-38
- Верисокин А.Ю., Вервейко Д.В., Иванова П.Р. Роль нейромодуляторов в активности нейроглиоваскулярной единицы № 3, с. 191-196
- Гребнева Е.А. Механизм образования редких таутомеров оснований ДНК при облучении однопечочной ДНК ультрафиолетовым светом № 1, с. 24-33
- Дегтяр А.Д., Евстигнеев М.П. Механический аналог теории коррелированных состояний гидрофобного эффекта в водной среде № 4, с. 256-262
- Душанов Э.Б., Аксёнова С.В., Родригез Я.К.Д., Демидов С.В. Моделирование взаимодействия борсодержащих препаратов с клеточной мембраной при различных концентрациях № 3, с. 186-190
- Кузьмичев С.А. Некоторые термодинамические особенности регуляции процессинга пиРНК-подобных транскриптов в соматических клетках у мыши № 3, с. 180-185
- Левченко И.Н., Панкратов В.С., Бакаева А.И., Левченко А.А., Машковцева Е.В., Макаренко Е.Ю., Липенгольц А.А. Разработка компьютерной программы для автоматизированного анализа научных статей при конструировании лекарственных препаратов № 4, с. 245-250
- Левченко И.Н., Панкратов В.С., Владимиров Г.К., Левченко А.А., Володяев И.В., Владимиров Ю.А. Исследование структуры кардиолипина, акцильной цепи в составе гетерогенного катализатора активированной кумаринами S_{252} , S_{334} и S_{314} хемилюминесценции под действием цитохрома С с кардиолипином № 4, с. 251-255
- Мегер Я.В., Лантушенко А.О. Сравнение перспективных молекулярных маркеров среди генов митохондриального генома для рода *Artemia* № 2, с. 111-115
- Филиппов С.В. Картографирование поверхности домена холодового шока: Часть 1. определение единого конформационного пространства для CSD-гомологов из разных таксономических групп № 2, с. 106-110

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

- Беликов Н.Е., Демина О.В., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А.** Влияние солей металлов на оптические свойства нового фотохромного хелатофора..... № 1, с. 62-70
- Бородин А.В., Пименов К.А., Веляев Ю.О.** Особенности накопления некоторых липидов в тканях двусторчатого моллюска *Polititapes aureus* (Gmelin, 1791) в сублитеральной зоне сева-стопольского побережья № 1, с. 71-79
- Ботин А.С., Аринбасарова А.Ю., Антипов С.С., Грицай Е.П., Кордова-Торрес А.В.** Неко-торые возможности синтетической биологии в конструировании новых штаммов микроорга-низмов методами генетической инженерии для биотехнологии (миниобзор) № 4, с. 283-289
- Бутенко Е.В., Турсунова Ю.Д., Добаева Н.М., Бакурова Е.М.** Некоторые особенности мета-болизма карцином молочной железы, опосредованные метформином..... № 3, с. 206-210
- Верлов Н.А., Бурдаков В.С., Ланда С.Б., Эмануэль В.Л.** Определение концентрации урото-дулина у животных с использованием фильтрации № 3, с. 202-205
- Дегтяр И.В., Веляев Ю.О., Осокин А.Р., Лантушенко А.О.** Анализ состава жирных кислот у *Dunaliella salina*, синтезируемых под воздействием различных стрессовых факторов..... № 2, с. 116-120
- Казаринов К.Д., Полников И.Г.** Механизм эффективности использования микроволнового изучения в фармакологическом производстве..... № 3, с. 211-215
- Клименко И.В., Трусова Е.А., Лобанов А.В.** Новые супрамолекулярные системы на основе металлокомплексов фталоцианинов и бескислородного графена для биомедицинских приложе-ний..... № 2, с. 143-147
- Лесных В.Н., Елистратов А.В., Коломбет В.А.** Программа для обработки итога сканирования мышления цепным вербальным тестом..... № 1, с. 46-54
- Медведева Д.И., Морозова Г.И., Рыбаков Ю.П.** К механизму неспецифической стимуляции лимфоцитов: модель реакции тимокитов на эритропоэтин с участием митохондриального элек-трокабеля № 4, с. 263-272
- Мельническая А.В., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Бельтов М.А.** Ингибитор комплекса Atp2/3 , соединение СК-0944666, ослабляет стимулирующий эффект глутоксида на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки № 1, с. 55-61
- Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И., Бельтов М.А.** Агонист рецепторов сигма-1, соединение (+)-SKF-10047, подавляет депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах..... № 1, с. 39-45
- Мутовкин П.А., Ращенкова И.И., Рындин А.Ю., Дегтяр А.Д., Мосунов А.А.** Исследование механических свойств клеток HeLa методом атомно-силовой спектроскопии № 2, с. 137-142
- Назарьев Е.В., Мишунин Б.А., Пластун И.Л.** Исследование межмолекулярного взаимодей-ствия аминокислотных цепей рецептора и лиганда фактора некроза опухоли № 4, с. 277-282
- Торхов Н.А., Ращенкова И.И., Лантушенко А.О.** Исследование микромеханических свойств клеток меланомы «Clone M-3» методами атомно-силовой микроскопии № 2, с. 121-125
- Черных Ю.А., Плешкова М.Н., Вандышев Д.Ю., Антипов С.С., Леденёва И.В.** Разработка флуоресцентных красителей на основе азолотриазиннов и оценка их физико-химических пара-метров № 3, с. 216-220
- Чжу О.П., Аравияшвили Д.Э., Руденко Н.С., Маринич И.И.** Оценка показателей состояния антиоксидантной системы как инструмент для понимания процессов старения № 2, с. 131-136
- Шабанова Д.А., Крюкова О.В., Тюменцева А.В., Максимов Н.Г., Столяр С.В.** Определение методом ЭПР металлосодержащих молекул в суспензии асцитной карциномы Эрлиха после криоконсервации № 3, с. 197-201
- Эрнандес Хименес Х., Кампос Кобос Э.Х., Моралес Марко А., Агустин Серрано Р., Зенте-но Матео Б., Сервантес Тавера А.М., Эрнандес Сантьяго А.А.** Математическое моделиро-вание процессов биоразложения в биореакторе: динамика стадий биопереваривания № 4, с. 273-276

Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В., Назимова С.В., Цомартова Э.С., Иванова М.Ю., Черешнева Е.В., Ломановская Т.А., Паюшина О.В., Цомартова Д.А. Динамика цитологических параметров тимуса крыс при постепенном уменьшении поступления дейтерия в организм № 2, с. 126-130

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

Барановский А.А., Кузнецов А.В. Анализ динамики экосистемы Чёрного моря на основе агентно-ориентированного моделирования № 1, с. 86-92

Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н., Оюн А.М., Колосова Е.М., Чуяшенко Д.Е., Мучкина Е.Я., Сутормин О.С. Биолуминесцентные ферментативные биотесты для экологического мониторинга № 3, с. 221-226

Мишкин И.А., Ахмеров Д.Н., Мишкина А.А., Богданович В.А., Кузнецов А.В. Горизонтальный лов микропланктона устройством последовательной фильтрации «Бобрёнок» № 3, с. 227-233

Пионтковский С.А., Мельник А.В., Климова Т.Н., Георгиева Е.Ю. Характеристики планктонного сообщества крымского шельфа в период прохождения тепловых волн № 1, с. 80-85

Рубцова С.И., Андреева Н.А. Санитарно-микробиологическое состояние поверхностных и питьевых вод и современные методы контроля (обзор) № 4, с. 290-299

Солдатов А.А., Андреев Т.И. Тканевая специфика белкового обмена у двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 № 2, с. 148-153

Чурилова Т.Я., Моисеева Н.А., Скороход Е.Ю., Орлова Т.Ю., Салюк П.А., Головин А.В., Бучельников А.С. Спектры показателей поглощения света пигментами планктонных одноклеточных водорослей класса *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae*, *Raphidophyceae* и цианобактерий № 4, с. 300-304

Шадрин Н.В., Григорьев М.Н., Мутин А.Д., Шапова Е.П., Помазкин В.К., Широкова Ю.А., Ануфриева Е.В. Подледная динамика кислорода и температуры в малом лесном озере (Прибайкальский национальный парк): роль абиотических и биотических факторов № 2, с. 154-160