

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Актуальные вопросы биологической физики и химии

Том 3, № 1
2018

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 3, № 1
2018**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 3, No. 1, 2018**

Севастополь
2018

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, нанобиофизики, экологической биофизики, а также современным проблемам биоорганической, биофизической и медицинской химии. 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.

Издан при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-04-20061).

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

Артюхов В.Г. (Воронеж);
Барановский С.Ф. (Севастополь);
Бержанский В.Н. (Симферополь);
Кожевников В.Н. (Ньюкасл, Великобритания);
Костюков В.В. (Севастополь);
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);
Паркинсон Дж. (Глазго, Великобритания).
Песик Я. (Гданск, Польша);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

Editorial Board

Artyuhov V.G. (Voronezh);
Baranovskiy S.F. (Sevastopol);
Berzhansky V.N. (Simferopol);
Kozhevnikov V.N. (Newcastle, UK);
Kostjukov V.V. (Sevastopol);
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);
Parkinson J. (Glasgow, UK);
Pesic Ya. (Gdansk, Poland);
Soldatov A.A. (Sevastopol);
Hernandez Santiago A.A. (Puebla, Mexico).

Ответственный секретарь

Воронин Д.П. (Севастополь).

Executive Secretary

Voronin D.P. (Sevastopol).

Рекомендован к печати Ученым советом ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет».

СОДЕРЖАНИЕ

Том 3, № 1, 2018

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

Т.А. Яхно, В.Г. Яхно

К вопросу о взаимодействии воды с гидрофильными поверхностями.....9

М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Структурно-функциональные свойства инулиназ в условиях различного микроокружения 19

В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Н.И. Новикова

Особенности влияния «нулевого» и комбинированных магнитных полей на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах 23

Н.К. Кочарли, С.Т. Гумматова

Мсек-замедленная эмиссия света флуоресцентных зондов в клетках дрожжей 30

М.А. Мажорина, Б.С. Мельник

Исследование влияния гибкости основной цепи белка на энергетический профиль апомиоглобина.....34

С.Р. Чырагова, Х.Д. Абдуллаев, Р.И. Агаларов

сравнительный анализ антиокислительной и антирадикальной активности ряда приправ из национальной кухни азербайджана 39

Е.А. Тихонова, А.Н. Бончук, Г.С. Качалова, П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко

Исследование структуры n-концевого димеризующего домена белка clamp методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) 43

К.А. Глухова, В.Г. Кляшторный, Б.С. Мельник

Модификация зеленого флуоресцентного белка для синтеза антимикробных пептидов.....46

О.Н. Сорокина, С.Н. Подойницын, М.А. Климов, И.И. Левин, С.Б. Симакин

Возможности сепарации клеток методом бесконтактного барьерного диэлектрофореза 51

А.Н. Бончук, К.М. Бойко, Г.С. Качалова, П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко

Исследование октамеризующихся втв-доменов группы tramtrack методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) 60

Л.Е. Петровская, Е.А. Крюкова, Е.П. Лукашев, Д.А. ДолгихПротеородопсины *Exiguobacteria* – новые представители семейства ретинальных белков 63

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ**Л.И. Велиева, Р.Э. Алиев**

Сравнительный анализ пространственной структуры молекул Leu-галлатостатина-4, дростатина-3, шистостатина-6 и аллатостатина-4 68

Я.М. Дусаева, В.В. Водопьянов

Исследование нелинейного параболического уравнения с кинетикой типа Моно.....72

Л.А. Краснобаева, Л.В. Якушевич

3D траектории движения кинков в неоднородной кольцевой ДНК..... 82

Л.А. Уварова, Е.Ю. Романова

Использование квантово-химического подхода и концепции «белок-машина» при моделировании активных центров металлосодержащих ферментов 87

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**И.В. Жигачева, И.Ф. Русина, И.П. Генерозова**

3-оксипиридины предотвращают дисфункцию митохондрий, обусловленную воздействием микродоз полициклических ароматических углеводов..... 91

У.Г. Летута, Д.М. ШалинаSensitivity of *E. Coli* cells to low static magnetic fields 98**А.П. Нечипоренко, У.Ю. Нечипоренко, Л.В. Плотникова,****М.И. Мельникова, М.В. Успенская**

Рефрактометрия в исследовании селективности масляных экстрагентов растительного сырья.....105

Л.В. Плотникова, А.П. Нечипоренко, У.Ю. Нечипоренко,**М.И. Мельникова**

Оптические свойства липидов животного и растительного происхождения..... 110

Ю.М. Гармаза, А.В. ТамашевскийМеханизмы развития окислительного стресса при моделировании состояния дефицита ионов цинка в эритроцитах человека *in vitro* 115**О.М. Алексеева, А.В. Кременцова, А.В. Кривандин, О.В. Шаталова, Ю.А. Ким**

Действие биологически активных веществ на экспериментальных моделях предшественников живых объектов.....123

Н.Н. Угарова, Г.Ю. Ломакина

О природе эмиттера в люциферин-люциферазной системе светляков 133

Т.А. Мишарина, В.И. Киселёва

Влияние растительных антиоксидантов на автоокисление каротиноидов паприки 139

Т.А. Мишарина, М.Б. Теренина, Н.И. Крикунова

Определение биологически активных летучих органических соединений твердофазной микроэкстракцией 146

П.Г. Пронкин, Л.А. Шведова, А.С. Татиколов

Катионные мезо-замещенные тиакарбоцианиновые красители в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для ДНК 153

А.С. Татиколов, Л.А. Шведова, П.Г. Пронкин

Изучение взаимодействия катионных и анионных полиметиновых красителей
с солями желчных кислот (холатами) 158

**С.В. Тищенко, О.С. Костарева, А.М. Михайлина, А.А. Лисов,
И.А. Коляденко, А.Г. Габдулхаков**

Исследование доступности T2/T3 центра двухдоменной лакказы из
Streptomyces Griseoflavus AC-993 163

Л.А. Шведова, А.С. Татиколов, П.Г. Пронкин, И.Г. Панова

Мезо-замещенные тиа- и оксакарбоцианиновые красители в качестве
молекулярных зондов на альбумин в биологических системах 168

В.Н. Морозов

Использование бионаноаэрозолей для лечения и диагностики легочных заболеваний 173

**Е.В. Инжеваткин, А.В. Барон, Н.Г. Максимов, М.Б. Волкова, А.П. Пузырь,
Н.О. Ронжин, В.С. Бондарь**

Использование эпр-спектроскопии для выявления наноалмазов в биоматериалах и
изучения их распределения в организме животных после внутривенного введения 183

С.Я. Гусейнова, Т.М. Гусейнов, М.З. Дадашов

Окислительная модификация эритроцитов умеренными дозами нитритом
натрия в опытах *in vitro* 189

А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, С.Н. Бутов, Н.И. Крутецкая, В.Г. Антонов

Аминазин модулирует влияние иммуномодулятора глутоксима на транспорт
Na⁺ в коже лягушки 196

**Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, А.А. Наумова, С.Н. Бутов, Н.И. Крутецкая,
В.Г. Антонов**

2-аминоэтоксидифенил борат модулирует депо-зависимый вход Ca²⁺ в макрофагах 200

**А.С. Скоробогатова, Е.И. Венская, Г.П. Зубрицкая, Л.М. Лукьяненко,
Е.И. Слободжанина**

Влияние ионов алюминия на изменения спектрально-флуоресцентных
характеристик амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима 204

**И.В. Петрова, Ю.Г. Бирулина, О.А. Трубачева, Е.А. Шефер,
Ю.А. Розенбаум, Е.С. Тесля, А.С. Овчинникова**

Механизмы регуляции газомедиаторами ионной проницаемости мембраны эритроцитов 209

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА**Г.А. Даллакян, И.В. Мошарова, И.В. Михеев, Д.С. Волков, М.А. Проскурнин**

Изучение влияния водных дисперсий немодифицированного фуллерена C₆₀
на численность бактериопланктона *in vitro* 214

**А.П. Синицын, И.А. Шашков, А.В. Гусаков, О.А. Синицына, А.М. Рожкова,
И.Н. Зоров, Е.Г. Кондратьева, О.Г. Короткова, Е.А. Рубцова, М.В. Семёнова,
А.Д. Сатрутдинов, Д.О. Осипов, П.В. Волков, А.В. Баширова, А.С. Доценко**

Биоконверсия возобновляемого растительного сырья в полезные продукты –
оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса 219

А.А. Замятнин

Физико-химические и функциональные характеристики полной системы природных
олигопептидов 225

CONTENTS

Volume 3, No. 1, 2018

GENERAL BIOPHYSICS

- T.A. Yakhno, V.G. Yakhno**
On the interaction of water with hydrophilic surfaces 9
- M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov**
Structural and functional properties of inulinases under conditions of different microenvironment 19
- V.V. Novikov, E.V. Yablokova, N.I. Novikova**
Specialities of influence of «zero» and combined magnetic fields on production of reactive oxygen species in neutrophils 23
- N.K. Kocharli, S.T. Hummatova**
Msec- delayed light emission of fluorescent probes in yeast cells 30
- M.A. Majorina, B.S. Melnik**
Studies of the effect of flexibility of the polypeptide chain of protein on the energy profile of apomyoglobin 34
- S.R. Chyragova, Kh.D. Abdullaev, R.I. Agalarov**
Comparative analysis of antioxidating and antiradical activity of a spice raw of the national cuisine of Azerbaijan 39
- E.A. Tikhonova, A.N. Bonchuk, G.S. Kachalova, P.G. Georgiev, O.G. Maksimenko**
Structural studies of n-terminal dimerization domain of clamp protein using small-angle x-ray scattering (SAXS) 43
- K.A. Glukhova, V. G. Kljashtorny, B.S. Melnik**
Modification of green fluorescent protein for synthesis of antimicrobial peptides 46
- O.N. Sorokina, S.N. Podoynitsyn, M.A. Klimov, A.L. Kovarski, I.I. Levin, S.B. Simakin**
Cell separation by barrier contactless dielectrophoresis 51
- A.N. Bonchuk, K.M. Boyko, G.S. Kachalova, P.G. Georgiev, O.G. Maksimenko**
Studies of octameric tramtrack group btb-domains using small-angle x-ray scattering (SAXS) 60
- L.E. Petrovskaya, E.A. Kryukova, E.P. Lukashev, D.A. Dolgikh**
Proteorhodopsins from *Exiguobacteria* – new members of the retinal proteins family 63

MODELLING IN BIOPHYSICS

- L.I. Veliyeva, R.E. Aliyev**
Comparative analysis of the spatial structure of leu-callotostatin-4, drostatin-3, shistostatine-6 and allatostatine-4 molecules 68

Ya.M. Dusaeva, V.V. Vodopyanov

The study of nonlinear parabolic equations with kinetics of the type Mono 72

L.A. Krasnobaeva, L.V. Yakushevich

3D trajectories of the movement of kinks in inhomogeneous circular DNA.....82

L.A. Uvarova, E.Yu. Romanova

The using of the quantum-chemical approach and the conception «protein-machine» for the active centers modeling of the metalcontaining ferments 87

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY**I.V. Zhigacheva, I.F. Rusina, I.P. Generosa**

3-oxypyridines prevent the mitochondrial dysfunction due to the influence of the micro-doses of polycyclic aromatic hydrocarbons 91

U.G. Letuta, D.M. ShailinaSensitivity of *E. coli* cells to low static magnetic fields.....98**A.P. Nechiporenko, U.Yu. Nechiporenko, M.I. Melnikova, L.V. Plotnikova, M.V. Uspenskaya**

Refractometry in the study of selectivity of vegetable extractants 105

L.V. Plotnikova, A.P. Nechiporenko, U.Yu. Nechiporenko, M.I. Melnikova

The optical properties of the lipids of animal and vegetable origin..... 110

Y.M. Harmaza, A.V. TamashevskiMechanisms of the oxidative stress development under zinc ions deficient state modeling in human erythrocytes *in vitro* 115**O.M. Alekseeva, A.V. Kremontsova, A.V. Krivandin, O.V. Shatalova, Yu.A. Kim**

The actions of biological active substances to experimental models of first living objects 123

N.N. Ugarova, G.Yu. Lomakina

On the nature of the emitter in luciferin-luciferase system of fireflies..... 133

T.A. Misharina, V.I. Kiseleva

Effect of plant antioxidants on autooxidation of paprika carotenoids..... 139

T.A. Misharina, M.B. Terenina, N.I. Krikunova

Determination of biologically active volatile organic compounds by solid-phase microextraction..... 146

P.G. Pronkin, L.A. Shvedova, A.S. Tatikolov

Biodegradable nanoparticles based on aliphatic polyester as drug delivery system 153

A.S. Tatikolov, L.A. Shvedova, P.G. Pronkin

Study of the interaction of cationic and anionic polymethine dyes with bile salts (cholates) 158

S.V. Tishchenko, O.S. Kostareva, A.O. Mikhaylina, A.V. Lisov, I.A. Kolyadenko, A.G. GabdulkhakovInvestigations of accessibility of T2/T3 copper centre of two-domain laccase from *Streptomyces Griseoflavus* AC-993..... 163

L.A. Shvedova, A.S. Tatikolov, P.G. Pronkin, I.G. Panova Meso-substituted thia- and oxacarbocyanine dyes as molecular probes for albumin in biological systems	168
V.N. Morozov Use of bionanoaersols in treatment and diagnostics of lung diseases	173
E.V. Inzhevatin, A.V. Baron, N.G. Maksimov, M.B. Volkova, A.P. Puzyr, N.O. Ronzhin, V.S. Bondar Biomaterials and to study their distribution in the body of animals after intravenous injection	183
S.Ya. Huseynova, T.M. Huseynov, M.Z. Dadashov Oxidative modification of erythrocytes moderately doses of sodium nitrite <i>in vitro</i> tests	189
A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, S.N. Butov, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov Aminazine modulates the effect of immunomodulator glutoxim on Na ⁺ transport in frog skin	196
L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, A.A. Naumova, S.N. Butov, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov 2-aminoethoxydiphenyl borate modulates store-dependent Ca ²⁺ entry in macrophages	200
A.S. Skarabahatava, E.I. Venskaya, G.P. Zubritskaya, L.M. Lukyanenko, E.I. Slobozhanina Aluminum ions influence on changes of spectral and fluorescent properties of amyloid fibrils from lysozyme.....	204
I.V. Petrova, Y.G. Birulina, O.A. Trubachova, E.A. Shefer, Y.A. Rozenbaum, E.S. Teslya, A.S. Ovchinnikova Regulation mechanisms of eritrocite membraane ionic penetration by gasomediators	209

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

G.A. Dallakyan, I.V. Mosharova, I.V. Mikheev, D.S. Volkov, M.A. Proskurnin A study of aqueous unmodified fullerene dispersions C ₆₀ influence on the total number of bacterioplankton <i>in vitro</i>	214
I.N. Zorov, E.G. Kondratieva, O.G. Korotkova, E.A. Rubtsova, M.V. Semenova, A.D. Satrutdinov, D.O. Osipov, P.V. Volkov, A.V. Bashirova, A.S. Dotsenko Bioconversion of renewable plant feedstocks into useful products – optimization of cellulases enzyme complex	219
A.A. Zamyatnin Physico-chemical and functional characteristics of complete system of natural oligopeptides	225

К ВОПРОСУ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ВОДЫ С ГИДРОФИЛЬНЫМИ ПОВЕРХНОСТЯМИ

Яхно Т.А., Яхно В.Г.

ФИЦ Институт прикладной физики Российской Академии Наук
ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: yakhta13@gmail.com
Поступила в редакцию: 20.04.2018

Аннотация. Кратко рассмотрена история исследования взаимодействия воды с гидрофильными поверхностями, включая феномен «поливоды». На примере стеклянных предметов, погруженных в воду, прослежено образование «зоны исключения» (EZ), подтверждено снижение концентрации ионов в пристеночном слое и его жидкокристаллическая структура. Показано, что EZ образуется как при освещении, так и в темноте. Рассматриваются молекулярные механизмы формирования и роста EZ, в основе которых лежит физическая адсорбция, обусловленная снижением свободной энергии системы. Присутствие в воде катионов существенно влияет на формирование EZ. Характер влияния определяется размером катиона (плотностью поверхностных зарядов). На основе данных литературы и собственных результатов обсуждается единая природа образования гидратных оболочек вокруг ионов и формирования EZ.

Ключевые слова: вода, гидрофильная поверхность, EZ, физическая адсорбция, гидратация стекла.

История вопроса о взаимодействии воды с гидрофильными поверхностями продолжительна [1], не проста и временами драматична. Достаточно вспомнить открытие и закрытие «поливоды» (воды-II) [2-4]. Вода, полученная советскими учеными при конденсации водяного пара в сверхтонких кварцевых капиллярах, обладала значительно большей вязкостью, плотностью, коэффициентом преломления и поверхностным натяжением, чем обычная. Ее растворяющая способность была меньше. Опыты по получению поливоды были успешно воспроизведены во многих исследовательских лабораториях мира, включая Европу, США и Австралию, широко обсуждались в прессе и на международных форумах [5,6]. Определенный по плотности пара молекулярный вес воды-II превышал данный показатель для обычной воды в 8 - 10 раз, а поглощение в ИК-области характеризовалось двумя пиками, не свойственными больше ни одному из известных веществ [7]. На основании полученных данных было сделано предположение о том, что новое вещество представляет собой полимер, состоящий из молекул воды, объединенных в гексагональные ячейки [7] (рис. 1). По факту образования воды-II из паров обычной воды на поверхности плавленого кварца или стекла Б.В. Дерягин предполагал существование особого рода конденсационного катализа [6]. Однако в пробах поливоды в ряде лабораторий были обнаружены неорганические [8-10] и органические [6] примеси. Кроме того, уникальные полосы поглощения в ИК-спектре, характерные для поливоды (1595 см^{-1} и 1400 см^{-1}), были обнаружены также в образце человеческого пота [11]. Все это, в конечном итоге, послужило поводом для обвинения авторов открытия в недостаточной чистоте эксперимента и поставило под вопрос само существование феномена [12]. Авторы были вынуждены согласиться с критикой [13, 14]. Однако оказалось, что и «примеси», взаимодействуя с окружающей водой, существенно меняют ее свойства на границе раздела фаз. В работе [15] (с. 68) читаем: *«Новым этапом исследований поверхностных явлений стало обнаружение особой структуры слоев полярных жидкостей, пограничных с поверхностью смежной фазы. Под влиянием этой поверхности полярные молекулы ориентируются относительно ее определенным образом, и эта ориентация передается от слоя к слою на некоторое расстояние. Подобное явление впервые наблюдалось в слоях воды, прилегающих к поверхности гидрофильного тела. В этом случае степень ориентации убывает по мере удаления от подложки, делаясь незначительной на расстоянии порядка длины сотен молекул. В результате изменения структуры свойства граничных слоев воды (показатель преломления, плотность, вязкость, растворяющая способность) отличаются от нормальных, характерных для объема воды. Меняется, также, температура замерзания. Именно по этой причине, как нами было показано, в районах вечной мерзлоты слои воды, прилегающие к частицам гидрофильных глин, не замерзают, во всяком случае при температуре не ниже $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ »*. И далее (с. 70): *«По оптическим свойствам граничный слой однороден и анизотропен, подобно жидким кристаллам, и отделен от объемной фазы резкой границей раздела. Таким образом, помимо ранее известных твердых, жидких и газообразных фаз, существуют «граничные фазы» строго определенной толщины, закономерно уменьшающейся с ростом температуры»*.

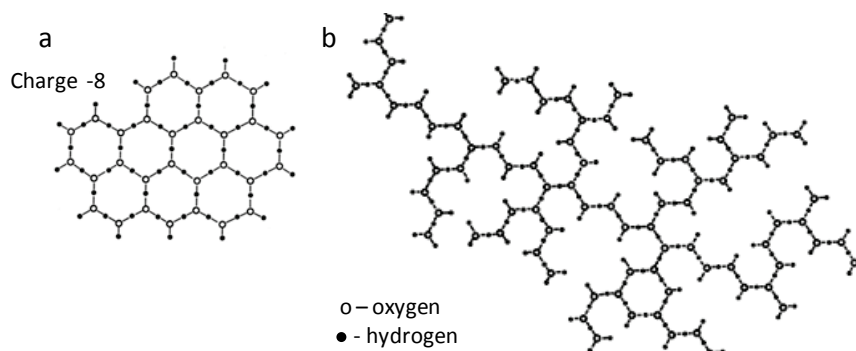


Рисунок 1. Представление авторов [7] о молекулярном строении поливодо: а – анион; б – монослой

В 2013 году вышла в свет уже ставшая знаменитой книга Г. Поллака «Четвертая фаза воды» [16]. Автор не только обобщил имевшуюся к тому времени информацию по проблеме, но значительно продвинул представления о строении и свойствах воды, граничащей с гидрофильными поверхностями. В качестве модельной гидрофильной поверхности чаще всего использовался нафтионовый гель – анионная ионообменная смола, набухающая в воде и приобретающая отрицательный поверхностный заряд. В ряде экспериментов был также использован катионный гель. Была разработана концепция разделения электрических зарядов, подтверждены особые физические свойства граничной зоны, измерен ее потенциал, подтверждена квазикристаллическая структура. Было выявлено важное свойство этой зоны – вытеснять все примесные частицы и ионы от гидрофильной поверхности вглубь объема воды. Благодаря этому свойству зона, прилегающая к гидрофильной поверхности, была названа «зоной исключения» (exclusion zone – EZ). Ширина этой зоны, в зависимости от концентрации и размера вытесняемых частиц, могла составлять до 600 мкм. Была также подтверждена большая вязкость EZ по сравнению с обычной водой. Там же предложена льдоподобная структура EZ, представляющая собой параллельные плоские слои гексагональных ячеек (аналогично рис. 1). Слои, в отличие ото льда, соединяются между собой слабыми электростатическими силами, благодаря небольшому сдвигу относительно друг друга, обеспечивающему сближение зарядов противоположного знака. Рост EZ значительно ускорялся при ИК-облучении воды (3000 нм), тогда как УФ-облучение стимулировало рост EZ значительно слабее. Рост EZ был прямо пропорционален времени облучения. Отключение источника облучения возвращало EZ к нормальному размеру в течение десятков минут. Ранее [17] было показано, что EZ активно поглощает энергию в УФ-области (270 нм) и имеет отрицательный заряд порядка -120 мВ. Добавление в воду хлоридов щелочноземельных металлов в концентрации 150 мМ приводило к разной скорости снижения потенциала у гидрофильной поверхности (к уменьшению ширины EZ) пропорционально положению катионов в ряду Гофмейстера. Однако даже при концентрации соли 0,5 М EZ продолжала существовать. Данные ИК-спектроскопии свидетельствуют об уменьшении эмиссии в области EZ по сравнению со свободной водой. Это говорит о меньшей подвижности молекул в EZ (и о более низкой температуре в этой зоне). Разная степень упорядоченности и динамического поведения молекул воды возле гидрофильной поверхности и за ее границами была выявлена также с помощью ЯМР-спектроскопии [18]. Интересная гипотеза о возникновении самопроизвольного тока воды, стимулированного УФ-облучением, через нафтионовый капилляр, погруженный в воду, изложена в работе [19]. Используя поглощение на 270 нм как «метку», указывающую на присутствие EZ, авторы [20] обнаружили ее в кювете с тающим льдом и пришли к выводу, что превращение льда в воду и обратно происходит через образование промежуточной квазикристаллической фазы в виде EZ.

Группа исследователей, изучающих изменение структуры воды при контакте с нафтионом [21, 22], предложила свой взгляд на феномен. По мнению авторов, EZ может быть представлена как структурированная фаза типа фотонного кристалла, в которой от поверхности нафтиона отходят продолговатые полимерные цепочки R-SO_3^- групп, несущие отрицательный заряд. Пространство между этими параллельными цепочками шириной ~ 130 нм заполнено рядами диполей воды, электростатически удерживаемых на поверхности цепочек. Этот факт позволяет объяснить повышение плотности и коэффициента преломления структурированной воды по сравнению со свободной. Кроме молекул воды, в пространстве между цепочками находятся продукты локальной электролитической диссоциации H_2SO_3 : HSO_3^- и H_3O^+ . Содержание данных ионов в структурированной фазе было в 6 раз выше, чем в окружающей воде. Несмотря на градиент концентраций, диффузии частиц не происходило, и система демонстрировала достаточную стабильность. Концентрацию HSO_3^- предложено использовать в качестве показателя для определения границ EZ у поверхности нафтиона. В работе [23] в структурированной у поверхности нафтиона (EZ) и в окружающей воде авторы наблюдали автоколебания хемилюминесценции после облучения лазером с длиной волны 1264 нм. Облучение запускало цепь реакций образования активных форм кислорода. Было показано, что у поверхности нафтиона колебания начинались позже и световая эмиссия (380-520 нм) была ниже, чем в свободной воде. Авторы объясняют экспериментальные факты «сгоранием» кислорода в EZ за счет реакции окисления HSO_3^- до HSO_4^- .

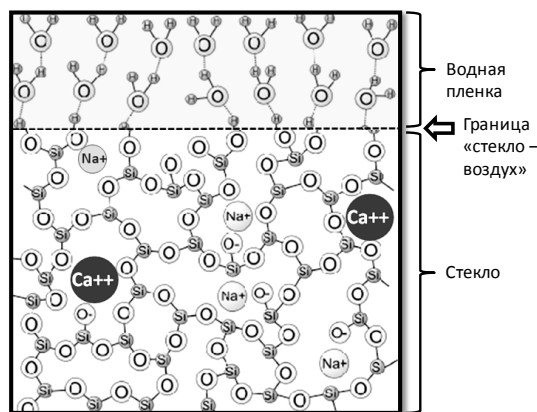


Рисунок 2. Схематическое строение стекла на границе с воздухом [27]

Кроме того, экспериментальные результаты указывают на проявление своеобразного ионного эффекта, влияющего на параметры эмиссии при взаимодействии катионов K^+ и Na^+ с мембраной нафiona [24]. В результате предложено при использовании понятия «EZ» возле поверхности нафiona подразумевать дисперсию частиц нафiona в данной области [25]. Однако не все исследователи готовы разделить это мнение. Применяв квантово-механический подход к анализу молекулярной структуры EZ в виде пластин гексагональных ячеек, авторы работы [26] теоретически нашли минимально модифицированные 3D-конструкции, позволяющие реализовать ряд основополагающих свойств EZ. При этом отрицательный потенциал определяется наличием гидроксильных анионов; реализуется максимум поглощения на длине волны 270 nm и полоса флюоресценции с максимумом 441 nm, что соответствует экспериментальным данным. Полученная молекулярная конфигурация отвечает также требованию «вытеснения» из своей зоны ионов и коллоидных частиц.

Представленный краткий обзор свидетельствует, с одной стороны, о неугасающем интересе исследователей к проблеме формирования и структуры пристеночного слоя (EZ) у гидрофильных поверхностей, с другой – о существенных разногласиях в представлениях, как о молекулярном строении, так и об энергозависимости процесса. Поскольку в большинстве известных работ в качестве субстрата используется нафion, мы решили провести ряд несложных экспериментов со стеклом. В доступной литературе нам не удалось найти регулярных исследований образования EZ у поверхности стекла.

Силикатное стекло схематически можно представить как трехмерную сетку, образованную цепочками из чередующихся атомов кислорода и кремния. Каждый атом кремния связан с четырьмя атомами кислорода. Двумерный «срез» такой сетки представлен на рисунке 2.

В петлях сетки располагаются, в основном, катионы Ca^{++} и Na^+ . Заряд катионов компенсируется ионами кислорода. В реальных условиях поверхность стекла на границе с воздухом всегда покрыта пленкой воды, толщина которой зависит от температуры и влажности. Для удаления пленки требуется нагреть стекло выше 200 °C [27]. Со временем часть воды диффундирует внутрь стекла, образуя «корку гидратации». Содержание воды в стекле составляет 0,2-3,5 % по массе. На этом факте основана возможность датирования стеклянных предметов, в частности, при археологических раскопках [28]. Стекло на границе раздела с водой заряжено отрицательно, поскольку его главный компонент Na_2SiO_3 отщепляет ионы Na^+ , переходящие в жидкую фазу [29].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали стеклянные стаканы (100 мл), стеклянные капилляры $d = 1$ мм (10 мкл Drummond Microdispenser, USA), стеклянные бусы $d = 3$ мм (ApexLab, Россия) и стеклянные шарики $d = 350-700$ мкм; предметные и покровные стекла производства ApexLab (Russia), размерами (25,4 x 72,2 x 1 мм) и (24 x 24 x 0,6 мм), соответственно, чашки Петри $d = 35$ мм (полистирол, стерильные, МиниМед, Россия). Всю стеклянную и пластмассовую посуду использовали новую, без дополнительной обработки, кроме стеклянных бус, которые отмывали перед использованием в 3-х сменах дистиллированной воды. Электропроводность дистиллированной воды составляла 5-7 мкСм/см. Для приготовления растворов использовали соли LiCl, NaCl и KCl марки «хч» («Реактив», Россия). Для выявления EZ добавляли в воду концентрированную суспензию мелкодисперсного латекса ($d = 1$ мкм) в концентрации 2 мкл/мл. Все эксперименты проводили в условиях лаборатории: $T = 19-21$ °C, $H = 67-79$ %. Использовали оптические микроскопы МБС-10, Люмам И-3 и Levenhuk с цифровой видеокамерой Levenhuk C-Series, сопряженной с компьютером (ToupView Program). Сравнительный анализ концентрации соли в солевом растворе возле стенок посуды и вдали от них осуществляли с помощью акустической импедансометрии, используя разработанный ранее метод [31, 32].

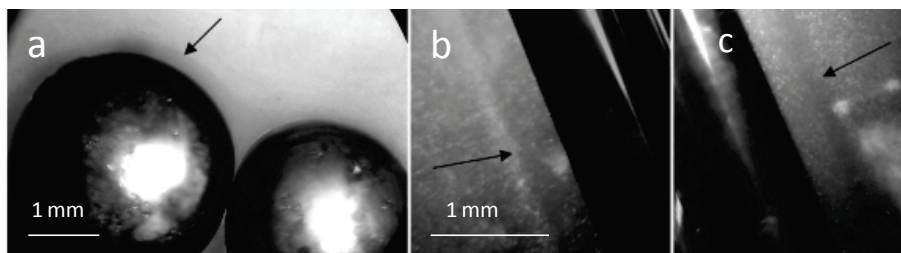


Рисунок 3. Образование EZ вокруг стеклянных предметов, погруженных в воду: а – шаров, b, c – капилляров (микроскоп МБС-10)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выявление EZ с помощью оптической микроскопии.

В чашку Петри помещали несколько стеклянных шаров и добавляли дистиллированную воду так, чтобы уровень воды не превышал половину их диаметра. Для выявления EZ добавляли концентрированную суспензию мелкодисперсного латекса (2 мкл/мл).

За короткое время (15-20 минут) суспензия отступала от шаров, образуя прозрачную зону. То же происходило и с капиллярами (рис. 3).

В следующем эксперименте маленькие стеклянные шарики помещали на предметное стекло, добавляли каплю дистиллированной воды, замутненной латексом, накрывали покровным стеклом и наблюдали в поляризованном свете через микроскоп «Люам И-3». Результаты наблюдений показаны на рисунке 4.

Результаты экспериментов подтверждают факт образования EZ вокруг стеклянных предметов, погруженных в воду. Единичное упоминание об этом факте мы нашли в работе [17]. Выяснение роли освещения в образовании EZ.

Следующий эксперимент был направлен на выяснение роли освещения в образовании EZ. Для этого один и тот же стеклянный капилляр был аккуратно разломлен пополам (исключая касание руками), и каждая его часть погружена в отдельную пластмассовую чашку Петри с дистиллированной водой, замутненной суспензией латекса. Верхний уровень воды слегка превышал высоту капилляра, лежащего на дне. Одна чашка оставалась стоять при дневном освещении, другую помещали под микроскоп, защищенный от света непроницаемым чехлом. Через 2,5 часа инкубации пробы исследовали под микроскопом (рис. 5).

Картина, показанная на рисунке 5, повторялась при каждой постановке эксперимента: отсутствие света не препятствовало росту EZ вокруг стеклянных поверхностей.

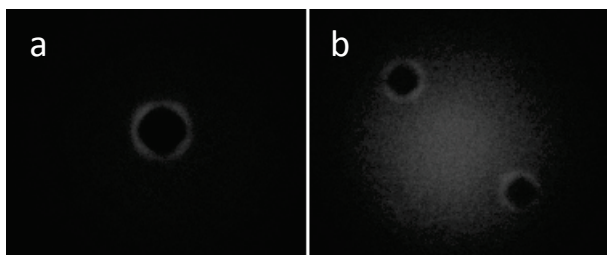


Рисунок 4. Стеклянные шарики в воде между предметным и покровным стеклами в поляризованном свете (a, b). Светящаяся зона свидетельствует о двойном лучепреломлении (ув. x 70)

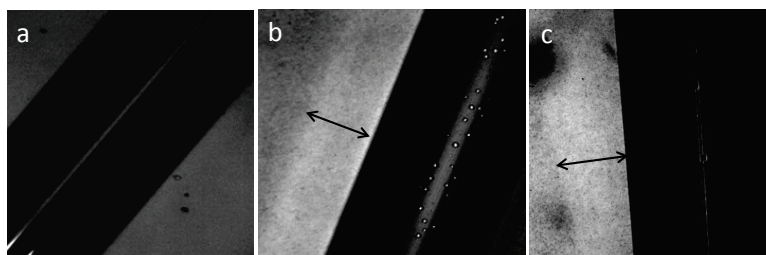


Рисунок 5. Образование EZ вокруг стеклянных капилляров, погруженных в воду в начальный момент эксперимента (a) и через 2,5 часа после инкубации проб в разных условиях: b – в темноте, c – при дневном освещении. Ширина капилляра 1mm

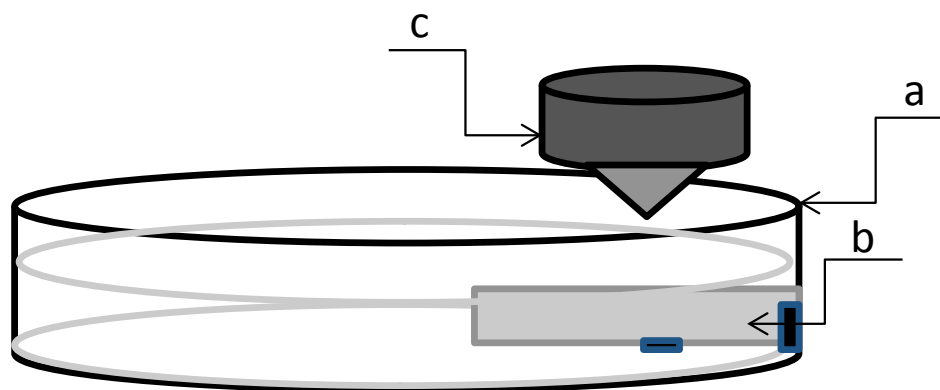


Рисунок 6. Экспериментальная кювета: а- чашка Петри, заполненная водой; b – стекло, закрепленное в кювете вертикально (верхняя кромка – на границе жидкости с воздухом); с – объектив микроскопа

2. Выяснение роли катионов в образовании EZ.

Следующая серия экспериментов имела целью сравнить рост EZ в растворах разных солей. Для этого были приготовлены 1 % водные растворы LiCl, NaCl и KCl. Экспериментальная кювета представляла собой чашку Петри с закрепленным в ней вертикально куском стандартного покровного стекла (рис. 6). Кювета заполнялась дистиллированной водой или солевым раствором. При этом стекло использовалось однократно, а чашка Петри тщательно промывалась дистиллированной водой перед каждым использованием. В каждом эксперименте время инкубации стекол составляло 4 часа.

В соответствии с полученными результатами (рис. 7), выраженность EZ уменьшалась в следующем порядке: раствор LiCl, дистиллированная вода, раствор NaCl. В растворе KCl EZ выявить не удалось.

Результаты не противоречат полученным в работе [24] данным о зависимости интенсивности фотолюминесценции EZ у поверхности нафiona на длине волны 508 nm от концентрации и типа катионов, присутствующих в окружающей жидкости (K^+ или Na^+). Существенную роль при этом, по мнению авторов, играет разница в плотности поверхностных зарядов на данных катионах – их расположение в ряду Гофмейстера, что определяет заряд полимерных нитей и дисперсных частиц нафiona. Если придерживаться факта, что в нашем эксперименте, кроме стекла, воды и соли, ничего нет (в отличие от нафiona, помещенного в воду [25]), то логике результатов не противоречит следующее предположение. В силу отрицательного заряда поверхности стекла, катионы, прежде всего, взаимодействуют с ней в соответствии с рядом Гофмейстера: $Li^+ > Na^+ > K^+$. Кроме того, Li^+ формирует вокруг себя плотную оболочку из диполей воды (космотроп), а K^+ (хаотроп) ослабляет силу естественных связей молекул воды между собой. Na^+ занимает промежуточное положение (слабый космотроп). Расчетные величины чисел гидратации при 25 °C составляют: для LiCl – 7,1, для NaCl – 3,5, и для KCl – 1,9 [30]. То есть, скопление у поверхности стекла ионов K^+ разрушает структуру воды, препятствуя образованию EZ, в то время как ионы Li^+ – наоборот, способствуют ее укреплению.

3. Измерение концентрации ионов в растворе у стеклянной поверхности и в объеме.

В следующей серии экспериментов была поставлена задача - оценить концентрацию солевого раствора в разных местах стакана: в пристеночном слое и в центре. Использовали два стакана одинаковой формы и объема – один из стекла, другой - из пластика. В качестве базового солевого раствора служил 3 % водный раствор NaCl. Растворы выдерживали в стаканах не менее часа, после чего производили отбор проб сухим шприцем (рис. 8).

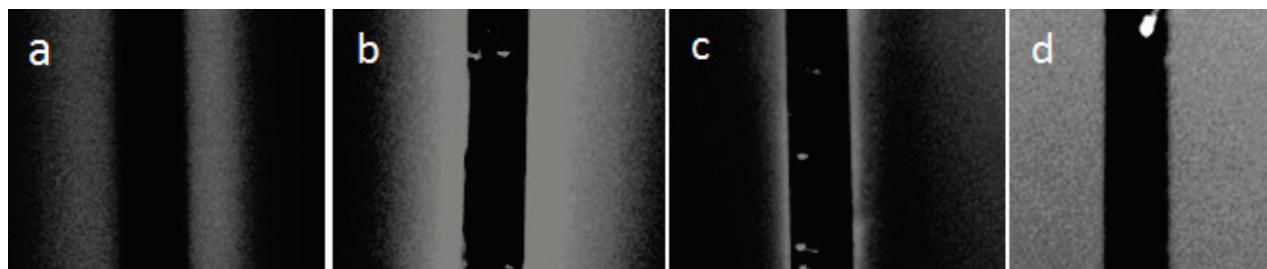


Рисунок 7. Величина EZ после 4х часовой инкубации стекол: а – в дистиллированной воде, b – в 1 % растворе LiCl, c – в 1 % растворе NaCl; d – в 1 % растворе KCl. Толщина стекла – 0,16 mm

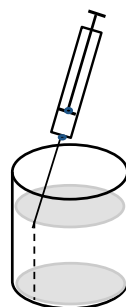


Рисунок 8. Отбор проб раствора из пристеночного слоя жидкости с помощью шприца. Пунктиром отмечен путь кончика иглы по стенке стакана во время аспирации. Пробу сравнения брали из объема жидкости ближе к центру стакана

Для анализа взятых проб использовали лабораторную установку, описанную ранее [31, 32]. Суть метода состоит в высушивании капель одинакового объема на поверхности кварцевого резонатора и отображении процесса фазовых переходов в них в виде «кривых высыхания» с помощью акустической импедансометрии (рис. 9).

Пробы, взятые возле стенки и в объеме раствора из стеклянного стакана (рис. 9а), разнокачественны. После испарения воды на кварцевой пластине остаются только кристаллы соли. Высота кривых пропорциональна массе осадка. Очевидно, что в пристеночном слое концентрация соли меньше (разница по массе сухого остатка составляет 26 %). Этот феномен не наблюдается в пластиковом стакане (рис. 9б). Суммарные данные по трем экспериментам представлены на диаграмме (рис. 10).

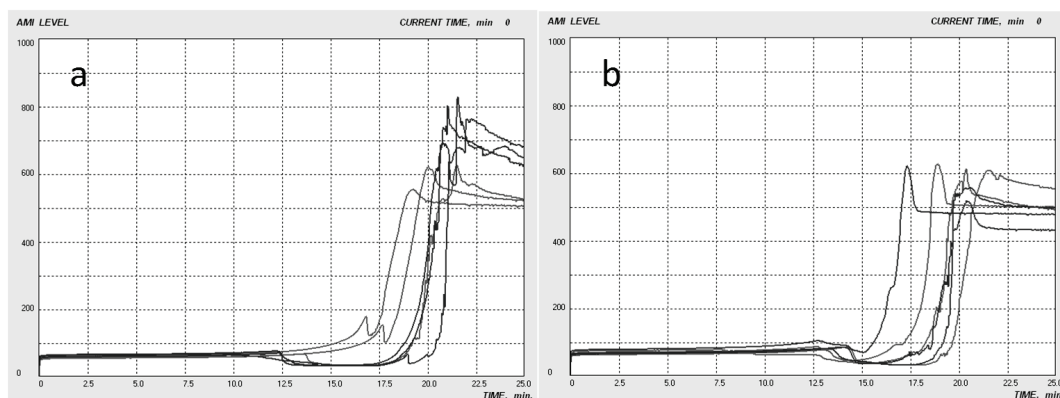


Рисунок 9. Интерфейс программы с экспериментальными данными. Каждая кривая отображает динамику акустомеханического импеданса (АМИ, у.е.) от времени (мин) при высыхании капли 3 %в раствора NaCl объемом 3 μ l: а – проб, взятых из стеклянного стакана, б – проб, взятых из пластикового стакана. Светло-серый цвет соответствует пробам из пристеночного слоя, темно - серый – из объема раствора

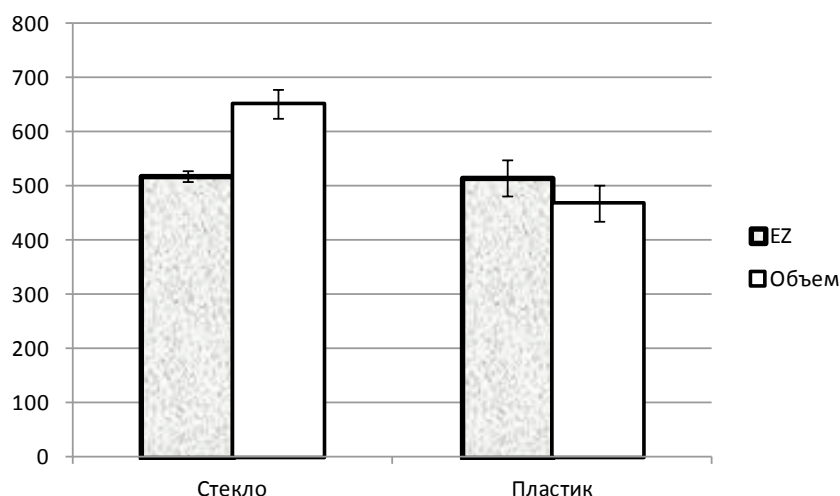


Рисунок 10. Значения АМИ (у.е.) после испарения свободной воды из капель 3 %в раствора NaCl объемом 3 μ l из разных зон стеклянного и пластикового стаканов. Высота пропорциональна массе сухого остатка

Проведенные эксперименты приводят к следующим заключениям:

1. У поверхности стеклянного предмета (как плоского, так и округлого) при погружении в дистиллированную воду, образуется EZ. Ширина ее может достигать 500 мкм.
2. Из зоны вытесняются как коллоидные частицы, так и ионы.
3. Рост EZ происходит с равным успехом, как при дневном освещении, так и в темноте.
4. Присутствие в воде катионов существенно влияет на формирование EZ. Характер влияния определяется размером катиона (плотностью поверхностных зарядов).

Рассмотрим с этих позиций ряд экспериментальных фактов, представленных в литературе. В работе [33] рассматривается теоретически существующая связь между коэффициентом оптического преломления среды и ее электрической чувствительностью. Поскольку коэффициент преломления в EZ выше, чем в обычной воде, ее электрочувствительность (выражаемая через диэлектрическую проницаемость) также выше. Этот показатель предлагается использовать как индикатор степени структурирования воды в биологических объектах. Экспериментально установлено, что в водных растворах солей в процессе их хранения в закрытых сосудах (дни, до года) существенно возрастает электропроводность [34]. Более того, прослеживается прямая связь между площадью контакта воды со стенками сосуда и скоростью возрастания электропроводности. Электропроводность возрастала в равной степени, как при хранении сосуда на свету, так и в темноте. При хранении растворов в замороженном виде их электропроводность не менялась. Описано также явление аутоитксотропии, спонтанно возникающее при долгом хранении водных растворов [34, 35]. Этот феномен авторы объясняют формированием крупных водных кластеров, в котором важная роль принадлежит ионам, поскольку в деионизированной воде тиксотропия не наблюдалась. Казалось бы, все перечисленные эффекты укладываются в представление о сокращении объема свободной воды из-за роста EZ и связанного с этим повышения концентрации носителей заряда в ней. Вероятность такого сценария подтверждают результаты работ [36, 37], в которых проводится анализ данных по молекулярной сжимаемости водных растворов электролитов. Раствор рассматривается как совокупность гидратных комплексов растворенного вещества и свободного растворителя, плотность и сжимаемость которых существенно различаются. Показано, что концентрационная зависимость коэффициента активности растворителя имеет вид разрывной функции, причем, точка разрыва соответствует границе полной сольватации ионов. Предлагается корректировать концентрации компонентов раствора с учетом перехода части свободной воды в гидратные оболочки. В соответствии с этим, факт повышения электропроводности в долго хранившейся воде не вызывает удивления, а явление тиксотропии, по-видимому, может быть обусловлено приближением системы к границе полной сольватации. Но авторы [34, 35] придерживаются другого мнения – повышение электропроводности происходит за счет активизации механизма протонного транспорта вдоль цепочек водородных связей в воде через «прыжок» или туннелирование протона от одной водной молекулы к другой (механизм Гроттуса [38]). В качестве аргумента приводятся эксперименты со сверхвысокими разведениями солевых растворов, сопровождающимися периодическим энергичным встряхиванием пробирок - «закачиванием кинетической энергии» для запуска данного механизма. Кластеризация водных молекул, по мнению авторов, способствует процессу транспорта протонов описанным способом.

Сольватация ионов, как известно [39], процесс самопроизвольный и экзотермический. Требуется ли энергетических затрат образование EZ у гидрофильной поверхности? Физическая адсорбция возникает за счет свободной энергии поверхности, обусловленной неуравновешенностью частиц, образующих поверхностный слой [40]. Притягивая к себе частицы из другой фазы, частицы поверхностного слоя уменьшают свою неуравновешенность, устанавливая связь с адсорбированными частицами и выделяя при этом энергию. Процессы, сопровождающиеся снижением свободной энергии системы, как известно, протекают самопроизвольно. Как следует из работы [41], энергия электростатической адсорбции молекул воды к поверхности кристалла NaCl(001) при образовании монослоя сравнима по величине с энергией водородной связи. Электростатическое поле поверхности кристалла убывает с увеличением расстояния экспоненциально; для образования второго и последующих слоев энергия поверхности ничтожно мала, поэтому молекулы второго и последующих слоев удерживаются благодаря взаимодействию с подлежащими слоями. Суммарная энергия связи молекул воды с поверхностью кристалла NaCl(001) авторами работы [42] определена в $-40 \text{ кДж} \cdot \text{М}^{-1}$; энтальпия конденсации воды в объеме при 25°C – $-44 \text{ кДж} \cdot \text{М}^{-1}$. Так что при комнатной температуре энергия кластерообразования в воде и энергия адсорбции воды к поверхности NaCl(001) оказались сопоставимыми. По данным работы [43], на основе расчета термодинамических параметров, молекулы воды на поверхности NaCl(001) имеют более сильные связи с поверхностью и более четкую структуру по сравнению со свободной водой.

Еще в 1918 году было определено [44] число молекулярных слоев воды, адсорбированной к поверхности стекла и слюды. Для покровного стекла это число составляло порядка четырех, для слюды – два. Адсорбция воды поверхностью слюды – экзотермический процесс. В начале адсорбции молекулы воды на поверхности образуют неупорядоченные островки и имеют большую энтропию, чем в водной среде, но, по мере заполнения

«пустот» на поверхности, энтропия снижается, и степень упорядоченности молекул становится больше, чем в жидкой фазе. В настоящее время можно считать установленным, что первый слой водных молекул на гидрофильной поверхности имеет льдоподобное строение [41]. Этот факт подтвержден неоднократно с помощью разных методов исследования; образование льдоподобной пленки происходит даже при комнатной температуре [45-49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов, анализа литературы и размышлений о физической сущности явления приводят к следующему заключению. На гидрофильной поверхности в силу физической адсорбции при комнатных условиях уже существуют молекулярные слои воды. Из них первый, прилегающий непосредственно к поверхности, имеет гексагональное льдоподобное строение и служит матрицей для организации последующих слоев. При погружении данной поверхности в воду при постоянстве температуры и давления слои начинают нарастать, следуя этой структуре. Процесс при этом сопровождается снижением свободной энергии системы, поэтому происходит самопроизвольно, не требуя притока внешней энергии. Квази-кристаллическая структура EZ обладает двойным лучепреломлением. Трудно ожидать, что эта жидкокристаллическая структура будет иметь точно такую же потенцию к хемилюминесценции, что и свободная вода [23]. Большой латентный период и меньшая интенсивность эмиссии, по-видимому, может объясняться структурной упорядоченностью приповерхностной воды. Повышение электропроводности воды при хранении является следствием вытеснения носителей заряда из объема, занимаемого пристеночным слоем, в снижающийся объем свободной воды. В процессе также участвуют коллоидные частицы и ионы. Влияние последних неоднозначно в зависимости от их положения в ряду Гофмейстера (анионы также следует учитывать как дополнительные объекты гидратации). Обратимый переход свободной воды в связанную объясняет тиксотропные свойства воды. В книге [16, с. 174] приводится следующий интересный факт: «Если заполнить стакан водой до краев, а затем добавить соль до образования «горки» на дне, стакан не переполнится. Добавленный объем как бы исчезает». Однако этот факт легко может быть объясним, если принять во внимание фазовый переход воды при формировании гидратных оболочек вокруг микрокристаллов и ионов соли. Более плотная упаковка молекул воды при этом приводит к снижению ее объема. Таким образом, пристеночная «поливода» и структурированная вода гидратных оболочек принципиально могут представлять одну и ту же субстанцию [10]. Невольно вспоминаются «Начала» Исаака Ньютона [50]: «Не должно принимать в природе иных причин сверх тех, которые истинны и достаточны для объяснения явлений... природа ничего не делает напрасно, а было бы напрасным совершать многим то, что может быть сделано меньшим. Природа проста и не роскошествует излишними причинами вещей». С интересом будем ждать новых экспериментальных фактов и мнений.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИПФ РАН (проект № 0035-2014-0008).

Список литературы / References:

1. Henniker J.C. The depth of the surface zone of a liquid. *Rev. Mod. Phys.*, 1949, vol. 21, iss. 2, pp. 322-341.
2. Дерягин Б.В., Чураев Н.В., Федякин Н.Н., Талаев М.В., Ершова И.Г. Модифицированное состояние воды и других жидкостей. *Изв. АН СССР, серия химич.*, 1967, № 10, с. 2178. [Derjagin B.V., Churaev N.V., Fedyakin N.N., Talaev M.V., Ershova I.G. Modified state of water and other liquids. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, seriya khimicheskaya*, 1967, no. 10, p. 2178. (In Russ.)]
3. Gould S.J. *The Mismeasure of Man*. Norton, 1996, 448 p.
4. Franks F. *Polywater*. Cambridge, MA: The MIT Press, 1982, 208 p.
5. Дерягин Б.В. Новые данные о сверхплотной воде. *Успехи физических наук*, 1970, т. 100, № 4, сс. 726-728. [Derjagin B.V. New data on superdense water. *Uspehi fizicheskikh nauk*, 1970, vol. 100, iss. 4, pp. 726-728. (In Russ.)]
6. Дерягин Б. Аномальная вода - гипотезы и факты, URL: o8ode.ru/article/water/udivit/anomalwater.htm, 11.03.2007. [Derjagin B. Abnormal water - hypotheses and facts, URL: o8ode.ru/article/water/udivit/anomalwater.htm, 11.03.2007 (In Russ.)]
7. Lippincott E.R., Stromberg R.R., Grant W.H., Cessac G.L. Polywater. *Science*, 1969, vol. 164, pp. 1482-1487.
8. Rousseau D.L., Porto S.P.S. Polywater: polymer or artifact? *Science*, 1970, vol. 167, pp. 1715-1719.
9. Davis R.E., Rousseau D.L., Board R.D. "Polywater": Evidence from electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA) of a complex salt mixture. *Science*, 1971, vol. 171, pp. 167-170.
10. Kurtin S.L., Mead C.A., Mueller W.A., Kurtin B.C., Wolf E.D. "Polywater": a hydrosol? *Science*, 1970, vol. 167, pp. 1720-1722.

11. Rousseau D.L. "Polywater" and sweat: similarities between the infrared spectra. *Science*, 1971, vol. 171, pp. 170-172.
12. Гинзбург В.Л. Какие проблемы физики и астрофизики представляются сейчас особенно важными и интересными? *УФН*, 1971, т. 103, № 87, с. 93-94. [Ginzburg V.L. What problems of physics and astrophysics seem to be especially important and interesting? *Uspehi fizicheskikh nauk*, 1971, vol. 103, no. 87, pp. 93-94. (In Russ.)]
13. Derjaguin B.V., Churaev N.V. Nature of "Anomalous Water". *Nature*, 1973, vol. 244, pp. 430-431.
14. Derjaguin B.V., Sorin Z.V., Rabinovich Ya.I., Churaev N.V. Results of analytical investigation of the composition of "anomalous" water. *Journal of colloid and Interface science*, 1974, vol. 46, iss. 3, pp. 437-441.
15. Дерягин Б.В. Мир коллоидно-поверхностных явлений. *Вестник АН СССР. Рубрика «Из рабочей тетради исследователя»*, 1990, № 9, с. 68-75. [Derjagin B.V. The world of colloid-superficial phenomena. *Vestnik Akademii Nauk SSSR. The heading "From the notebook of the researcher"*, 1990, no. 9, pp. 68-75. (In Russ.)]
16. Pollack G. *The fourth phase of water: beyond solid, liquid, and vapor*. Ebner and Sons Publishers, 2013, 320 p.
17. Zheng J., Chin W.-C., Khijniak E., Khijniak E. Jr., Pollack G. Surfaces and interfacial water: evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. *ACIS*, 2006, vol. 127, pp. 19-27.
18. Yoo H., Paranj R., Pollack G. Impact of hydrophilic surfaces on interfacial water dynamics probed with NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2011, vol. 2, iss. 6, pp. 532-536.
19. Rohani M., Pollack G. Flow through horizontal tubes submerged in water in the absence of a pressure gradient: mechanistic considerations. *Langmuir*, 2013, vol. 29, pp. 6556-6561.
20. So E., Stahlberg R. & Pollack G. H. Exclusion zone as intermediate between ice and water. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 2011, vol. 153, p. 9.
21. Bunkin N.F., Ignatiev P.S., Kozlov V.A., Shkirin A.V., Zakharov S.D., Zinchenko A.A. Study of the phase states of water close to nafion interface. *Water*, 2013, vol. 1, DOI: 10.14294.
22. Bunkin N.F., Gorelik V.S., Kozlov V.A., Shkirin A.V., Suyazov N.V. Colloidal Crystal Formation at the "Nafion-Water" Interface. *J. Phys. Chem. B*, 2014, vol. 118, iss.12, pp. 3372-3377, DOI: 10.1021/jp4100729.
23. Gudkov S.V., Astashev M.E., Bruskov V.I., Kozlov V.A., Zakharov S.D., Bunkin N.F. Self-oscillating water chemiluminescence modes and reactive oxygen species generation induced by laser irradiation; effect of the exclusion zone created by nafion. *Entropy*, 2014, vol. 16, pp. 6166-6185, DOI: 10.3390/e16116166.
24. Bunkin N.F., Kozlov V.A., Aliev I.N., Molchanov I.I., Abdullaev S.A., Belosludtsev K.N., Astashev M.E., Gudkov S.V. Investigation of the phase states of aqueous salt solutions near a polymer membrane surface. *Physics of Wave Phenomena*, 2015, Vol. 23, iss. 4, pp. 255-264.
25. Astashev M.E., Gudkov S.V., Le Chevalier L., Kozlov V.A., Tuan V.M., Molchanov I.I., Bunkin N.F. Non-invasive laser diagnostics of swelling nafion in water and aqueous solutions of salts. *Water conference, 2016*.
26. Segarra-Martí J., Roca-Sanjuán D., Merchán M. Can the hexagonal ice-like model render the spectroscopic fingerprints of structured water? Feedback from quantum-chemical computations. *Entropy*, 2014, vol. 16, pp. 4101-4120, DOI: 10.3390/e16074101.
27. URL: vegasd.ru/whats_glass_surface.
28. Вагнер Г.А. *Научные методы датирования в геологии, археологии и истории*. М.: Техносфера, 2006, 575 с. [Wagner G.A. *Scientific methods of dating in geology, archeology and history*. М.: Technosfera, 2006, 575 p. (In Russ.)]
29. Марченко Р.Т. *Физическая и коллоидная химия*. М.: Высшая школа, 1965, 374 с. [Marchenko R.T. *Physical and colloid chemistry*. М.: Visshaya Shkola, 1965, 374 p. (In Russ.)]
30. Робинсон Р., Стокс Р. *Растворы электролитов*. Москва: ИЛ, 1963, 643 с. [Robinson R., Stokes R. *Solutions of electrolytes*. М.: Inostrannaya Literatura, 1963, 643 p. (In Russ.)]
31. Yakhno T.A., Sanin A.G., Vacca C.V., Falcione F., Sanina O.A., Kazakov V.V., Yakhno V.G. A new technology for studying multicomponent liquids using a quartz crystal resonator: theory and applications. *Technical Physics*, 2009, vol. 54, iss. 10, pp. 1423-1430.
32. Yakhno T.A., Sanin A.G., Sanina O.A., Yakhno V.G. Dynamics of mechanical properties of drying drops of biological liquids as a reflection of the features of self-organization of their components from nano- to microlevel. *Biophysics*, 2011, vol. 56, iss. 6, pp. 1005-1010.
33. Tychinsky V. High electric susceptibility is the signature of structured water in water-containing objects. *Water*, 2011, DOI: 10.14294/Water.2011.8.
34. Verdel N., Jerman I., Krasovec P. Conductivity measurements as a possible means to measure the degree of water ordering. *Journal of Physics: Conference Series*, 2011, vol. 329, pp. 1-8.
35. Verdel N., Jerman I., Bukovec P. The "autothixotropic" phenomenon of water and its role in proton transfer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, pp. 7481-7494, DOI: 10.3390/ijms 12117481.

36. Афанасьев В.Н., Зайцев А.А. Особенности структурного состояния растворителя в растворах электролитов. *Журнал структурной химии*, 2006, т. 47, с. 94-101. [Afanasyev V.N., Zaitsev A.A. Features of the structural state of the solvent in electrolyte solutions. *Zhurnal Strukturnoi Himii*, 2006, vol. 47, pp. 94-101. (In Russ.)]
37. Афанасьев В.Н. Количественная оценка разрывной функции растворителя в водных растворах электролитов. *Журнал структурной химии*, 2013, т. 54, № 1, с. 82-94. [Afanasyev V.N. Quantitative evaluation of the discontinuous function of a solvent in aqueous solutions of electrolytes. *Zhurnal Strukturnoi Himii*, 2013, vol. 54, no. 1, pp. 82-94. (In Russ.)]
38. Agmon N. The Grotthuss mechanism. *Chem. Phys. Lett.*, 1995, vol. 244, iss. 5, pp. 456-462.
39. Карапетьянц М.Х., Дракин С.И. *Общая и неорганическая химия*. М.: Химия, 2000, 591 с. [Karapetyants M.Kh., Drakin S.I. *General and inorganic chemistry*. M.: Khimiya, 2000, 591 p. (In Russ.)]
40. Фролов В.В. *Химия*. М: Высшая школа, 1986, 544 с. [Frolov V.V. *Chemistry*. M: Visshaya Shkola, 1986, 544 p. (In Russ.)]
41. Ewing G.E. Ambient thin film water on insulator surfaces. *Chem. Rev.*, 2006, vol. 106, pp. 1511-1526.
42. Engkyist O., Stone A.J. Adsorption of water on NaCl(001). I. Intermolecular potentials and low temperature structures. *The Journal of Chemical Physics*, 1999, vol. 110, p. 12089, DOI: 10.1063/1.479144.
43. Foster M., Ewing G.E. Adsorption of water on the NaCl(001) surface. II. An infrared study at ambient temperatures. *The Journal of Chemical Physics*, 2000, vol. 112, p. 6817, DOI: 10.1063/1.481256.
44. Langmuir I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, 1918, vol. 40, iss. 9, pp. 1361-1403, DOI: 10.1021/ja02242a004.
45. Spagnoly C., Loos K., Ulman A., Cowman M. K. Imaging structured water and bound polysaccharide on mica surface at ambient temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, iss. 23, pp. 7124-7128.
46. Aarts I.M.P., Pipino A.C.R., Hoefnagels J.P.M., Kessels W.M.M., van de Sanden M.C.M. Quasi-ice monolayer on atomically smooth amorphous SiO₂ at room temperature observed with a high-finesse optical resonator. *Phys. Rev. Lett.*, 2005, vol. 95, p. 166104.
47. Asay D.B., Kim S.H. Evolution of the adsorbed water layer structure on silicon oxide at room temperature. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, pp. 16760-16763.
48. Teschke O. Imaging ice-like structures formed on HOPG at room temperature. *Langmuir*, 2010, vol. 26, iss. 22, pp. 16986-16990.
49. Wang Ya, Duan Zh., Fan D. An ion diffusion method for visualizing a solid-like water nanofilm. *Scientific Reports*, 2013, vol. 3, p. 3505, DOI: 10.1038/screp03505.
50. Ньютон И. *Математические начала натуральной философии*. М: Наука, 1989, с. 501-504. [Newton I. *Mathematical Principles of Natural Philosophy*. M: Nauka, 1989, p. 501-504. (In Russ.)]

ON THE INTERACTION OF WATER WITH HYDROPHILIC SURFACES

Yakhno T.A., Yakhno V.G.

FRC Institute of Applied Physics Russian Academy of Science

Ulyanov St., 46, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: yakhta13@gmail.com

Abstract. The history of the study of the interaction of water with hydrophilic surfaces, including the phenomenon of "polywater", is briefly considered. On the example of glass objects immersed in water, the formation of an "exclusion zone" (EZ) was traced, the decrease in the ion concentration in the EZ and its liquid crystal structure was confirmed. It is shown that EZ is formed both under illumination and in darkness. Molecular mechanisms of formation and growth of EZ are considered, which are based on physical adsorption caused by a decrease in the free energy of the system. The presence of cations in water significantly influences the formation of EZ. The nature of the effect is determined by the size of the cation (the density of surface charges). Based on literature data and the results of the study, the unified nature of the formation of hydrated shells around ions and the organization of EZ is discussed.

Key words: water; hydrophilic surfaces; EZ; physical adsorption; glass hydration.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИНУЛИНАЗ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию: 08.05.2018

Аннотация. Изучена роль следующих процессов в проявлении функциональной активности инулиназы: а) формирование димеров с измененной пространственной структурой (при 45 и 55 °С / значениях рН 4,5, 5,0-6,5 / УФ-облучении в дозах до 453 Дж/м² для дрожжевой и растительной инулиназы и до 4530 Дж/м² для грибного энзима), б) образование тетрамеров и более крупных ассоциатов (при 61 °С и выше / рН 3,5 и 13,0 / УФ-облучении молекул дрожжевой и растительной инулиназы дозой 755 Дж/м²), в) диссоциация молекулы фермента на субъединицы (при 60 °С / рН 3,0). Предложены схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие высоких температур (до 70 °С), высоких и низких значений рН среды (от 3,0 до 13,0), УФ-излучения (240-390 нм) в дозах 151-6040 Дж/м².

Ключевые слова: инулиназа, мономер, димер, тетрамер, ассоциация, диссоциация.

Карбогидразы (или гликозидазы, КФ 3.2.1) катализируют гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов. Эти ферменты встречаются в клетках почти всех живых организмов. Гликозидазы выполняют множество разнообразных функций: деградация биомассы (целлюлазы), участие в антибактериальной защите организма (лизозим), развитие патогенеза (вирусные нейраминидазы), клеточный биосинтез (маннозидазы, вовлечённые в созревание N-гликозилированных гликопротеинов). Гликозидазы вместе с гликозилтрансферазами образуют основу биологического аппарата синтеза и разрушения гликозидных связей.

Изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств инулиназ (КФ 3.2.1.7) имеет высокое теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития органов. Инулиназы могут быть использованы в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, в частности, фруктозы и фруктоолигосахаридов – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения [1].

Многие гликозидазы способны образовывать надмолекулярные комплексы при изменении их микроокружения, причем у некоторых из карбогидраз процессы ассоциации-диссоциации являются одним из механизмов регулирования их каталитической активности [2, 3].

Целью данной работы является изучение структурно-функциональных, физико-химических и кинетических свойств инулиназ из различных продуцентов, закономерностей формирования ферментом надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения.

Объектами исследования были инулиназы, выделенные из культуры дрожжей *Kluyveromyces marxianus* и клубней топинамбура *Helianthus tuberosus* на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета, а также коммерческий препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия).

Каталитическую активность инулиназы измеряли спектрофотометрически резорциновым методом. В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури.

Размеры инулиназы и ее субъединиц в экспериментах по исследованию закономерностей образования надмолекулярных комплексов и влиянию УФ-облучения на указанные объекты определяли методом динамического светорассеяния на приборе Photocor complex (ООО «Фотокор», Россия) ($\lambda = 647$ нм, He/Ne-лазер). Форма белковой глобулы принималась за идеальную сферическую. Полученные данные обрабатывали в программе DynaLS. В других экспериментах был использован прибор Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632,8 нм) собирали под углом 173 ° при температуре 25 °С. Концентрация белка составляла 1,0-1,5 мг/мл в 0,1 М ацетатном буфере с рН 4,7. Образец предварительно пропускали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,45 мкм.

t, °C	Каталитическая активность		Процесс
25 30 35 40	Снижение активности ↑	7 % 13 % 27 % 53 %	Процессы ассоциации-диссоциации молекул фермента не зарегистрированы при концентрациях инулиназы 1, 5 и 10 мг/мл ↑
45		более 70 %	Модификация третичной структуры белка, тенденция к снижению величины радиуса молекулы при концентрации инулиназы 1 мг/мл
50	Оптимум	100 %	Преобладание димерной формы фермента ↑ ↓
55	Снижение активности ↓	более 85 %	Модификация третичной структуры белка, тенденция к снижению величины радиуса молекулы при концентрациях инулиназы 5 и 10 мг/мл ↓
61		~ 50 %	Образование тетрамерных и октамерных форм фермента как предшественников процессов интенсивной агрегации молекул при концентрациях инулиназы 5 и 10 мг/мл ↓
62 64 70		~ 30 % 20 %	Практически полная агрегация частиц: при концентрации инулиназы 10 мг/мл при концентрации инулиназы 5 мг/мл при концентрации инулиназы 1 мг/мл

Рисунок 1. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на температурные воздействия

На рисунках 1 и 2 отражены предлагаемые нами схемы отдельных этапов ответной реакции инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* на воздействие различных температур. При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении температуры (50 и 48 °C соответственно) молекулы энзима находятся преимущественно в димерной форме (каталитическая активность фермента принята за 100 %). При повышении или понижении значений температуры относительно оптимума функционирования происходит частичная или полная потеря каталитической способности инулиназ. При этом в диапазоне от 25 до 40 °C процессы ассоциации-диссоциации молекул не зарегистрированы для обеих инулиназ. Интенсивная агрегация частиц при концентрациях энзима в растворе 1, 5 и 10 мг/мл наблюдалась соответственно при 60, 58 и 50 °C для растительной инулиназы и при 70, 64 и 62 °C – для дрожжевой.

На рисунке 3 представлена схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на воздействие различных значений pH среды. При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении pH 4,7 молекулы энзима находятся преимущественно в димерной форме. При повышении или понижении pH относительно значения 4,7 происходит частичная или полная (pH 3,0 и pH 6,5 и выше) потеря функциональной способности инулиназы. При pH среды в диапазоне 5,0-6,5 единиц происходит модификация третичной структуры белка, которая при pH 13,0 приводит к обратимому формированию неактивных тетрамеров молекул фермента. При pH 4,5 мы регистрировали появление димеров с измененной пространственной структурой, сохраняющих более 80 % каталитической способности. При pH 3,5 – детектировали образование октамерных форм (до 11,5 % от общего числа частиц в системе) и более крупных ассоциатов, количество которых возрастало с увеличением времени инкубации. При значении pH 3,0 происходила практически полная (но обратимая) диссоциация молекулы инулиназы на субъединицы, которые не проявляли функциональной активности.

t, °C	Каталитическая активность		Процесс
25 30 35 40 45	Снижение активности ↑	36 % 54 % 75 % 92 % 96 %	Процессы ассоциации-диссоциации молекул фермента не зарегистрированы при концентрациях инулиназы 1, 5 и 10 мг/мл
48	Оптимум	100 %	Преобладание димерной формы фермента ↑ ↓
50 58 60	Снижение активности ↓	92 % 48 % 43 %	Интенсивная агрегация частиц: при концентрации инулиназы 10 мг/мл при концентрации инулиназы 5 мг/мл при концентрации инулиназы 1 мг/мл

Рисунок 2. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы I из *Helianthus tuberosus* на температурные воздействия

pH	Каталитическая активность		Процесс
13,0	Снижение активности ↑	0	Образование тетрамеров, которые после 30 мин инкубации постепенно диссоциируют ↑
6,5 6,0 5,0		0 ~ 7 % ~ 87 %	Модификация третичной структуры белка
4,7		100 %	Преобладание димерной формы фермента ↑ ↓
4,5	Снижение активности ↓	более 80 %	Появление димеров с измененной пространственной структурой ↓
3,5		20 %	Образование октамерных форм (до 11,5 %) и более крупных ассоциатов, количество которых возрастает с увеличением времени инкубации ↓
3,0		0	Практически полная диссоциация молекулы инулиназы на субъединицы, после трех часов инкубации вновь образуются димеры

Рисунок 3. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* на воздействие высоких и низких значений pH среды

На рисунках 4 и 5 приведены схемы процессов ассоциации-диссоциации молекул инулиназ при различных условиях их термической и УФ-инактивации.

Из изложенного выше материала можно сделать следующие выводы:

1. При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении температуры (50 и 48 °C соответственно) молекулы энзима из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* находятся преимущественно в димерной форме. В диапазоне от 25 до 40 °C процессы ассоциации-диссоциации молекул белка практически не зарегистрированы. Интенсивная агрегация макромолекул при концентрациях энзима в растворе 1, 5 и 10 мг/мл наблюдалась соответственно при 60, 58 и 50 °C для растительной инулиназы и при 70, 64 и 62 °C – для дрожжевой.

2. При оптимальном для осуществления реакции гидролиза инулина значении pH 4,7 молекулы энзима из *Kluyveromyces marxianus* находятся преимущественно в димерной форме. При pH 3,5 детектируется образование октамерных форм (до 11,5 % от общего числа частиц в системе) и более крупных ассоциатов.

3. При УФ-облучении в дозах 755 Дж/м² и выше происходит фотомодификация ароматических и серосодержащих аминокислотных остатков белка, приводящая к ассоциации молекул дрожжевой и растительной инулиназы. Следствием воздействия доз УФ-излучения в диапазоне 4530-6040 Дж/м² является снижение каталитической активности инулиназ.

Процесс	Условия протекания		
	t, °C	Время инкубации	Концентрация инулиназы, мг/мл
Преобладание димерных форм фермента ↓	от 50 до 57	до 4 часов	1, 5, 10
Протекание процессов диссоциации ↓	60	1,5 часа	1
Появление тетрамерных форм фермента ↓	60 61 63	2 часа 5 мин 20 мин	1 5, 10 1
Практически полная агрегация частиц	60 62 63 64 70	3,5 часа 5 мин 1 час 40 мин 5 мин 5 мин	5 10 1 5 1

Рисунок 4. Схема процессов ассоциации-диссоциации молекул инулиназ из *Kluyveromyces marxianus* при различных условиях ее термической инактивации

Инулиназы из <i>Kluyveromyces marxianus</i> и <i>Helianthus tuberosus</i>	УФ-облучение (240-390 нм)	Инулиназа из <i>Aspergillus niger</i>
151-453 Дж/м ²	↓ Хромофоры нативных димеров фермента ↓ Возбужденные состояния ↓ Миграция возбужденных состояний внутри молекулы белка ↓ Фотомодификация третичной структуры белка. Появление димеров с измененной пространственной структурой ↓	151-4530 Дж/м ²
755 Дж/м ²	Образование тетрамеров	не происходит
4530 Дж/м ²	↓ Снижение функциональной активности	6040 Дж/м ²

Рисунок 5. Схема отдельных этапов ответной реакции инулиназ различного происхождения на воздействие УФ-облучения: роль процессов миграции возбужденных состояний, фотомодификации третичной структуры белка, образования димеров и тетрамеров в фотоинаktivации фермента

Список литературы / References:

1. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholiyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkin M.V., Obratsova T.B. Study of the oligomeric structure and some physicochemical properties of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* Y-303. *Biophysics*, 2009, vol. 54, no. 6, pp. 675-680.
2. Ковалева Т.А., Холявка М.Г. Исследование структурных особенностей инулиназ из различных продуцентов методом ИК-спектрофотометрии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2011, т. 9, № 1, с. 3-7. [Kovaleva T.A., Kholiyavka M.G. Investigation of structural features of inulinases from different producers by IR spectrophotometry. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2011, vol. 9, no. 1, pp. 3-7. (In Russ.)]
3. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A. Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their activity. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 493-501.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF INULINASES UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT MICROENVIRONMENT

Holyavka M.G., Artyukhov V.G.

Voronezh State University

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

Abstract. The role of the following processes in the manifestation of the functional activity of inulinase was studied: a) the formation of dimers with a changed spatial structure (at 45 and 55 °C / pH 4,5, 5,0-6,5 / UV irradiation at doses up to 453 J/m² for yeast and plant inulinase and up to 4530 J/m² for the fungal enzyme), b) the formation of tetramers and larger associates (at 61 °C and higher / pH 3,5 and 13,0 / UV irradiation of yeast and plant inulinase molecules by a dose 755 J/m²), c) the dissociation of the enzyme molecule into subunits (at 60 °C / pH 3,0). The schemes of the response stages for various inulinases to high temperatures (up to 70° C), high and low pH values (from 3,0 to 13,0), UV radiation (240-390 nm) at doses of 151- 6040 J/m².

Key words: inulinase, monomer, dimer, tetramer, association, dissociation.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ «НУЛЕВОГО» И КОМБИНИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

Новиков В.В.¹, Яблокова Е.В.¹, Новикова Н.И.²

¹ФГБУН Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино Московской области, 142290, РФ; e-mail: docmag@mail.ru

²Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
проспект Науки, 6, г. Пущино Московской области, 142290, РФ

Поступила в редакцию: 15.05.18

Аннотация. Показано, что 1,5 часовое экспонирование перитонеальных нейтрофилов мышей при физиологических температурах в слабых комбинированных постоянном (42 мкТл) и коллинеарном ему низкочастотном переменном (сумма частот 1,0; 4,4 и 16,5 Гц, амплитуда 0,86 мкТл) магнитных полях вызывает усиление внутриклеточной продукции активных форм кислорода, регистрируемое по изменению интенсивности флуоресценции продуктов окисления 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и дигидрорадамина 123. Дополнительное введение малых концентраций активаторов респираторного взрыва (формилированного пептида N-formyl-Met-Leu-Phe или форболового эфира форбол-12-меристат-13-ацетата) значительно усиливает степень выраженности этого эффекта слабых магнитных полей. В отличие от этого экспонирование нейтрофилов при магнитном экранировании в гипوماгнитных условиях (остаточное постоянное магнитное поле 20 нТл) вызывает снижение внутриклеточной продукции активных форм кислорода. При дополнительном введении малых концентраций активаторов респираторного взрыва этот эффект гипوماгнитного поля сохраняется.

Ключевые слова: магнитное поле, гипوماгнитное поле, нейтрофилы, кровь, активные формы кислорода, флуоресценция.

Возможность влияния на продукцию активных форм кислорода (АФК) рассматривается как один из перспективных подходов к анализу механизмов биологического действия слабых магнитных полей [1-4]. Ранее в экспериментах на цельной крови млекопитающих и отдельных клеточных субпопуляциях (нейтрофилах) методами активированной хемилюминесценции и флуоресцентной спектроскопии нами было показано усиление генерации свободных радикалов и других активных форм кислорода и хлора в результате действия комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей (КМП) с очень слабой переменной составляющей (менее 1 мкТл) [5-12]. В отдельных опытах мы показали, что «нулевое» магнитное поле (гипوماгнитные условия - остаточное постоянное магнитное поле 20 нТл) вызывает снижение базовой продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах. В этой связи представляет интерес сравнительный анализ эффектов КМП и «нулевого» МП, так как это может способствовать выявлению первичных мишеней и биофизических механизмов трансдукции магнитного сигнала в суспензии нейтрофилов.

На данном этапе для анализа эффектов этих МП мы применили метод флуоресцентной спектроскопии с использованием хорошо изученных проникающих в клетки флуоресцентных зондов на АФК - 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H₂DCF-DA) и дигидрорадамина 123 (DHR 123) [13-16]. H₂DCF-DA проникает в клетку, где под действием внутриклеточных эстераз переходит в форму H₂DCF. H₂DCF – слабо флуоресцирующий агент, который в реакциях с окислителями превращается в сильно флуоресцирующий продукт – дихлорфлуоресцеин (DCF). Дигидрорадамин 123 так же, как и H₂DCF-DA, является липофильным соединением, которое легко проникает в клетку. При окислении DHR 123 превращается во флуоресцирующий родамин 123. При окислении одна из аминокрупп красителя приобретает заряд, что препятствует его выходу из клетки в окисленной форме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на перитонеальных нейтрофилах мышей. Для получения нейтрофилов использовали лабораторных мышей самцов линии CD-1 массой 24-26 г., полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино Московская область). В перитонеальную полость мыши инъецировали 150 мкл суспензии опсонизированного зимозана с концентрацией 5 мг/ мл (Zymozan A из *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США). После этого через 12 часов животных умерщвляли методом ульнарной дислокации, и их брюшную полость промывали тремя миллилитрами охлажденного раствора Хенкса без кальция. Экссудат собирали пипеткой и центрифугировали в течение 10 мин при 600 g. Супернатант декантировали, а осадок разводили в 2 мл бескальциевого раствора Хенкса и оставляли на 1 час при 4 °С. Количество выделенных клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли, используя витальный краситель трипановый синий. Содержание живых клеток при этом составляло не менее 98%. Для опытов образцы получали, разводя суспензию нейтрофилов стандартной средой Хенкса (138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 5,5 mM глюкозы, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4; Sigma, США) до концентрации 1 млн кл/мл.

Установка для воздействия слабыми КМП состояла из двух пар коаксиально расположенных колец Гельмгольца диаметром 140 см (расстояние между кольцами одной пары 70 см), ориентированных вдоль вектора геомагнитного поля. На одну пару колец подавали постоянный ток для формирования заданной величины постоянной составляющей МП $42 \pm 0,1$ мкТл. На вторую пару колец подавали электрический ток от программируемого генератора синусоидальных сигналов (ЦАП платы L-791 фирмы L-Card, Россия) для формирования переменной компоненты поля. Базовая амплитуда переменной компоненты составляла 860 ± 10 нТл. В опытах был использован трехчастотный сигнал 1; 4,4 и 16,5 Гц, показавший активность в предыдущих экспериментах [17], с амплитудами отдельных частот 600; 100 и 160 нТл соответственно. Величины действующих МП определяли прямым измерением с помощью феррозондового датчика Mag – 03 MS 100 (Bartington, UK). Нейтрофилы инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °С в концентрации 1 млн кл/мл по 250 мкл в полипропиленовых пробирках типа Эппендорф. Типичное время инкубации составляло 1,5 часа. При экспонировании суспензии нейтрофилов в гипомангнитном поле для формирования гипомангнитных условий использовалась установка, которая состояла из трех, вставленных соосно один в другой, цилиндрических экранов МП из пермаллоя (толщиной 1 мм), закрытых крышками. Величины остаточных постоянных МП не превышали 20 нТл. Контрольные (геомагнитное поле) и опытные образцы по 10 штук инкубировали при $37,0 \pm 0,2$ °С одновременно. Образцы контрольных групп находились в локальном геомагнитном поле с постоянной составляющей ~ 42 мкТл и уровнем магнитного фона на 50 Гц 15-50 нТл. Опыты повторяли не менее трех раз.

После 1,5 часовой инкубации к суспензии нейтрофилов добавляли флуоресцентные зонды на внутриклеточные АФК $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ или DHR 123 до конечной концентрации 0,01 мг/мл. В ряд контрольных и опытных образцов также добавляли один из активаторов генерации АФК: хемотаксический формилированный пептид N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma, США) в концентрациях 0,1-0,5 мкМ или форбол-12-меристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma, США) в концентрациях 0,01-0,05 мкМ. Пробы продолжали инкубировать при 37 °С в темноте, чтобы минимизировать фотооксидацию красителей. В случае с $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ время инкубации составило 30 минут. При использовании DHR 123 – 10 минут. Затем клетки отмывали, центрифугируя при 600 g 10 мин при комнатной температуре в растворе Хенкса. Далее к осадку добавляли 1 мл среды, ресуспендировали, и регистрировали спектры флуоресценции образцов на приборе Thermo Scientific Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA), при возбуждении на длине волны 488 нм.

Результаты статистически обработаны с применением *t*-критерия Стьюдента. Часть результатов представлена в процентах, как отношение максимальной интенсивности флуоресценции в опытах к базовому контролю без активаторов, принятому за 100 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в слабых КМП вызывает значительное (на 22 %) увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF (рис. 1). При использовании дополнительной стимуляции клеток после воздействия КМП с помощью fMLF (0,2 мкМ) степень различий между контролем и опытом увеличивается до 43 %. Стимуляция нейтрофилов активатором ФМА (0,02 мкМ) вызывает увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF в контрольных группах в среднем на 35 %, а проведенная после обработки полем, приводит к двукратному усилению интенсивности флуоресценции в опыте по сравнению с соответствующим контролем (рис. 1).

Интенсивность флуоресценции родамина 123 в опыте (воздействие КМП без дополнительной стимуляции) существенно выше (на 47 %) чем в контроле (рис. 2). Использование активатора ФМА приводит к двукратному усилению флуоресценции в контрольных группах. После предварительной обработки суспензии клеток КМП и введения ФМА различия между контролем и опытом достигают 100 % (рис. 2). Следует отметить, что максимальные значения интенсивности флуоресценции родамина 123 в этой серии опытов отмечены при использовании дополнительной стимуляции ФМА. При воздействии КМП наблюдается рост флуоресценции DCF и родамина 123 приблизительно в два раза по сравнению с контрольными образцами, также простимулированными ФМА (рис. 1, 2).

Экспонирование перитонеальных нейтрофилов в гипомангнитных условиях (при ослаблении геомагнитного поля $\sim$ в 2000 раз) вызывает значительное (на 25 %) уменьшение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF (Рис. 3). При использовании дополнительной стимуляции клеток с помощью fMLF (0,5 мкМ) степень различий между контролем (геомагнитное поле) и опытом (гипомангнитное поле) сохраняется (~ 23 %). Стимуляция нейтрофилов активатором ФМА (0,05 мкМ) вызывает увеличение интенсивности флуоресценции внутриклеточного DCF в контрольных группах в среднем на 30 %, а проведенная после пребывания в гипомангнитных условиях, на 22 % по сравнению с соответствующим контролем (рис. 3).

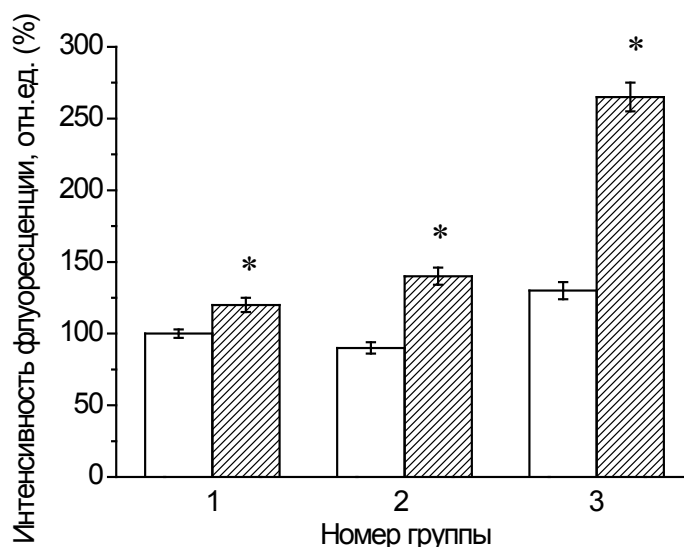


Рисунок 1. Влияние слабых комбинированных магнитных полей (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП 0,86 мкТл - сумма трех частот 1; 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6; 1 и 1,6) на интенсивность флуоресценции диchlorфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва.

Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$).

Ось абсцисс – номер группы.

1 – контроль и опыт без активаторов.

2 – контроль и опыт с добавками fMLF.

3 – контроль и опыт с добавками ФМА.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

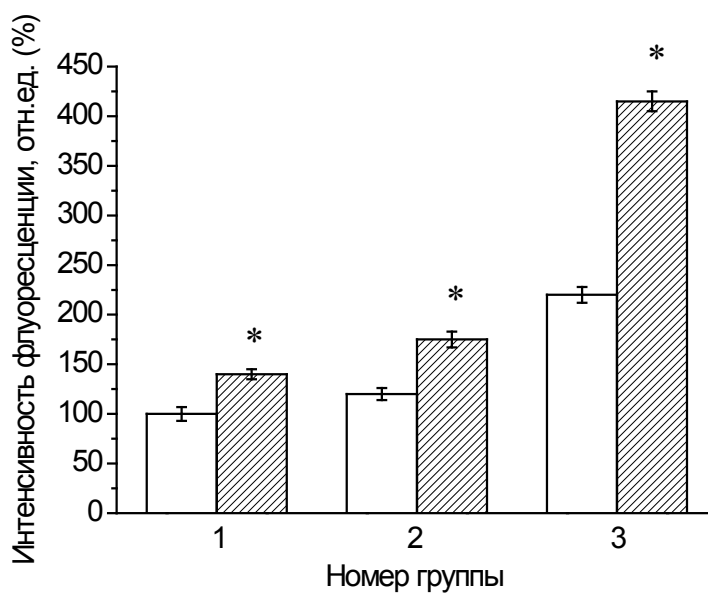


Рисунок 2. Влияние слабых комбинированных магнитных полей (постоянное МП 42 мкТл; переменное МП 0,86 мкТл - сумма трех частот 1; 4,4 и 16,5 Гц при соотношении амплитуд 6; 1 и 1,6) на интенсивность флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва.

Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$).

Ось абсцисс – номер группы.

1 – контроль и опыт без активаторов.

2 – контроль и опыт с добавками fMLF.

3 – контроль и опыт с добавками ФМА.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

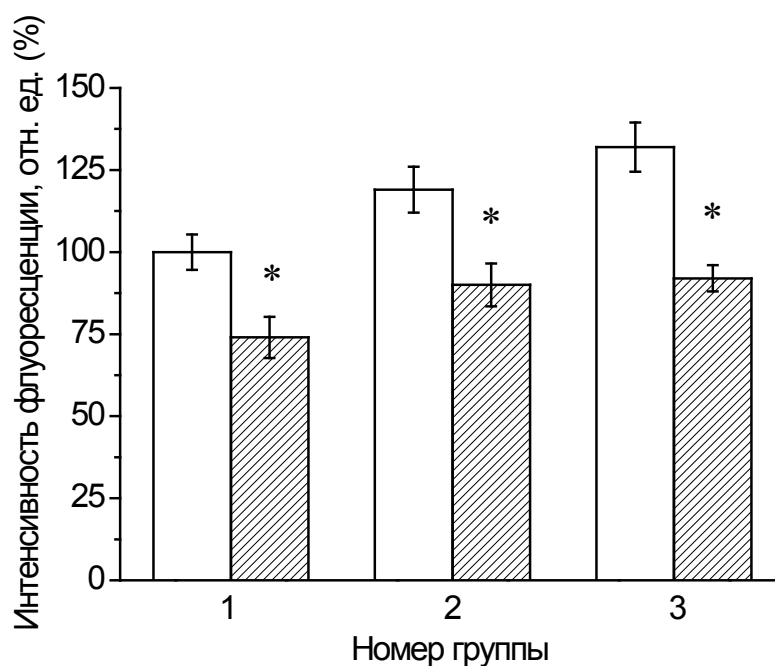


Рисунок 3. Влияние гипоманнитного поля на интенсивность флуоресценции дихлорфлуоресцеина в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва. Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$).

Ось абсцисс – номер группы.

1 – контроль и опыт без активаторов.

2 – контроль и опыт с добавками fMLF.

3 – контроль и опыт с добавками ФМА.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

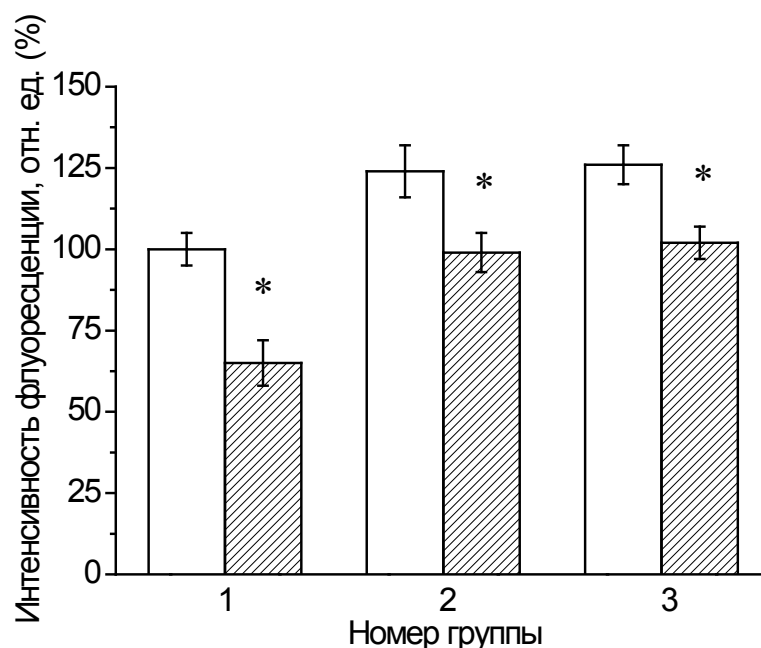


Рисунок 4. Влияние гипоманнитного поля на интенсивность флуоресценции родамина 123 в суспензии нейтрофилов в отсутствии и в присутствии активаторов респираторного взрыва.

Ось ординат – максимальная интенсивность флуоресценции в процентах по отношению к базовому контролю без активаторов (средние значения и стандартные отклонения, $n = 10$).

Ось абсцисс – номер группы.

1 – контроль и опыт без активаторов.

2 – контроль и опыт с добавками fMLF.

3 – контроль и опыт с добавками ФМА.

Звездочкой отмечены достоверные отличия от показателей контрольных групп ($P < 0,05$)

Интенсивность флуоресценции родамина 123 в опыте (гипомагнитные условия без дополнительной стимуляции) существенно ниже (на 35 %) чем в контроле (рис. 4). Эффект дополнительной стимуляции с помощью fMLF составляет 23 % в контроле и 35 % в опыте. В этом случае (стимуляция fMLF) различия между контролем и опытом составляют 20 %. Аналогичным образом проявляется эффект дополнительной стимуляции нейтрофилов с помощью ФМА (рис. 4).

Таким образом, воздействие гипомагнитных условий вызывает снижение базовой продукции внутриклеточных АФК в нейтрофилах, что отмечается во всех опытах с обоими флуоресцирующими зондами. В опытах с дополнительной последующей стимуляцией нейтрофилов химическими активаторами респираторного взрыва fMLF или ФМА этот эффект действия гипомагнитного поля также проявляется, но обусловлен в большей степени исходной разницей в продукции АФК, чем нарушением ответа нейтрофилов на эти активаторы.

Известными сайтами образования внутриклеточных АФК в нейтрофилах, являются фагосомы, однако, АФК могут синтезироваться и вне фагосом, в цитохром b-содержащих гранулах [18-20]. Помимо НАДФН-оксидазы в фагоцитах есть и другие АФК-образующие системы (например, НАДФН-оксидазы, включающие другие члены NOX-семейства [18], NO-синтазы [19], а также единичные митохондрии [18-20]). Но именно ферментный комплекс оксидазы фагоцитов, содержащей NOX2, образует значительно более высокий уровень АФК, чем другие клеточные оксидазы [18-20]. Сборка оксидазы на цитоплазматической мембране ведет к выходу АФК во внеклеточное окружение (внеклеточные АФК), а сборка оксидазы на внутриклеточных мембранах приводит к синтезу АФК, остающихся внутри мембранных органелл (внутриклеточные АФК). Ключевым моментом в регуляции активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов, является степень фосфорилирования ее субъединиц, определяющая возможность сборки этого ферментативного комплекса в мембране из нескольких специфических цитоплазматических и мембранных белков [21,22]. Фосфорилирование субъединиц НАДФН-оксидазы находится под контролем прежде всего протеинкиназы С, активность которой сильно зависит от уровня внутриклеточного Ca^{2+} [19-22], а также сопряжена с активностью фосфолипазы С, обеспечивающей уровень инозитолтрифосфата (стимулирует выход ионов кальция из эндоплазматического ретикула) и диацилглицерола (напрямую активирует протеинкиназу С).

На основании полученных нами данных можно предположить, что в гипомагнитных условиях тормозятся именно процессы фосфорилирования компонентов НАДФН-оксидазы, что и приводит к снижению внутриклеточной продукции АФК. Напротив, при действии комбинированных магнитных полей с определенными нами параметрами отмечается преактивация (прайминг) нейтрофилов, блокируемая низкими концентрациями внутриклеточного хелатора Ca^{2+} [7,9], что также свидетельствует об участии процессов фосфорилирования НАДФН-оксидазы в механизме биологического действия слабого МП. Без сомнения, эти вопросы заслуживают специальных детальных исследований.

Список литературы / References:

1. Бинги В.Н. *Принципы электромагнитной биофизики*. М: Физматлит, 2011, 592 с. [Binhi V.N. *Principles of Electromagnetic Biophysics*. Moscow: Fizmatlit, 2011, 592 p. (In Russ.)]
2. Новиков В.В., Пономарев В.О., Новиков Г.В., Кувичкин В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Эффекты и молекулярные механизмы биологического действия слабых и сверхслабых магнитных полей. *Биофизика*, 2010, т. 55, № 4, с. 631-639. [Novikov V.V., Ponomarev V.O., Novikov G.V., Kuvichin V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Effects and molecular mechanisms of the biological action of weak and extremely weak magnetic fields. *Biophysics*, 2010, vol. 55, no. 4, pp. 631-639. (In Russ.)]
3. Бучаченко А.Л. Магнитно-зависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине. *Успехи химии*, 2014, т. 83, № 1, с. 1-12. [Buchachenko A.L. Magnetic-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine. *Usp. Khim*, 2014, vol. 83, no. 1, pp. 1-12. (In Russ.)]
4. Пономарев В.О., Новиков В.В. Действие низкочастотных переменных магнитных полей на скорость биохимических реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода. *Биофизика*, 2009, т. 54, № 2, с. 235-241. [Ponomarev V.O., Novikov V.V. Effect of low-frequency alternating magnetic fields on the rate of biochemical reactions proceeding with formation of reactive oxygen species. *Biophysics*, 2009, vol. 54, no. 2, pp. 235-241. (In Russ.)]
5. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой на люминолзависимую хемилюминесценцию крови млекопитающих. *Биофизика*, 2015, т. 60, № 3, с. 530-533. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The action of combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component on luminol-dependent chemiluminescence in mammalian blood. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 530-530. (In Russ.)]
6. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Действие слабых магнитных полей на хемилюминесценцию крови человека. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 1, с. 126-130. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of weak magnetic fields on the chemiluminescence of human blood. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 126-130. (In Russ.)]
7. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Праймирование респираторного взрыва у нейтрофилов *in vitro* при действии слабых комбинированных постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 3, с. 510-515. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. Priming of the respiratory

burst in neutrophils exposed to a combination of weak constant and alternating low-frequency magnetic fields *in vitro*. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 510-515. (In Russ.)]

8. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние слабых магнитных полей на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2016, т. 61, № 6, с. 1159-1163. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of weak magnetic fields on the production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 1159-1163. (In Russ.)]

9. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Роль гидроксильных радикалов и ионов кальция в праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах и усилении люминол-зависимой хемилюминесценции крови при действии комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 3, с. 547-551. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The role of hydroxyl radicals and calcium ions in the priming of a respiratory burst in neutrophils and the increase in luminol-dependent blood chemiluminescence on exposure to combined magnetic fields with a very weak low-frequency alternating component. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 3, pp. 547-551. (In Russ.)]

10. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Новиков Г.В., Фесенко Е.Е. Роль липидной пероксидации и миелопероксидазы в праймировании респираторного взрыва в нейтрофилах при действии комбинированных постоянного и переменного магнитных полей. *Биофизика*, 2017, т. 62, № 5, с. 926-931. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Novikov G.V., Fesenko E.E. The role of lipid peroxidation and myeloperoxidase in priming a respiratory burst in neutrophils under the action of combined constant and alternating magnetic fields. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 926-931. (In Russ.)]

11. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Роль кислорода в прайминге нейтрофилов при действии слабого магнитного поля. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 2, с. 277-281. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The role of oxygen in the priming of neutrophils on exposure to a weak magnetic field. *Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 277-281. (In Russ.)]

12. Новиков В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах. *Биофизика*, 2018, т. 63, № 3, с. 484-488. [Novikov V.V., Yablokova E.V., Fesenko E.E. The effect of «zero» magnetic field on production of reactive oxygen species in neutrophils. *Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 484-488. (In Russ.)]

13. Crow J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1997, vol. 1, iss. 2, pp. 145-157.

14. Hempel S.L., Buettner G.R., O'Malley Y.Q., Wessels D.A., Flaherty D.M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, 1999, vol. 27, iss. 1-2, pp. 146-159.

15. Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta*, 2006, vol. 368, pp. 53-76.

16. Freitas M., Lima J.L., Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils oxidative burst. *Anal Chim Acta*, 2009, vol. 649, pp. 8-23.

17. Novikov V.V., Novikov G.V., Fesenko E.E. Effect of weak combined static and extremely low-frequency alternating magnetic fields on tumor growth in mice bearing the Ehrlich ascites carcinoma. *Bioelectromagnetics*, 2009, vol. 30, pp. 343-351.

18. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*, 2009, т. 49, с. 341-388. [Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Usp. Biol. Himii*, 2009, vol. 49, pp. 341-388. (In Russ.)]

19. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция. *Цитокины и воспаление*, 2007, т. 6, № 3, с. 3-13. [Mayanskiy A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Cytokines and inflammation*, 2007, vol. 6, no. 3, pp. 3-13. (In Russ.)]

20. Воробьева Н.В. НАДФН-оксидаза нейтрофилов и заболевания, связанные с ее дисфункцией. *Иммунология*, 2013, т. 34, № 4, с. 227-233. [Vorobyeva N.V. NADPH-oxidase of neutrophils and diseases associated with its dysfunction. *Immunology*, 2013, vol. 34, no. 4, pp. 227-233. (In Russ.)]

21. El-Benna J., Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.*, 2008, vol. 30, pp. 279-289.

22. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E. et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukocyte Biol.*, 2005, vol. 78, pp. 1025-1042.

SPECIALITIES OF INFLUENCE OF «ZERO» AND COMBINED MAGNETIC FIELDS ON PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN NEUTROPHILS**Novikov V.V.¹, Yablokova E.V.¹, Novikova N.I.²**¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences*Institutskaya St., 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: docmag@mail.ru*²Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences*6 avenue of Science, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

Abstract. It was shown that a 1.5 hour-long exposure of mouse peritoneal neutrophils to a combination of a weak constant magnetic field (42 μ T) and low-frequency alternating magnetic field collinear to the weak constant magnetic field (the sum of the frequencies 1.0, 4.4, and 16.5 Hz; amplitude, 0.86 μ T) at physiological temperatures caused an increase in the intracellular production of reactive oxygen species, as measured by the changes in fluorescence of the products of 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 oxidation. The effect of weak magnetic fields was significantly more pronounced in the presence of low concentrations of respiratory burst activators (N-formyl-Met-Leu-Phe or phorbol-12-myristate-13-acetate). In contrast, exposure of neutrophils under magnetic shielding in hypomagnetic conditions (residual static magnetic field of 20 nT) causes a decrease in intracellular production of reactive oxygen species. The effect of the hypomagnetic field is observed after respiratory burst activators applied at low concentrations are additionally added.

Key words: *magnetic field, hypomagnetic field, neutrophils, blood, reactive oxygen species, fluorescence.*

МСЕК-ЗАМЕДЛЕННАЯ ЭМИССИЯ СВЕТА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский Государственный Университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ 1148, Азербайджан; e-mail: sam_bio@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.06.2018

Аннотация. Показано, что введение акридинового оранжевого (АО, АНС) в живые клетки дрожжей способствует возникновению в них возбуждаемой светом мсек-замедленной эмиссии света (мсек-ЗЭС). Кинетика замедленной эмиссии света АО, АНС дрожжей носит индукционный характер, описывается S-образной кривой, и ее интенсивность зависит от концентрации красителя. В нашей исследовательской работе была изучена интенсивность мсек-ЗЭС АО в клетках дрожжей после действия γ -лучей, различными дозами (5 Гр, 20 Гр, 50 Гр, 100 Гр). Обнаружено, что кинетические показатели интенсивности мсек-ЗЭС АО, АНС изменяются в зависимости от дозы γ -лучей. Изучение влияния γ -лучей на мсек-ЗЭС АО в клетках показало, что интенсивность мсек-ЗЭС АО и АНС в клетках предварительно облученных уменьшается по сравнению с необлученными клетками и изменяется форма индукционной кривой.

Установлено, что после действия γ -лучей на клетки дрожжей в малых дозах, практически не вызывающих повреждений, увеличивает мсек-ЗЭС АО. При возрастании дозы излучения интенсивность мсек-ЗЭС АНС снижается. Сделан вывод о том, что мсек-ЗЭС АО и АНС может быть использована для изучения влияния биогенных и абиогенных факторов среды на биологические системы, а также для биомониторинга загрязнения окружающей среды с целью ранней диагностики.

Ключевые слова: клетки дрожжей, АО, АНС, мсек-ЗЭС, γ -облучение.

ВВЕДЕНИЕ

Современным биофизическим методом исследования, позволяющим изучать структурное состояние биомембран, транспорт ионов, трансмембранный потенциал, взаимодействие веществ различной природы с мембранами и другие процессы, признан метод флуоресцентных зондов [1-5].

Отрицательное влияние на живые организмы, различных опасных факторов увеличивается. Эти отрицательные воздействия оказывают повреждающие действия на различные структурно-метаболические комплексы. Нарушения в функционировании приводят к существенным метаболическим сдвигам и в итоге, к гибели клеток. К настоящему времени в мире существует много информации, касающейся общих закономерностей проявления адаптивной реакции у микроорганизмов, клеток крови, организмов животных и растений [6-10].

На дрожжевых клетках изучено летальное действие малых доз и проявление адаптивной реакции после хронического облучения при малых мощностях доз. Исследована чувствительность клеток, подвергавшихся хроническому воздействию в широком диапазоне мощностей доз (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 0.5, 1, 3, 8, 10 и 40 Гр/ч), к последующему воздействию острого облучения [9,11,12]. Целью данной работы является изучение мсек-ЗЭС флуоресцентных зондов АО и АНС в клетках дрожжей и влияния различных доз γ -излучения на интенсивность мсек-ЗЭС.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Культуру дрожжей выращивали на сусло-агаре 4⁰ Балл. Опыты проводили со свежеприготовленной суспензией 3-х суточной культуры. В работе была использована фотометрическая установка, позволяющая регистрировать мсек-ЗЭС [13]. В установке был применен фосфороскоп. Облучение клеток дрожжей осуществляли γ -квантами на установке ^{60}Co .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучена миллисекундная замедленная эмиссия света в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* У-916 в зависимости от концентрации акридинового оранжевого (АО).

Установлено, что в течение 1-2 минут после включения возбуждающего света мсек-ЗЭС клеток с АО практически не регистрируется, затем наблюдается очень быстрое нарастание интенсивности мсек-ЗЭС, которая так же быстро достигает максимального значения и стабилизируется на высоком уровне. В дальнейшем интенсивность процесса не изменяется и продолжает протекать в стационарном режиме. При проведении кинетических измерений большое значение имеет концентрация красителя. Индукционная кривая мсек-ЗЭС имеет S-образную форму, но наблюдается отсутствие пика (рис. 1). При малой концентрации ($< 10^{-5}$ М) регистрируемое свечение имеет низкую интенсивность. мсек-ЗЭС АО обнаруживается даже при очень низкой концентрации (10^{-9} - 10^{-8} М) акридинового оранжевого.

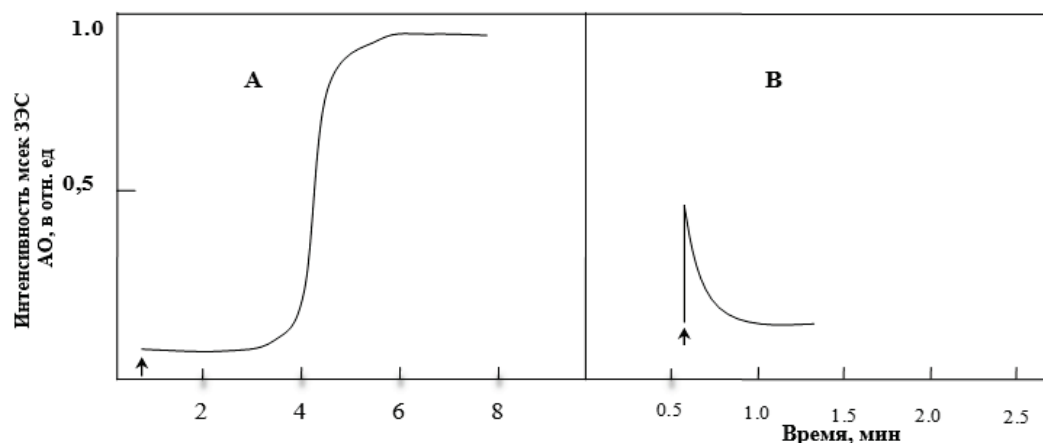


Рисунок 1. Кривая индукции msec-ЗЭАО клеток *Candida guilliermondii*. А-индукционная кривая; В-кривая затухания

В условиях, постоянной плотности клеток (10^8 кл/мл) при увеличении концентрации АО, стационарное положение кинетических показателей msec-ЗЭС также увеличиваются и при 10^{-5} М, достигает максимального значения. Необходимо отметить, что при более высокой концентрации АО (10^{-4} М) интенсивность msec-ЗЭС снижается (рис. 2).

Известно, что мономерная форма акридинового оранжевого существующая в сильно разбавленных растворах, характеризуется следующими оптическими свойствами максимум поглощения 494 нм, максимум люминесценции 530 нм, время жизни возбужденного состояния $\tau = 2 \cdot 10^{-9}$ с. В концентрированных растворах акридиновый оранжевый существует в димерной форме с иными оптическими характеристиками максимум поглощения 465 нм, максимум люминесценции 640 нм, время жизни возбужденного состояния $\tau = 20 \cdot 10^{-9}$ с. С увеличением исходной концентрации красителя максимум спектра возбуждения димеров ($\tau = 490$ нм) растет. При этом изменяется соотношение между максимумами возбуждения флуоресценции мономеров ($\tau = 530$ нм) и димеров. Зависимость msec-ЗЭС клеток дрожжей *Candida guilliermondii* Y-916 от концентрации акридинового оранжевого показывает, что концентрация АО является одним из факторов, определяющих msec-ЗЭС клеток дрожжей.

В нашей исследовательской работе была изучена интенсивность msec-ЗЭС АО в клетках дрожжей после действия γ -лучей, различными дозами. Установлено, что интенсивность msec-ЗЭС АО в облученных клетках дрожжей, характеризуется S-образной кривой. Установлено что кинетические показатели интенсивности msec-ЗЭС АО изменяются в зависимости от дозы γ -лучей. Изучение влияния γ -лучей на msec-ЗЭС АО в клетках показало, что интенсивность msec-ЗЭС АО в клетках предварительно облученных уменьшается по сравнению с необлученными клетками и изменяется форма индукционной кривой при действии дозой 5 Гр. При дозе 5 Гр стационарный уровень индукционных кривых резко возрастает и имеет пик (Р). Так, интенсивность msec-ЗЭС АО у клеток, облученных γ -лучами в дозе 5 Гр выше, чем у необлученных клеток. Ранее проведенных экспериментах мы наблюдали изменение формы и пик на вершине индукционной кривой при предварительном УФ- облучении (254 нм) клеток дрожжей [13, 14]. Как было нами показано, индукционные кривые msec-ЗЭС АО в клетках дрожжей при всех дозах УФ- излучения ($1,2 \cdot 10^{-2}$ – $4,8 \cdot 10^2$ эрг/мм²) имеют пик.

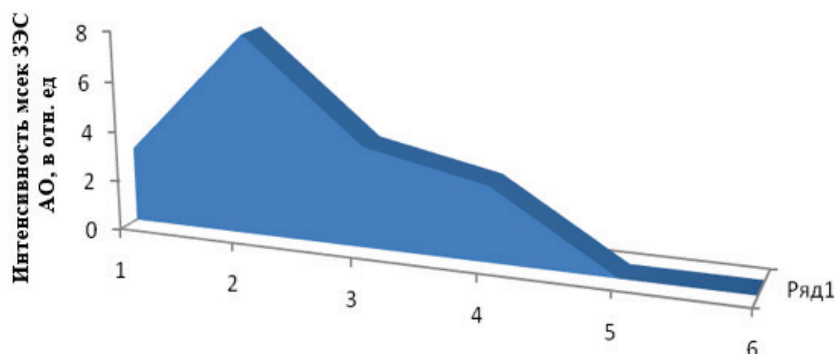


Рисунок 2. Зависимость замедленной эмиссии света от концентрации акридинового оранжевого: $1 \cdot 10^{-4}$ М; $2 \cdot 10^{-5}$ М; $3 \cdot 10^{-6}$ М; $4 \cdot 10^{-7}$ М; $5 \cdot 10^{-8}$ М; 10^{-9} М

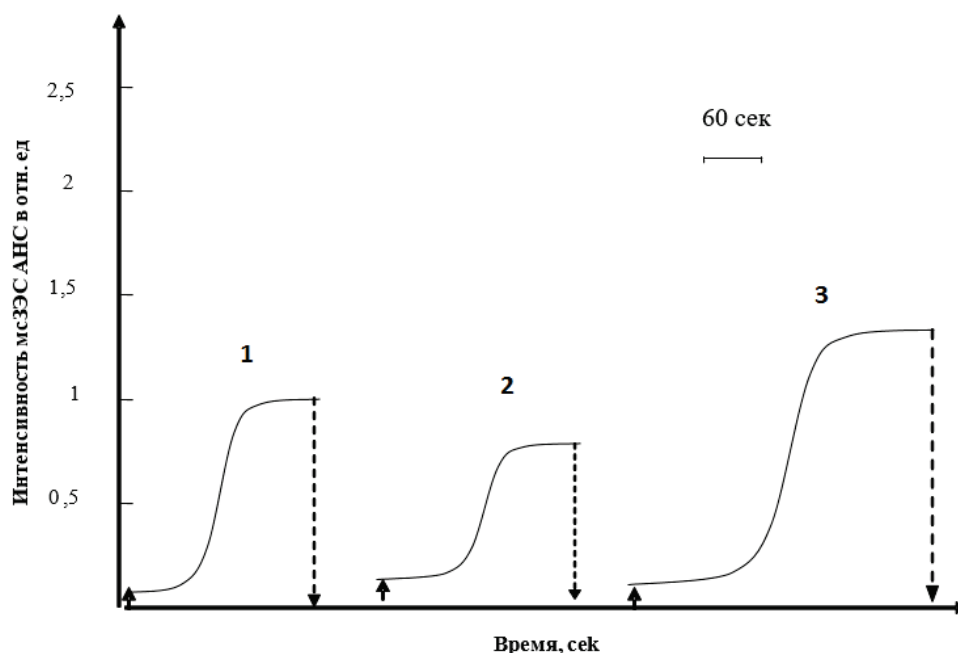


Рисунок 3. Влияние γ -лучей на мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* Y-916, обработанных α -токоферолом:

1. Контроль; 2. γ -излучение 20 Гр; 3. γ -излучение 20 Гр+ α -токофероль

Известно, что при действии γ лучей, происходит процесс пероксидации ненасыщенных жирных кислот липидов клеточной мембраны. В результате образуются органические радикалы R^+ и RO^+ . Образованные R^+ и RO^+ радикалы вместе с АО, обладая высокой энергией и способностью вступать в реакцию, образуют комплекс с АО. Можно предположить, что после действия γ -лучей на клетки дрожжей реакция адаптивного ответа, представляющего воздействие на клетки повреждающего агента в малых дозах, практически не вызывающих повреждений увеличивает мсек-ЗЭС АО. Для исследования влияния γ -лучей на клетки был использован и другой флуоресцентный зонд (АНС). В представленной работе в клетках дрожжей, подвергнутых воздействию γ -излучения, исследовано влияние возбуждающего света на мсек-ЗЭС АНС. Во всех опытах использовался водный раствор АНС при концентрации 10^{-6} М. При этой концентрации индукция мсек-ЗЭС АНС принимала максимальные значения. Как видно из рисунка 3, индукционная кривая мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей подвергнутых действию γ -лучей также образует S-образную форму. На рисунке 3 показаны изменения интенсивности мсек-ЗЭС АНС в клетках дрожжей от дозы γ -излучения.

При возрастании дозы излучения интенсивность мсек-ЗЭС АНС снижается. Известно, что отрицательно заряженная молекула АНС локализуется в полярной части клеточной мембраны [1, 2].

Можно считать, что уменьшение мсек-ЗЭС АНС в опытах с клетками, подвергнутыми облучению, связано с изменениями, возникшими в полярной части клеточной мембраны. При пероксидации липидов, происходящей под действием γ -лучей полярность мембраны и число радикалов увеличивается, в связи с тем, что молекула АНС заряжена отрицательно, вероятность ее соединения с мембраной уменьшается. При действии γ -лучей на кривой индукции мсек-ЗЭС АНС не образуется вершин (в отличие от мсек-ЗЭС АО), так как не образуется комплекс ($R^+ + АНС$).

Сделан вывод о том, что мсек-ЗЭС АО и АНС может быть использована для изучения влияния биогенных и абиогенных факторов среды на биологические системы, а также для биомониторинга загрязнения окружающей среды с целью ранней диагностики.

Список литературы / References:

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. М.: Наука, 1980, 320 с. [Vladimirov Y. A., Dobresov Q. E. *Fluorescent probes in the investigations of biological membranes*. Moscow: Science, 1980, 320 p. (In Russ.)]
2. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследования клеток, мембран и липопротеинов*. М.: Наука, 1989, 276 с. [Dobresov Q. E. *The fluorescent probes in the cell investigations, membranes and lipoproteins*. Moscow: Science, 1989, 276 p. (In Russ.)]
3. Chatterjee S., Kumar G.S. Binding of fluorescent acridine dyes acridine orange and 9-aminoacridine to hemoglobin: Elucidation of their molecular recognition by spectroscopy, calorimetry and molecular modeling techniques. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, pp. 169-78, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.045.
4. Drummen, G.P.C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques – Illuminating Biological and Biomedical Research. *Molecules*, 2012, vol. 17, pp. 14067-14090, DOI: 10.3390/molecules171214067.

5. Rao J., Dragulescu-Andrasi A., Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, vol. 18, pp. 17-25, DOI: 10.1016/j.copbio.2007.01.003.
6. Зюзиков Н.А., Корогодин В.И., Корогодина В.Л. Особенности действия малых доз γ -излучения на дрожжевые клетки. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 1999, т. 39, № 6, с. 619-622. [Zyuzikov N.A., Korogodin V.I., Korogodina V.L. Features of the action of small doses of γ -radiation on yeast cells. *Radiation Biology. Radioecology*, 1999, vol. 39, no. 6, pp. 619-622. (In Russ.)]
7. Спитковский Д.М. Биологическое действие малых доз ионизирующей радиации. *Радиобиология*, 1992, т. 32, № 3, с. 382-400. [Spitkovsky D.M. Biological effect of small doses of ionizing radiation. *Radiobiology*, 1992, vol. 32, no. 3, pp. 382-400. (In Russ.)]
8. Филиппович И.В. Феномен адаптивного ответа клеток в радиобиологии. *Радиобиология*, 1991, т. 31, № 3, с. 803-814. [Filippovich I.V. The phenomenon of adaptive response of cells in radiobiology. *Radiobiology*, 1991, vol. 31, no. 3, pp. 803-814. (In Russ.)]
9. Dutta K., Verma N. Exposure to low dose of gamma radiation enhances the excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1998, vol. 44, pp. 243-249.
10. O'Haver T.C Development of luminescence spectrometry as an analytical tool. *Journal of Chemical Education*, 1978, vol. 55, no. 7, pp. 423-428, DOI: 10.1021/ed055p423.
11. Komarova L.N., Lyapunova E.R., Amosova N.V., Sorokina I.V. Adaptive response of yeast cells after ionizing radiation exposure. *J. Medical and Biological Problems*, 2015. vol. 2, no. 14, p. 59-65
12. Libkind D. [et al.] Radio-adaptive response in human lymphocytes. *Radiobiology*, 2002, vol. 2, pp. 38-43.
13. Тарусов Б.Н., Веселовский В.А. *Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение*. М.: Изд-во МГУ, 1978, 150 с. [Tarusov B.N., Veselovsky V.A. *Super weak irradiation of plants and their applied value*. Moscow: pub. MSU, 1978, 150 p. (In Russ.)]
14. Гумматова С.Т., Кочарли Н.К. *Флуоресцентные зонды в исследовании влияния модификаторов на клетки*. Монография, Lap Lambert Academic Publishing, 2014, 148 с.
15. Kocharli N.K., Hummatova S.T. The influence of γ -irradiation on the msec-delayed light emission fluorescent probe in yeast cells. *Journal of Interciencia*, 2017, vol. 42 no. 10, pp. 32-42.

MSEC- DELAYED LIGHT EMISSION OF FLUORESCENT PROBES IN YEAST CELLS

Kocharli N.K., Hummatova S.T.

Biophysics and Molecular Biology department, Baku State University
Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ 1148, Azerbaijan; e-mail: sam_bio@mail.ru

Abstract. It was shown that acridine orange (AO, ANS) introduction into the living yeast cells promotes the appearance of excitable msec-delayed light emission (DLE) in them. The kinetics of delayed light emission AO, ANS in yeast cells has inductive character, is described by S-shaped curve, and its intensity depends on the dye concentration.

At work was used photometric installation allowing to register msec-DLE. At our investigation work has been studied msec-DLE AO intensity in yeast cells after γ -irradiation of various doses (5 gr, 20 gr, 50 gr, 100 gr). It was determined that, the kinetic intensity indications of msec-DLE AO change depending on γ -irradiation doses. The investigation of γ -irradiation on msec-DLE AO in cells showed that, msec-DLE AO intensity in cells previously illuminated decreases compared with non-irradiated ones and changes the form of induction curve under the influence 5 gr. dose.

It was identified that, after γ -irradiation influence on yeast cells at low doses, practically not causing any damage, msec-DLE AO increase. By increasing irradiation doses msec-DLE ANS intensity decreases. It was supposed that, msec-DLE AO and ANS can be used to investigate the influence of biogenic and not biogenic factors of medium in biological systems, and also for biomonitoring of pollution in environmental medium with the aim of early diagnostics.

Key words: yeast cells, AO, ANS, msec-DLE, γ -irradiation.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИБКОСТИ ОСНОВНОЙ ЦЕПИ БЕЛКА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ АПОМИОГЛОБИНА

Мажорина М.А., Мельник Б.С.

Институт белка РАН

Ул. Институтская, 4, г. Пуцзино, 142290, РФ; e-mail: MariaMazhorina@yandex.ru

Поступила в редакцию: 14.06.2018

Аннотация. Апомиоглобин – удобная модель для *in vitro* исследований сворачивания/разворачивания глобулярных белков. В данной работе представлены результаты кинетических исследований сворачивания/разворачивания мутантных форм апомиоглобина с заменами остатков пролина в двух его петлях на глицин (P37G и P120G), а также удлинение петли (в положении 120) на три и шесть остатков глицина (P120(3G) и P120(6G)). Для всех белков измерены кинетические кривые денатурации и ренатурации, рассчитаны константы скоростей сворачивания/разворачивания, построены их зависимости от концентрации денатуранта (шеvronные графики), рассчитаны свободные энергии всех состояний апомиоглобина. Полученные данные о кинетических свойствах мутантных форм апомиоглобина позволили изучить влияние гибкости и длины выбранных петель на энергетический профиль белка. В частности, показано, что все исследованные мутации дестабилизируют промежуточное состояние апомиоглобина относительно развернутого состояния.

Ключевые слова: апомиоглобин, сворачивание белка, триптофановая флуоресценция, эксперименты остановленного потока, шевронный график, энергетический профиль.

Апомиоглобин является удобной моделью для изучения сворачивания/разворачивания глобулярных белков *in vitro*. Этот небольшой альфа-спиральный белок с молекулярной массой 17 кДа содержит 153 аминокислотных остатка, 65 % из которых входят в состав α -спиралей [1]. На сегодняшний день апомиоглобин достаточно хорошо изучен. Многочисленные исследования позволили установить ряд основных характеристик этого белка. В частности, в процессе сворачивания апомиоглобина выделяют две стадии (быстрая и медленная фазы), первая из которых связана с очень быстрым формированием из развернутого состояния компактного промежуточного интермедиата типа расплавленной глобулы, обладающего гидрофобным ядром с нативоподобной спиральной структурой [2, 3]. Медленная, скорость – лимитирующая, фаза связана с переходом белка из расплавленной глобулы в нативное состояние [2]. Кинетические эксперименты, основанные на измерении флуоресценции триптофана с использованием приставки остановленного потока, не позволяют рассчитать скорость образования расплавленной глобулы, поскольку ее формирование происходит за «мертвое время» прибора (порядка нескольких микросекунд). В связи с этим, в нашей лаборатории разработан экспериментальный подход к анализу кинетических данных многостадийно сворачивающихся белков [2], который позволяет получать информацию о населенности промежуточного состояния белка в зависимости от концентрации денатуранта. Полученные с помощью такого подхода данные могут быть использованы для оценки стабильности состояния расплавленной глобулы.

Важно отметить тот факт, что кинетический интермедиат сворачивания апомиоглобина аналогичен по структуре расплавленной глобуле, наблюдаемой при pH 4.2 в равновесных экспериментах [3].

Кроме того, данные ЯМР-анализа указывают, что некоторые мутации способны изменить путь сворачивания апомиоглобина [4], что вызвано изменением структуры кинетического интермедиата сворачивания [5].

В предыдущих работах, выполненных в нашей лаборатории, сделаны систематические исследования по выяснению влияния разных видов мутаций на энергетический профиль апомиоглобина [2, 6-9]. Методами кругового дихроизма и флуоресценции установлено, что ни одна из более 20 исследованных одиночных замен аминокислотных остатков ни в ядре, ни на поверхности апомиоглобина существенно не изменила стабильность промежуточного состояния типа расплавленной глобулы [6, 8, 9]. Следует подчеркнуть, что это промежуточное состояние выявляется при сворачивании большинства белков. Поэтому знание о его стабильности и особенностях сворачивания необходимо для понимания самоорганизации большинства белковых молекул.

Возникает вопрос, а можно ли вообще какими-то мутациями повлиять на стабильность промежуточного состояния апомиоглобина?

Мы предположили, что такое влияние должны оказывать мутации, затрагивающие конформационные особенности белка, в частности, подвижность и компактность его структуры. Например, замены аминокислотных остатков в петлях, соединяющих элементы вторичной структуры апомиоглобина. Введение глицинов для «гибкости», а также удлинение петель за счет нескольких глицинов может повлиять на взаимодействие элементов вторичной структуры в состоянии расплавленной глобулы.

Для проверки этой гипотезы мы спроектировали мутации в апомиоглобине с заменами остатков пролина в двух его петлях (в 37 и 120 положении) на глицин (P37G, P120G), а также удлинение петли в районе 120 аминокислотного остатка на 3 и 6 остатков глицина (P120(3G), P120(6G)). Петля, в которой находится P120, расположена между спиралью, формирующейся при переходе апомиоглобина из развернутого состояния в

состояние расплавленной глобулы [3]. Петля, в которой находится P37, соединяет спирали, формирующиеся при переходе белка из состояния расплавленной глобулы в нативное состояние.

Экспериментальная часть. На основе плазмиды, несущей ген апомиоглобина дикого типа, были получены плазмиды, несущие гены мутантных форм апомиоглобина с выбранными заменами аминокислотных остатков. Рекомбинантные белки выделены и очищены в соответствии с методами, которые были применены нами в предыдущих работах [2, 6-9]. Влияние мутаций на структуру нативного состояния апомиоглобина оценивалось с помощью метода кругового дихроизма (КД) в дальней ультрафиолетовой (УФ) области. Слабое отличие спектров КД мутантных белков от спектра белка дикого типа свидетельствует о том, что введенные нами замены аминокислотных остатков практически не повлияли на структуру нативного состояния апомиоглобина (графики не приведены). Влияние указанных выше замен аминокислотных остатков на скорости сворачивания/разворачивания апомиоглобина при разных концентрациях мочевины изучали методом триптофановой флуоресценции, используя приставку остановленного потока. Для всех белков были получены кинетические кривые денатурации и ренатурации. Все измерения проводили при 11 °С с использованием 20 мМ натрий-фосфатного буфера при pH 6.2. Методика измерений подробно описана в наших предыдущих работах [2, 6-9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Напомним, что сворачивание апомиоглобина включает быструю и медленную (скорость-лимитирующую) фазы. Быстрая фаза сворачивания, соответствующая переходу белка из развернутого состояния в промежуточное состояние ($U \leftrightarrow I$), происходит за «мертвое время» прибора, вследствие чего ее скорость невозможно измерить. Получаемые экспериментально кривые сворачивания апомиоглобина позволяют рассчитать только константу скорости медленной фазы сворачивания, соответствующей переходу белка из промежуточного состояния (I) в нативное состояние (N). Для расчета видимых констант скоростей кинетические кривые медленной фазы сворачивания и разворачивания апомиоглобина аппроксимировались в программе Sigma Plot, согласно формуле (1):

$$y = A * \exp(-k_{app} * t) + C, \quad (1)$$

где k_{app} – значение видимых (apparent) констант скоростей сворачивания и разворачивания; A и C – параметры кривой; t – время реакции.

Рассчитав видимые константы скоростей, можно построить шевронные графики - зависимость логарифма видимых констант скоростей от концентрации денатуранта.

На рисунке 1 показаны шевронные графики апомиоглобина дикого типа и его мутантных форм.

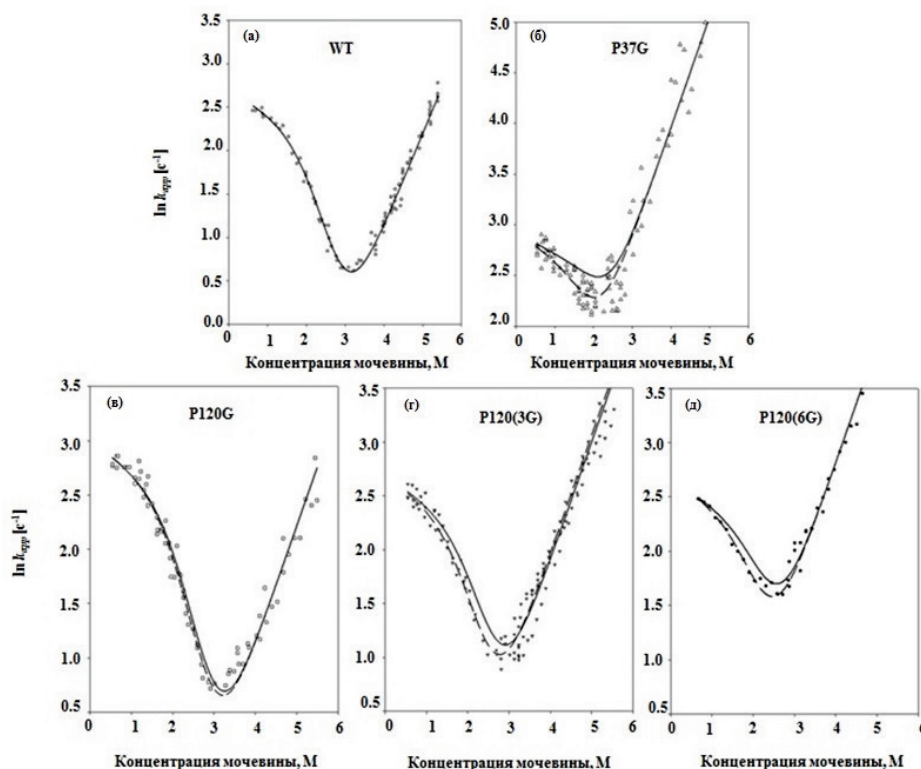


Рисунок 1. Шевронные графики зависимости видимой константы скорости сворачивания/разворачивания апомиоглобина дикого типа и исследуемых мутантных форм от концентрации денатуранта (обозначения на графиках)

Каждая точка на шевронных графиках соответствует натуральному логарифму видимой константы скорости сворачивания или разворачивания, рассчитанной по формуле (1), при данной концентрации мочевины.

Для белков с одностадийной схемой сворачивания, видимая константа скорости на шевронном графике равна сумме констант скоростей прямой и обратной реакции:

$$k_{app} = k_f + k_u, \quad (2)$$

где k_{app} – видимая константа скорости сворачивания и разворачивания; k_f – константа скорости сворачивания; k_u – константа скорости разворачивания.

В случае апомиоглобина (сворачивающегося с образованием одного промежуточного состояния) для учета влияния быстрой фазы сворачивания на последующую медленную фазу сворачивания необходимо ввести в формулу (2) дополнительный параметр F_I – населенность промежуточного состояния, принимающий значения от 0 до 1 [2]:

$$k_{app}(x) = k_f(x) * F_I(x) + k_u(x), \quad (3)$$

где $F_I(x)$ – населенность промежуточного состояния; x – концентрация мочевины.

В общем виде запишем уравнение, которое мы использовали для аппроксимации шевронных графиков:

$$y = \ln(k_f(x) * F_I(x) + k_u(x)), \quad (4)$$

здесь

$$k_f(x) = A_f * x + B_f, \quad (5)$$

$$k_u(x) = A_u * x + B_u, \quad (6)$$

$$F_I(x) = 1 / (1 + \exp((X_i - x) / S_i)), \quad (7)$$

где A_f , B_f , A_u , B_u – параметры прямых, описывающих истинные значения констант скоростей медленной фазы сворачивания и разворачивания апомиоглобина, X_i и S_i – параметры S-образной кривой, описывающей населенность промежуточного состояния: X_i – середина сигмоиды, S_i – наклон сигмоиды [2].

Если предположить, что путь сворачивания мутантных форм апомиоглобина не изменился по сравнению с белком дикого типа, тогда при аппроксимации во всех шевронных графиках должен быть одинаковый наклон веток сворачивания (параметр A_f), одинаковый наклон веток разворачивания (параметр A_u) и одинаковые параметры населенности промежуточного состояния (X_i и S_i) [2]. Изменится только положение веток сворачивания и разворачивания (параметры B_f и B_u), которое достаточно точно определяется из эксперимента при низких и высоких концентрациях мочевины («вес» точек на краях шевронного графика больше, чем в середине). Таким образом, при аппроксимации шевронных графиков, мы используем достаточно много ограничений.

На рисунке 1 сплошной черной линией показана аппроксимация экспериментальных данных (шеvronных графиков) с вышеописанными ограничениями в уравнении. Видно, что для мутантных белков середина шевронных графиков описывается плохо. Самые большие отличия наблюдаются для белка с заменой пролина 37 на глицин (рис. 1(б)) и для белка с петлей в положении 120, удлиненной на шесть глицинов (рис. 1(д)). Такие отличия могут означать, что исследованные нами мутации повлияли именно на стабильность промежуточного состояния апомиоглобина относительно развернутого состояния.

Если «снять» ограничение параметра X_i , связанного со стабильностью промежуточного состояния, то все экспериментальные данные аппроксимируются очень хорошо (пунктирные линии на рисунке 1). Таким образом, можно сделать вывод, что исследованные мутации повлияли на стабильность промежуточного состояния апомиоглобина относительно развернутого состояния.

Аппроксимация шевронных графиков позволяет рассчитать параметры, которые позволяют построить профили свободной энергии, наглядно представляющие, на какие из состояний белка повлияла каждая из мутаций (рис. 2, 3).

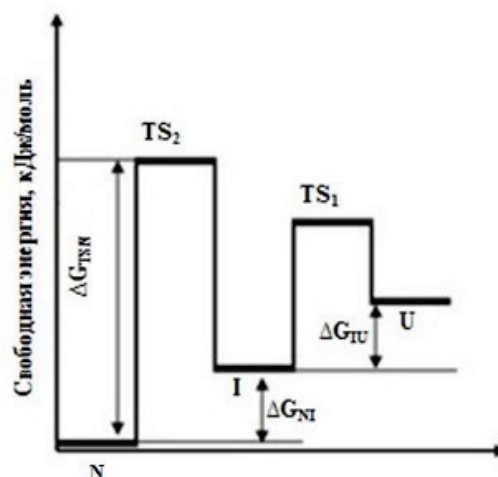


Рисунок 2. Схема профиля свободной энергии (N – нативное состояние белка, I – промежуточное состояние, U – развернутое состояние, TS₁ и TS₂ – первое и второе переходные состояния, ΔG_{TSN} , ΔG_{NI} , ΔG_{IU} – изменение свободной энергии)

Формулы для построения энергетического профиля:

$$\Delta G_{IU} = -RT \ln(F_I / (1 - F_I)), \quad (8)$$

$$\Delta G_{NI} = -RT \ln(k_f / k_u), \quad (9)$$

$$\Delta G_{TSN} = -RT [\ln(k_u) - \ln(RT/h)], \quad (10)$$

где F_I – населенность промежуточного состояния; k_f – константа скорости сворачивания; k_u – константа скорости разворачивания; R – универсальная газовая постоянная; T – температура в К; h – постоянная Планка.

На рисунке 3 обозначены экспериментально полученные профили свободной энергии апомиоглобина дикого типа и исследуемых мутантных форм в 2.1 М мочевины.

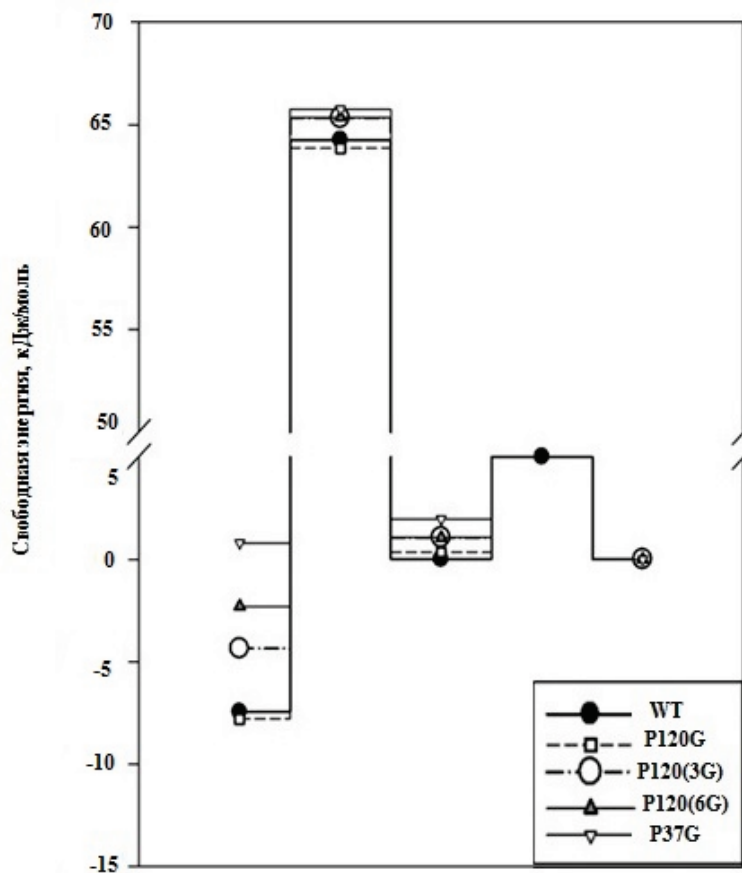


Рисунок 3. Профили свободной энергии апомиоглобина дикого типа и исследуемых мутантных форм

Видно, что исследованные мутантные формы апомиоглобина по-разному влияют на стабильность нативного и переходного состояний белка, но все они в той или иной степени дестабилизируют промежуточное состояние относительно развернутого состояния белка.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Нами было изучено сворачивание/разворачивание мутантных форм апомиоглобина с заменами остатков пролина в двух его петлях на глицин (P37G и P120G), а также удлинение петли (в положении 120) на три и шесть остатков глицина (P120(3G) и P120(6G)). Для всех мутантных форм белка были построены шевронные графики (зависимость видимых констант скоростей денатурации и ренатурации от концентрации денатуранта) и рассчитаны свободные энергии нативного, переходного и промежуточного состояний. Результаты проведенных экспериментов показали, что исследованные мутации, введенные в петли, соединяющие элементы вторичной структуры апомиоглобина, дестабилизируют состояние расплавленной глобулы белка относительно развернутого состояния.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00307 мол_а.

Список литературы / References:

1. Gast K., Damaschun H., Misselwitz R., Muller-Frohne M., Zirwer D., Damaschun G. Compactness of protein molten globules: temperature-induced structural changes of the apomyoglobin folding intermediate. *Eur. Biophys. J.*, 1994, vol. 23, pp. 297-305.
2. Baryshnikova E.N., Sharapov M.G., Kashparov I.A., Ilyina N.B., Bychkova V.E. Investigation of apomyoglobin stability depending on urea and temperature at two different pH values. *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 39, pp. 292-297.
3. Jennings P.A., Wright P.E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science*, 1993, vol. 262, pp. 892-896.
4. Garcia C., Nishimura Ch., Cavagnero S., Dyson H.J., Wright P.E. Changes in the apomyoglobin pathway caused by mutation in the distal histidine residue. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, pp. 11227-11237.
5. Nishimura C., Dyson H.J., Wright P.E. Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 355, pp. 139-156.
6. Samatova E.N., Katina N.S., Balobanov V.A., Melnik B.S., Dolgikh D.A., Bychkova V.E., Finkelstein A.V. How strong are side chain interactions in the folding intermediate? *Protein Sci.*, 2009, vol. 18, pp. 2152-2159.
7. Samatova E.N., Melnik B.S., Balobanov V.A., Katina N.S., Dolgikh D.A., Semisotnov G.V., Finkelstein A.V., Bychkova V.E. Folding intermediate and folding nucleus for I-N and U-I-N transitions in apomyoglobin: contributions by conserved and nonconserved residues. *Biophys. J.*, 2010, vol. 98, pp. 1694-1702.
8. Melnik T.N., Majorina M.A., Larina D.S., Kashparov I.A., Samatova E.N., Glukhov A.S., Melnik B.S. Independent of Their Localization in Protein the Hydrophobic Amino Acid Residues Have No Effect on the Molten Globule State of Apomyoglobin and the Disulfide Bond on the Surface of Apomyoglobin Stabilizes This Intermediate State. *Plos.one*, 2014, vol. 9, e98645.
9. Мажорина М.А., Глухова К.А., Марченков В.В., Мельник Б.С. Влияние аминокислотных замен на поверхности апомиоглобина на энергетический профиль белка. *Молекулярная биология*, 2018, т. 52, № 1, с. 62-72. [Majorina M.A., Glukhova K.A., Marchenkov V.V., Melnik B.S. Effect of substitutions in surface amino acids on energy profile of apomyoglobin. *Molecular biology*, 2018, vol. 52, no. 1, pp. 62-72 (In Russ.)]

STUDIES OF THE EFFECT OF FLEXIBILITY OF THE POLYPEPTIDE CHAIN OF PROTEIN ON THE ENERGY PROFILE OF APOMYOGLOBIN

Majorina M.A., Melnik B.S.

Institute of protein research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: MariaMazhorina@yandex.ru

Abstract. Apomyoglobin is a convenient model for in vitro studies of folding/unfolding of globular proteins. Herein we describe the results of kinetic studies of folding/unfolding of mutant forms of apomyoglobin with substitutions of proline residues on its two loops (P37G and P120G) by glycine as well as loop extension in position 120 by three and six glycine residues (P120(3G) and P120(6G)). For all proteins, we measured kinetic denaturation and renaturation curves, calculated rate constants of folding/unfolding, plotted their dependences on the denaturant concentration (chevron plots) and computed free energies of all states of apomyoglobin. The obtained data on the kinetic properties of mutant forms of apomyoglobin allowed us to analyze the effect of flexibility and length of chosen loops on the energy profile of the protein. Specifically, it was demonstrated that the studied mutations destabilized the intermediate state of apomyoglobin as compared to the unfolded state.

Key words: apomyoglobin, protein folding; tryptophan fluorescence, stopped-flow experiments, chevron plot, energy profile.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РЯДА ПРЯНОСТЕЙ ИЗ НАЦИОНАЛЬНОЙ КУХНИ АЗЕРБАЙДЖАНА

Чырагова С.Р., Абдуллаев Х.Д., Агаларов Р.И.

Бакинский Государственный Университет

ул. ак. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: chyragova71@mail.ru

Поступила в редакцию: 14.06.2018

Аннотация. В представленной работе впервые были изучены антиоксидантные (АО) и антирадикальные (АР) свойства ряда пряностей, широко используемых в Азербайджанской кухне. С этой целью были использованы настойки гвоздики (*Syzgium aromaticum*), тмина (*Nigella sativa*), зиры (*Cuminum cymin*) шафрана (*Crocus sativus*), приготовленные на спирту. Исследования проводили с использованием метода, основанного на способности и степени тушения стабильного свободного радикала DPPH (2,2 дифенил-1-пикрилгидрозил) и на хемилюминесцентной модели. Анализ IC₅₀ для образцов пряностей по отношению IC₅₀ стандартного тушителя тролокса (аналога витамина Е) и хемилюминесценции показал, что образцы пряностей по эффективности АО и АР, располагаются в следующей последовательности: шафран > гвоздика > зира > тмин.

Ключевые слова: пряности, метод DPPH, антирадикальная активность (АРА), хемилюминесценция.

Одним из важнейших факторов связи человека с внешней средой является питание. Обеспечение безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов-одно из основных направлений, определяющих здоровье населения и сохранение его генофонда. Говоря о безопасности продуктов питания, необходимо в первую очередь ставить вопрос об экологически чистом сырье для их производства и, конечно, о самом продукте. В последние годы ведутся исследования по определению антиокислительной и антирадикальной активности пряностей и кулинарных растений [1]. Еще в средневековой литературе существуют целые разделы, посвященные натуральным источникам сырья, в частности пряностям, для медицинских целей. В последнее время резко возрос интерес к антиокислительным и антирадикальным свойствам и потенциальной антиокислительной мощности растительной пищи их продуктов природной и технологической переработки. Эти свойства растений и их продуктов играют важную роль в поддержании здоровья, в качестве фактора защиты от негативных воздействий. Эти свойства включены во многие технологические процессы получения биологически активных добавок, а также как добавки в процесс приготовления пищи с целью увеличения времени ее сохранности и повышения качества [2]. В данной работе приводятся результаты исследования экстрактов пряностей, широко используемые в национальной кулинарии Азербайджана, на предмет их АО и АР активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись экстракты пряностей, широко используемые в национальной кухне Азербайджана. С этой целью были использованы экстракты гвоздики (*Syzgium aromaticum*), тмина (*Nigella sativa*), зиры (*Cuminum cymin*) и шафрана (*Crocus sativus*), приготовленные на спирту. Экстракты из пряностей приготавливали растиранием их в керамической ступке до порошкообразного состояния. В полученный порошок сразу же добавляли 40% этиловый спирт в соотношении (1:10). Настаивали при температуре 15-20 °С, периодически перемешивая в течении суток. В течении эксперимента настойку хранили в холодильнике. Жидкая фаза отделялась от осадка путем фильтрования. Исследования АО активности экстрактов пряностей проводилось методом хемилюминесцентной пероксидазной модельной системы, основанной на окислении пирогаллола перекисью водорода в реакции, катализируемой пероксидазой хрена [3]. Антирадикальную активность экстрактов пряностей производили на основе измерения степени тушения свободного радикала DPPH (2,2- дифенил-1-пикрилгидразида) по изменению плотности при 517 нм [4]. По мере восстановления DPPH происходит изменение его окраски от интенсивно - фиолетового до соломенно-желтого. Одним из основных показателей, характеризующих АР активность является IC₅₀-концентрация антиоксиданта, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование радикала DPPH. В качестве стандартного тушителя радикальных состояний использовался тролокс (синтетический аналог витамина Е), широко, используемый в пищевой и фармакологической промышленности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 приведены данные, указывающие концентрацию экстрактов пряностей, способные тушить на 50 % стабильный DPPH радикал.

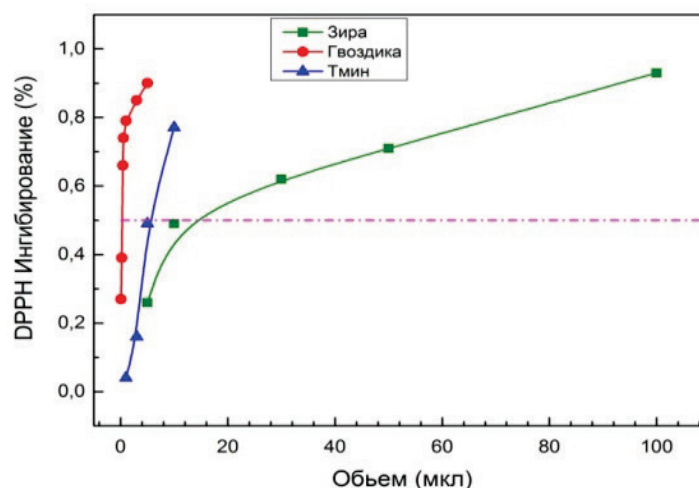


Рисунок 1. Эффективность тушения свободных радикалов спиртовым экстрактом ряда пряностей. Пунктирная линия – 50 % ингибирование свободных радикалов DPPH тролоксом

Эксперименты с экстрактами пряностей гвоздики (*Syzgium aromaticum*), тмина (*Nigella sativa*) и зиры (*Cuminum cyminum*) показали, что наиболее эффективным в качестве тушителя радикальных состояний является экстракт гвоздики, где $IC_{50} = 0,2$ мкл концентрации исходного материала. Наименее выражено антирадикальное действие для экстракта зиры, при $IC_{50} = 20$ мкл концентрации исходного материала. Для экстракта тмина IC_{50} составляет 5 мкл концентрации исходного материала при прочих равных условиях.

Антиокислительную активность пряностей измеряли хемилюминесцентным методом с использованием различных концентраций экстрактов гвоздики, тмина и зиры – 2,5 %, 5 % и 10 % (табл. 1). Как видно из таблицы в начале реакции 2,5 %-ный экстракт гвоздики ингибирует свечение на $4 \pm 0,8$ у. е. по отношению к контролю; 5 %-ный на $2,6 \pm 0,9$ у. е.; а 10 %-ый на $1,4 \pm 1,2$ у. е. от $7 \pm 0,3$ по отношению к контролю. 2,5 %-ный экстракт из семян тмина ингибирует на $3,2 \pm 0,9$ у. е.; 5% на $2,2 \pm 1,1$ у. е.; 10 % на $1,8 \pm 0,8$ у. е. по отношению к контролю $5,3 \pm 0,3$ у. е. 2,5 %-ный экстракт зиры ингибирует на $3 \pm 0,7$ у. е.; 5 %-ный на $2,7 \pm 0,8$ у. е.; 10 %-ный раствор на $2,1 \pm 1,1$ у. е. относительно контроля $4,25 \pm 0,7$ у. е.

Анализируя полученные результаты, можно сделать заключение о том, что более высокой АО и АР активностями обладает экстракт гвоздики по отношению к исследуемым образцам экстрактов тмина и зиры, значения которых убывают по ряду: **гвоздика > тмин > зира**. Ряд авторов свидетельствуют о содержании в гвоздике органических соединений, придающих ей антиоксидантные и антирадикальные свойства [5]. Из фенольных соединений присутствуют: кверцетин, рутин, кверцитрин, кемферол, лютеолин, эвгеноль, катехин. Такая высокая антиоксидантная и антирадикальная активности экстракта гвоздики проявляются, вероятно, благодаря такому богатому составу.

Были исследованы сравнительные АО активности водно-спиртовых экстрактов, приготовленные из рылец шафрана и лепестков шафрана на ХЛ модели (рис. 2).

Таблица 1. Показатели начальной скорости хемилюминесцентной реакции ($E+S+H_2O_2+AO$) под влиянием различных концентраций экстрактов пряностей по отношению к контролю

Образцы экстрактов пряностей	Контроль	Концентрация экстракта		
		2,5 %	5 %	10 %
		Хемилюминесценция (у. е)		
гвоздика	$7 \pm 0,3$	$4 \pm 0,8$	$2,6 \pm 0,9$	$1,4 \pm 1,2$
тмин	$5,3 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,9$	$2,2 \pm 1,1$	$1,8 \pm 0,8$
зира	$4,25 \pm 0,7$	$3 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,8$	$2,1 \pm 1,1$

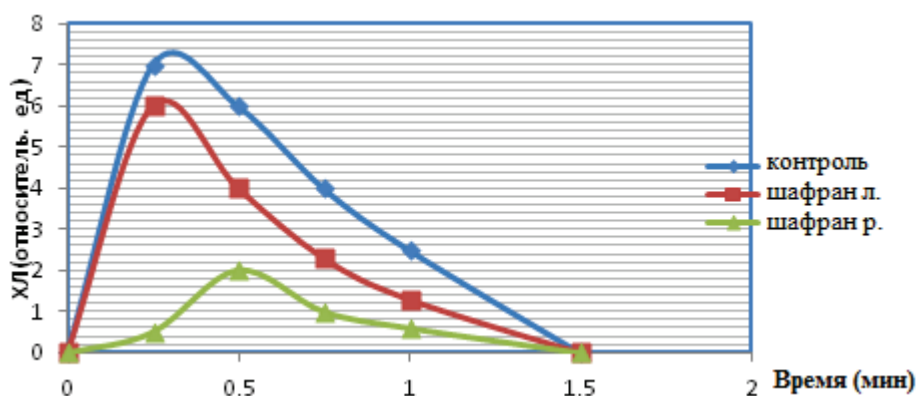


Рисунок 2. Кинетическая картина развития ХЛ реакции (E+S+ H₂O₂+ АО) без добавок (контроль) и в присутствии водно- спиртового экстракта из лепестков и рылец шафрана

Как видно из рисунка, экстракт из лепестков проявляет низкую АО активность, по сравнению с экстрактом из рылец шафрана. У 2,5 % экстракта из рылец шафрана ингибирование на $0,35 \pm 1,7$ у.е. от $5 \pm 0,4$ у.е. по отношению к контролю, а у 2,5 % экстракта из лепестков шафрана $4,7 \pm 1,3$ у.е. от $5 \pm 0,4$ у.е. по отношению к контролю. Сравнительный анализ АО активности 2,5 %-ных водно-спиртовых экстрактов пряностей показал, что наибольшим эффектом обладает экстракт шафрана, а именно его рыльца. Согласно литературным данным в состав натурального эфирного масла растения *Crocus sativus* входит уникальный для данной культуры летучий компонент – сафрональ (до 70 вес. %), очень сильный природный антиоксидант, являющийся продуктом гидролиза гликозида пикрокроцина. На основании полученных данных, можно предположить, что такая активность связана именно с присутствием в рыльцах шафрана сафроналя, входящего в состав эфирных масел. Таким образом обе модели охарактеризовали пряности, как натуральные природные источники материалов, имеющих в своем составе сильные антиокислители и тушители свободных радикалов. Выявлены наиболее перспективные пряности, экстракты которых могут использоваться как натуральные источники АО и АР, необходимых для поддержания здоровья. Установлено, что соединениями, обладающими этими свойствами наиболее богаты рыльца шафрана, цветочные бутоны гвоздичного дерева и семена тмина. Тычинки и лепестки шафрана и семян зиры в меньшей степени проявляют эти свойства.

Обобщая, полученные в результате исследований данные можно считать целесообразным высказать предложение о полезности при планировании индивидуальной и семейной «здоровой» диеты, включать в баланс питания продукты, обладающие антиокислительными свойствами и способными нейтрализовать кислородные и органические свободные радикалы.

Список литературы / References:

1. Яшин Я.И. [и др.] Антиоксидантная активность специй и их влияние на здоровье человека. *Сб. мат. 9 Меж. симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты»*, Москва, 2015, с. 700-705. [Yashin Ya.I., [et al.] Antioxidant activity of spices and their effect on human health. *Proceedings of 9 Inter. symposium "Phenolic compounds: fundamental and applied aspects"*, Moscow, 2015, pp. 700-705. (In Russ.)]
2. Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., [et al.] Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*, 2007, vol. 104, pp. 1635-1640.
3. Chapple I.L., [et al.] Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Ann. Clin. Biochem.*, 1997, vol. 34, pp. 412-421.
4. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol.*, 1995, vol. 28, pp. 25-30.
5. Atawodi S. E., [et. al.] Assessment of the polyphenol components and in vitro antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L). *Merr. & Perry. EJEAChe. J.*, 2011, vol. 10, pp. 1970-1978.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIOXIDATING AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF A SPICE RAW
OF THE NATIONAL CUISINE OF AZERBAIJAN

Chyragova S.R., Abdullaev Kh.D., Agalarov R.I.

Baku State University

ac. Z. Khalilov str., 23, Baku, AZ1148, Azerbaijan; e-mail: chyragova71@mail.ru

Abstract. Antioxidant (AO) and antiradical (AR) qualities of some species used in Azerbaijani food culture were examined in present analysis. The AO and AR quality so selected species were proved by methods of DPPH (2,2diphenyl-1-picrylhydrosil) and chemiluminescence (XC). The alcohol-diluted models of following spices were used in that purpose: carnation (*Syzygium aromaticum*), caraway (*Cuminum Cyminum*), black bread grass (*Nigella sativa*) and saffron (*Crocus sativus*). Their AO and AR qualities were examined. The qualities of selected spices to react on DPPH stable radical and XL can be lined up as following: saffron > carnation > black bread grass > caraway

Key words: *species, DPPH assay, antiradical (AR) activity, chemiluminescence.*

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ДИМЕРИЗУЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА CLAMP МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ (SAXS)

Тихонова Е.А.¹, Бончук А.Н.¹, Качалова Г.С.², Георгиев П.Г.¹, Максименко О.Г.¹

¹Институт биологии гена РАН

ул. Вавилова, д. 34/5, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: errinaceus@rambler.ru

²ФИЦ Биотехнологии РАН

Ленинский проспект, д. 33, г. Москва, 119071, РФ

Поступила в редакцию: 20.06.2018

Аннотация. CLAMP – транскрипционный фактор *Drosophila*, участвующий в привлечении комплекса дозовой компенсации на специфические сайты ДНК. При помощи малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) получены данные о пространственной структуре N-концевого домена данного белка, содержащего домен типа «цинковый палец» и прилежащую аминокислотную последовательность с неизвестной структурой. Для этого домена ранее была показана способность к гомо-димеризации и взаимодействию с комплексом дозовой компенсации. Домен типа «цинковый палец» важен для функциональной активности N-концевого домена. Данные SAXS подтверждают, что N-концевой домен CLAMP является димером, свернут и имеет компактную симметричную структуру.

Ключевые слова: мультимеризация, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, хроматин.

Дозовая компенсация у дрозофилы осуществляется посредством увеличения уровня экспрессии генов X-хромосомы самца (X/Y) в два раза по сравнению с самками (X/X). За увеличение экспрессии генов X-хромосомы самцов отвечает мультисубъединичный комплекс дозовой компенсации (КДК), состоящий из пяти белков, MSL1, MSL2, MSL3, MOF и MLE, и двух некодирующих РНК – гоX1 и гоX2 [1]. Белки MSL1 и MSL2 создают структурную основу КДК [2, 3]. Полногеномный анализ сайтов связывания белков КДК показал, что комплекс рекрутируется в кодирующие области активно транскрибируемых генов [4, 5]. Одним из неразрешенных вопросов является, каким образом КДК специфично связывается с X-хромосомой самцов. При инактивации белков MSL3 или MLE наблюдается связывание неполного комплекса MSL1-MSL2 с определенным и воспроизводимым набором, состоящим из примерно 200 сайтов на X-хромосоме, которые были названы сайтами первичного связывания (СПС) [6]. Наиболее вероятным механизмом привлечения КДК является присутствие в составе СПС-сайтов для TF, которые участвуют в специфичном связывании с КДК. В скрининге транскрипционных факторов, определяющих способность СПС-элемента стимулировать транскрипцию в культуре клеток S2, был найден белок CLAMP, который содержит семь доменов «цинковые пальцы» C2H2-типа [7]. In vitro было показано, что часть белка, содержащая с 4 по 7 C2H2-домены, специфично связывается с GA-повторами [8]. Полногеномный ChIP-seq анализ показал, что белок CLAMP связывается с районами СПС, но одновременно имеет более 5 000 сайтов по всему геному, большая часть из которых распределена на аутосомах [8]. В настоящее время предполагается, что CLAMP совместно с белком MSL2 участвует в привлечении КДК на СПС.

На N-конце белка Clamp находится одиночный домен типа «цинковый палец» C2H2-типа, окруженный последовательностями, не имеющими выраженной гомологии с известными белковыми доменами. Цинковые пальцы C2H2-типа обычно участвуют в связывании ДНК, однако имеются данные и о том, что они могут принимать участие в белок-белковых взаимодействиях, в том числе и в димеризации. Однако структурные данные для таких взаимодействий отсутствуют. Предварительные исследования в дрожжевой двугибридной системе показали, что N-концевой домен Clamp обладает способностью к мультимеризации. Анализ делеционных мутантов выявил, что C2H2-домен важен для правильного функционирования данного домена, вместе с 30-аминокислотной последовательностью, примыкающей к этому домену. Эта же последовательность участвует во взаимодействии с коровым компонентом MSL-комплекса – белком MSL2. Учитывая очень широкую распространенность доменов C2H2 у высших многоклеточных, и слабую изученность их способности к белок-белковым взаимодействиям, структурные данные о таком взаимодействии представляет большой интерес. Формирование димеров было подтверждено при помощи гель-фильтрации и химической сшивки с помощью глутаральдегида.

Дальнейшее исследование N-концевого домена белка Clamp проводилось при помощи метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (SAXS). Эксперимент проводился на источнике рентгеновского излучения BM29 BioSAXS в ESRF (Гренобль, Франция). Измерения проводились при длине волны 0.099 нм, концентрация белка варьировалась от 2.3 до 11.8 мг/мл. Радиус гирации (R_g) белковой молекулы в растворе был рассчитан при помощи аппроксимации Гинье при малых углах ($s < 1.3/R_g$, $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$, где 2θ – угол рассеяния), интенсивность $I(s)$ принималась равной $I_0 \exp(-sR_g^2/3)$. Для оценки максимального размера частиц D_{max} , функция парных расстояний $P(r)$ была рассчитана при помощи алгоритма GNOM из программного пакета ATSAS (рис. 1А, Б). Молекулярный вес молекул был рассчитан исходя из исключенного объема гидратированных белковых молекул по закону Поро для гомогенных частиц.

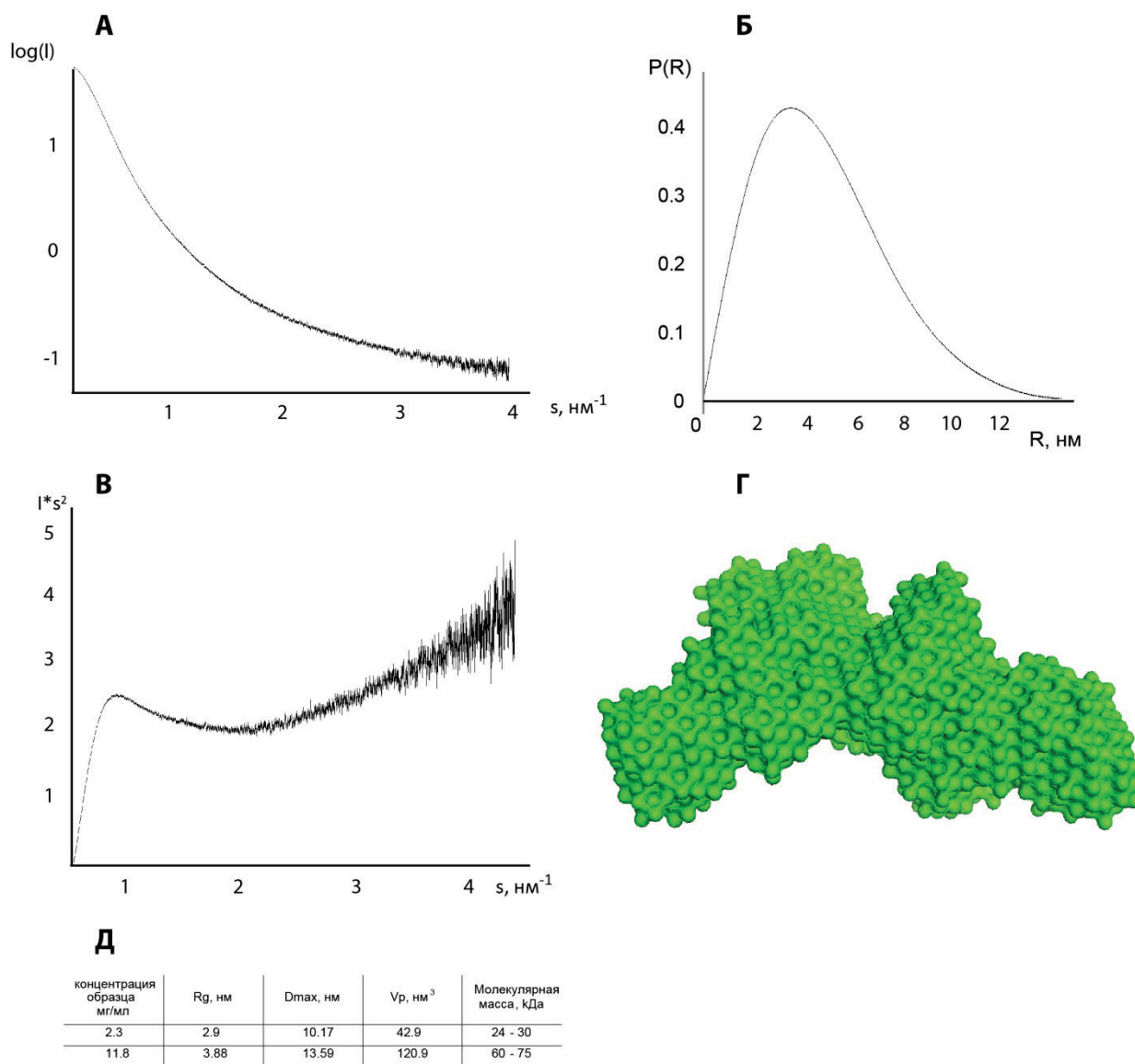


Рисунок 1. Результаты эксперимента по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей N-концевого домена белка Clamr в растворе (1-153 ак, мол. масса мономера 17 кДа). А) Кривая распределения интенсивности рассеяния (2,3 мг/мл); Б) График функции парных расстояний (2,3 мг/мл); В) График Кратки (2,3 мг/мл); Г) Одна из возможных *ab initio* моделей низкого разрешения при концентрации 2,3 мг/мл; Д) Рассчитанные параметры олигомеров N-концевого домена белка Clamr в растворе (мол. масса мономера 17 кДа) при разных концентрациях образца

В результате эксперимента в зависимости от концентрации образца были получены следующие значения: $R_g = 2,9-3,9$ нм, $D_{max} = 10,2-13,7$ нм, что соответствует молекулярной массе 25-35 кДа при концентрации 2,3 мг/мл и 60-75 при 11,8 мг/мл (рис. 1Д) и подтверждает формирование димеров (молекулярная масса мономера составляет 17 кДа) и указывает на формирование олигомеров более высокого порядка при высокой концентрации, однако учитывая высокую концентрацию, при которой наблюдается их сборка, можно заключить, что данные тетрамеры имеют достаточно невысокую константу диссоциации и не являются физиологическими их появление по всей видимости связано с высокой концентрацией и заморозкой-разморозкой образца.

Дальнейший анализ проводился для данных, полученных при концентрации 2,3 мг/мл. Для анализа структурированности исследуемого домена проводился анализ графика Кратки ($I \times s^2$ относительно s), форма которого сильно зависит от степени свернутости исследуемого белка. Для структурированных полипептидов характерна куполообразная форма кривой при малых значениях s , в то же время для развернутых полипептидов кривая имеет логарифмическую форму. Данные представлены на рисунке 1В. Как видно, для N-концевого домена Clamr характерно наличие небольшого куполообразного изгиба, что свидетельствует о том, что часть аминокислотной цепи не структурирована. *Ab initio* модели низкого разрешения для белка Clamr (1-153 ак) были получены при помощи алгоритма DAMMIN из программного пакета ATSAS (рис. 1Г). Большинство моделей являются симметричными, что подтверждает формирование димеров. Каждый из мономеров состоит в

свою очередь из двух частей – одна из них участвует в формировании димера, а вторая, по всей видимости, не имеет структуры. Сопоставление данных моделей с известными кристаллическими структурами C2H2-доменов также позволяет предположить, что C2H2-домен находится вблизи димерного интерфейса, поскольку его размеры слишком велики и не позволяют предположить присутствия цинкового пальца в части домена, не участвующей в формировании димера. Полученные данные хорошо соотносятся с результатами анализа делеционных мутантов и подтверждают участие C2H2-домена в белок-белковых взаимодействиях.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-74-20155).

Список литературы / References:

1. Kuroda M.I., Hilfiker A., Lucchesi J.C. Dosage Compensation in Drosophila—a Model for the Coordinate Regulation of Transcription. *Genetics*, 2016, vol. 204, pp. 435-450.
2. Hallaceli E., Lipp M., Georgiev P., Spielman C., Cusack S., Akhtar A., Kadlec J. Msl1-mediated dimerization of the dosage compensation complex is essential for male X-chromosome regulation in Drosophila. *Mol Cell*, 2012, vol. 48, pp. 587-600.
3. Kadlec J., Hallaceli E., Lipp M., Holz H., Sanchez-Weatherby J., Cusack S., Akhtar A. Structural basis for MOF and MSL3 recruitment into the dosage compensation complex by MSL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 18, pp. 142-149.
4. Alekseyenko A.A., Ho J.W., Peng S., Gelbart M., Tolstorukov M.Y., Plachetka A., Kharchenko P.V., Jung Y.L., Gorchakov A.A., Larschan E. Sequence-specific targeting of dosage compensation in Drosophila favors an active chromatin context. *PLoS Genet.*, 2012, vol. 8, e1002646.
5. Straub T., Zabel A., Gilfillan G.D., Feller C., Becker P.B. Different chromatin interfaces of the Drosophila dosage compensation complex revealed by high-shear ChIP-seq. *Genome Res.*, 2013, vol. 23, pp. 473-485.
6. Straub T., Grimaud C., Gilfillan G.D., Mitterweger A., Becker P.B. The chromosomal high-affinity binding sites for the Drosophila dosage compensation complex. *PLoS Genet.*, 2008, e1000302.
7. Larschan E., Soruco M.M., Lee O.K., Peng S., Bishop E., Chery J., Goebel K., Feng J., Park P.J., Kuroda M.I. Identification of chromatin-associated regulators of MSL complex targeting in Drosophila dosage compensation. *PLoS Genet.*, 2012, vol. 8, e1002830.
8. Marcela M.I., Chery J., Bishop E.P., Siggers T., Tolstorukov M.Y., Leydon A.R., Sugden A.U., Goebel K., Feng J., Xia P., Vedenko A., Bulyk M.I., Park P.J. and Larschan E. The CLAMP protein links the MSL complex to the X chromosome during Drosophila dosage compensation. *Genes & development*, 2013, vol. 27, pp. 1551-1556.

STRUCTURAL STUDIES OF N-TERMINAL DIMERIZATION DOMAIN OF CLAMP PROTEIN USING SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)

Tikhonova E.A.¹, Bonchuk A.N.¹, Kachalova G.S.², Georgiev P.G.¹, Maksimenko O.G.¹

¹ Institute of gene biology RAS

Vavilova str., 34/5, Moscow, 119334, Russia; e-mail: errinaceus@rambler.ru

² Research Center of Biotechnology RAS

Leninsky prospekt, 33, Moscow, 119071, Russia

Abstract. CLAMP is Drosophila transcription factor involved in the recruitment of Dosage Compensation Complex. Spatial structure of N-terminal domain of CLAMP protein from Drosophila was studied using small-angle X-ray scattering (SAXS). This domain contains zinc-finger and adjacent amino-acid sequence with unknown structure. Earlier dimerization activity and binding of dosage compensation complex were shown for this domain. SAXS data confirm dimer formation and provide insight into the structure of the domain, which is folded, and have compact symmetrical structure.

Key words: multimerization, small-angle X-ray scattering, chromatin.

МОДИФИКАЦИЯ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ДЛЯ СИНТЕЗА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Глухова К.А., Кляшторный В.Г., Мельник Б.С.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пушкино, 142290, РФ; e-mail: gkseniya@gmail.com

Поступила в редакцию: 22.06.2018

Аннотация. В настоящее время антимикробные пептиды являются конкурентоспособной альтернативой классическим антибиотикам. Их широкое использование ограничивается рядом проблем, связанных с наработкой токсичных пептидов в клетках *E. coli* и их доставкой в целевой сайт в организме. В данной работе проверена идея, которая помогла бы решить эти проблемы. Мы предположили, что зеленый флуоресцентный белок можно использовать как контейнер для «хранения» антибактериального пептида. Изначально, внутри бочонка зеленого флуоресцентного белка «спрятана» альфа-спираль, на которой образуется хромофор. В самой альфа-спирали есть гидрофильные аминокислоты, рядом, в середине бочонка, множество молекул связанной воды. Поэтому, мы предположили, что центральная альфа-спираль зеленого флуоресцентного белка может быть заменена на альфа-спиральный антибактериальный пептид. Реализация такой идеи достаточно сложна и на первом этапе возникают несколько вопросов, без ответа на которые невозможна дальнейшая работа в намеченном направлении. Будет ли зеленый флуоресцентный белок с замененной альфа-спиралью сворачиваться? Возможно ли при этом образование хромофора? Токсична ли такая конструкция для клетки? В данной работе была выполнена модификация зеленого флуоресцентного белка. Центральная альфа-спираль была заменена на последовательность антимикробного пептида бактенецина. Результаты наших экспериментов показывают, что такой химерный (мутантный) белок компактен, растворим, не токсичен для клетки. Однако он сильно дестабилизирован, вероятно, поэтому не образуется хромофор. Полученные результаты показывают, что идея об использовании зеленого флуоресцентного белка как «контейнера» для небольших пептидов вполне может быть реализована.

Ключевые слова: *зеленый флуоресцентный белок, антимикробные пептиды, бактенецин, молекулярная динамика.*

Антимикробные пептиды (АМП) представляют амфипатические молекулы, состоящие в основном из положительно заряженных и гидрофобных аминокислот. АМП взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами плазматической мембраны бактерий и формируют поры в мембране, что приводит к потере мембранного потенциала и в итоге к гибели клетки. Действие пептидов направленно на широкий ряд патогенов, таких, как бактерии, грибы, вирусы [1]. Исследование и внедрение АМП в терапевтическую практику ограничиваются рядом проблем, связанных с их производством и применением. Так, антибактериальная активность затрудняет их продукцию в бактериальной культуре. Альтернативные способы получения (эукариотические продуценты, химический синтез или очистка из природных источников) значительно повышают затраты на производство. Современные подходы основаны на снижении токсичности АМП за счет синтеза в неактивной форме. Для этого пептиды нарабатывают в бактериальной культуре в виде химерных белков, где вспомогательный белок или пептид (тиоредоксин, SUMO, PurF и др.) нейтрализуют действие АМП [2].

Другая проблема связана с быстрой деградацией пептидов после введения в организм. Для решения этой проблемы предложены варианты защиты пептидов от протеолиза путем инкапсуляции в липосомах или полимерных частицах [3].

Оптимальным решением обеих проблем может быть применение носителя для АМП, устойчивого к действию протеаз и способного полностью изолировать пептид от окружающей среды во время синтеза и доставки пептида в целевой сайт организма. С этой точки зрения, зеленый флуоресцентный белок GFP представляется одним из наиболее перспективных объектов. GFP состоит из 238 аминокислот, свернутых в серию 6 альфа-спиралей и 11 бета-слоев, соединенных петлями. Антипараллельные бета-слои образуют цилиндр, внутри которого располагается альфа-спираль с хромофором. Считается, что бочонок из бета-слоев служит защитой для хромофора от ингибиторов и протеаз [4]. Известно, что GFP устойчив к действию протеаз [5]. Несмотря на плотную упаковку, внутри белка есть свободное пространство, в котором обнаруживаются молекулы воды [6]. Также, внутри GFP могут задерживаться ионы солей [7]. Микроокружение хромофора богато заряженными остатками и некоторые из них ответственны за удержание ионов внутри «бочонка».

Особенности структуры GFP позволили нам предположить, что центральную альфа-спираль этого белка можно попытаться заменить на альфа-спиральный чужеродный пептид. Ранее Kent и соавт. уже была сделана попытка заменить центральную альфа-спираль GFP похожей спиралью другого GFP-подобного белка. В результате авторам удалось «переставить» спирали разных белков. При этом белки оставались структурированными, и наблюдалась флуоресценция созревших хромофоров [8]. Данные результаты подтверждают наше предположение.

Для замены альфа-спирали мы выбрали пептид бактенецин. Он относится к группе антимикробных пептидов, синтезируется нейтрофилами и активен против грамотрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* [9]. Выбор основывался на длине и расположении гидрофильных и гидрофобных аминокислот в аминокислотной последовательности бактенецина.

Создание полноценной системы синтеза и доставки антимикробных пептидов, пригодной для практического использования, является трудоемкой, многостадийной задачей. Целью данной работы была проверка возможности создания такой системы на основе GFP, где синтезированный токсичный пептид изолирован от окружающей среды внутри белка.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн гибридного белка выполнен с помощью программы RasMol (<http://www.rasmol.org>).

Оптимизация последовательности гибридного белка выполнена с помощью метода молекулярной динамики программой Gromacs 4.5.3 [10], силовые поля Charmm27. В качестве стартовой модели для молекулярной динамики использовали пространственную структуру 1B9C [11] из банка белковых структур (PDB: <https://www.rcsb.org/>). Полученная модель помещалась в орторомбический водный бокс размером 65 x 65 x 65 Å, содержащий молекулы воды типа TIP3P. Водный бокс выстраивали так, чтобы от крайних атомов в каждом из направлений до края водного бокса расстояние составляло, по крайней мере, 12 Å. Для проверки качества полученных параметров использовали сравнение стереохимических показателей структуры, полученных после 270 нс молекулярной динамики. По ходу траекторий не наблюдалось значительных отклонений координат белка от стартовой конформации. Структура GFP флуктуировала в районе своего равновесного положения. Среднеквадратичные отклонения для всех атомов системы не превышали 3 Å (не более 2 Å для Ca-атомов белков) по ходу всех траекторий.

Для анализа влияний мутаций на структуру белка рассчитали 300 нс молекулярно-динамические траектории при постоянной температуре 300 K и давлении 1 атм. Все расчеты проводили с использованием ресурсов Межведомственного суперкомпьютерного центра (МСЦ РАН, www.jscc.ru). Координаты системы сохраняли и анализировали каждую 1 пс.

Фрагмент ДНК, кодирующий гибридный белок GFP-бактенецин, синтезировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами. Фрагмент кДНК клонировали в экспрессионном векторе pET28a по сайтам рестрикции Nde I и EcoRI. Направленный мутагенез выполнен, как описано ранее [7].

Рекомбинантные белки были наработаны в клетках *E. coli* штамм BL21(DE3). Синтез белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 mM при ОП культуры 0,5 OE. Клетки культивировали в течение 16 ч при 18 °C. Клеточные осадки ресуспендировали в буфере, содержащем 20 mM Трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier (Германия). Клеточные лизаты центрифугировали при 20 тыс. g в течение 30 мин. Супернатант и осадок анализировали с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы был сконструирован гибридный белок GFP-бактенецин, где часть аминокислот внутренней альфа-спирали GFP заменена на аминокислоты бактенецина. При этом в последовательность бактенецина были добавлены три аминокислоты S, Y, G, которые в зеленом флуоресцентном белке образуют хромофор. На рисунке 1 показана структура GFP, а также последовательности бактенецина, альфа-спирали GFP и гибридного белка GFP-бактенецин. В последовательностях бактенецина и GFP видно (рис. 1Б) очень похожее расположение и чередование гидрофильных и гидрофобных аминокислот, характерное для альфа-спиралей глобулярных водорастворимых белков.

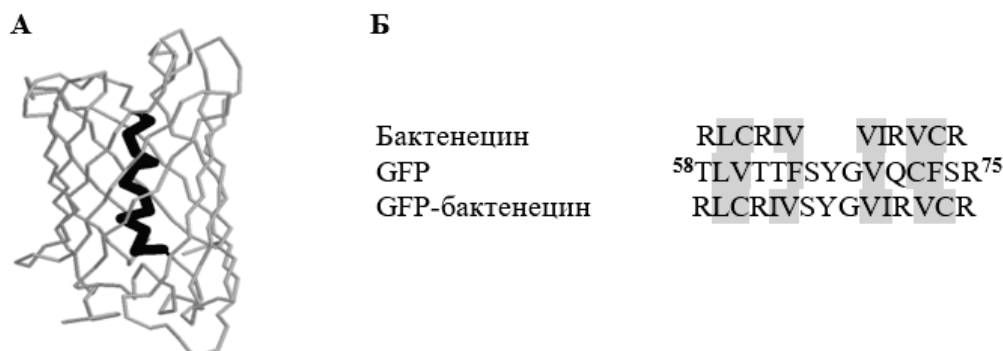


Рисунок 1. А. Структура GFP. Черным цветом выделена альфа-спираль; Б. Выравнивание последовательностей альфа-спирали GFP, гибридного белка GFP-бактенецин и бактенецина. Серым цветом отмечены гидрофобные аминокислоты

Тем не менее, вставка бактенецина вместо центральной альфа-спирали, которую мы спроектировали, меняет большинство аминокислот в самой середине зеленого флуоресцентного белка (рис 1А). Поэтому, первой задачей нашей работы было выяснить, возможно ли принципиально сворачивание GFP с множественными заменами в центральной альфа-спирали.

Гибридный белок наработали в бактериальной культуре *E. coli*. Было установлено, что белок GFP-бактенецин синтезируется в значительном количестве и не токсичен для культуры-продуцента. При этом клетки не флуоресцировали, то есть в гибридном белке не образовывался хромофор. После ультразвуковой дезинтеграции клеток-продуцентов GFP-бактенецин обнаруживался во фракции нерастворимого белка (рис. 2). Это свидетельствует о том, что GFP-бактенецин нестабилен и агрегирует (модификация приводит к нарушению сворачивания и агрегации).

Поскольку GFP дикого типа сильно агрегирует при повышенной температуре или в присутствии денатурантов [4, 12], мы предположили, что причиной агрегации химерного белка может быть дестабилизация структуры. Для поиска мутаций, которые стабилизируют GFP-бактенецин, улучшат его сворачивание и, тем самым, уменьшат агрегацию, было выполнено моделирование пространственной структуры GFP методом молекулярной динамики. Анализ структуры белка GFP-бактенецин методом молекулярной динамики и сравнение ее со структурой белка дикого типа показали, что замены трех аминокислот вполне могли бы стабилизировать этот белок.

Мы провели моделирование структуры белка с заменами F8D, I167D, Q177E, которое показало, что выбранные замены действительно улучшают компактность белка и, возможно, стабилизируют его. На рисунке 3 показана структура белка GFP-бактенецин (рис. 3А) смоделированная методом молекулярной динамики и структура белка GFP-бактенецин с дополнительными стабилизирующими мутациями F8D, I167D, Q177E (рис. 3Б). Видно, что структура белка GFP-бактенецин «разрушается» по сравнению с белком дикого типа. Моделирование белка GFP-бактенецин с дополнительными мутациями показало, что выбранные мутации могут стабилизировать структуру белка.

В результате был сконструирован оптимизированный вариант GFP-бактенецин с аминокислотными заменами F8D, I167D, Q177E, стабилизирующими структуру белка. В процессе наработки в бактериальной культуре оптимизированный белок не оказывал токсического действия на клетки. В отличие от предыдущего варианта оптимизированный белок обнаруживался во фракции растворимого белка после ультразвуковой дезинтеграции клеток (рис. 3В). Таким образом, введенные замены стабилизировали структуру белка и снизили агрегацию. К сожалению, ни клеточная культура, ни выделенный белок (из фракции растворимых белков) не флуоресцировали. Это свидетельствует о том, что в модифицированном GFP не образуется хромофор.

Тем не менее, полученные результаты говорят о том, что GFP вполне может быть использован как «контейнер» для токсичных пептидов. Экспериментальные (в этой работе и [7]) и теоретические исследования, выполненные с помощью метода молекулярной динамики, показывают, что изменения в центральной альфа-спирали и замена внутри белка большого числа гидрофильных или гидрофобных аминокислот дестабилизируют белок, но не «запрещают» такому белку приобрести компактную структуру, близкую к структуре белка дикого типа.

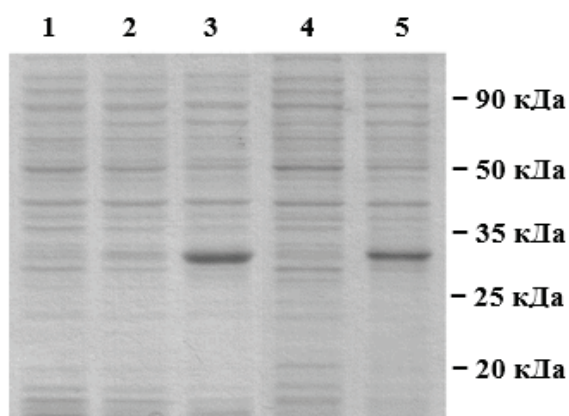


Рисунок 2. Электрофореграмма образцов клеток, продуцирующих GFP-бактенецин: 1. Клетки до индукции синтеза белка; 2. Клетки через 2 ч после индукции синтеза белка; 3. Клетки через 4 ч после индукции синтеза белка; 4. Фракция растворимого белка; 5. Фракция нерастворимого белка

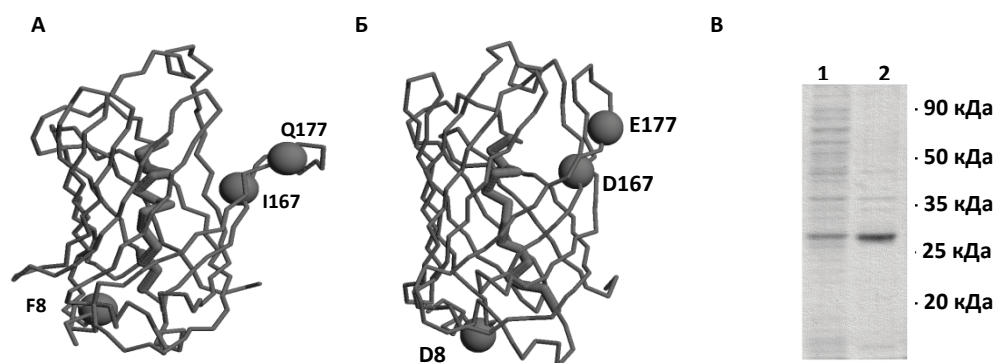


Рисунок 3. А. Структура белка GFP-бактенецин смоделированная методом молекулярной динамики; Б. Оптимизированная структура белка GFP-бактенецин; В. Электрофореграмма образцов клеток, продуцирующих GFP-бактенецин. 1. Клетки до индукции синтеза белка; 2. Клетки через 4 ч после индукции синтеза белка; 3. Фракция растворимого белка; 4. Фракция нерастворимого белка

Авторы выражают благодарность Глухову Анатолию Сергеевичу за помощь в конструировании экспрессионных векторов. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00313.

Список литературы / References:

1. Hancock R.E., Haney E.F., Gill E.E. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*, 2016, vol. 16, pp. 321-334.
2. Li Y. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* *Biotechnol. Appl. Biochem*, 2009, vol. 54, pp. 1-9.
3. Urbán P., Valle-Delgado J.J., Moles E., Marques J., Díez C., Fernández-Busquets X. Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. *Curr Drug Targets*, 2012, vol. 13, pp. 1158-1172.
4. Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, vol. 67, pp. 509-544.
5. Bokman S.H., Ward W.W. Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, vol. 101, pp. 1372-1380.
6. Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 1996, vol. 273, pp. 1392-1395.
7. Glukhova K. F., Marchenkov V.V., Melnik T. N., Melnik B. S. Isoforms of green fluorescent protein differ from each other in solvent molecules 'trapped' inside this protein. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, vol. 35, pp. 1215-1225.
8. Kent K.P., Oltrogge L.M., Boxer S. G. Synthetic Control of Green Fluorescent Protein *J Am Chem Soc*, 2009, vol. 131, pp. 15988-15989.
9. Wu M., Hancock R.E. Interaction of the Cyclic Antimicrobial Cationic Peptide Bactenecin with the Outer and Cytoplasmic Membrane, *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, pp. 29-35.
10. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 2015, vol. 1, pp. 19-25.
11. Battistutta R., Negro A., Zanotti, G. Crystal structure and refolding properties of the mutant F99S/M153T/V163A of the green fluorescent protein. *Proteins*, 2000, vol. 41, pp. 429-437.
12. Stepanenko O. V., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K. Beta-Barrel Scaffold of Fluorescent Proteins: Folding, Stability and Role in Chromophore Formation. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, vol. 302, pp. 221-278.

MODIFICATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR SYNTHESIS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Glukhova K.A., Kljashtorny V. G., Melnik B.S.

Institute of protein research RAS

Institutskaya Str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: gkseniya@gmail.com

Abstract. At present antimicrobial peptides are a competitive alternative to classic antibiotics. Their wide use is limited to a number of problems associated with the generation of toxic peptides in *E. coli* cells and their delivery to the target site in the organism. We have verified the idea that could help solving this problem. We proposed that green fluorescent protein can be used as a container for “storage” of an antibacterial peptide. An alpha-helix on which a chromophore is formed is initially “hidden” inside the barrel of green fluorescent protein. The alpha-helix itself contains hydrophobic amino acids, and nearby in the center of the barrel there are many bound water molecules. Therefore we suggested that the central alpha-helix of green fluorescent protein can be substituted for an antibacterial peptide. It is rather difficult to realize this idea, and at the first stage there appear several issues without solving which it is impossible to continue the studies as required. Will green fluorescent protein with the substituted alpha-helix fold? Can the chromophore be formed in this case? Is this construction toxic to the cell? We modified green fluorescent protein. The central alpha-helix was substituted by the sequence of antimicrobial peptide batenecin. The results of our experiments show that such a chimera (mutant) protein is compact, soluble, nontoxic to the cell. However it is strongly destabilized, which may be a reason why the chromophore is not formed. Our results demonstrate that the idea to use green fluorescent protein as a “container” for small peptides is quite realizable.

Key words: green fluorescent protein, antibacterial peptides, batenecin, molecular dynamics.

ВОЗМОЖНОСТИ СЕПАРАЦИИ КЛЕТОК МЕТОДОМ БЕСКОНТАКТНОГО БАРЬЕРНОГО ДИЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Сорокина О.Н.¹, Подойницын С.Н.¹, Климов М.А.¹, Левин И.И.², Симакин С.Б.²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e.mail: alsiona@gmail.com

²ООО «ИОНТЕК-нано»
Нагорный проезд, 7, г. Москва, 117105, РФ

Поступила в редакцию: 25.05.2018

Аннотация. Предложена конструкция сепарационного устройства и метод разделения микробиологических образцов в устройствах, реализующих барьерный бесконтактный диэлектрофорез. Принцип работы сепарационного устройства основан на формировании диэлектрофоретических барьеров в объеме сепарационной камеры, благодаря чему разрабатываемый метод отличается высокой производительностью и простотой использования по сравнению с традиционными планарными системами диэлектрофореза. Кроме того, особенностью метода можно назвать отсутствие контакта разделяемых образцов с проводящими элементами электродной структуры. Проведено компьютерное моделирование распределения напряженностей электрических полей в области формирования диэлектрофоретических барьеров, а также показано влияние толщины изолирующего покрытия на диэлектрофоретические свойства барьеров. На основании данных компьютерного моделирования проведены оценки сил, действующих на частицу (клетку дрожжей диаметром 7 мкм) в сепарационной камере. Теоретически предсказана и экспериментально подтверждена возможность задерживания клеток на ДЭФ барьерах на примере дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Ключевые слова: сепарация клеток, бесконтактный барьерный диэлектрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Манипулирование биологическими частицами имеет важное значение для развития множества отраслей науки и техники [1-4].

Для захвата фокусировки и сепарации микро- и наночастиц наряду с оптическими [5], механическими [6] и магнитными [7] методами могут использоваться методы пространственного разделения частиц с помощью электрических полей [8, 9]. Воздействие электрического поля позволяет эффективно управлять движением клеток в потоке. Основными методами манипулирования биологическими частицами в электрических полях можно назвать электрофорез (ЭФ) [9] и диэлектрофорез (ДЭФ) [8].

Метод диэлектрофореза основан на перемещении микрочастицы в переменном или постоянном неоднородном электрическом поле, вызванном взаимодействием между индуцируемым диполем в микрочастице и внешним электрическим полем [4, 10, 11]. Практически все частицы могут проявлять диэлектрофоретическую активность в присутствии градиентных электрических полей. Метод диэлектрофореза находит свое применение для разделения клеточных культур, органелл ДНК и др. [4, 10, 11].

В настоящее время для сепарации микробиологических объектов методом диэлектрофореза используется ряд подходов, таких как ловушки, фракционирование в потоке в присутствии поля, разделение в бегущей волне, захват на непроводящих структурах, бесконтактный ДЭФ и диэлектрофорез барьерного типа [12-17].

Наиболее перспективным с точки зрения своей производительности можно назвать ДЭФ барьерного типа, при реализации которого градиентные электрические поля формируются в объеме сепарационной камеры, а не только вдоль плоскости с электродами, как это характерно для ДЭФ устройств планарного типа. Основной принцип работы сепарационного устройства барьерного типа основан на формировании узких барьеров градиентного электрического поля, непроницаемых для частиц, подверженных сильному диэлектрофоретическому воздействию [17, 19]. Развитие ДЭФ барьерного типа может быть направлено как на разработку дизайна новых электродных структур эффективных для решения конкретной задачи, так и на модификацию и объединение свойств различных методик ДЭФ разделения для расширения возможностей сепарационного процесса. В случае бесконтактного ДЭФ в разделительном микроэлементе создается электрическое поле с использованием электродов, отделенных от образца тонким изолирующим слоем [16, 20]. Электроды с изолирующим покрытием можно рассматривать как плоские конденсаторы, внутри которых создается электрическое поле, проникающее через покрытие, при приложении переменного напряжения к обкладкам. Основным преимуществом бесконтактного ДЭФ является отсутствие контакта между металлом электрода и биологическим образцом. Отсутствие контакта между электродами и жидкостью пробы внутри канала предотвращает образование пузырьков и минимизирует загрязнение среды.

Объединение ДЭФ барьерного типа и бесконтактного ДЭФ может стать перспективным методом ДЭФ сепарации, который будет обладать достоинствами обоих методов ДЭФ сепарации.

В настоящей работе была предложена концепция сепарационного устройства, основанная на объединении принципов барьерного бесконтактного диэлектрофореза. Эффективность работы такого ДЭФ устройства, а

также его применимость для сепарации биологических объектов были показаны теоретически и экспериментально.

Теоретические основы диэлектрофоретического разделения. На частицу, обладающую диэлектрическим моментом в потоке, проходящем через сепарационную камеру, будут действовать разнонаправленные силы – диэлектрофоретическая сила (F_{DEP}) и гидродинамическая сила (влекущая сила потока) (F_{drag}).

$$F_{drag} = 6\pi R\eta v, \quad (1)$$

где R – радиус частицы; η – динамическая вязкость среды; v – линейная скорость потока.

Усредненная во времени диэлектрическая сила (F_{DEP}), действующая на сферическую частицу, может быть определена из выражения:

$$F_{DEP} = 2\pi R^3 \varepsilon_0 \varepsilon_m \operatorname{Re}[CM_f(\omega)] |\nabla|E|^2|, \quad (2)$$

где R – радиус частицы; ε_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума; ε_m – электропроницаемость среды; $|\nabla|E|^2|$ – градиент квадрата напряженности электрического поля; $\operatorname{Re}[CM_f(\omega)]$ – действительная часть константы Клаузиуса-Мосотти (CM_f), которая характеризует соотношение диэлектрических свойств среды (ε_m^*) и частицы (ε_p^*):

$$CM_f = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}. \quad (3)$$

Значение константы CM_f может варьироваться в пределах от 1 до $-0,5$ для сферических частиц. Знак перед константой CM_f определяет направление действия диэлектрофоретической силы. Положительные значения константы соответствуют положительному ДЭФ (р-ДЭФ) и частица втягивается в область увеличивающегося электрического поля, отрицательные, соответственно отрицательному ДЭФ (н-ДЭФ), когда частицы выталкиваются из области высокого градиентного электрического поля.

Электропроницаемость ε^* описывает комплексную переменную частотной зависимости величины константы CM_f :

$$\varepsilon^* = \varepsilon_0 \varepsilon_p - j \frac{\sigma}{\omega}, \quad (4)$$

где ε_p – электропроницаемость материала (клетки); σ – электропроводность материала (клетки); ω – угловая частота приложенного электрического поля.

Выражения (3) и (4) пригодны для расчета величины диэлектрофоретического воздействия на частицу с однородными диэлектрическими свойствами по всему объему. Клетки микроорганизмов имеют более сложную структуру и представляют собой многослойные системы, каждый слой которой имеет свои диэлектрические свойства.

В этом случае для расчета величины ДЭФ воздействия используют модифицированные выражения для константы CM_f для многослойной модели клетки эллиптической формы [21].

Эффективное удержание частиц и управление их движением возможно в случае, когда проекции сил на направление потока $F_{DEP} \geq F_{drag}$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Сепарационное устройство. Конструкция предлагаемого сепарационного устройства состоит из двух пластин с электродами, формирующими сепарационную камеру (30 x 10 мм), разделенную тонкой (0,05 мм) диэлектрической прокладкой. Структура электродов представляет собой мелкую штриховку чередующихся параллельных токопроводящих линий шириной 100 мкм и диэлектрических промежутков шириной 200 мкм, ориентированных под углом 60° к потоку, вводимой суспензии. В работе использовались пластины с изолирующим покрытием и без него. Диэлектрическое тонкопленочное покрытие карбида кремния наносилось методом осаждения из ионного пучка с источником ионов типа END-HALL с холодным катодом на специализированном вакуумном стенде (Ion Beam Deposition).

Перед осаждением диэлектрической пленки производилась очистка поверхности образца пучком ускоренных ионов аргона с энергией до 1 кэВ. При этом ток пучка ионов аргона составлял 100-120 мА. Время процесса очистки – 20 минут. При нанесении диэлектрической пленки карбида кремния (SiC) в разрядную камеру источника ионов напускался гексаметилдисилоксан ($C_6H_{18}OSi_2$) до достижения давления $3,0 \cdot 10^{-1}$ Па.

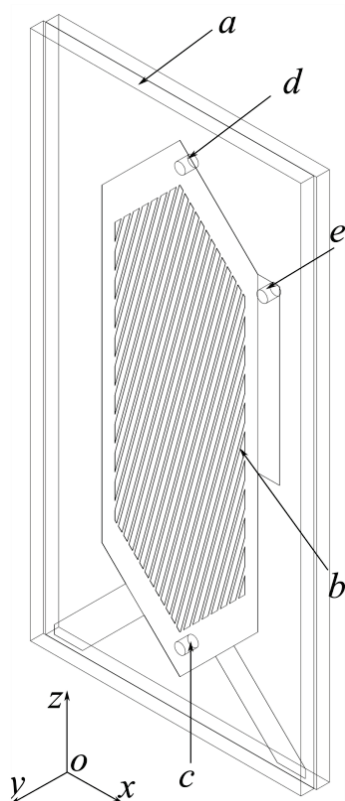


Рисунок 1. Схема ячейки барьерного ДЭФ

При этом в разрядной камере под действием электронного удара происходил распад молекул гексаметилдисилоксана и ионизация распавшихся частей молекул. Образовавшиеся ионы через систему экстракции ионного пучка источника ионов ускорялись и направлялись на объект обработки, на поверхности которого осаждалась диэлектрическая пленка. Энергия ионов составляла 1,2-1,5 кэВ, ток ионов в пучке – 150-160 мА. Суммарное время нанесения диэлектрического покрытия составило 10 часов. В результате удавалось получить устойчивое однородное диэлектрическое покрытие толщиной 4-6 мкм.

Разрабатываемое сепарационное устройство (рис. 1) имеет одно входное отверстие для подачи суспензии (с) разделяемых частиц в сепарационную камеру и два выводных отверстия для забора фракций образцов с сильным (е) и слабым (d) ДЭФ эффектом. Переменный электрический сигнал подается на входные электроды (b) сепарационного устройства, расположенные на корпусе сепаратора (a).

2. Сепарационная установка. Сепарационная установка для ДЭФ сепарации включает в себя предлагаемое сепарационное устройство, подключенное к системе подачи образца и электрического сигнала.

Входное отверстие сепарационной камеры с помощью трубок соединяется с системой подачи образца, которая состоит из шприца, установленного в инфузионный насос (SN-50C6, Китай). Инфузионный насос используется для регулирования скорости подачи пробы в диапазоне 0,1-400 мл/ч. Для тестовых экспериментов была выбрана скорость подачи 20 мл/ч.

Для подачи напряжения и регулирования его амплитуды используется генератор переменного напряжения UNI-T (UTG9010C) (Китай), клеммы которого подключают к электродам сепаратора (рис. 1b). Генератор позволяет устанавливать частоту напряжения в широком диапазоне 1-10⁸ Гц, а амплитуду – в диапазоне 0,01-20 В. В настоящей работе частота равна 100 кГц, амплитуда сигнала варьировали в диапазоне 1-20 В, форма импульса – прямоугольная (меандр). Контроль амплитуды и частоты осуществляется при помощи цифрового осциллографа OWON HDS2062-MN (Китай).

3. Подготовка и анализ пробы. Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* (ООО «САФ-НЕВА»-LESAFFRE, Россия) были выбраны в качестве объекта для тестирования возможностей метода барьерного бесконтактного ДЭФ. Навеску замороженных дрожжевых клеток нагревали до комнатной температуры и растворяли в деионизованной воде MilliQ так чтобы массовая концентрация клеток составляла 0.5 мг/мл. Средний диаметр дрожжевых клеток составлял 7 мкм.

Подготовленную суспензию дрожжевых клеток объемом 10 мл подавали в камеру сепарационного устройства со скоростью прокачки 20 мл/ч. В экспериментах последовательно отбирали из выходных отверстия (рис. 1d) ячейки контрольную фракцию образца клеток, проходящих через сепарационное устройство без электрического поля и экспериментальную фракцию образца при подключенном электрическом поле. Экспериментальная фракция представляет собой фильтрат без частиц или с частицами со слабым ДЭФ эффектом. Частицы, подвергающиеся значительному ДЭФ воздействию, концентрировались в специальном «депо» и выводились через выходное отверстие (рис. 1e) после отключения электрического поля посредством

вымывания из «депо» остатками сепарируемой суспензии со скоростью прокачки 400 мл/ч. Объем каждой фракции образца составлял 1 мл.

Изменение относительной концентрации клеток в суспензии в процессе сепарации определяли фотометрически [22]. Ранее было показано, что фотометрический метод дает хорошие корреляции ($r = 0,980$) с методами прямого микроскопического подсчета окрашенных клеток [23]. Измерения интенсивностей поглощения образцов проводились на фотометре вертикального сканирования Anthos ht1 (Германия) на длинах волн $\lambda_{\text{abs}} = 405, 450, 540, 620, 690$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В объеме сепарационной камеры неоднородности поля, полученные за счет парной ориентации токопроводящих дорожек пластин электродов, формируют множество барьеров высокоградиентного электрического поля (ДЭФ барьеров). При работе устройства частицы движутся в потоке жидкости, встречая на своем пути ДЭФ барьеры. Частицы, обладающие сильным ДЭФ эффектом, будут задерживаться на барьере и смещаться вдоль него под действием суммарного вектора сил F_{DEP} и F_{drag} (рис. 2). Частицы со слабой или нулевой ДЭФ-активностью, могут свободно преодолевать эти барьеры вместе с потоком, не отклоняясь от исходного направления. Таким образом, происходит пространственное разделение потоков частиц с различными диэлектрофоретическими свойствами.

Направление гидродинамического потока и направление ДЭФ барьера образуют малый угол θ , что позволяет увеличивать эффективность сепарационного устройства за счет ослабления действия влекущей силы потока на частицу в соответствии с выражением:

$$F_{\text{drag}} = 6\pi R \eta v \sin(\theta). \quad (5)$$

Преимуществом предложенной конфигурации проводников является то, что ДЭФ активные частицы, преодолевшие один ДЭФ барьер, могут быть захвачены на последующих барьерах. Это позволяет увеличить расстояние между пластинами с проводниками и соответственно увеличить производительность сепаратора. Эффективность бесконтактного ДЭФ устройства барьерного типа будет зависеть от геометрических параметров электродов и сепарационной камеры таких, как: расстояние между пластинами, ширина электрода, расстояние между соседними электродами на пластине, толщина изолирующего покрытия на электродах. Предложенная конструкция позволяет за счет изменения геометрических параметров электродов и самой камеры расширять круг потенциальных объектов для разделения. Так, например, уменьшая зазор между пластинами сепаратора и, следовательно, электродами, можно уменьшать размер потенциально разделяемых объектов.

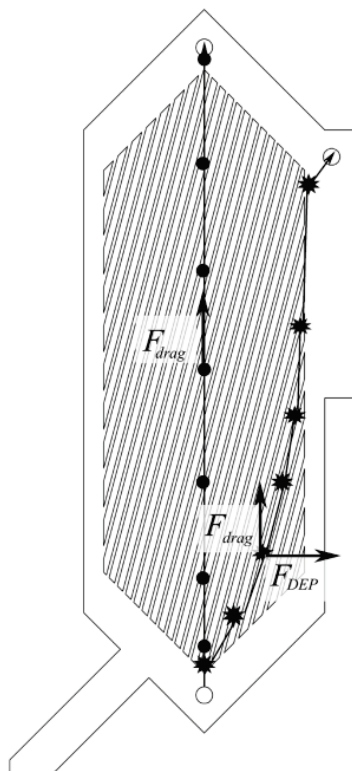


Рисунок 2. Схема распределения векторов сил, действующих на частицу со слабым (круг) и сильным ДЭФ (звезда) эффектом в потоке сепарационной камеры

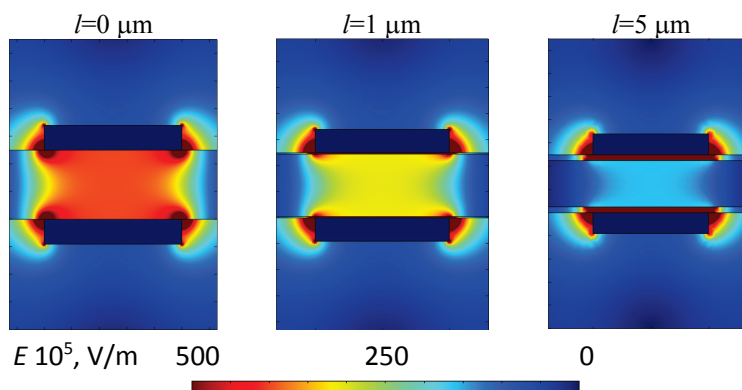


Рисунок 3. Компьютерное моделирование распределения электрического потенциала (а) и напряженности электрического поля (б) в зазоре ячейки между токопроводящими дорожками в зависимости от толщины изолирующего покрытия

1. Компьютерное моделирование сепарационного процесса. Используя средства компьютерного моделирования (ПО ElCut, ООО «ТОР», Россия), были получены визуальные изображения распределения напряженности электрического поля между электродами в зазоре сепарационной камеры рабочего образца сепарационного устройства при ориентации токопроводящих дорожек друг напротив друга. Для расчета была создана плоская модель сечения сепарационной камеры с токопроводящими дорожками шириной 100 мкм, расположенными на расстоянии 200 мкм друг от друга, расстояние между электродами составляет 50 мкм. Материал пластин – стеклотекстолит, материал электродов – медь, тонкое изолирующее покрытие – карбид кремния ($\epsilon = 9,7$), среда между пластинами – вода ($\epsilon = 80$). Расчет проводился методом конечных элементов, в плоской постановке в рамках электростатической модели при разности потенциалов между электродами противоположных пластин 20 В. На рисунке 3 приведены изолинии электрического потенциала и напряженности электрического поля, формирующегося на электродах сепарационной камеры в зависимости от толщины изолирующего покрытия.

В отсутствии изолирующего покрытия основной градиент электрического поля формируется на углах токопроводящих дорожек и убывает по направлению к центру канала. В результате, при взаимной ориентации дорожек друг напротив друга, формируются коридоры с резко убывающей или резко возрастающей напряженностью электрического поля. Границы этих коридоров представляют собой барьеры градиентного электрического поля. По мере приближения к углам дорожек градиенты электрического поля будут резко увеличиваться, и достигать своих максимумов в углу дорожки. Таким образом, каждая пара токопроводящих дорожек создает по два барьера.

При реализации барьерного разделения, частицы, отличающиеся по диэлектрическим свойствам от среды, будут задерживаться на барьере градиентного электрического поля. Частицы с негативными диэлектрофоретическими свойствами (**n**-ДЭФ) не будут проникать в область барьера, а будут двигаться «снаружи» барьера вдоль него. Частицы с пол ожительными диэлектрофоретическими свойствами (**p**-ДЭФ), наоборот, будут втягиваться внутрь барьера и двигаться вдоль него. Поскольку **p**-ДЭФ частицы двигаются в сторону увеличения напряженности электрического поля, при перемещении внутри барьера такие частицы будут демонстрировать тенденцию к притяжению к стенкам сепарационной камеры, где согласно компьютерной модели электрическое поле максимально. Частицы с **n**-ДЭФ при движении вдоль барьера будут выталкиваться в области, где согласно компьютерной модели электрическое поле минимально.

При нанесении тонких изолирующих покрытий характер распределения электрического поля не изменяется, однако, на электродах устройства происходит частичное экранирование приложенного электрического потенциала. В результате экранирования потенциала напряженность электрического поля, формирующегося вокруг электродов, будет существенно меньше, чем в случае неизолированных электродов. Причем с увеличением толщины изолирующего покрытия его экранирующие способности резко возрастают. Следовательно, можно предположить, что бесконтактный ДЭФ барьерного типа может быть применим для разделения частиц по их диэлектрическим свойствам только при сравнительно небольших толщинах изолирующего покрытия.

Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* можно рассматривать как сферу диаметром 7 мкм, состоящую из нескольких оболочек с разными диэлектрическими свойствами. Клетка состоит из цитоплазматического пространства, содержащего клеточные органеллы и клеточной оболочки, которая состоит из тонкой мембраны и толстой клеточной стенки, разделенных переплазматическим пространством. Диэлектрические свойства отдельных оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae* представлены в таблице 1 [24].

Таблица 1. Диэлектрические свойства отдельных оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae*

Наименование оболочки	Клеточная стенка	Плазматическая мембрана	Цитоплазма
Диэлектрическая проницаемость (ϵ)	60	6	50
Проводимость (σ), (Ом м) ⁻¹	0,014	$3 \cdot 10^{-6}$	0,45
Толщина, нм	100	7	3400

Расчетный параметр константы Клаузиуса-Массоти (ур. 4-10), полученный в рамках модели многослойной клетки [21] для *Saccharomyces cerevisiae* в деионизованной воде ($\epsilon_m = 78$, $\sigma_m = 0,0001$ (Ом·м)⁻¹) при частоте 100 кГц, составляет $CM_f = 0,86$. Это свидетельствует о том, что клетки дрожжей в условиях эксперимента обладают положительным ДЭФ эффектом, а, значит, будут втягиваться в область увеличения напряженности поля и иметь тенденцию к осаждению на стенках сепарационной камеры.

Оценки параметров сил, действующих на клетку *Saccharomyces cerevisiae* в сепарационном устройстве F_{DEP} и F_{drag} , проводилась по ур. 2 и 5 соответственно исходя из градиентов напряженностей электрического поля, рассчитанных по данным компьютерного моделирования (рис. 3). Для расчетов был выбран участок размером 100 x 50 мкм по оси Oy и Oz соответственно, включающий в себя область проводящей дорожки электрода (50 мкм) и пространства без проводника (50 мкм), для более наглядной визуализации барьера градиентного электрического поля, формирующегося между электродами. Градиент электрического поля рассчитывали в направлении движения основного потока жидкости вдоль оси Ox . Расчет влекущей гидродинамической силы (F_{drag}) производился в приближении ламинарного течения со средней линейной скоростью потока 1100 мкм/с. Ламинарный поток между двух пластин можно рассматривать в рамках модели течения Пуазейля, когда профиль линейных скоростей потока представляет собой параболу с максимумом в центральной части канала при этом $V_{max} \approx 2V_{cp}$. На рисунке 4 представлены профили, действующих на частицу в канале сепарационной камеры, сил ДЭФ и влекущей силы потока в ячейке без изоляционного покрытия и с изоляционным покрытием толщиной 5 мкм.

Из рисунка 4 видно, что в отсутствии изоляционного покрытия по всему профилю канала сила ДЭФ воздействия много выше гидродинамической силы потока, действующей на частицу дрожжей радиусом 3,5 мкм. Можно говорить о том, что в этих условиях клетки дрожжей не смогут преодолеть барьер ДЭФ сил и должны практически полностью задерживаться на электродах сепарирующего устройства. Кроме того, наличие множества барьеров должно повышать эффективность сепарации т.к. частицы, преодолевшие один барьер, могут перераспределяться в пространстве и удерживаться на следующем барьере. Экспериментальное тестирование ячейки без изолирующего покрытия продемонстрировало высокую эффективность захвата дрожжевых частиц. Так во фракции образца, отобранной при напряжении 20 В, интенсивность сигнала поглощения близка к 0 (рис. 5а, кривая 2), что подтверждает захват основной части клеток сепарационным устройством. При этом в смыве концентрация клеток увеличивается практически в 2 раза (рис. 5а, кривая 3) по сравнению с контрольным образцом (рис. 5а, кривая 1).

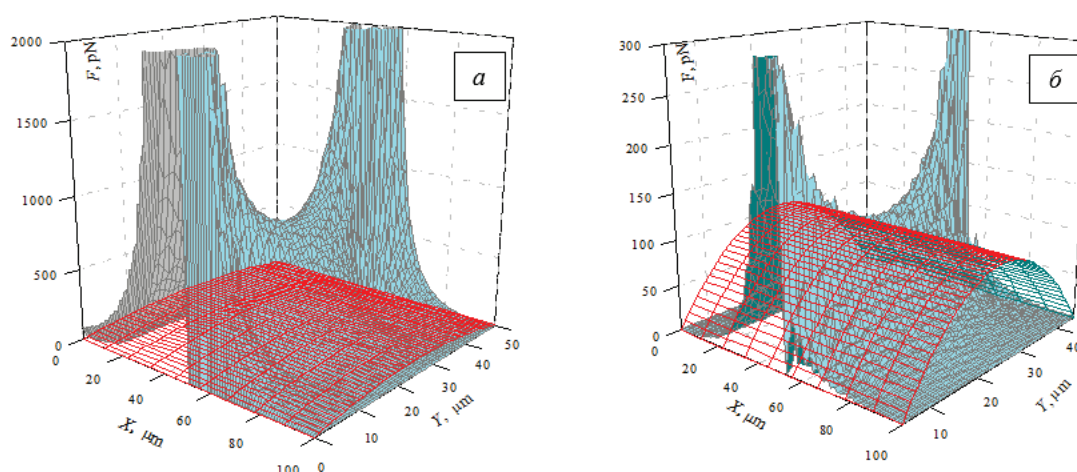


Рисунок 4. 3-х мерное изображение профилей сил действующих на клетку дрожжей радиусом 3,5 мкм в потоке в процессе диэлектрофоретической сепарации в ячейке без изолирующего покрытия (а) и с изолирующим покрытием толщиной 5 мкм (б). Красная сетка – гидродинамическая сила потока, влекущая частицу, серая сетка – сила диэлектрофоретического воздействия

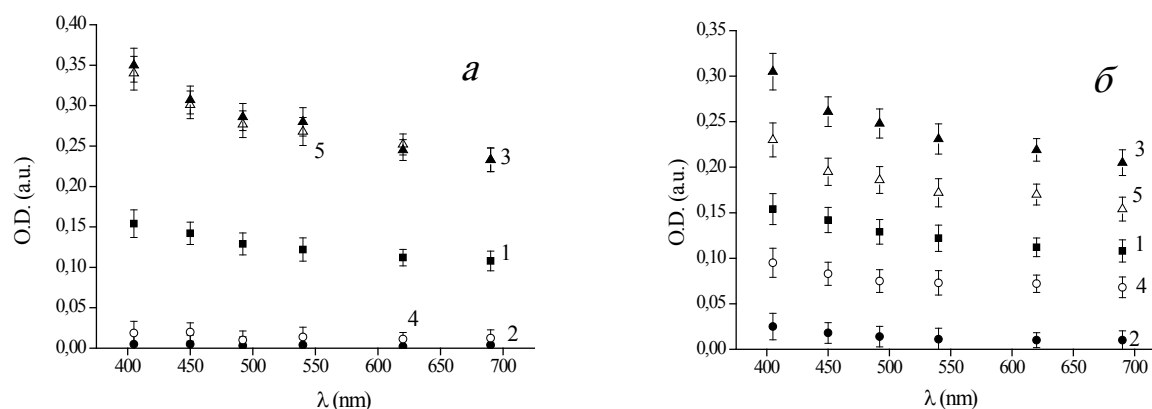


Рисунок 5. Кривые рассеивания (поглощения) суспензии дрожжевых клеток в контрольной фракции образца (1), в экспериментальной фракции образца на ячейке без изолирующего покрытия (2) и ее смыве (3), в экспериментальной фракции образца на ячейке с изолирующим покрытием (4) и ее смыве (5) при напряжении 20 В (а) и 10 В (б)

При нанесении сравнительно тонкого изолирующего покрытия (ок. 5 мкм) интенсивность ДЭФ воздействия на клетку дрожжей со средним диаметром 7 мкм падает примерно в 8 раз. В этом случае величина гидродинамической силы потока, действующей на клетку, становится соизмеримой по величине с силой ДЭФ воздействия в области минимальной высоты ДЭФ барьера. Таким образом, даже при наличии изолирующего слоя большая часть дрожжевых клеток должна задерживаться в ячейке, что подтверждается в результате экспериментального тестирования ДЭФ ячейки с изолирующим покрытием. Концентрация дрожжевых клеток во фракции образца, отобранной при напряжении 20 В, уменьшается более чем на 90 % (рис. 5а, кривая 4). Высокие показатели эффективности задерживания клеточной суспензии в сепарационной камере полученные в эксперименте совпадают с теоретическими оценками, предсказывающими превалирование диэлектрфоретических сил, действующих на частицу над влекущей силой потока, по всему объему сепарационной камеры.

При уменьшении подаваемого напряжения эффективность захвата частиц ячейкой, как с изолирующим покрытием, так и без него ожидаемо уменьшается. Эффективность захвата клеток дрожжей при уменьшении разности потенциалов с 20 до 10 В в ячейке с неизолированными электродами изменяется незначительно и близка к 90 % (рис 5б, кривая 2). При этом двукратное уменьшение подаваемого на электроды потенциала приводит к существенному снижению эффективности захвата клеток в ячейке с изолирующим покрытием. Более 50 % клеток оказываются во фракции фильтрата (рис 5б, кривая 4). При уменьшении напряжения до 5 и 1 В значимого задерживания клеток в ячейках с изолирующим покрытием не наблюдается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесконтактный барьерный диэлектрфорез доказал свою пригодность при работе с микробиологическими объектами. Несмотря на частичное экранирование прикладываемого электрического потенциала, эффективность ДЭФ задерживания остается достаточно высокой. Следует учитывать, что толщина диэлектрического слоя существенно влияет на способность экранировать прикладываемый потенциал, поэтому важно создавать тонкие покрытия, с толщиной.

Наличие диэлектрического покрытия исключает электрохимические процессы, возникающие на поверхности проводящих структур при приложении электрического потенциала, такие как электрофорез, выход ионов металлов с поверхности электродов и др., что позволяет улучшить качество работы с биологическими объектами, т.к. отсутствует контакт с поверхностью металла.

При этом бесконтактный барьерный диэлектрфорез сохраняет высокую производительность, и структуру градиентных полей как в обычном барьерном диэлектрфорезе.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-08-00704.

Список литературы / References:

1. Hsiung L.-C., Chiang C.-L., Wang C.-H., [et. al.] Dielectrophoresis-based cellular microarray chip for anticancer drug screening in perfusion microenvironments. *Lab. Chip.*, 2011, vol. 11, pp. 2333-2342, DOI: 10.1039/C1LC20147F.
2. Laux E.M., Kaletta U.C., Bier F.F., [et. al.] Functionality of dielectrophoretically immobilized enzyme molecules. *Electrophoresis*, 2014, vol. 35, pp. 459-466, DOI: 10.1002/elps.201300447.
3. Ivanoff C.S., Hottel T.L., Garcia-Godoy F. Dielectrophoresis: A model to transport drugs directly into teeth. *Electrophoresis*, 2012, vol. 33, pp. 1311-1321, DOI: 10.1002/elps.201100505.

4. Pethig R., Markx G.H. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1997, vol. 15, p. 426, DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01096-2.
5. Huang S.-B., Wu M.-H., Lin Y.-H., [et. al.] High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force. *Lab. Chip.*, 2013, 13, pp. 1371-1383, DOI: 10.1039/C3LC41256C.
6. Shenoy A., Tanyeri M., Schroeder C.M. Characterizing the performance of the hydrodynamic trap using a control-based approach. *Microfluid Nanofluid.*, 2015, vol. 18, pp. 1055-1066, DOI: 10.1007/s10404-014-1495-7.
7. Podoynitsyn S.N., Sorokina O.N., Kovarski A.L. High-gradient magnetic separation using ferromagnetic membrane. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2016, 397, pp. 51-56, DOI: 10.1016/j.jmmm.2015.08.075.
8. Gupta V., Jafferji I., Garza M., [et. al.] ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 2012, vol. 6, no. 2, e024133, DOI: 10.1063/1.4731647.
9. Turgeon R.T., Bowser M.T. Micro free-flow electrophoresis: theory and applications. *Anal Bioanal Chem.*, 2009, vol. 394, no. 1, 187-198, DOI: 10.1007/s00216-009-2656-5.
10. Yahya W.N., Kadri N.A., Ibrahim F. Cell patterning for liver tissue engineering via dielectrophoretic mechanisms. *Sensors (Basel)*, 2014, vol. 14, no. 7, pp. 11714-34, DOI: 10.3390/s140711714.
11. Braff W.A., Willner D., Hugenholtz P., [et. al.] Dielectrophoresis-Based Discrimination of Bacteria at the Strain Level Based on Their Surface Properties. *PLoS One*, 2013, vol. 8, e76751, DOI: 10.1371/journal.pone.0076751.
12. Markx G.H., Huang Y., Zhou X.-F., [et al.] Dielectrophoretic characterization and separation of microorganisms. *Microbiology*, 1994, vol. 140, pp. 585-591, DOI: 10.1099/00221287-140-3-585.
13. Vykoukal J., Vykoukal D.M., Freyberg S., [et. al.] Enrichment of putative stem cells from adipose tissue using dielectrophoretic field-flow fractionation. *Lab. Chip.*, 2008, vol. 8, pp. 1386-1393, DOI: 10.1039/B717043B.
14. Liu D., Garimella S.V. Microfluidic pumping based on traveling-wave dielectrophoresis. *CTRC Research Publications*, 2009, paper 120, pp. 1-43, DOI: 10.1080/15567260902892713.
15. Lapizco-Encinas B.H., Cummings B.A., Simmons E.B., [et. al.] Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76, no. 6, pp. 1571-1579, DOI: 10.1021/ac034804j.
16. Čemažar J., Douglas T.A., Schmelz E.M., [et. al.] Enhanced contactless dielectrophoresis enrichment and isolation platform via cell-scale microstructures. *Biomicrofluidics*, 2016, vol. 10, e014109, DOI: 10.1063/1.4939947.
17. Dürr M., Kentsch J., Müller T., Schnelle Th., Stelzle M. Microdevices for manipulation and accumulation of micro- and nanoparticles by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, pp. 722-731, DOI: 10.1002/elps.200390087.
18. Qian Ch., Huang H., Chen L., [et. al.] Dielectrophoresis for Bioparticle Manipulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, pp. 18281-18309, DOI: 10.3390/ijms151018281.
19. Lee D., Hwang B., Choi Y., [et al.] Negative dielectrophoretic force based cell sorter with simplified structure for high reliability. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 2016, vol. 17, no. 2, pp. 247-251, DOI: 10.1007/s12541-016-0032-x.
20. H. Shafiee, J.L. Caldwell, M.B. Sano, R.V. Davalos Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation. *Biomed Microdevices*, 2009, vol. 11, pp. 997-1006, DOI: 10.1007/s10544-009-9317-5.
21. Park S., Zhang Y., Wang T.-H., [et. al.] Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity. *Electronic Supplementary Material (ESI) for Lab on a Chip*, 2011, vol. 11, pp. 2893-2900, DOI: 10.1039/c1lc20307j.
22. Price J.A.R., Butt J.P.H., Pethig R. Applications of a new optical technique for measuring the dielectrophoretic behaviour of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, vol. 964, pp. 221-230, DOI: 10.1016/0304-4165(88)90170-5.
23. Markx G.H., Talary M.S., Pethig R. Separation of viable and nonviable yeast using dielectrophoresis. *Journal of Biotechnology*, 1994, vol. 32, pp. 29-37, DOI: 10.1016/0168-1656(94)90117-1.
24. Fikar P., Babuska V., Georgiev V., Rousseau G., Zach P., Georgiev D. Dependence of dielectrophoretic forces on membrane proteins. *Poster presented at The Sixth International Meeting on Synthetic Biology*, London, Great Britain, 2013.

CELL SEPARATION BY BARRIER CONTACTLESS DIELECTROPHORESIS

Sorokina O.N.¹, Podoynitsyn S.N.¹, Klimov M.A.¹, Kovarski A.L.¹, Levin I.I.²,
Simakin S.B.²¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e.mail: alsiona@gmail.com²JSC «IONTEC-nano»
Nagorny proezd, 7, Moscow, 117105, Russia

Abstract. A design of a separation device and a method for microbiological samples separation based on barrier contactless dielectrophoresis are proposed. The principle of operation of the separation device is based on the formation of dielectrophoretic barriers in the volume of the separation chamber. The suggested method is highly efficient and easy to use in comparison with traditional planar dielectrophoresis systems. The feature of the method is the absence of contact between the separated samples and the conductive elements of the electrode structure. A computer simulation of the distribution of electric field over the dielectrophoretic barriers was carried out, and the effect of the thickness of the insulating coating on the dielectrophoretic properties of the barriers was shown. Based on the computer simulation data, the forces acting on the particle (a yeast cell with a diameter of 7 μm) in the separation chamber were estimated. The possibility of cell retention on cDEP barriers is theoretically predicted and experimentally confirmed using the example of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: cell separation, barrier contactless dielectrophoresis.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКАМЕРИЗУЮЩИХСЯ ВТВ-ДОМЕНОВ ГРУППЫ TRAMTRACK МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ (SAXS)

Бончук А.Н.¹, Бойко К.М.^{2,3}, Качалова Г.С.², Георгиев П.Г.¹, Максименко О.Г.¹

¹Институт биологии гена РАН

ул. Вавилова, 34/5, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: errinaceus@rambler.ru

²ФИЦ Биотехнологии РАН

Ленинский проспект, 33, г. Москва, 119071, РФ

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, г. Москва, 123098, РФ

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. В геноме *Drosophila* присутствует несколько десятков транскрипционных факторов, содержащих ВТВ-домены, формирующие октамеры (группа ТТК). При помощи метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) получены первые данные о пространственной структуре доменов данного типа двух белков – CG6765 и CG32121. Данные SAXS подтверждают способность доменов этого типа к октамеризации. Построены модели низкого разрешения, позволяющие сделать выводы о пространственной организации октамеров.

Ключевые слова: мультимеризация, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, хроматин.

Белковые домены ВТВ (bric-a-brac, tramtrack and broad complex) являются одними из широко распространенных белковых мотивов, участвующих в различных белок-белковых взаимодействиях [1]. Данные домены обнаружены на N-концах многих транскрипционных факторов [2]. Согласно литературным данным, ВТВ-домены способны образовывать димеры [3, 4] или олигомеры более высокого порядка [2, 5]. Так, у *Drosophila* было описано обширное семейство октамеризующихся ВТВ-доменов (группа ТТК, характеризующаяся уникальным мотивом FxRWN на N-конце, где x- гидрофобная аминокислота [2, 6]). На сегодняшний день данные о структуре октамеризующихся ВТВ-доменов группы ТТК полностью отсутствуют, несмотря на то, что известно более 10 кристаллических структур димеризующихся ВТВ-доменов. Помимо специфического взаимодействия между ВТВ-доменами различных архитектурных белков, показано также, что ВТВ-домены способны привлекать другие белки, не содержащие такие домены [4]. Также ВТВ-домены группы ТТК способны к избирательному взаимодействию друг с другом, однако механизм такого взаимодействия остается неясным [2].

Нами был проведен широкий скрининг возможности экспрессии разных представителей доменов семейства ТТК с целью исследования структурных особенностей ВТВ-доменов этой группы. 21 домен был клонирован в экспрессионный вектор в рамке с Тиоредоксином, который может быть отрезан при помощи TEV-протеазы. Была протестирована эффективность экспрессии, растворимость полученных конструкций и их стабильность после очистки и отрезания Тиоредоксина. В результате для нескольких доменов были получены белковые препараты высокой степени чистоты и гомогенности, однако попытки их кристаллизации были неудачными. Было проведено исследование двух ВТВ-доменов семейства ТТК (CG6765 и CG32121) при помощи метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (SAXS). Эксперимент проводился на источнике рентгеновского излучения BM29 BioSAXS в ESRF (Гренобль, Франция). Измерения проводились при длине волны 0,099 нм, концентрация белка варьировалась от 1 до 6 мг/мл. Радиус гирации (R_g) белковой молекулы в растворе был рассчитан при помощи аппроксимации Гинье при малых углах ($s < 1.3/R_g$, $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$, где 2θ – угол рассеяния), интенсивность $I(s)$ принималась равной $I_0 \exp(-(sR_g)^2/3)$. Для оценки максимального размера частиц D_{max} , функция парных расстояний $P(r)$ была рассчитана при помощи алгоритма GNOM из программного пакета ATSAS). Молекулярный вес молекул был рассчитан исходя из исключенного объема гидратированных белковых молекул по закону Поро для гомогенных частиц. Рассчитанные характеристики частиц ВТВ-доменов в растворе приведены в Таблице 1. В результате эксперимента в зависимости от концентрации образца для ВТВ-домена CG6765 были получены следующие значения: $R_g = 3,82-4,42$ нм, $D_{max} = 15,89-18,03$ нм, что соответствует молекулярной массе 88-117 кДа при концентрации 1.5мг/мл и 106-141 при 6.0 мг/мл подтверждает формирование октамеров (молекулярная масса мономера составляет 15,3 кДа). В случае ВТВ-домена белка CG32121 ситуация была менее однозначной: в процессе очистки выяснилось, что олигомеры медленно диссоциируют на частицы более низкого порядка, поэтому исследуемый препарат вероятнее всего представляет собой смесь частиц разного размера, особенно при низких концентрациях, когда равновесие смещается в сторону диссоциации. По данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей функция парных расстояний имеет несколько пиков, что также говорит о том, что в данном случае образец является смесью олигомеров разного порядка.

Таблица 1. Рассчитанные по данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей характеристики частиц ВТВ-доменов белков CG6765 и CG32121 в растворе

Полипептид	Концентрация, мг/мл	Rg, нм	Dmax, нм	Vp, нм ³	Молекулярная масса, кДа	Молекулярная масса мономера, кДа
CG6765 1-133	1,5	3,82	15.89	175,39	87,70-116,93	15,3
CG6765 1-133	3,0	4,23	18.03	191,43	95,72-127,62	15,3
CG6765 1-133	6,0	4,42	15.24	212,58	106,3-141,72	15,3
CG32121 1-147	1,06	5,78	17.93	436,18	218,1-290,79	17,4
CG32121 1-147	2,1	6,50	23.08	457,11	228,56-304,74	17,4
CG32121 1-147	4,2	6,10	20.21	449,63	224,82-299,75	17,4

Рассчитанные параметры для частиц данного домена в растворе соответствуют скорее олигомерам, содержащим 12-16 субъединиц (рассчитанная по экспериментальным данным масса 218-304 кДа при молекулярной массе мономера 17,4 кДа). В то же время, по данным гель-фильтрации и химической сшивки, данный ВТВ-домен является октамером, как и другие представители семейства ТТК. При моделировании формы частиц были использованы данные, полученные для ВТВ-домена CG6765.

Как видно из рассчитанных характеристик частиц в растворе – максимальный линейный размер частиц Dmax существенно превосходит радиус гирации Rg, что говорит о том, что частицы, скорее всего, имеют вытянутую форму, график функции парных расстояний показан на рисунке 1А. Поскольку олигомеры по всей видимости имеют четное число субъединиц, и большинство известных структур ВТВ-доменов являются симметричными димерами, мы предположили, что октамер состоит из четырех димеров, при моделировании также учитывалась возможная симметрия частиц, были рассмотрены варианты симметрии P2, P4₂. *Ab initio* модели низкого разрешения были получены при помощи алгоритмов DAMMIN, DAMMIF и GASBOR из программного пакета ATSAS. Достоверность построения моделей оценивалась при помощи онлайн-сервиса AMBIMETER, рассматривались модели со значением индекса достоверности менее 2.

Большинство моделей имело вытянутую форму, часто с полостью в центре, одна из таких моделей показана на рис. 1Б. При такой форме молекулы можно предположить, что тетрамеры молекул связываются друг с другом при помощи обращенных внутрь N-концевых участков, содержащих последовательность FxRWN. Однако некоторые модели имели правильную шарообразную форму, либо форму шара с несколькими выступающими частями или с полостью внутри. На основании имеющихся данных невозможно однозначно определить форму исследуемых белковых молекул, наиболее вероятной представляется форма, представленная на рисунке 1Б. Таким образом, данные малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в растворе, полученные для ВТВ-домена белка CG6765 подтверждают формирование октамеров, наиболее вероятной представляется форма частицы в виде правильного эллипсоида с полостью в центре.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ 14-24-00166).

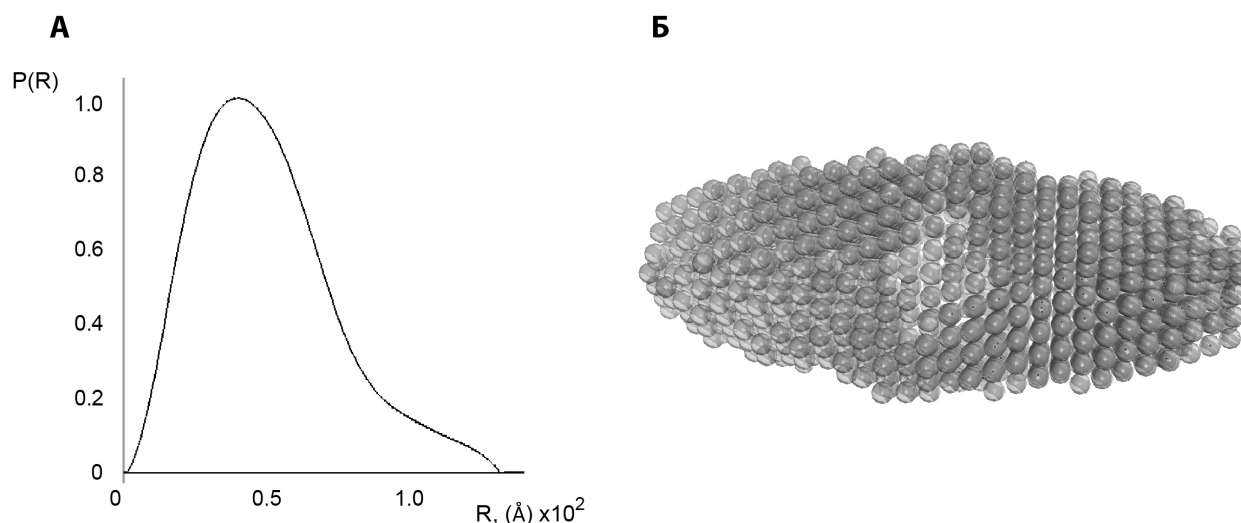


Рисунок 1. Исследование структуры ВТВ-домена белка CG6765 в растворе. А) График функции парных расстояний, Б) Одна из наиболее вероятных *ab initio* моделей низкого разрешения ВТВ-домена белка CG6765

Список литературы / References:

1. Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J., Nandra S.K., Prive G.G. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.*, 2005, vol. 6, no. 10, p. R82, epub.
2. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. Drosophila BTB/POZ domains of "ttk group" can form multimers and selectively interact with each other. *J Mol Biol.*, 2011, vol. 412, pp. 423-436.
3. Ahmad K.F., Engel C.K., Prive G.G. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, pp. 12123-12128.
4. Ahmad K.F., Melnick A., Lax S., Bouchard D., Liu J., [et al.] Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain. *Mol Cell*, 2003, vol. 12, pp. 1551-1564.
5. Stead M.A., Trinh C.H., Garnett J.A., Carr S.B., Baron A.J., [et al.] A beta-sheet interaction interface directs the tetramerisation of the Miz-1 POZ domain. *J Mol Biol.*, 2007, vol. 373, pp. 820-826.
6. Zollman S., Godt D., Prive G.G., Couderc J.L., Laski F.A. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, vol. 91, pp. 10717-10721.

**STUDIES OF OCTAMERIC TRAMTRACK GROUP BTB-DOMAINS USING
SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)****Bonchuk A.N.¹, Boyko K.M.^{2,3}, Kachalova G.S.², Georgiev P.G.¹, Maksimenko O.G.¹**¹Institute of gene biology RAS

Vavilova str., 34/5, Moscow, 119334, Russia; e-mail: errinaceus@rambler.ru

²Research Center of Biotechnology RAS

Leninsky prospekt, 33, Moscow, 119071, Russia

³National Research Center "Kurchatov Institute"

Academic Kurchatov square, 1, Moscow, 123098, Russia

Abstract. Drosophila genome contains near 30 transcription factors containing BTB-domains able to form octamers (TTK group). Spatial structure of two domains of this group – CG6765 and CG32121 was studied using small-angle X-ray scattering (SAXS). SAXS data confirm that these domains are able to form octamers and provide insight into the structure of such octamers.

Key words: multimerization, small-angle X-ray scattering, chromatin.

ПРОТЕОРОДОПСИНЫ *EXIGUOBACTERIA* – НОВЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА РЕТИНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Петровская Л.Е.¹, Крюкова Е.А.¹, Лукашев Е.П.², Долгих Д.А.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, ГСП-7, 117997, РФ; e-mail: lpetr65@yahoo.com

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. Микробные родопсины – интегральные мембранные белки, которые выполняют светозависимый транспорт протонов и других ионов или сенсорные функции. Они обнаруживаются у архей, бактерий и эукариотических водорослей и включают в себя семь трансмембранных сегментов и хромофор ретиналь. Гены, кодирующие потенциальные ретинальные белки, были выявлены в геномах Грамположительных бактерий *Exiguobacterium sibiricum*, выделенной из вечномерзлого грунта возрастом 3 млн лет (ESR), термофильной *Exiguobacterium* AT1b из горячих источников Йеллоустонского Национального парка (ATER) и *Exiguobacterium* 7-3, также выделенной из многолетнемерзлого грунта (E7_3R). Ранее мы клонировали ген ESR и провели его структурно-функциональную характеристику. Аминокислотная последовательность E7_3R отличается от ESR в семи положениях, а ATER – в 39 положениях. Для сравнения свойств ретинальных белков, принадлежащих к близкородственным видам из разных мест обитания, мы экспрессировали ATER и E7_3R в клетках *E. coli* и исследовали их методом флеш-фотолиза при различных pH. Показано, что фотоцикл ATER и E7_3R отличается от ESR сдвигом pKa образования интермедиата М (депротонированного основания Шиффа) в щелочную область, а также пониженной скоростью его образования. Наблюдаемые различия обсуждаются во взаимосвязи с данными о трехмерной структуре ESR.

Ключевые слова: ретинальный белок, протеородопсин, *Exiguobacterium*, основание Шиффа, акцептор протонов, донор протонов, фотоцикл.

Микробные родопсины – интегральные мембранные белки, содержащие хромофор ретиналь и осуществляющие светозависимый транспорт протонов и других ионов, а также сенсорные функции. Ретиналь-содержащие белки, выполняющие функцию ионных насосов, создают мембранный градиент концентрации, который используется в качестве источника энергии каналами и другими транспортными белками для импорта питательных веществ, генерации электрических импульсов и других целей. Необходимо отметить, что, несмотря на многолетние исследования механизмов ионного транспорта, осуществляемого бактериородопсином и его аналогами, многие детали этого процесса остаются невыясненными. В связи с обнаружением новых представителей семейства, обладающих специфическими особенностями первичной и пространственной структуры, задача уточнения роли отдельных аминокислотных остатков в функционировании ретинальных белков приобретает особую актуальность.

Наиболее изученным в настоящее время ретинальным белком является бактериородопсин *Halobacterium salinarum* (BR), который был впервые обнаружен в начале 70-х гг. Д. Остерхельтом и В. Стокениусом [1]. Установлено, что BR обладает способностью к светозависимому переносу протонов через мембрану, сопровождаемому генерацией трансмембранного градиента pH и синтезом АТФ. BR состоит из белка-опсина и хромофора *all-trans*-ретиналя, связанного с остатком лизина-216 через основание Шиффа [2]. В результате поглощения света ретиналь осуществляет конформационный переход в *13-cis* конфигурацию с образованием промежуточного состояния (интермедиата) К. Последующее возвращение ретиналя в *all-trans* конфигурацию сопровождается конформационными перестройками белка, которые характеризуются образованием интермедиатов L, M, N и O, и освобождением протона на внешней поверхности белка с последующим поглощением с цитоплазматической поверхности [3]. Основными стадиями этого процесса являются протонирование и депротонирование Шиффова основания, изомеризация ретиналя и др., приводящие к существенным сдвигам в максимуме поглощения интермедиатов фотоцикла BR [4]. Исследование мутантных вариантов BR позволило установить, что важнейшее значение для функционирования белка имеет система водородных связей, объединяющая акцептор протона Asp85 и соседние остатки, которые определяют pKa акцептора [5].

За последнее время в ходе широкомасштабного геномного и метагеномного секвенирования обнаружено существование значительного количества аналогов BR у протеобактерий, актиномицетов, цианобактерий, грибов и других микроорганизмов [6, 7]. Многие протеобактерии, относящиеся к морскому планктонному сообществу, используют для генерации мембранного потенциала аналог BR – протеородопсин (PR) [8, 9]. В молекуле PR Asp97 и Glu108 выполняют функции акцептора и донора протона для Шиффова основания, соответственно, однако у него отсутствуют остатки, образующие группу освобождения протона в молекуле BR. PR проходит те же основные стадии фотоцикла, которые характерны и для BR, однако перенос протона от

донора (Glu108) на Шиффово основание происходит одновременно с поглощением протона с цитоплазматической стороны белка в процессе перехода $M \rightarrow N$.

Грамположительные бактерии рода *Exiguobacterium* обнаруживаются во многих экологических нишах, в том числе экстремальных, включая вечномёрзлые грунты и горячие источники, с температурным диапазоном от $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$. В частности, психротрофная бактерия *E. sibiricum* (штаммы 255-15 и 7-3) была выделена из вечномёрзлых отложений, а термофильная *Exiguobacterium* AT1b – из горячего источника в Йеллоустонском Национальном парке [10]. Такое разнообразие привлекает внимание к изучению адаптационных стратегий, направленных на выживание представителей данного рода в различных условиях. Геномы нескольких бактерий рода *Exiguobacterium* были секвенированы DOE Joint Genome Institute (США), что позволяет проводить изучение гомологичных белков, получая их в необходимых количествах при помощи гетерологичной экспрессии. Все описанные в настоящий момент виды *Exiguobacterium* содержат потенциальный ген протейородопсина, при этом аминокислотные последовательности соответствующих белков обладают высокой степенью гомологии, что облегчает поиск молекулярных основ наблюдаемых функциональных различий между ними.

Ранее нами был впервые клонирован ген протейородопсина *E. sibiricum* (ESR), сконструирован штамм *E. coli* – продуцент этого белка, и проведена его структурно-функциональная характеристика [11]. В результате измерения фотоиндуцированного изменения pH в суспензии ESR-содержащих липосом установлено, что при поглощении света ESR осуществляет выброс протонов в среду, обеспечивая ее закисление. Однако, в отличие от бактериородопсина *H. salinarum*, выброс протона происходит на поздних стадиях фотоцикла, после его захвата из внутриклеточной части белка. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что полученный белок является новым представителем семейства транспортных бактериородопсинов, выполняющих функцию протонных насосов.

Дальнейшие исследования показали, что зависимость максимума поглощения ESR от pH среды имеет комплексный характер и включает три перехода с pKa 2.3, 6.0 и 9.1. Соответствующая зависимость для мутанта H57M характеризуется более значительным сдвигом (около 50 нм), вызванным депротонированием Asp85, с pKa 6.3, что указывает на тесное взаимодействие остатков His57 и Asp85 в акцепторной части молекулы [12]. Благодаря этому взаимодействию акцептор протонов находится преимущественно в депротонированном состоянии уже при $\text{pH} > 2$ и может функционировать в широком диапазоне pH.

Изучение фотоцикла ряда мутантных вариантов ESR, содержащих замены остатка Lys96, показало, что такие мутации более чем в 100 раз замедляют распад интермедиата M (репротонирование основания Шиффа), особенно в области высоких значений pH [13]. При снижении pH наблюдается линейное ускорение распада M, однако даже при pH 7 он происходит медленнее, чем в природном белке. Добавление 20 mM азида натрия, который является трансмембранным переносчиком протонов, при pH 8 вызывает примерно 10-кратное ускорение распада M в мутанте K96A [13]. Аналогичные данные получены при сравнении эффективности транспорта протонов в суспензии протейолипосом, содержащих мутант K96A и ESR дикого типа.

Измерение кинетики светоиндуцированных изменений концентрации протонов продемонстрировало, что в молекуле ESR поглощение протона из среды после образования M предшествует репротонированию основания Шиффа при переходе $M \rightarrow N$. Результаты проведенных экспериментов указывают на то, что остаток лизина в положении 96, а также, возможно, связанные с ним молекулы воды, выполняют функции донора протона для основания Шиффа. Таким образом, ESR является первым примером ретиналь-содержащего белка, для которого доказано наличие подобной роли у остатка лизина.

На основании полученных данных была предложена схема переноса протонов в фотоцикле ESR. Она содержит ряд существенных отличий от последовательности событий в фотоцикле BR, наиболее важным из которых является то, что донор протонов K96 в ESR находится преимущественно в депротонированном состоянии и приобретает протон только в течение короткого промежутка времени. Проведенные нами исследования внесли существенные коррективы в ранее сложившуюся концепцию, согласно которой наличие карбоксильных остатков в роли донора и акцептора протонов для Шиффова основания является необходимым условием функционирования транспортных бактериородопсинов и отличает их от сенсорных ретиналь-содержащих белков [13].

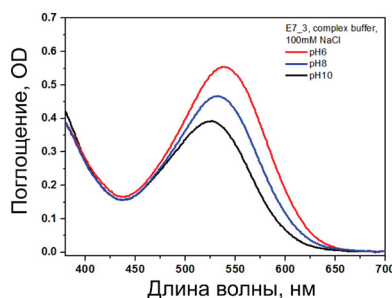


Рисунок 1. Спектры поглощения протейородопсина E7_3R при различных значениях pH

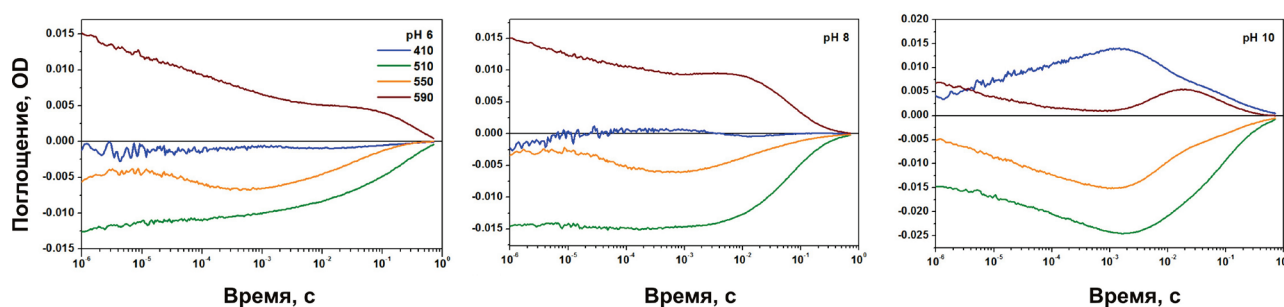


Рисунок 2. Фотоцикл E7_3R в мицеллах DDM при pH 6, 8 и 10

Пространственная структура ESR с разрешением 2.3 Å была впервые исследована группой ученых под руководством В. Горделия [14]. Установлено, что уникальными структурными особенностями ESR являются: 1) расположение донора протонов для Шиффова основания – остатка K96 – в гидрофобной полости близко к поверхности белка, которое может облегчать доступ протонов из цитоплазмы; 2) нарушение альфа-спиральной структуры в средней части спирали F благодаря наличию 3_{10} и пи-спиральных элементов; 3) наличие водородной связи между остатками H57 и D85. В отличие от BR, остаток R82 в молекуле ESR удален от основания Шиффа и не образует водородной связи с акцептором протонов D85, соответственно не оказывая существенного воздействия на его свойства. С целью сравнительного исследования физико-химических свойств и фотоцикла ретинальных белков различных представителей рода *Exiguobacterium* нами проведена амплификация соответствующих генов на матрице геномной ДНК *Exiguobacterium* AT1b и *E. sibiricum* 7-3 и их клонирование в *E. coli*.

Выделение рекомбинантных белков проводили с помощью металлоаффинной хроматографии после экстракции из мембраны в присутствии неионного детергента *n*-додецил- β -D-мальтозида (DDM) в условиях, аналогичных описанным для ESR [11]. Максимумы поглощения ATER и E7_3R составили 533 нм при pH 8 и 537 нм при pH 6, что соответствует величинам, полученным ранее для ESR (рис. 1).

Исследование фотоцикла очищенных белков в мицеллах DDM проводили методом флэш-фотолиза при 4 длинах волн (410, 490, 550, 590 нм). Установлено, что при pH 6 и 8 в ответ на вспышку света E7_3R образует преимущественно интермедиаты, поглощающие в области длинных волн (K-, L- и N/O-подобные), а количество M-интермедиата, соответствующего депротонированному основанию Шиффа, с максимумом поглощения 410 нм крайне мало (рис. 2а, б). При увеличении pH выше 9 наблюдается быстрое появление интермедиата M, которое достигает максимума примерно за 2 мс после вспышки (рис. 2в). Аналогичные данные были получены ранее для ESR [12, 15], однако для данного белка рКа образования M сдвинут в щелочную область pH.

Для протерородопсина ATER установлено наличие аналогичной pH-зависимости фотоцикла (рис. 3а). В отличие от ESR, для ATER и E7_3R также характерно более медленное накопление интермедиата M. В частности, быстрая микросекундная стадия в фотоцикле ATER составляет около 10-15 %, независимо от pH (рис. 3б).

Для установления причины возникновения наблюдаемых различий нами проведено сравнение аминокислотных последовательностей изученных белков с помощью программы ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (рис. 4). Обнаружено, что они обладают существенной степенью гомологии (93-94 сходства), при этом E7_3R отличается от ESR в семи позициях, а ATER – в 39. В частности, последовательность ATER содержит остаток валина в положении, которое в молекуле ESR занимает треонин (остаток T43). Согласно результатам исследования пространственной структуры ESR, этот остаток расположен поблизости от основания Шиффа [14]. Таким образом, вероятно, что данная замена обуславливает особенности кинетики фотоцикла ATER. Дальнейшие исследования с помощью сайт-направленного мутагенеза и изучения свойств мутантных белков позволят проверить это предположение.

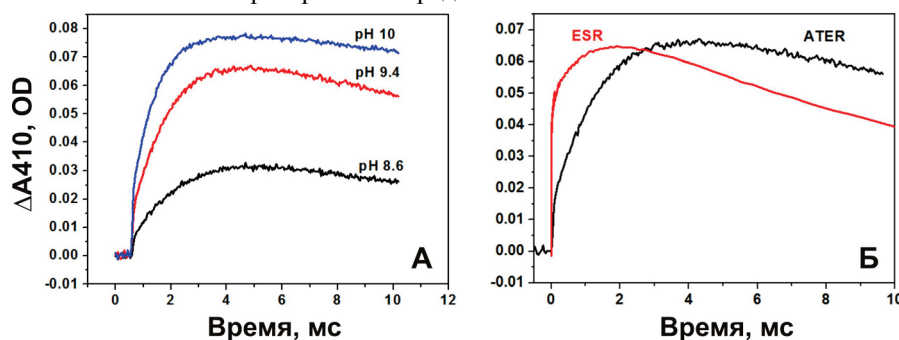


Рисунок 3. А) Кинетика изменений поглощения протерородопсина ATER при 410 нм, вызванных образованием и распадом M-интермедиата, при трех значениях pH. Б) Сравнение кинетики изменений поглощения ESR и ATER при 410 нм, pH 9

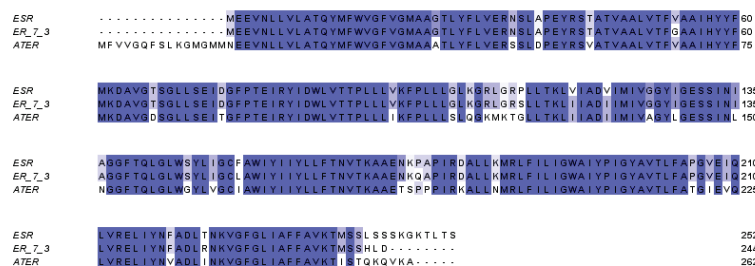


Рисунок 4. Выравнивание аминокислотной последовательности белков ESR, ATER и E7_3R с помощью программы ClustalW2

Работа проводится при финансовой поддержке грантов РФФИ №17-00-00165комфи и 16-04-01264а.

Список литературы / References:

1. Oesterhelt D., Stoekenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1973, vol. 70, pp. 2853-2857.
2. Lanyi J.K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.*, 2004, vol. 66, pp. 665-688.
3. Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. Bacteriorhodopsin. *Principles of Bioenergetics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, pp. 139-156.
4. Lanyi J.K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1757, pp. 1012-1018.
5. Balashov S.P. Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2000, vol. 1460, pp. 75-94.
6. Běja O., Spudich E.N., Spudich J.L., Leclerc M., DeLong E.F. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 2001, vol. 411, pp. 786-789.
7. Brown L.S., Jung K.H. Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, vol. 5, pp. 538-546.
8. Bamann C., Bamberg E., Wachtveitl J., Glaubitz C. Proteorhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2014, vol. 1837, pp. 614-625.
9. Běja O., Aravind L., Koonin E.V., Suzuki M.T., Hadd A., Nguyen L.P., Jovanovich S.B., Gates C.M., Feldman R.A., Spudich J.L., Spudich E.N., DeLong E.F. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 2000, vol. 289, pp. 1902-1906.
10. Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F., Tiedje J.M. Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. *Description of Exiguobacterium sibiricum sp. nov., Extremophiles*, 2006, vol. 10, pp. 285-294.
11. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Spirina E.V., Rivkina E.M., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Gilichinsky D.A., Shuvalov V.A., Kirpichnikov M.P. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, pp. 4193-4196.
12. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Imasheva E.S., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., A.B. Rubin, M.P. Kirpichnikov, Lanyi J.K. Aspartate-histidine interaction in the retinal schiff base counterion of the light-driven proton pump of *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, pp. 5748-5762.
13. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Breaking the carboxyl rule: lysine 96 facilitates reprotonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, pp. 21254-21265.
14. Gushchin I., Chervakov P., Kuzmichev P., Popov A.N., Round E., Borshchevskiy V., Ishchenko A., Petrovskaya L., Chupin V., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M., Gordeliy V. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, vol. 110, pp. 12631-12636.
15. Petrovskaya L., Balashov S., Lukashev E., Imasheva E., Gushchin I.Y., Dioumaev A., Rubin A., Dolgikh D., Gordeliy V., Lanyi J. ESR – A retinal protein with unusual properties from *Exiguobacterium sibiricum*. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, pp. 688-700.

PROTEORHODOPSINS FROM *EXIGUOBACTERIA* – NEW MEMBERS
OF THE RETINAL PROTEINS FAMILY

Petrovskaya L.E.¹, Kryukova E.A.¹, Lukashev E.P.², Dolgikh D.A.^{1,2}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya str., 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia; e-mail: lpetr65@yahoo.com

²M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Department
Leninskie gory, 1, bld. 12, Moscow, 119234, Russia

Abstract. Microbial rhodopsins are the integral membrane proteins, which perform light-dependent transport of protons and other ions or sensor functions. They are found in archaea, bacteria and eukaryotic algae and share common heptahelical fold with a retinal chromophore. Potential rhodopsin-encoding genes were identified in the genomes of Gram-positive bacteria *Exiguobacterium sibiricum*, isolated from 3-million year old permafrost (ESR), the thermophilic *Exiguobacterium* AT1b from the Yellowstone National Park hot spring (ATER) and *Exiguobacterium* 7-3, also isolated from permafrost soil (E7_3R). Previously, we have cloned the ESR gene and performed its structural and functional characterization. Amino acid sequence of E7_3R differs from ESR in seven positions, and ATER – in 39 positions. In order to compare the properties of retinal proteins belonging to closely related species from different environments, we have expressed ATER and E7_3R in *E. coli* cells and studied them by flash photolysis at different pH. We have shown that the photocycle of ATER and E7_3R differs from that of ESR by the shift of pKa of the M intermediate (the deprotonated Schiff base) formation to more alkaline pH and its reduced rate. The observed differences are discussed in relationship with the data about 3D structure of ESR.

Key words: retinal protein, proteorhodopsin, *Exiguobacterium*, Schiff base, proton acceptor, proton donor, photocycle.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛ LEU-ГАЛЛАТОСТАТИНА-4, ДРОСТАТИНА-3, ШИСТОСТАТИНА-6 И АЛЛАТОСТАТИНА-4

Велиева Л.И., Алиев Р.Э.

Бакинский Государственный Университет

ул. 3.Халилова, 23, Баку, AZ 1148, Азербайджан; e-mail: Lala_Veliyeva@rambler.ru

Поступила в редакцию: 05.05.2018

Аннотация. Одной из актуальных проблем в современной науке является поиск и целенаправленный синтез соединений, используемых для регуляции численности вредителей сельскохозяйственных культур. К числу таких соединений относятся молекулы Leu-галлатостатин-4, дроостатин-3, шистостатин-6 и аллатостатин-4, которые принадлежат семейству аллатостатинов и играют ключевую роль в регуляции процессов синтеза и выделения ювенильных гормонов у различных видов насекомых, в частности, *Calliphora Vomitoria*, *Drosophilla melanogaster*, *Shistostocerca gregaria*. Важную роль в реализации функций аллатостатинов играют их конформационные свойства и трехмерная пространственная организация, изучение которых необходимо для понимания механизмов функционирования этих соединений на молекулярном уровне. В данной работе методами теоретического конформационного анализа и молекулярной динамики и на основе поэтапного подхода, проведено исследование пространственной структуры, конформационных свойств и подвижность боковых цепей этих соединений.

Ключевые слова: нейропептиды; структура; конформационный анализ; молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Аллатостатины, синтезируемые нейросекреторными клетками мозга различных видов насекомых [1-3] ингибируют синтез и выделение ювенильных гормонов в процессе онтогенеза насекомых и участвуют в нейротрансмиссии и регуляции функций нервной системы. Важнейшим аспектом в исследованиях функциональной активности этих соединений является изучение молекулярных основ механизма их действия и создание эффективных аналогов этих соединений с пролонгированным эффектом действия. Целью настоящего исследования явилось изучение пространственной структуры, конформационных свойств и электронно-динамических характеристик молекул Leu галлатостатина-4, дроостатина-3, шистотатина-6 и аллатостатина-4, секретируемых нейросекреторными клетками мозга насекомых *Calliphora Vomitoria*, *Drosophilla melanogaster*, *Shistostocerca gregaria*. Все эти молекулы являются октапептидами, содержат одинаковую последовательность аминокислотных остатков на участке 4-8 пептидной цепи и различаются лишь структурой аминокислотного остатка в положении 1 и 3 пептидной последовательности (рис. 1). В работе проведен сопоставительный анализ результатов, полученных полуэмпирическими методами молекулярной механики и квантовой химии [4-7]. Динамические свойства молекул изучались на основе метода молекулярной динамики. Все расчеты были проведены с помощью вычислительных компьютерных программ, апробированных на большом классе биологически активных соединений-антибиотиков, гормонов, полипептидов и белков.

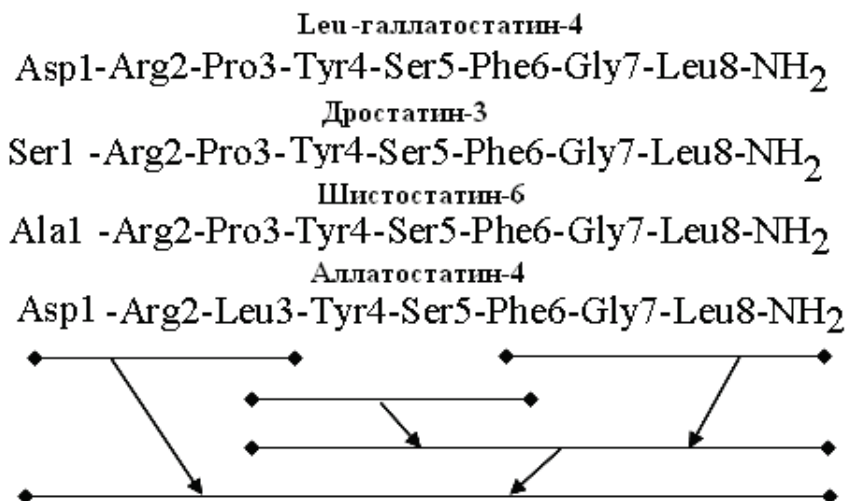


Рисунок 1. Аминокислотная последовательность и схема поэтапного расчета молекул Leu галлатостатина-4, дроостатина-3, шистотатина-6 и аллатостатина-4

МЕТОД И РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Моделирование структуры молекул проводилось методом теоретического конформационного анализа с учетом полярного окружения атомов на основе пакета прикладных компьютерных программ [8]. Используемые в работе полуэмпирические потенциальные функции и их параметризация были взяты из работы [4].

Пространственная структура молекул изучены на основе стабильных конформаций метиламидов N-ацетил- α -аминокислот с учетом различных ориентаций их боковых цепей. Поэтапный расчет пространственной структуры этих нейропептидов включал изучение конформационных состояний последовательно наращиваемых фрагментов согласно схеме, приведенной на рисунке 1.

Согласно результатам исследования нейропептиды - Leu галлатостатин-4, дроостатин-3, шистотатин-6 и аллатостатин-4 обладают компактной пространственной структурой и содержат α -спиральный сегмент, включающий остатки Arg2-Pro3(Leu3)-Tyr4-Ser5-Phe6-Gly7-Leu8 (рис. 2).

Низкоэнергетические конформационные состояния молекул нейропептидов стабилизированы водородными связями, в образовании которых участвуют атомы основной цепи остатков Arg2 и Ser5, а также функционально активные участки их боковых цепей (табл. 1).

Следует отметить, что именно остаток аргинина в положении 2 пептидной цепи образует максимально большое число внутримолекулярных контактов, в то время как алифатическая боковая цепь Leu8 ориентирована в сторону от пептидной цепи. Боковые цепи двух других остатков Tyr4 и Phe6 также ориентированы в окружающую среду, поэтому можно утверждать, что молекулы имеют гидрофобную оболочку, которая и будет определять их функциональную активность при взаимодействии с рецепторными участками белков.

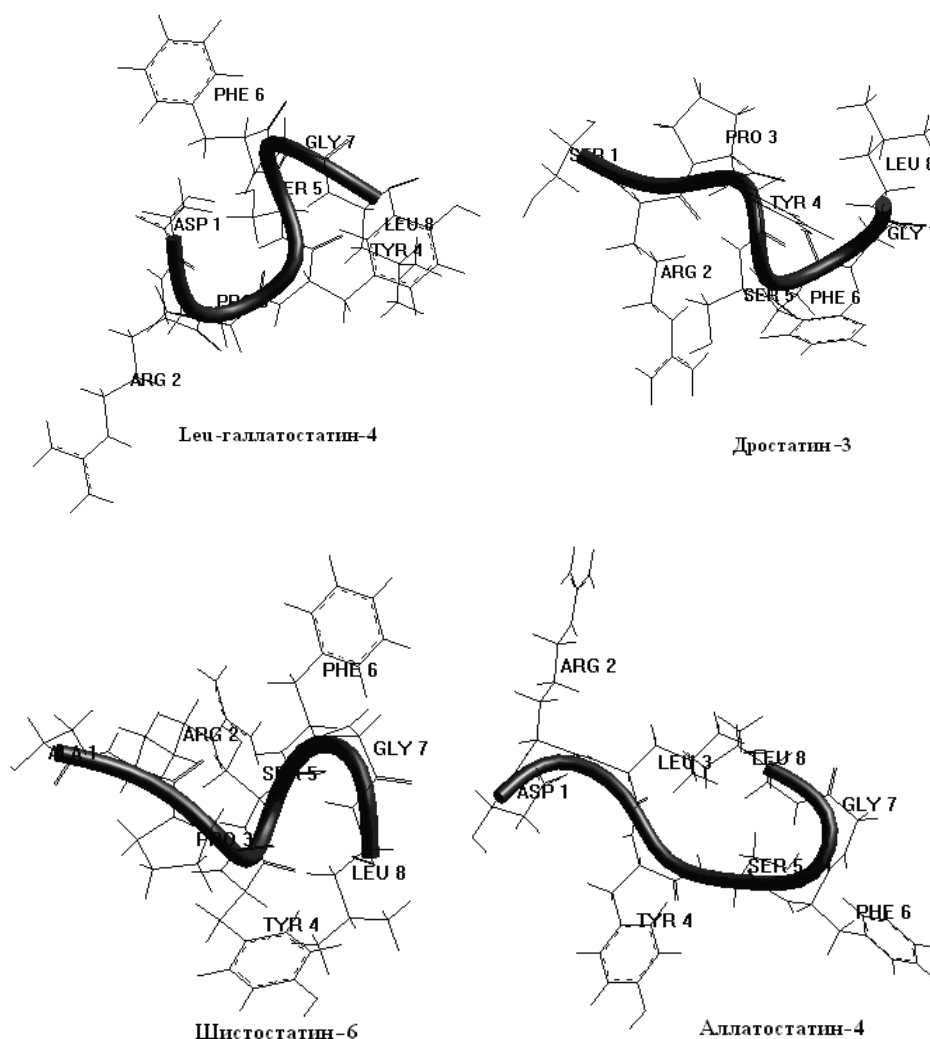


Рисунок 2. Структура молекул Leu-галлатостатина-4, дроостатина-3, шистотатина-6 и аллатостатина-4 по данным теоретических расчетов

Таблица 1. Водородные связи молекул Leu галлатостатина-4, дроstatина-3, шистотатина-6 и аллатостатина-4

Молекулы	Водородная связь	Межатомные расстояния (Å)
Leu галлатостатин-4	(Asp1) CO...HN (Arg2)	2,61
	(Arg2) CO...HN (Tyr4)	2,80
	(Ser5) NH...OH (Leu8)	2,55
	(Ser5) CO...HN (Leu8)	2,93
	(Phe6) CO...HN (Leu8)	2,01
Дростатин-3	(Ser1) NH...OH (Ser1)	2,48
	(Ser1) OH...HN (Arg2)	2,21
	(Arg2) CO...HN (Ser5)	2,10
	(Arg2) CO...HN (Phe6)	2,39
	(Pro3) CO...HN (Leu8)	2,41
	(Phe6) CO...HN (Leu8)	2,02
Шистотатин-6	(Arg2) CO...HN (Ser5)	2,10
	(Arg2) CO...HN (Phe6)	2,02
	(Pro3) CO...HN (Leu8)	2,46
	(Phe6) CO...HN (Leu8)	2,07
Аллатостатин-4	(Asp1) CO...HN (Arg2)	2,83
	(Tyr4) CO...HN (Gly7)	2,75
	(Ser5) NH...OC (Ser5)	2,50
	(Phe6) CO...HN (Leu8)	2,12

На основе количественной оценки стабильности и пределов конформационной подвижности двугранных углов вращения в основной и боковых цепях, составляющих молекулу аминокислотных остатков, была установлена пространственная структура этих соединений. Глобальный минимум конформационной энергии и равновесная геометрическая конфигурация молекул были найдены путем поиска стационарных точек на многомерной потенциальной поверхности исследуемых молекул (табл.2). Установлено, что в глобальной конформации участок пептидной цепи Leu3-Leu8 в аллатостатине-4 формирует β -поворот, конформационная подвижность которого ограничена по сравнению с участком Asp1-Leu3 на N-конце пептидной молекулы.

Полученные результаты были подтверждены также исследованием молекулярно-динамических свойств этих соединений. Молекулярная динамика молекул, проведенная в условиях вакуума и в водной среде в течение 30 пикосекунд, выявила устойчивость структур к действию молекул воды. Установлено, что эти соединения сохраняют виток α -спирали и β -изгибы несмотря на образование большого числа межмолекулярных водородных связей с молекулами воды. Такие связи не вносят существенного вклада в энергию, однако они участвуют в дополнительной стабилизации пространственных структур молекул. Наличие гидрофобной поверхности подтверждают результаты исследования распределения электронной плотности и молекулярного электростатического потенциала.

Полученные в данном исследовании результаты будут использованы для изучения зависимости структурных и электронно-динамических свойств молекул с функциональными характеристиками и биологической ролью в процессах ингибирования.

Таблица 2. Энергетические вклады глобальных конформаций молекул Leu-галлатостатина-4, дроstatина-3, шистотатина-6 и аллатостатина-4

Нейропептиды	Энергетические вклады (ккал/моль)			
	Е _{нев}	Е _{эл}	Е _{торс}	Е _{полн}
Leu-галлатостатин-4	-48,34	2,49	5,26	-41,59
Дростатин-3	-45,23	3,66	3,07	-38,51
Шистотатин-6	-43,09	3,39	3,26	-35,86
Аллатостатин-4	-44,30	3,00	4,30	-36,90

Список литературы / References:

1. Lenz C., Williamson M. et al. Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, vol. 273, no. 2, pp. 571-577.
2. Hewes R.S., Taghert P.H. Neuropeptides and Neuropeptide Receptors in the *Drosophila melanogaster* Genome. *Genome Res.*, 2001, vol. 11, no. 6, pp. 1126-1142.

3. Audsley N., Weaver R.J. et al. Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, vol. 30, no. 8-9, pp. 681-689.
4. Momany F.A., McGuire R.F., Burgess A.W., Scheraga H.A. Energy parameters in polypeptides: Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interaction for naturally occurring amino acid. *Phys. Chem.*, 1975, vol. 79, pp. 2361-2381.
5. Mills I., et al. *IUPAC-IUB Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, vol. 39.
6. Balabaev N.K., Lemak A.S. Molecular dynamics simulation of ferredoxin in different electronic states. *Laser Spectroscopy of Biomolecules*, E.I. Korppi-Tommola, Ed., Proc. SPIE 1921, 1993, pp. 375-385.
7. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy minimization, and dynamics calculations. *J.Comput.Chemistry*, 1983, vol. 4, no. 2, pp. 187-217.
8. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Gojayev N.M. Program for semiempirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp.147-148.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE SPATIAL STRUCTURE OF LEU-CALLOTOSTATIN-4, DROSTATIN-3, SHISTOSTATINE-6 AND ALLATOSTATINE-4 MOLECULES

Veliyeva L.I., Aliyev R.E.

Baku State University

Z. Khalilov str., 23, AZ 1148, Baku, Azerbaijan; e-mail: Lala_Veliyeva@rambler.ru

Abstract. One of the urgent problems in contemporary science is the searching and targeted synthesis of compounds, which is used to regulate the number of pests of agricultural crops. The molecules Leu-gallatostatin-4, drostatin-3, schistostatin-6 and allatostatin-4, which belong to the family of allatostatin and play a key role in regulating the processes of synthesis and isolation of juvenile hormones in various insect species, in particular, *Calliphora Vomitoria*, *Drosophilla melanogaster*, *Shistostocerca gregaria* are among these compounds. An important role in the realization of the functions of allatostatin is played by their conformational properties and three-dimensional spatial organization, the study of which is necessary for understanding the mechanisms of the functioning of these compounds at the molecular level. In this paper, methods of theoretical conformational analysis and molecular dynamics and based on a step-by-step approach are used to study the spatial structure, conformational properties, and mobility of the side chains of these compounds.

Key words: *neuropeptides; structure; conformational analysis; molecular dynamics.*

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЛИНЕЙНОГО ПАРАБОЛИЧЕСКОГО УРАВНЕНИЯ С КИНЕТИКОЙ ТИПА МОНО

Дусаева Я.М.¹, Водопьянов В.В.²

Уфимский государственный авиационный технический университет
ул. К. Маркса, 12, Уфа, 450008, РФ; e-mail: ¹yanadusaeva@mail.ru, ²vodop@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.06.2018

Аннотация. Работа посвящена исследованию уравнения типа Фишера-КПП с особой правой частью в виде функции Моно. Данный тип уравнения часто используется при моделировании биологических систем, например, в системе уравнений, описывающей рост опухолевых клеток. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию уравнения данного типа с различными источниками, подобный тип источника редко встречается в исследованиях. Функция Моно возникает в случае, когда речь идет о биологических популяциях, которые могут вступать в реакцию только при адсорбции, а также в ряде многих других случаях. Целью данной работы является исследование данного типа уравнений. Для поставленной задачи была доказана теорема сравнения и теорема о постоянстве формы волны во времени, а также найдено поведение решения уравнения в окрестности нуля и в бесконечности. Результаты аналитического исследования были подтверждены при численном моделировании.

Ключевые слова: уравнение КПП, кинетика Моно, нелинейное параболическое уравнение, теорема сравнения, модели биологических систем, численное моделирование, решение типа бегущей волны.

ВВЕДЕНИЕ

Рассмотрение точечных математических моделей биологических систем

$$\frac{\partial u}{\partial x} = f(u),$$

где $u(t)$ – плотность популяции, показывает, что в качестве источников роста (активатора) или стока (ингибитора) $f(u)$ выступают, как правило, аддитивные и мультипликативные комбинации функций всего трех видов:

- 1) u^n – при $n=1$ функция Мальтуса, при $n=2$ функция судного дня;
- 2) $u(K-u)$ – логистическая функция (функция Ферхюльста);
- 3) $\frac{Mu}{K+u}$ – функция Моно (функция Михаэлиса-Ментен).

Выбор той или иной комбинации функций типа 1-3 определяются кинетикой исследуемого процесса.

В работах Фишера, Колмогорова, Петровского, Пискунова впервые началось исследование нелинейных параболических уравнений вида:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + F(u). \quad (1)$$

С этого момента исследованием данного уравнения занимались многие авторы (достаточно подробно полученные результаты можно найти в [1] и [2]). Однако в качестве функции $F(u)$ использовали в основном комбинации функций 1 и 2 видов. Источник типа Моно редко встречается в исследованиях нелинейных параболических уравнения. Вместе с тем рассмотрение уравнений с функциями вида $\frac{Mu}{K+u}$ представляет несомненно большой интерес. Эта функция возникает в случае, когда речь идет о биологических популяциях, которые могут вступать в реакцию только при адсорбции, а также в ряде многих других случаях (см. примеры подобных математических моделей в [3], [4], [5]).

Цель наших исследований – изучение уравнения типа (1), где в качестве источника выступает функция типа Моно.

Госановка задачи. Рассмотрим полулинейное параболическое уравнение с источником в виде функции Моно:

$$\frac{\partial w(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 w(x,t)}{\partial x^2} + \frac{w(x,t)}{1+w(x,t)}, \quad (2)$$

$$w(x, t) \in C^2([0, T] \times [0, +\infty)) \cap C([0, T] \times [0, +\infty)).$$

Введем обозначения:

$$B(w) = k \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} + \frac{w(x, t)}{1 + w(x, t)},$$

$$F(w) = \frac{w(x, t)}{1 + w(x, t)}.$$

Здесь $w(x, t)$ – плотность вещества в данной точке, D – коэффициент диффузии, а свободный член удовлетворяет следующим условиям:

$$F(0) = 0, F(1) = \frac{1}{2}, F(w) < 1 \text{ при } w \geq 0,$$

$$F'(0) = 1, F'(1) = \frac{1}{4}, F'(w) \leq 1 \text{ при } w \geq 0.$$

Функция $F(w)$ имеет следующий смысл: в каждой точке пространства, кроме диффузии, имеется также источник, скорость которого монотонно растет к максимальному значению с ростом плотности вещества. В биологических системах подобные случаи встречаются при неограниченном (или очень большом) присутствии продуктов питания.

Возьмем коэффициент диффузии $D = 1$. Зададим начальные:

$$w(x, 0) = w_0(x) \geq 0, x \in [0, +\infty) \quad (3)$$

и граничные условия:

$$\left. \frac{\partial w(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, t \in [0, T] \quad (4)$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} w(x, t) = 0, t \in [0, T]. \quad (5)$$

Если функция $w_0(x)$ имеет компактный носитель, т.е. носитель на отрезке $[0, X_0]$, то вне этого отрезка не будет происходить роста $w(x, t)$ пока за счет диффузионных процессов в этой точке функция $w(x, t)$ станет ненулевой. Но так как процессы рассматриваются в конечный промежуток и скорость диффузии конечна, то задачу можно рассмотреть не на промежутке $[0, +\infty)$, а на отрезке $[0, X]$ при достаточно больших значениях X . Таким образом, уравнение (2) можно рассматривать для функции

$$w(x, t) \in C^{1,2}([0, T] \times [0, X]) \cap C([0, T] \times [0, X])$$

и заменить граничное условие (5) на условие

$$w(X, t) = 0. \quad (6)$$

Теорема 1 (существования решения). Пусть дано уравнение

$$\frac{\partial w(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} + F(x, t, w), \quad (7)$$

где непрерывная и ограниченная функция $F(x, t, w)$ удовлетворяет условию Липшица по w и x , т. е.

$$|F(x_2, t, w_2) - F(x_1, t, w_1)| < k |w_2 - w_1| + k |x_2 - x_1|$$

(k – постоянная, не зависящая от x, t, w). Пусть $w_0(x, t)$ – некоторая ограниченная функция, определенная для всех значений x . Для простоты будем предполагать, что $w_0(x, t)$ имеет только конечное число точек разрыва. Тогда существует одна и только одна ограниченная при ограниченных значениях t функция $w(x, t)$, которая при $t > 0$ удовлетворяет уравнению (7) и при $t = 0$ принимает значение $w_0(x, t)$ во всех точках непрерывности этой функции, а также условию (4). В дальнейшем, для краткости говоря, что $w(x, t)$ обращается в $w_0(x, t)$ при $t = 0$, мы будем всегда иметь в виду только точки непрерывности функции $w_0(x, t)$.

Утверждение теоремы может быть получено из соответствующей теоремы в [6], если рассматривать уравнение (7) на всей числовой оси, продолжив симметрично на отрицательную ось начальное условие (3). В этом случае, в силу симметрии начальных условий и уравнения, решение, существование которого установлена в [6], будет заведомо удовлетворять условию (4).

Теорема (принцип максимума). Пусть функция определена и непрерывна в замкнутой области $0 \leq t \leq T, 0 \leq x \leq X$, удовлетворяет уравнению (2). Пусть она достигает своего максимума в точке P_0 , являющейся серединой отрезка $t = T$. Тогда $u(x, t) \equiv u(P_0)$ всюду в области $0 \leq t \leq T, 0 \leq x \leq X$.

Доказательство теоремы можно найти в статье [7].

Теорема (сравнения). Пусть в $[0, T] \times \bar{\Omega}$ определено решение задачи (2)-(4), (6) $w(x, t)$, а также функции $w_-(x, t), w_+(x, t) \in C^{1,2}([0, T] \times [0, X])$, удовлетворяющие неравенствам:

$$\frac{\partial w_+(x, t)}{\partial t} \geq B(w_+(x, t)), \quad (9)$$

$$\frac{\partial w_-(x, t)}{\partial t} \leq B(w_-(x, t)) \text{ в } [0, T] \times [0, X], \quad (10)$$

и кроме того

$$w_-(x, 0) < w_0(x) < w_+(x, 0), x \in [0, X], \quad (11)$$

$$\left. \frac{\partial w_-(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} < \left. \frac{\partial w(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} < \left. \frac{\partial w_+(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (12)$$

$$w_-(X, t) < w(X, t) < w_+(X, t). \quad (13)$$

Тогда верно:

$$w_-(x, t) < w(x, t) < w_+(x, t) \text{ в } [0, T] \times [0, X]. \quad (14)$$

Доказательство:

Рассмотрим неравенства:

$$\frac{\partial w_-(x, t)}{\partial t} \leq B(w_-(x, t)) \text{ в } [0, T] \times [0, X],$$

$$w_-(x, 0) < w_0(x), x \in [0, X],$$

$$\left. \frac{\partial w_-(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} < \left. \frac{\partial w(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} = 0,$$

$$w_-(X, t) < w(X, t) = 0.$$

Если все неравенства являются строгими в некоторых подобластях, то в силу непрерывности решения, строгое неравенство будет выполняться, по крайней мере, в окрестности нулевой точки времени.

Пусть M – множество точек σ в интервале $(0, T]$ таких, что:

$$w_-(x, t) < w(x, t) \text{ в } [0, \sigma) \times [0, X].$$

Обозначим $t_0 = \sup(\sigma)$. Нужно доказать, что $t_0 = T$. Пусть $t_0 < T$. Обозначим $z(x, t) = w(x, t) - w_-(x, t)$. Тогда:

$$z(x, t) > 0 \text{ в } \Omega_{t_0} = [0, X] \cap (0 < t < t_0),$$

$$z(x, t) \geq 0 \text{ в } D_{t_0} = (0, X) \times \{t = t_0\}.$$

Так как $z(x, t) = w(x, t) - w_-(x, t)$, $w_-(X, t) < w(X, t)$, то $z(x, t) \neq 0$ на границе $[0, X] \times \{t = t_0\}$. Следовательно, $\exists$ точка $P^0 = (x^0, t^0) : z(P^0) = 0$ в области D_{t_0} .

В точке $P^0 : w(x^0, t^0) = w_-(x^0, t^0)$. Так как в точке P^0 функция $z(x^0, t^0)$ достигает минимума, то

$$\left. \frac{\partial z(x, t)}{\partial x} \right|_{(x^0, t^0)} = 0, \text{ а } \left. \frac{\partial^2 z(x, t)}{\partial x^2} \right|_{(x^0, t^0)} > 0.$$

Но

$$\left. \frac{\partial^2 z(x, t)}{\partial x^2} \right|_{(x^0, t^0)} = \left. \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} \right|_{(x^0, t^0)} - \left. \frac{\partial^2 w_-(x, t)}{\partial x^2} \right|_{(x^0, t^0)} > 0 \Rightarrow \left. \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} \right|_{(x^0, t^0)} > \left. \frac{\partial^2 w_-(x, t)}{\partial x^2} \right|_{(x^0, t^0)}.$$

Получаем:

$$\left. \begin{aligned} B(w(x, t)) - k \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} + F_0(w(x, t)) \\ B(w_-(x^0, t^0)) = k \frac{\partial^2 w_-(x, t)}{\partial x^2} \Big|_{(x^0, t^0)} + F_0(w_-(x, t)) \end{aligned} \right\} \Rightarrow B(w_-(x^0, t^0)) > B(w_-(x^0, t^0)).$$

С учетом неравенств (2) и (10), получаем:

$$\left. \frac{\partial w(x, t)}{\partial t} \right|_{(x^0, t^0)} = B(w(x^0, t^0)) > B(w_-(x^0, t^0)) \geq \left. \frac{\partial w_-(x, t)}{\partial t} \right|_{(x^0, t^0)} \Rightarrow \left. \frac{\partial w(x, t)}{\partial t} \right|_{(x^0, t^0)} > \left. \frac{\partial w_-(x, t)}{\partial t} \right|_{(x^0, t^0)}.$$

С другой стороны:

$$z(P^0) < z(P) \forall P \in D_{t_0} \Rightarrow \frac{\partial z(x^0, t^0)}{\partial t} \leq 0 \Rightarrow \frac{\partial w(x^0, t^0)}{\partial t} \leq \frac{\partial w_-(x^0, t^0)}{\partial t},$$

получили противоречие. Значит $t_0 = T$. Аналогично доказывается для $w_+(x, t)$.

Функции $w_-(x, t)$ и $w_+(x, t)$ называются, соответственно, нижним и верхним решением задачи (2)-(4), (6).

Единственность решения данной задачи вытекает из теоремы сравнения. Пусть существует два решения исходной задачи: $w_1(x, t)$ и $w_2(x, t)$ с одинаковыми граничными условиями. Пусть $w_+(x, t) = w_1(x, t)$, $w_-(x, t) = w_2(x, t)$. Тогда $w_1(x, t) \geq w_2(x, t)$. Если же взять $w_+(x, t) = w_2(x, t)$, $w_-(x, t) = w_1(x, t)$, то получим $w_1(x, t) \leq w_2(x, t)$. А значит, что $w_1(x, t) = w_2(x, t)$.

Одновременно будем рассматривать уравнение:

$$\frac{\partial v(x, t)}{\partial t} = k \frac{\partial^2 v(x, t)}{\partial x^2} + v(x, t), \quad (15)$$

$$v(x, t) \in C^{1,2}([0, T] \times \Omega) \cap C([0, T] \times \overline{\Omega}),$$

с такими же начальными:

$$v(x, 0) = w_0(x, t) \geq 0, x \in \Omega \quad (16)$$

и граничными условиями:

$$\left. \frac{\partial v(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, t \in [0, T] \quad (17)$$

$$v(x, t) = 0, t \in [0, T]. \quad (18)$$

Исходя из теоремы сравнения, получаем, что $v(x, t)$, являющееся решением задачи (15)-(18), также является верхним решением задачи (2)-(4),(6).

Найдем $v(x, t)$. Заменой $v(x, t) = e^t u(x, t)$ от уравнения (15) придем к уравнению вида:

$$\frac{\partial u(x, t)}{\partial t} = k \frac{\partial^2 u(x, t)}{\partial x^2}$$

с начальным условием:

$$u(x, 0) = e^{-t} w_0(x)$$

и граничными условиями:

$$\left. \frac{\partial u(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, t \in [0, T],$$

$$u(X, t) = 0, t \in [0, T].$$

Решением этого уравнения является функция:

$$u(x, t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi kt}} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{(x-\xi)^2}{4kt}} e^{-t} w_0(\xi) d\xi.$$

Исходя из решения этого уравнения и теоремы сравнения, получим:

$$w(x, t) \leq v(x, t) = \frac{e^t}{2\sqrt{\pi kt}} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{(x-\xi)^2}{4kt}} e^{-t} w_0(\xi) d\xi.$$

Из последнего неравенства можно найти такую зависимость между x и t , при которой плотность будет принимать половину своего максимального значения. Назовем эту зависимость глубиной проникновения волны. В силу принципа максимума, с учетом данных граничных и начальных условий получаем, что максимум плотности приходится на $x = 0$. Тогда из последнего неравенства можно оценить максимальную плотность $w_{\max}$, а затем оценить и глубину проникновения волны для каждого момента времени t .

Утверждение. Решение задачи Коши для уравнения (2) с начальной функцией

$$w(0, x) = \delta \theta^0(x), x \in R$$

асимптотически сходится к автомодельной функции $\theta^0(\xi)$ в следующем смысле: $\exists \xi_0 = \text{const}$ такая, что

$$w(t, \xi - \lambda_0 t) - \theta^0(\xi + \xi_0) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} 0 \text{ для } \forall \xi \in R.$$

Доказательство:

Рассмотрим функцию:

$$F(x, t) = \frac{w(x, t)}{1 + w(x, t)}.$$

Найдем такое δ , чтобы было выполнено неравенство $F(\delta w) \geq \delta F(w)$:

$$\frac{\delta w}{1+\delta w} - \delta \frac{w}{1+w} = \frac{\delta w^2(1-\delta)}{(1+w)(1+\delta w)} \Rightarrow F(\delta w) - \delta F(w) \geq 0 \text{ при } \delta \in (0,1).$$

Зададим начальные условия: $w(x,0) = w_0(x) = \delta \theta^0(x)$, $x \in R$. Перейдем от уравнения (2) к уравнению для функции $\theta(\xi, t) = w(t, \xi - \lambda_0 t)$:

$$\frac{\partial \theta(\xi, t)}{\partial t} = k \frac{\partial^2 \theta(\xi, t)}{\partial \xi^2} + \lambda_0 \frac{\partial \theta(\xi, t)}{\partial \xi} + F(\theta), t > 0, \xi \in R. \quad (19)$$

Начальное условие:

$$\theta_0(\xi) = \theta(\xi, 0) = w_0(x) = \delta \theta(x).$$

Граничные условия:

$$\left. \frac{\partial \theta(x, t)}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, t \in [0, T],$$

$$\theta(X, t) = 0.$$

Проверим решение уравнения (19) на критичность, то есть на выполнение условия $\theta_t \geq 0$. Сделаем замену

$$z = \frac{\partial \theta(\xi, t)}{\partial t};$$

$$\frac{\partial z(\xi, t)}{\partial t} = k \frac{\partial^2 z(\xi, t)}{\partial \xi^2} + \lambda_0 \frac{\partial z(\xi, t)}{\partial \xi} + F'(\theta) \frac{\partial z(\xi, t)}{\partial t},$$

$$z(\xi, 0) = \left. \frac{\partial \theta(\xi, t)}{\partial t} \right|_{t=0}.$$

Если $z(\xi, 0) \geq 0$, то в силу принципа максимума $z(\xi, t) \geq 0$. Проверим это:

$$\left. \frac{\partial \theta(\xi, t)}{\partial t} \right|_{t=0} = k \frac{\partial^2 \theta_0(\xi, t)}{\partial \xi^2} + \lambda_0 \frac{\partial \theta_0(\xi, t)}{\partial \xi} + F(\theta_0) = \delta \left(k \frac{\partial^2 \theta^0(\xi, t)}{\partial \xi^2} + \lambda_0 \frac{\partial \theta^0(\xi, t)}{\partial \xi} \right) + F(\delta \theta^0) =$$

$$= -\delta F(\theta^0) + F(\delta \theta^0) \geq 0.$$

Из последнего следует, что

$$z(\xi, t) = \frac{\partial \theta(\xi, t)}{\partial t} \geq 0,$$

то есть функция $\theta(\xi, t)$ является неубывающей по t .

Заметим, что, так как в начальный момент времени $\theta(\xi, 0) = \delta \theta^0(x)$ и $\delta \in (0,1)$, то в силу теоремы сравнения, получаем, что $\theta(\xi, t) \leq \theta^0(\xi)$.

Получаем, что функция $\theta(\xi, t)$ является неубывающей по t и, кроме того, ограничена сверху. А значит при $\forall \xi \in R$ существует предел. Получим, что

$$w(t, \xi - \lambda_0 t) - \theta^0(\xi + \xi_0) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} 0 \text{ для } \forall \xi \in R.$$

То есть, с течением времени форма волны не меняется.

Численное моделирование. При численном моделировании решения поставленной задачи было обнаружено, что в пакетном режиме происходило существенное искажение решения на границе области исследования. В связи с этим, была написана программа для численного решения задачи.

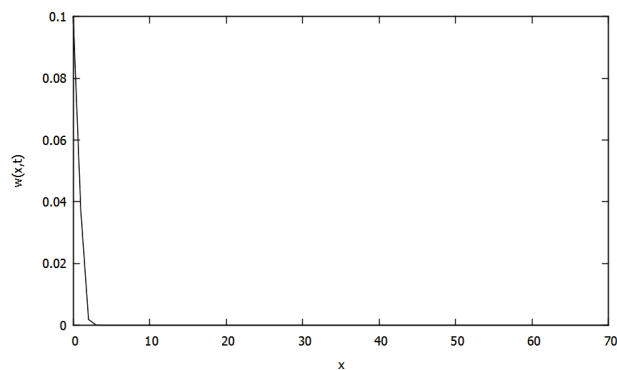


Рисунок 1. График функции $w(x, t)$ при $t = 0$

Аппроксимируем исходную задачу (2) с начальными условиями вида (3) и граничными (4),(6) разностной схемой. Введем в области в $D = \{0 \leq t \leq T, 0 \leq x \leq X\}$ равномерную сетку с шагом h по координате и шагом τ по времени:

$$x_i = ih, i = 0, 1, \dots, N, Nh = X;$$

$$\tau_j = j\tau, j = 0, 1, \dots, M, M\tau = T.$$

Выпишем явную схему для данного уравнения:

$$\frac{w_i^{j+1} - w_i^j}{\tau} = \frac{w_{i+1}^j - 2w_i^j + w_{i-1}^j}{h} + \frac{w_i^j}{1 + w_i^j} \Rightarrow w_i^{j+1} = \tau \left(\frac{w_{i+1}^j - 2w_i^j + w_{i-1}^j}{h} + \frac{w_i^j}{1 + w_i^j} \right) + w_i^j.$$

Начальные и граничные условия аппроксимируем следующим образом:

$$w_i^0 = w_0, i = 0, 1, \dots, N;$$

$$w_1^j - w_0^j = 0, j = 0, 1, \dots, M;$$

$$w_N^j = 0, j = 0, 1, \dots, M.$$

Данная схема является устойчивой при условии:

$$\tau \leq \frac{h^2}{2} \quad (20)$$

Из условия устойчивости получим, что при шаге по пространству $h=1$ следует, что $\tau = \frac{1}{2}$. На рисунке 1 предоставлен график начального распределения функции $w(x, t)$, а на рисунке 2 – графики самой функции $w(x, t)$ при разном значении t .

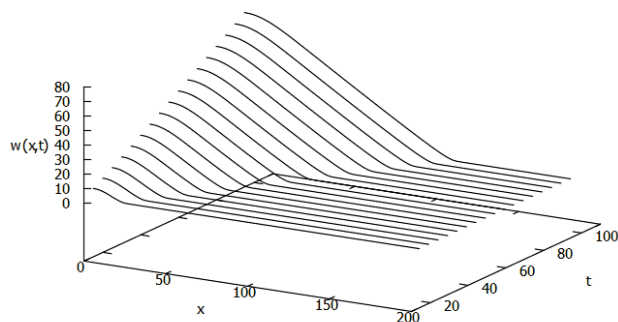


Рисунок 2. График функции $w(x, t)$

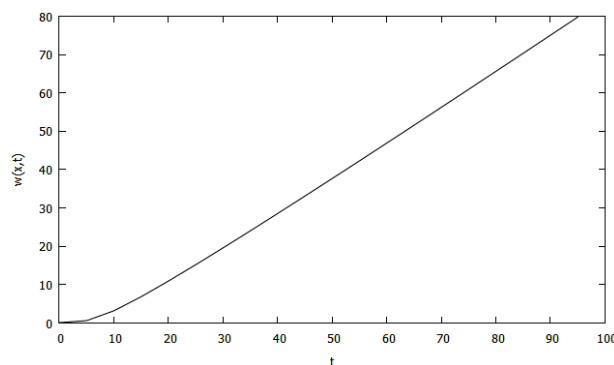


Рисунок 3. График функции $w(x, t)$ при $x = 0$

Из графиков видно, что с течением времени плотность вещества неограниченно увеличивается, то есть растет максимум исследуемой функции. Волна движется к правой границе, охватывая всю большую площадь. Так же можно заметить, что сама форма волны не меняется, как и доказывалось ранее.

На рисунке 3 представлен график поведения максимума решения в разные моменты времени. Из графика видно, что рост функции $w(x, t)$ при $x = 0$ в начальные моменты времени не является линейным. Однако при больших t рост становится линейным. В дальнейшем эта особенность будет доказана исходя из асимптотики решения.

Исследование поведения уравнения при больших и малых значениях функции $w(x, t)$

Исследуем теперь поведение решения задачи (2)-(4), (6) при малых плотностях. Рассмотрим свободный член

$$F(w) = \frac{w(x, t)}{1 + w(x, t)}.$$

При малых значениях $w(x, t)$ свободный член можно аппроксимировать следующим образом:

$$\frac{w(x, t)}{1 + w(x, t)} \approx w(x, t).$$

Следовательно, получим уравнение:

$$\frac{\partial w(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} + w(x, t) \quad (21)$$

Решением данного уравнения с учетом начальных условий (3) будет

$$w(x, t) = \frac{0.1 \cdot e^t \cdot e^{\frac{-x^2}{1+4t}}}{\sqrt{1+4t}}.$$

Из решения видно, что при малых значениях функции $w(x, t)$ у нее наблюдается экспоненциальный рост.

Теперь рассмотрим свободный член $F(w)$ при $w(x, t) \gg 1$. Его аппроксимация будет такой: $F(w) \approx 1$. В связи с этим будем решать уравнение:

$$\frac{\partial w(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial x^2} + 1. \quad (22)$$

Решением данного уравнения с учетом начальных условий (3) будет функция

$$w(x, t) = \frac{0.1 \cdot e^{\frac{-x^2}{1+4t}}}{\sqrt{1+4t}} + t.$$

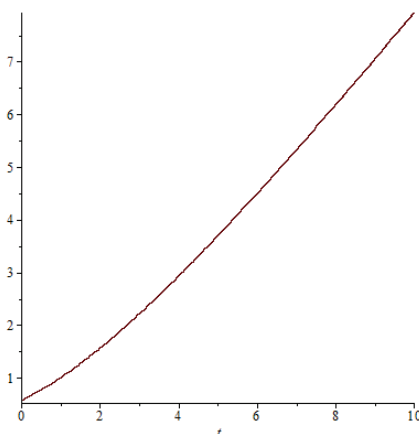


Рисунок 4. График функции (23)

При больших плотностях, то есть в самой волне, вторая производная мала (что можно наблюдать и при численном моделировании), и поэтому можно рассмотреть следующее уравнение:

$$\frac{\partial w(x, t)}{\partial t} = \frac{w(x, t)}{1 + w(x, t)}.$$

Решением данного уравнения будет функция, удовлетворяющая уравнению:

$$w(x, t) + \ln(w(x, t)) = t + C, \quad (23)$$

где C – некая константа. Построим график этой функции

Из графика видно, что функция имеет линейный рост. А значит, волна в области больших плотностей растет линейно.

Таким образом, была найдена асимптотика функции $w(x, t)$ при малых значениях функции и при фиксированных значениях x , но больших t .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследуется нелинейное параболическое уравнение с источником в виде функции Моно, которое часто используется при моделировании биологических популяций.

Было установлено, что у поставленной задачи существует единственное решение. Благодаря теореме сравнения, удалось оценить функцию сверху и доказать утверждение о том, что решение задачи Коши асимптотически сходится к автомодельной функции.

Для численного решения задачи была написана программа, реализующая разностную схему. Полученные графики доказали, что задача имеет решение типа бегущей волны и что форма волны с течением времени не изменяется.

Было исследовано поведение решения при больших и малых значениях функции. Доказано, что при малых значениях функции решение имеет экспоненциальную скорость. Фактически, была найдена асимптотика по временной и пространственной переменной.

Список литературы / References:

1. Полянин А.Д., Зайцев В.Ф. *Справочник по нелинейным уравнениям математической физики: точные решения*. М.: Физматлит, 2002, 432 с. [Polyanin A.D., Zaicev V.F. *Handbook of nonlinear equations of mathematical physics: exact solutions*. Moscow: Fizmatlit, 2002, 432 p. (In Russ.)]
2. Самарский А.А., Галактионов В.А., Курдюмов С.П., Михайлов А.П. *Режимы с обострением в задачах для квазилинейных параболических уравнений*. М.: Наука, 1987, 480 с. [Samarski A.A., Galaktionov V.A., Kurdumov S.P., Mihailov A.P. *Regimes with aggravation in the problems for parabolic equations quasilinear*. Moscow: Science, 1987, 480 p. (In Russ.)]
3. Колобов А.В., Анашкина А.А., Губернов В.В., Полежаев А.А. Математическая модель роста опухоли с учетом дихотомии миграции и пролиферации. *Компьютерные исследования и моделирование*, 2009, т. 1, № 4, с. 415-422. [Kolobov A.V., Anashkin A.A., Gubernev V.V., Polezhev A.A. Mathematical model of tumor growth taking into account the dichotomy of migration and proliferation. *Computer research and modeling*, vol. 1, no. 4, pp. 415-422, 2009 (In Russ.)]
4. Буляница А.Л., Курочкин В. Е. Исследование процессов упорядочивания в открытых системах (на примере эволюции колонии несовершенных мицелиальных грибов). *Научное приборостроение*, 2000, т. 10,

№ 2, с. 43-49. [Bulyanica A.L., Kurochkin V.E. Research of processes of ordering in open systems (on the example of the evolution of colonies of imperfect mycelial fungi). *Scientific instrument manufacturing*, 2000, vol. 10, no. 2, pp 43-49. (In Russ.)]

5. Idiyatullina A.R., Vodopyanova L.L., Vodopyanov V.V. Mathematical Modelling of the Micromicetes Colonies Growth Applying the Diffusion Equation. *Advances in Microbiology*, 2013, no. 3, pp. 7-10.

6. Колмогоров А.Н., Петровский И.Г., Пискунов Н.С. Исследование уравнения диффузии, соединенной с возрастанием количества вещества, и его применение к одной биологической проблеме. *Бюллет. МГУ*, 1937, т. 1, № 6, с. 1-26. [Kolmogorov A.N, Petrovskii I.G, Piskunov N.S. Investigation of the diffusion equation connected with the increase in the amount of substance and its application to one biological problem. *Bulletin MSU*, vol. 1, no. 6, pp. 1-26, 1937 (In Russ.)]

7. Takasi K. On the maximum principle for quasi-linear parabolic equations of the second order. *Proc. Japan Acad.*, 1963, vol. 39, no. 4, pp. 211-216.

THE STUDY OF NONLINEAR PARABOLIC EQUATIONS WITH KINETICS OF THE TYPE MONO

Dusaeva Ya.M.¹, Vodopyanov V.V.²

Ufa State Aviation Technical University

K. Marx str., 12, Ufa, 450008, Russia; e-mail: ¹yanadusaeva@mail.ru, ²vodop@yandex.ru

Abstract. This article is about study of the Fisher-KPP type equation with a special right-hand side in the form of Mono function. This type of equation is often used in the modeling of biological systems, for example, in the system of equations describing the growth of tumor cells. Despite the large number of works devoted to the study of this type equation with different sources, this type of source is rarely found in studies. Mono function occurs when it comes to biological populations, which can react only when adsorption, as well as in many other cases. The aim of this work is to research this type of equations. For assigned task, the comparison theorem and the theorem of the constancy of the wave form in time were proved, and the behavior of the solution of the equation in the neighborhood of zero and infinity was found. The results of the analytical solution were confirmed by numerical solution.

Key words: KPP equation, Mono kinetics, nonlinear parabolic equation, comparison theorem, models of biological systems, numeric modeling, traveling wave type solution.

3D ТРАЕКТОРИИ ДВИЖЕНИЯ КИНКОВ В НЕОДНОРОДНОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ДНК

Краснобаева Л.А.^{1,2}, Якушевич Л.В.³

¹Сибирский государственный медицинский университет,
Московский тр-т, 2, г. Томск, 634050, РФ

²Томский государственный университет,
пр. Ленина, 36, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: kla1983@mail.ru

³Институт биофизики клетки РАН,
ул. Институтская 3, г.Пуццоно, 142290, РФ; e-mail: yakushev@icb.psn.ru

Поступила в редакцию: 13.06.2018

Аннотация. Несмотря на большое количество публикаций, посвященных нелинейной динамике ДНК, и, в частности, изучению особенностей движения кинков в неоднородных последовательностях, многие задачи в этой области остаются нерешенными. Среди них задача о движении кинков в последовательности кольцевой ДНК - плазмиды pBR322. В настоящей работе эта задача исследуется методами математического моделирования. Для имитации движения кинков используется уравнение МакЛафлина-Скотта, а решение этого уравнения находится с помощью блочного метода. Результаты расчета представлены в виде траекторий движения в 3D пространстве.

Ключевые слова: нелинейная динамика неоднородной ДНК, уравнение МакЛафлина-Скотта, кинки, блочный метод, 3D траектории, плаزمида pBR322.

ВВЕДЕНИЕ

Особенности движения кинков в неоднородных последовательностях ДНК – одна из наиболее интересных задач современной математической биофизики. Она тесно связана с другой важной задачей молекулярной биологии – задачей о динамике транскрипционных пузырей, образующихся в начальной стадии процесса транскрипции [1]. Несмотря на большое количество публикаций, посвященных этой теме, многие вопросы, касающиеся движения кинков все еще остаются нерешенными. Среди них задача о движении кинков в последовательности плазмиды pBR322.

Плазмида pBR322 представляет собой кольцевую ДНК (рис. 1а), последовательность которой состоит из 4361 оснований [2]. Из них 983 аденинов, 1034 тимина, 1134 гуанина и 1210 цитозина. Плазмида pBR322 широко используется в генных исследованиях, а ее компоненты – при создании новых инструментальных плазмид [3]. На рис. 1б представлен линейный аналог плазмиды, полученный путем разрезания кольцевой ДНК в точке S. Известно, что основная цепь плазмиды (рис. 1б) содержит два кодирующих участка CDS-1 и CDS-2 с координатами (86..1276) и (1915..2106), соответственно, а комплементарная цепь содержит один кодирующий участок CDS-3 с координатами (3293..4153).

В настоящей работе задача о движении кинков в плазмиде pBR322 решается методами математического моделирования. Для имитации движения кинков используется уравнение МакЛафлина-Скотта [4], а решение этого уравнения находится с помощью блочного метода [5]. Результаты расчета представлены в виде траекторий движения в 3D пространстве.

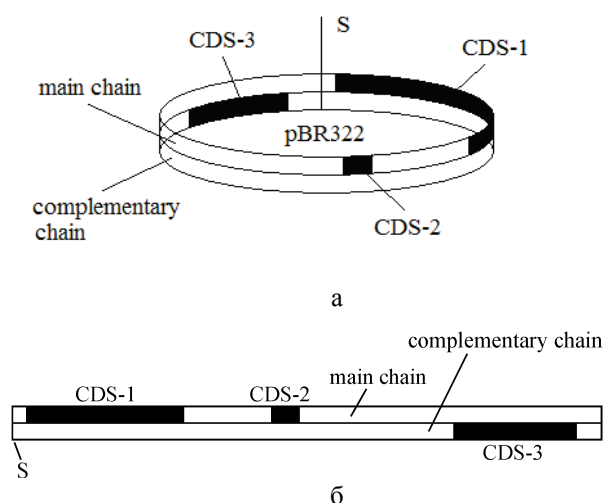


Рисунок 1. Схематическое изображение (а) кольцевой плазмиды pBR322 и (б) ее линейного аналога, S – точка разреза. Черным цветом показаны кодирующие участки CDS-1, CDS-2 и CDS-3. В основной полинуклеотидной цепи расположены CDS-1, CDS-2, в комплементарной цепи - CDS-3

МОДЕЛЬ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для моделирования движения кинка воспользуемся уравнением МакЛафлина-Скотта [4]:

$$\frac{dv_k(t)}{dt} = -\frac{\beta}{I} v_k(t) \left[1 - \left(\frac{v_k(t)}{C} \right)^2 \right], \quad (1)$$

для скорости движения кинка в однородной полинуклеотидной цепочке [6]. Здесь $\beta = \alpha R^2$; α – коэффициент диссипации; R – расстояние от центра масс азотистого основания цепочки до сахаро-фосфатной цепочки; I – момент инерции основания; $C = (K' a^2 / I)^{1/2}$ – скорость звука, K' – константа, характеризующая крутильную жесткость сахаро-фосфатной цепочки; a – расстояние между ближайшими парами оснований.

Решение этого уравнения – скорость кинка, имеет вид [6]:

$$v_k(t) = \frac{v_0 \gamma_0 \exp\left(-\frac{\beta}{I}(t-t_0)\right)}{\sqrt{1 + \left(\frac{v_0 \gamma_0}{C}\right)^2 \exp\left(-\frac{2\beta}{I}(t-t_0)\right)}}, \quad (2)$$

где $v_0 = v_k(t_0)$ – скорость кинка в начальный момент времени t_0 , $\gamma_0 = (1 - v_0^2 / C^2)^{-1/2}$.

Координата кинка $z_k(t)$, связанная со скоростью соотношением: $v_k(t) = \frac{dz_k(t)}{dt}$, определяется выражением [7]:

$$z_k(t) = z_0 - C \frac{I}{\beta} \operatorname{arcsinh}\left(\frac{v_0}{C} \gamma_0 \exp\left(-\frac{\beta}{I}(t-t_0)\right)\right) + C \frac{I}{\beta} \operatorname{arcsinh}\left(\frac{v_0}{C} \gamma_0\right), \quad (3)$$

где z_0 – координата кинка в начальный момент времени t_0 .

Полная энергия кинка определяется формулой:

$$E_k(t) = \frac{E_0}{\sqrt{1 - \frac{v_k^2(t)}{C^2}}}, \quad (4)$$

где $E_0 = 8\sqrt{K'V}$ – энергия покоя кинка; $V = k_{1-2}R^2$; k_{1-2} – константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар.

Чтобы распространить подход МакЛафлина-Скотта на неоднородные последовательности, в частности, на последовательность плазмиды pBR322, воспользуемся блочным методом. Из рисунка 1б видно, что основная последовательность плазмиды pBR322 состоит из пяти таких участков (блоков): двух кодирующих участков CDS-1 и CDS-2, а также трех промежуточных областей с координатами (1..85), (1277..1914) и (2107..4361). Перенумеруем все эти участки, как показано на рисунке 2.

В таблице 1 представлены данные о структуре этих участков. $N^{(i)}$ означает там общее количество оснований в i -м участке, $N_A^{(i)}$ – количество аденинов в i -м участке, $N_T^{(i)}$ – количество тиминов в i -м участке, $N_G^{(i)}$ – количество гуанинов в i -м участке, $N_C^{(i)}$ – количество цитидинов в i -м участке, $i = 1, 2, 3, 4, 5$.



Рисунок 2. Нумерация участков в основной цепи плазмиды pBR322

Таблица 1. Детали структуры последовательности плазмиды pBR322

Номер участка	Координаты участка	N_A	N_T	N_G	N_C	N
1	1..85	597	584	573	586	2340
2 (CDS-1)	86..1276	190	268	353	380	1191
3	1277..1914	142	145	160	191	638
4 (CDS-2)	1915..2106	54	37	48	53	192
5	2107..4361	597	584	573	586	2340

Усредним коэффициенты модельного уравнения (1) по каждому (i -му) участку (блоку):

$$\begin{aligned}\tilde{I}^{(i)} &= I_A C_A^{(i)} + I_T C_T^{(i)} + I_G C_G^{(i)} + I_C C_C^{(i)}, \\ \tilde{K}^{(i)} &= K_A C_A^{(i)} + K_T C_T^{(i)} + K_G C_G^{(i)} + K_C C_C^{(i)}, \\ \tilde{V}^{(i)} &= V_A C_A^{(i)} + V_T C_T^{(i)} + V_G C_G^{(i)} + V_C C_C^{(i)}, \\ \tilde{\beta}^{(i)} &= \beta_A C_A^{(i)} + \beta_T C_T^{(i)} + \beta_G C_G^{(i)} + \beta_C C_C^{(i)},\end{aligned}\quad (5)$$

где $C_j^{(i)} = N_j^{(i)} / N^{(i)}$ – концентрация оснований j -го типа ($j = A, T, G, C$) в i -м участке.

В результате для каждого из пяти участков получим свой набор коэффициентов уравнения МакЛафлина-Скотта (1). Однако, чтобы учесть кольцевой характер структуры ДНК (рис. 1а), объединим участки 1 и 5 и рассчитаем средние значения коэффициентов уравнения МакЛафлина-Скотта путем усреднения по объединенному участку 5 + 1. Значения усредненных коэффициентов, рассчитанные для каждого из пяти участков с учетом кольцевого характера структуры ДНК, представлены в табл. 2.

С учетом данных таблицы 2 находим формулы, определяющие основные динамические характеристики кинка: скорость, координату и полную энергию, на каждом из пяти участков:

$$v_k^{(i)}(t) = \frac{\left[v_0^{(i)} \tilde{\gamma}_0^{(i)} \exp\left(-\frac{\tilde{\beta}^{(i)}}{\tilde{I}^{(i)}}(t-t_{0i})\right) \right]}{\sqrt{1 + \left[\left(\frac{v_0^{(i)}}{\tilde{C}^{(i)}} \tilde{\gamma}_0^{(i)} \right) \exp\left(-\frac{\tilde{\beta}^{(i)}}{\tilde{I}^{(i)}}(t-t_{0i})\right) \right]^2}}, \quad (6)$$

$$z_k^{(i)}(t) = z_0^{(i)} - \tilde{C}^{(i)} \frac{\tilde{I}^{(i)}}{\tilde{\beta}^{(i)}} \operatorname{arcsinh} \left(\frac{v_0^{(i)}}{\tilde{C}^{(i)}} \tilde{\gamma}_0^{(i)} \exp\left(-\frac{\tilde{\beta}^{(i)}}{\tilde{I}^{(i)}}(t-t_{0i})\right) \right) + \tilde{C}^{(i)} \frac{\tilde{I}^{(i)}}{\tilde{\beta}^{(i)}} \operatorname{arcsinh} \left(\frac{v_0^{(i)}}{\tilde{C}^{(i)}} \tilde{\gamma}_0^{(i)} \right), \quad (7)$$

$$\tilde{E}^{(i)}(t) = \frac{8\sqrt{\tilde{K}^{(i)} \tilde{V}^{(i)}}}{\sqrt{1 - \left(\frac{v_k^{(i)}(t)}{\tilde{C}^{(i)}} \right)^2}}, \quad (8)$$

где $v_0^{(i)}$ – начальная скорость кинка на i -м участке, $\tilde{C}^{(i)} = (\tilde{K}^{(i)} a^2 / \tilde{I}^{(i)})^{1/2}$ – скорость звука на i -м участке, $\tilde{\gamma}_0^{(i)} = (1 - (v_0^{(i)} / \tilde{C}^{(i)})^2)^{-1/2}$, $z_0^{(i)}$ – координата кинка в начальный момент времени, t_{0i} – время начала движения кинка на i -м участке, $i = 1, 2, 3, 4, 5$.

Для получения временных зависимостей динамических характеристик кинков на всем временном интервале остается только «сшить» решения (6-8) на границах между участками. Наиболее простым способом это можно сделать, если предположить, что при пересечении границ потерь энергии кинка нет. В этом случае условия «сшивки» сводятся к приравниванию полной энергии (8) справа и слева от границы.

Таблица 2. Коэффициенты уравнения (1), усредненные по длине каждого из участков

Номер участка	Координаты участка	$\tilde{I}^{(i)} \times 10^{-44}$ (кг·м ²)	$\tilde{K}^{(i)} \times 10^{-18}$ (Н·м)	$\tilde{V}^{(i)} \times 10^{-20}$ (Н/м)	$\tilde{\beta}^{(i)} \times 10^{-34}$ (Дж·с)
1	1..85	6,19	1,94	2,18	3,51
2 (CDS-1)	86..1276	6,05	1,90	2,26	3,44
3	1277..1914	6,09	1,92	2,21	3,47
4 (CDS-2)	1915..2106	6,26	1,96	2,23	3,55
5	2107..4361	6,19	1,94	2,18	3,51

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того, чтобы построить 3D траектории движения кинков, были найдены численные решения системы связанных дифференциальных уравнений для скорости и координаты кинка:

$$\frac{d\tilde{z}_k^{(i)}(t)}{dt} = \tilde{v}_k^{(i)}(t), \quad (9)$$

$$\frac{d\tilde{v}_k^{(i)}(t)}{dt} = -\frac{\tilde{\beta}^{(i)}}{\tilde{I}^{(i)}} \tilde{v}_k^{(i)}(t) \left[1 - \left(\frac{\tilde{v}_k^{(i)}(t)}{\tilde{C}^{(i)}} \right)^2 \right], \quad i = 1, 2, 3, 4, 5. \quad (10)$$

Первое уравнение описывает связь координаты и скорости кинка на i -м участке. Второе – уравнение МакЛафлина-Скотта для скорости кинка на i -м участке. Результаты численного решения этих уравнений были использованы для построения траекторий движения кинка в пространстве $\{v, z, t\}$, рассчитанных для трех различных значений начальной скорости кинка (рис. 3).

Эти три значения начальной скорости были выбраны следующим образом. Первое модельное значение начальной скорости ($v_0^{(1)} = 150$ м/с) подбиралось так, чтобы кинк остановился внутри 1-го участка, не достигнув первой кодирующей области CDS-1.

Второе модельное значение ($v_0^{(1)} = 1650$ м/с) подбиралось таким образом, чтобы кинк смог пройти первую кодирующую область CDS-1, но не достиг второй кодирующей области CDS-2.

Третье модельное значение было подобрано так, чтобы кинк прошел через обе кодирующие области (CDS-1 и CDS-2).

Из рисунка 3 видно, что все три кривые убывают, что объясняется эффектами диссипации. На второй кривой наблюдается зигзаг (резкое увеличение скорости) в момент $t_2^{end,1650} = 7,99 \times 10^{-10}$ с. В этот момент кинк пересекает границу между 2-м и 3-м участками и, таким образом, выходит из первой кодирующей области CDS-1. На третьей кривой наблюдаются два зигзага. Первый зигзаг (резкое уменьшение скорости) наблюдается в момент $t_3^{end,1879} = 4,10 \times 10^{-10}$ с, когда кинк пересекает границу между 3-м и 4-м участками и входит во вторую кодирующую область CDS-2. Второй зигзаг (резкое увеличение скорости) наблюдается в момент $t_4^{end,1879} = 4,96 \times 10^{-10}$ с, когда кинк пересекает границу между 4-м и 5-м участками и, таким образом, выходит из первой кодирующей области CDS-2.

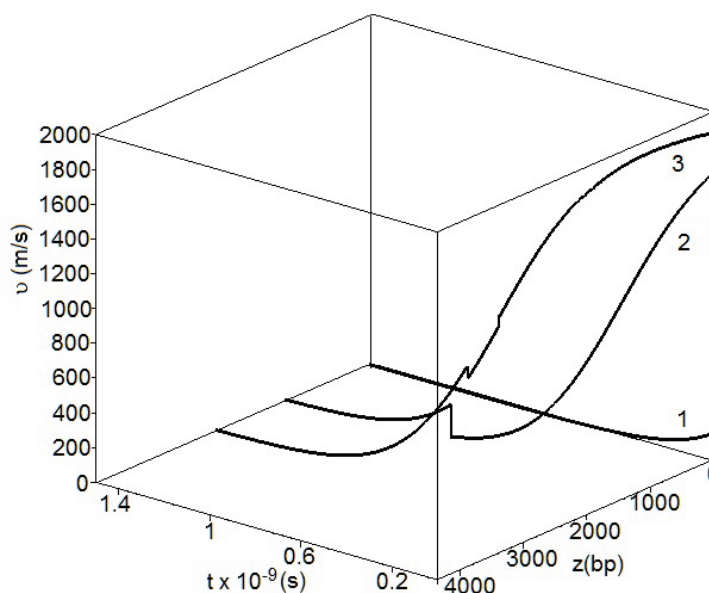


Рисунок 3. 3D траектории кинка в плазмиде pBR322. Кривая 1 соответствует начальной скорости 150 м/с, кривая 2 - начальной скорости 1650 м/с и кривая 3 - начальной скорости 1879 м/с

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В настоящей работе методами математического моделирования были построены 3D траектории движения кинка в плазмиде pBR322. Значения коэффициентов модельного уравнения МакЛафлина-Скотта рассчитывались с учетом кольцевой структуры молекулы ДНК. Расчеты проводились для трех специальным образом подобранных значений начальной скорости кинка: 150 м/с, 1650 м/с и 1879 м/с.

Преимущество 3D представления в том, что оно компактно и в то же время информативно. В частности, проекции 3D траекторий на плоскости $\{v, t\}$ и $\{z, t\}$ представляют собой графики зависимости скорости и координаты кинка от времени, а проекция на плоскость $\{v, z\}$ является фазовым портретом кинка.

Заметим, однако, что все описанные выше результаты, получены в рамках упрощенной модели, которая учитывает подвижность азотистых оснований только в одной из двух полинуклеотидных цепей ДНК. При этом вторая цепочка моделируется лишь как среднее поле. Также следует отметить, что для расчета динамических характеристик кинка было использовано уравнение МакЛафлина-Скотта, которое справедливо лишь для случая малой диссипации. Определенные ограничения накладывает также применение блочного метода, в котором реальную (нативную) последовательность оснований заменяют приближенной, полученной путем разбиения реальной последовательности на блоки и усреднения параметров модели внутри каждого блока.

Однако, несмотря на все эти ограничения, можно ожидать, что описанный в статье простой и удобный подход, основанный на использовании аналитических и численных методов, передает основные закономерности поведения кинка в плазмиде pBR322.

Список литературы / References:

1. Алейникова Т.Л. *Биохимия*. М.: ГЭОТАР-МЕД, ред. Е.С. Северин, 2003, 779 с. [Aleynikova T.L. *Biochemistry*. Moscow: GEOTAR-MED, ed. E.S. Severin, 2003, 779 p. (In Russ.)]
2. GenBank: URL: ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J01749.1
3. Watson N.A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene*, 1988, vol. 70, pp. 399-403.
4. McLaughlin D.W., Scott A.C. Perturbation analysis of fuxon dynamics. *Phys. Rev. A*, 1978, vol. 18, p. 1652.
5. Grinevich A.A., Ryasik A.A., Yakushevich L.V. Trajectories of DNA bubbles. *Chaos, Solitons & Fractals*, 2015, vol. 75, pp. 62-75.
6. Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A. Effects of dissipation and external fields on the dynamics of conformational distortions in DNA. *Biophysics*, 2007, vol. 52, pp. 237-243.
7. Yakushevich L.V., Grinevich A.A., Ryasik A.A. Simulation of a kink movement in homogeneous and heterogeneous DNA. *RJNMM*, 2014, vol. 29, pp.197-204.

3D TRAJECTORIES OF THE MOVEMENT OF KINKS IN INHOMOGENEOUS CIRCULAR DNA

Krasnobaeva L.A.^{1,2}, Yakushevich L.V.³

¹Siberian State Medical University,

Moskovskii trakt, 2, Tomsk, 634050, Russia

²Tomsk State University

Lenin av., 36, Tomsk, 634050, Russia: e-mail: kla1983@mail.ru

³Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,

Institutskaya str., 2, Pushchino, 142290, Russia: e-mail: yakushev@icb.psn.ru

Abstract. Despite a large number of publications devoted to nonlinear DNA dynamics, and, in particular, to the study of the features of the movement of kinks in inhomogeneous sequences, many problems in this area remain unresolved. The problem of kinks movement in the sequence of the circular DNA - plasmid pBR322, is among them. In this paper, the problem is considered by the methods of mathematical modeling. To simulate the movement of kinks, the McLaughlin-Scott equation is used, and the solution of this equation is found by the block method. The results of the calculations are presented in the form of trajectories in 3D space.

Key words: *nonlinear dynamics of inhomogeneous DNA, McLaughlin-Scott equation, kinks, block method, 3D trajectories, plasmid pBR322.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОГО ПОДХОДА И КОНЦЕПЦИИ «БЕЛОК-МАШИНА» ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ МЕТАЛЛОСодержащих ферментов

Уварова Л.А.¹, Романова Е.Ю.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный технологический университет «СТАНКИН»,
Вадковский пер., 3А, г. Москва, 127055, РФ; e-mail: l.uvarova@stankin.ru,

²ФГБУН Институт конструкторско-технологической информатики РАН,
Вадковский пер., 18., стр. 1А, г. Москва, 127055, РФ

²ФГБОУ ВО Тверская сельскохозяйственная академия,
ул. Маршала Василевского (Сахарово), 7, Тверь, 170904, РФ; e-mail: kati-v@yandex.ru

Поступила в редакцию: 24.06.2018

Аннотация. Рассматривается квантово-химический подход в моделировании электронной структуры активных центров металлосодержащих ферментативных бионанок комплексов, заключающийся в использовании основных положений следующих теорий: метод валентных связей, теория кристаллического поля, теории поля лигандов, элементы теории симметрии и теории групп. Показано, что взаимодействие центральных ионов и лигандов происходит по донорно-акцепторному механизму: ионы предоставляют на связь вакантные орбитали, а лиганды – неподеленные пары электронов; одно координационное место в комплексе – функциональное, используемое для взаимодействия с субстратами. Структура активного центра определяется электронной конфигурацией d-уровней центральных ионов и природой лигандов. В целом, активный центр рассматривается как бионанок комплекс, относящийся к определённой группе симметрии. Приводится алгоритм построения квантово-химических моделей активных центров. Предполагается, что с квантово-химической точки зрения механизм функционирования бионанок комплекса универсален и, в конечном итоге, сводится к донированию и акцептированию электрона с разрыхляющих молекулярных орбиталей (МО) комплекса, что вызывает его переход из одного состояния в другое. Распределение электронов на МО, электронно-конформационные переходы, изменения, происходящие в активном центре при его функционировании, роль его белкового окружения объясняется на основе концепции «белок – машина». В качестве примера обсуждается квантово-химическая модель активных центров железопорфиринов, содержащих в роли центральных ионов ионы Fe(II) или Fe(III).

Ключевые слова: структура, система, взаимодействие, квантово-химический подход, активный центр, ион, электрон, бионанок комплекс, теория, лиганд, орбиталь, связь, симметрия, концепция, конформационный переход, моделирование.

Металлосодержащие ферменты широко распространены в природе, используются в промышленности, участвуют в основных процессах жизнедеятельности, и представляют собой уникальные устройства, осуществляющие каталитические функции, функции переносчиков электронов, кислорода, действующие в определённых средах. Общие представления о молекулярной структуре металлоферментов были получены в результате их исследований с использованием физико-химических методов [1-3] и заключаются в следующем: 1) активные центры ферментов содержат ионы d-металлов (Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), Co(II) и т.п.), которые взаимодействуют, как правило, с пептидными атомами азота и кислорода, являющимися лигандами; 2) активные центры – координационные соединения, стереохимия которых определяется размерами и координационными числами центральных ионов и природой лигандов [2, 4]; 3) в целом металлоферменты имеют глобулярную структуру, а активные центры погружены в белковый матрикс; 4) каждый металлофермент строго специфичен – взаимодействует только со своим субстратом; 5) при функционировании активных центров изменяются зарядовые состояния центральных ионов.

Наибольший интерес представляет механизм функционирования активных центров, который можно представить и моделировать, используя квантово-химический подход, рассматривая активные центры как нелинейные бионанок комплексы. С квантовой точки зрения функционирование активных центров определяется распределением электронов на молекулярных орбиталях (МО) комплекса. В работах [8-12] авторами обсуждались квантово-химические модели активных центров для различных металлоферментов и разработанный алгоритм построения модели [13]. Моделирование электронных структур активных центров металлосодержащих бионанок комплексов строилось на основе следующих теоретических методов [4-7]:

1. Метод валентных связей (ВС): координационная связь образуется за счёт обобщенной пары электронов между центральным ионом и лигандами. Механизм образования связи – донорно-акцепторный: центральный ион d – металла предоставляет вакантные атомные орбитали (АО), которые акцептируют электроны или неподелённую пару электронов лигандов. Вакантные орбитали центральных ионов являются гибридованными орбиталями (ГО). Тип связи определяется видом перекрывания волновых функций: σ - связи (перекрывание волновых функций электронов, ориентированных по оси, соединяющей центры

взаимодействующих атомов) и π - связи (перекрывание волновых функций в двух областях пространства), δ -связь (более сложные перекрывания).

2. Теория кристаллического поля (ТКП) – электростатический подход, рассматривающий распределение в пространстве АО центральных ионов. Лиганды – источники внешнего электрического поля, расщепляющего внешние d-энергетические уровни центральных ионов. Структура лигандов не учитывается. Различают слабые и сильные поля лигандов. В слабых полях образуются высокоспиновые комплексы, а в сильных – низкоспиновые за счёт спаривания d-электронов.

3. Теория поля лигандов (ТПЛ) – соединение метода молекулярных орбиталей (МО) и ТКП. Комплекс рассматривается как единое целое, МО комплекса записываются в приближении линейной комбинации атомных орбиталей (ЛКАО), причём, АО центральных ионов и молекулярная орбиталь лигандов должны соответствовать одинаковым свойствам симметрии.

4. Элементы теории симметрии и теории групп. В квантово-химических исследованиях применение теории групп связано со свойствами симметрии молекулярных и атомных систем. В теории электронного строения и свойств координационных соединений большое значение имеют представления симметрии [4-7]. Симметрия фигуры (молекулы) обычно определяется совокупностью перемещений, совмещающих её саму с собой, которые называются преобразованиями или операциями симметрии (вращение, отражение в плоскости симметрии, инверсия, зеркально-поворотное и тождественное преобразования). Преобразования симметрии для системы образуют группу, т.е. совокупность элементов, удовлетворяющих определённым условиям. Для молекул характерны группы точечных преобразований, а для рассматриваемых d-металлсодержащих бионанок комплексов особый интерес представляет группа O_h , соответствующая симметрии октаэдрического комплекса. Как известно, состояния атомов и молекул описываются волновыми функциями, удовлетворяющими уравнению Шредингера. Преобразования симметрии производятся над каждой функцией, полученные функции также удовлетворяют уравнению Шредингера. Из подобных преобразований записываются матрицы, которые называются представлениями группы, их базисом является совокупность волновых функций состояний. Как правило, в физике и химии используются неприводимые представления (НП) за счёт их специфических свойств. Для квантовой химии важно, что каждому энергетическому уровню молекулы сопоставляется определённое неприводимое представление её группы симметрии. Для обозначения типов симметрии молекулярных орбиталей используются следующие символы: A и B (a_{1g}) – одномерные представления; E (e_g) – двумерные; T (t_{1g} , t_{1u}) – трёхмерные; индексы u (нечётность) и g (чётность) у символа НП указывают на поведение функции при операции инверсии (отражение в центре симметрии); индексы 1 и 2 указывают на изменение знака волновой функции при поворотах и отражениях. Теория симметрии позволяет упростить процесс моделирования МО: можно не учитывать те линейные комбинации АО, которые не соответствуют НП рассматриваемой точечной группы симметрии комплекса. Линейные комбинации орбиталей лигандов, преобразующиеся по НП группы O_h называются групповыми орбиталями (ГО).

В связи с вышеизложенным, авторами был разработан алгоритм построения модели [13]: 1) определение точечной группы симметрии комплекса; 2) МО комплекса выразить в виде линейной комбинации АО центральных гибридных орбиталей (ГО) лигандов; 3) при сортировке ГО и рассмотрении электронной структуры МО комплекса – активного центра необходимо: а) отнести АО центрального иона к тем или типам симметрии, б) определить тип симметрии ГО лигандов; в) провести комбинирование полученных АО и ГО, принадлежащих одному и тому же типу симметрии.

На рисунке 1 представлена модель активных центров – железопорфиринов, содержащих в активных центрах ионы Fe(II) или Fe(III).

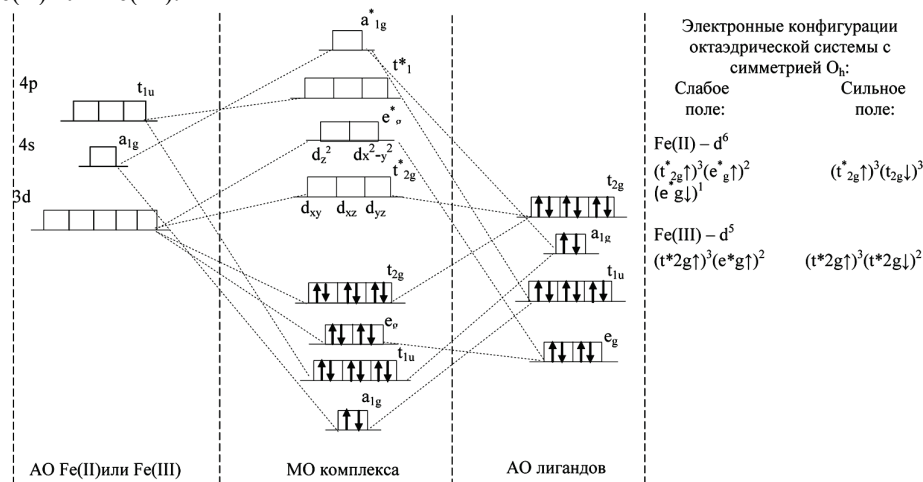


Рисунок 1. Квантово-химическая модель активного центра железопорфиринов с центральными ионами Fe(II) и Fe(III). АО – атомные орбитали (слева АО свободного иона, справа АО (атомные орбитали) лигандов, в центре – распределение электронов на функциональных молекулярных орбиталях (МО) комплекса). Распределение электронов по функциональным МО e_g^* и t_{2g}^* для центральных ионов Fe(II) и Fe(III) указано справа (* – индекс, означающий разрыхляющие орбитали, индексы у d – МО орбиталей означают их ориентацию в пространстве)

К железопорфиринам относится большое число бионаноконплексов, выполняющих различные функции, например, ферродоксин – переносчик электрона в ЭТЦ (электронно-транспортная цепь), гемоглобин – переносчик кислорода, оксидазы (пероксидазы) – разлагают H_2O_2 и т.д. как правило, ионы Fe(II) и Fe(III) имеют шесть координационных мест, что соответствует октаэдру. Пять координационных мест идут на связь с белковым лигандом через пептидные атомы азота (слабое поле лигандов), предоставляющие на связь неподеленные пары электронов, а центральный ион – вакантные орбитали. Одно координационное место – функциональное (взаимодействие с субстратами). В образовании связи от центрального иона участвуют s-, p- и d-орбитали, а от лигандов – по одной σ - и по две π -орбитали. В октаэдрической системе s-орбиталь центрального иона участвует только в σ -МО (a_{1g}^* , a_{1g}), две e_g – орбитали образуют двукратно вырожденную МО (e_g^*) (d_{z^2} , $d_{x^2-y^2}$) а три орбитали (t_{2g} – орбитали) – π -МО (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} – t_{2g}^*). Модель электронной структуры МО – комплекса железопорфиринов (Fe(II), Fe(III)) показывает, что функционирование активных центров сводится к удалению одного электрона с функциональной орбитали или e_g^* или t_{2g}^* : в зависимости от того, какое поле образуют лиганды (слабое или сильное), какой ион в центре: Fe(II) или Fe(III). Из энергетических соображений оптимальный вариант – удаление неспаренного электрона.

С точки зрения квантовой химии на связывающих орбиталях происходит перераспределение электронной плотности таким образом, чтобы энергия электронов на МО была меньше, чем на исходных АО, а на разрыхляющих – больше, чем на исходных АО. Взаимодействие с субстратом приводит всю систему активного центра в возбужденное состояние, что вызывает электронно-конформационный переход (ЭКП) в комплексе, имеющий кооперативный характер, свойственный физическим процессам, инициирующим скачкообразные переходы системы из одного состояния в другое.

Концепция «белок – машина» [14] позволяет объяснить процессы, происходящие в активных центрах при поступлении электрона на молекулярную орбиталь комплекса. При электронно-конформационном переходе происходит перемещение отдельных групп атомов, вызывающих перемещение, связанных с ними, других групп. Такие перемещения не носят хаотический характер, их можно считать одномерными, то есть характеризовать их одной степенью свободы подобно движению механизма – машины, когда в движении участвует много деталей, а перемещение системы в целом однонаправлено. В белковых системах кооперативный характер конформационных переходов вызывает напряжение, не превышающее предела упругости, т.е. деформацию. Окружающая среда (например, мембрана) и ближайшее окружение активного центра – белковый матрикс сохраняют структуру и, соответственно, симметрию наноконплекса, создавая условия для перехода в исходное состояние при удалении электрона с функциональной орбитали по туннельному механизму [15].

В заключении необходимо отметить, что квантово-химический подход и концепция «белок-машина» позволяют моделировать МО комплекса и выяснить универсальный механизм функционирования металлосодержащих ферментов, заключающийся, в конечном итоге, в транспорте электрона. Акт взаимодействия активного центра с субстратом требует их структурного соответствия и вызывает конформационные переходы из одного состояния в другое и обратно. Белковый матрикс, окружающий активный центр сохраняет его структуру. В связи с этим бионаноконплексы – это открытые, нелинейные, самоорганизующиеся, самосогласованные системы – наномашин, работающие по «заданной» программе.

Список литературы / References:

1. Маров И.Н. *Методы и достижения бионеорганической химии*. М.: Мир, 1978, 416 с. [Marov I.N. *Techniques and Topics in Bioinorganic chemistry*. М.: Mir, 1978, 416 p. (In Russ.)]
2. Эйхгорн Г. *Неорганическая биохимия*. М.: Мир, 1978, т. 1, 711 с. [Einhorn G. *Inorganic biochemistry*. М.: Mir, 1978, vol. 1, 711 p. (In Russ.)]
3. Эйхгорн Г. *Неорганическая биохимия*. М.: Мир, 1978, т. 2, 736 с. [Einhorn G. *Inorganic biochemistry*. М.: Mir, 1978, vol. 2, 736 p. (In Russ.)]
4. Берсукер И.Б. *Электронное строение и свойства координационных соединений*. Л.: Химия, 1976, 352 с. [Bersuker I.B. *The electronic structure and the properties of the coordination compounds*. L.: Chemistry, 1976, 352 p. (In Russ.)]
5. Дмитриев И.С. *Симметрия в мире молекул*. Л.: Химия, 1976, 128 с. [Dmitriev I.S. *The symmetry in the molecule world*. L.: Chemistry, 1976, 128 p. (In Russ.)]
6. Васильева Л.Ю., Романова Е.Ю. Значение теории симметрии при моделировании функционирования биологически-активных наноконплексов. *Вестник МГУП*, 2005, № 1, с. 34-43. [Vasil'eva L.Yu., Romanova E.Yu. The significance of the symmetry theory on the modeling biologically active nanocomplexes functioning. *MSU digest*, no. 1, 2005, p. 34-41. (In Russ.)]
7. Папулов Ю.Г., Папулова Д.Р. *Строение молекул и физические свойства*. Тверь: Тверской государственный университет, 2010, 280 с. [Papulov Yu.G., Papulova D.R. *The molecules formation and the physical properties*. Tver: Tver State University, 2010, 280 p. (In Russ.)]
8. Васильева Л.Ю., Романова Е.Ю. Квантово-химическое моделирование нелинейных процессов ферментов. *Вестник ННГУ: Математическое моделирование и оптимальное управление*, 2006, с. 13-18. [Vasil'eva L.Yu., Romanova E.Yu. Quantum-chemical modeling of nonlinear ferment processes. *NNSU journal: Mathematical modeling and optimal management*, 2006, pp. 13-18. (In Russ.)]

9. Васильева Л.Ю., Романова Е.Ю. Бионаноконплексы – нелинейные самоорганизующиеся системы. *Сб. научн. тр. «Фундаментальные физико-математические проблемы и моделирование технико-технологических систем»*, 2013, № 16, т. 2, с. 35-41. [Vasil'eva L.Yu., Romanova E.Yu. Bionanocomplexes – nonlinear selforganizing systems. *The fundamental physico-mathematical problems and modeling of technical and technological systems*, 2013, no. 16, vol. 2, pp. 35-41. (In Russ.)]
10. Vasil'eva L.Yu., Romanova E.Yu. The modeling problem of the electron structure and quantum-chemical functioning mechanism of the bio-nanocomplexes active centers. *Mathematical models of non-linear phenomena, processes and systems: from molecular scale to planetary atmosphere*, 2014, ch. 25, pp. 427-440.
11. Васильева Л.Ю., Романова Е.Ю. Анализ информативности квантово-химических моделей бионаноконплексов. *Матер. междунар. междисципли. науч. конф. «Синергетика в естественных науках. Шестые Курдюмовские чтения»*, Тверь, 2010, с. 137-139. [Vasil'eva L.Yu., Romanova E.Yu. The analysis of the quantum-chemical bionanocomplexes models information content. *Proceedings of the international interdisciplinary scientific conference «Sinergetic in the natural Sciences. Sixth reading named after Kurdyumov»*, 2010, pp. 137-139. (In Russ.)]
12. Васильева Л.Ю., Уварова Л.А., Романова Е.Ю. Специфические свойства металлосодержащих ферментативных комплексов, связанных с информационными процессами. *Сб. научн. тр. «Фундаментальные физико-математические проблемы и моделирование технико-технологических систем»*, 2016, № 17, с. 70-78. [Vasil'eva L.Yu., Uvarova L.A., Romanova E.Yu. The specific properties of the metalcontaining fermentative complexes, connected with information processes. *The fundamental physico-mathematical problems and modeling of technical and technological systems*, 2016, no. 17, pp. 70-78. (In Russ.)]
13. Васильева Л.Ю., Уварова Л.А., Романова Е.Ю. *Моделирование мезо- и нанообъектов в различных средах и полях*. Тверь: ООО «Лаборатория деловой графики», 2010, 201 с. [Vasil'eva L.Yu., Uvarova L.A., Romanova E.Yu. *The meso- and nanoobjects modeling in different mediums and fields*. Tver: ООО «Laboratory of the business drawing», 2010, 201 p. (In Russ.)]
14. Чернавский Д.С., Чернавская Н.М. «Белок-машина». *Биологические молекулярные конструкции*. М.: Издательство «Янус – К», 1999, 256 с. [Chernavskii D.S., Chernavskaya N.M. «Protein-machine». *The biological macromolecular construction*. М.: «Yanus-K», 1999, 256 p. (In Russ.)]
15. Чернавская Н.М., Чернавский Д.С. *Туннельный транспорт электронов в фотосинтезе*. М.: Издательство Московского университета, 1977, 176 с. [Chernavskaya N.M., Chernavskii D.S. *The electrons tunnel transfer in the photosynthesis*. М.: Publishing House of Moscow University, 1977, 176 p. (In Russ.)]

THE USING OF THE QUANTUM-CHEMICAL APPROACH AND THE CONCEPTION «PROTEIN-MACHINE» FOR THE ACTIVE CENTERS MODELING OF THE METALCONTAINING FERMENTS

Uvarova L.A.¹, Romanova E.Yu.²

¹MSTU «STANKIN»

Vadkovskii by-street, 3a, Moscow, 127055, Russia; e-mail: l.uvarova@stankin.ru,

²FGBUN The Institute of the construction-technical-science RAS,

Vadkovskii by-street, 18, bld. 1A, Moscow, 127055, Russia

²FSBEI HE «Tver State Agricultural Academy»

Marshal Vasilevsky str. (Sakharovo), 7, Tver, 170904, Russia; e-mail: kati-v@yandex.ru

Abstract. It is considered the quantum-chemical approach in the electron structure modeling of the active centers of the metal-containing fermentative bionanocomplexes, resulting in the using of the central tenets of the following theories: the method of the valence bonds, the crystal field theory, the ligands field theory, the elements of the symmetry theory and the groups theory. It is demonstrated that the interaction of the central ions with the ligands is carried out by the donor-acceptor mechanism: the ions provide for the connection the vacant orbitals and the ligands – the unshared electrons pairs, one of the coordination bond is functional, using for the interaction with substrates. The active centers structure is defined by the central ions and the ligands nature. The active center as a whole is considered as the bionanocomplex, relating to the certain symmetry group. It is given the algorithm for the construction of the quantum-chemical active centers models. It is proposed that from the quantum-chemical point of view the functional mechanism of the bionanocomplexes is universal and, in the final, it is reduced to the acceptance and the less of the functional electron in the molecular antibonding orbitals of the complex that induces the active center transition from one state to another. It is explained the electron distribution on the molecular orbitals, the electron-conformational transitions, the active centers changes at it functioning, the role of it protein surrounding on a basis of the conception «protein – machine». It is discussed, as an example, the quantum-chemical model of the ferroporphyrin active centers, containing Fe(II) or Fe(III) central ions.

Key words: structure, system, interaction, quantum-chemical approach, active center, ion, electron, bionanocomplex, theory, ligand, orbital, bond, symmetry, conception, conformational transition, modeling.

3-ОКСИПИРИДИНЫ ПРЕДОТВРАЩАЮТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ, ОБУСЛОВЛЕННУЮ ВОЗДЕЙСТВИЕМ МИКРОДОЗ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Жигачева И.В.¹, Русина И.Ф.², Генерозова И.П.³

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

² ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: rusina939@mail.ru

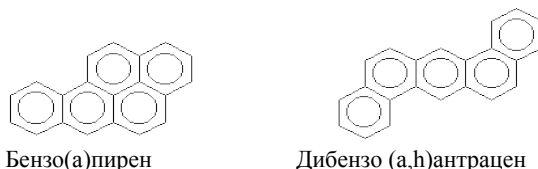
³ ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, г. Москва, 127276, РФ; e-mail: igenozova@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.04.2018

Аннотация. Исследованы антирадикальные, антиоксидантные и противотоксические свойства производных 3-гидроксипиридина (3-ОП), в частности N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ОП). Показаны высокие значения антирадикальной активности этого препарата. В модельных экспериментах препарат предотвращал активацию ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс и митохондрий проростков гороха в диапазоне концентраций 10^{-6} - 10^{-16} М. Он снижал интенсивность ПОЛ до контрольных значений в условиях затравки животных газо-воздушной смесью, содержащей полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), которая вызывала 6-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени. Предупреждение ПОЛ способствовало сохранению функциональной активности митохондрий. Обладая антирадикальной и антиоксидантной активностью препарат предупреждал индукцию цитохрома Р450 в ткани печени при затравке животных ПАУ, что свидетельствовало о наличии у него антитоксических свойств.

Ключевые слова: производные 3-гидроксипиридина, полициклические ароматические углеводороды, митохондрии, ПОЛ.

В окружающей среде обнаружено несколько сотен ПАУ [1]. Последствия длительного воздействия этих соединений на организм начали детально исследовать более 100-150 лет назад [2]. Интерес исследователей к этим токсикантам связан с высокими канцерогенными свойствами ПАУ. Характерные особенности строения этих соединений отражают структуры классических представителей группы: бензо(а)пирена и бенз(а, h)антрацена:



ПАУ возникают как продукт абиогенного происхождения в результате термических превращений органических структур: в результате вулканической деятельности, во время природных пожаров: горении леса, торфа, травяного покрова [3]. Наиболее характерным и наиболее распространенным в ряду ПАУ является бенз(а)пирен (БП): Доля БП в общем количестве ПАУ невелика (1-20 %). Его делают значимым:

- Активная циркуляция в биосфере
- Высокая молекулярная устойчивость
- Значительная проканцерогенная активность

БП хорошо растворим в органических растворителях, тогда как в воде он растворим чрезвычайно мало. Абиотический синтез БП при горении леса, торфа, торфяного покрова составляет до 5 т год [3]. Формирование природного фона ПАУ возможно также за счет биотического синтеза БП при участии анаэробных бактерий и водорослей, в частности хлореллы [4]. Однако, основная масса ПАУ в окружающей среде имеет антропогенное происхождение. Главными источниками ПАУ являются: бытовые, промышленные сбросы, смывы, транспорт, аварии. Антропогенный поток ПАУ в частности бенз(а)пирена (БП) составляет примерно 30 т год [5]. В настоящее время загрязнение полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) носит глобальный характер. Их присутствие обнаружено во всех элементах природной среды (воздух, почва, вода, биота) от Арктики до Антарктиды.

Большинство биологических эффектов ПАУ опосредуется через арил-углеводородный рецептор (AhR-зависимая экспрессия генов) [6]. AhR является членом семейства факторов транскрипции, которые регулируют несколько генов, в том числе членов семейства цитохрома Р450, таких как CYP1A1 [7]. В ходе биологического окисления ароматических углеводородов инициируются свободнорадикальные процессы в клетках, образуются ареноксиды, формирующие ковалентные связи с нуклеофильными структурами клеток (белками,

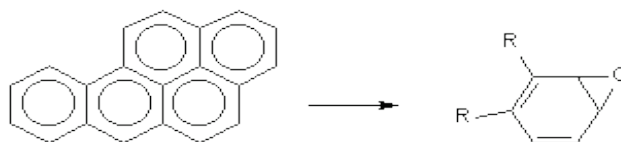
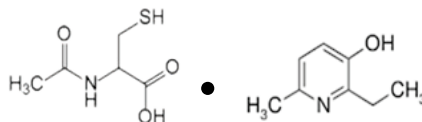


Рисунок 1. Образование ареноксидов в процессе метаболизма ароматических полициклических углеводов при участии оксидаз смешанных функций (ОСФ) [8]

сульфгидрильными группами, нуклеиновыми кислотами и т.д.). Они активируют перекисное окисление липидов биологических мембран, в том числе и в мембранах митохондрий (рис. 1) [8, 9].

Одним из наиболее опасных последствий длительного воздействия этих токсикантов на организм является снижение реактивности иммунной системы [10]. Не менее важным показателем является энергетический статус, определяющий адаптивные возможности организма. Установлено, что повреждающее действие активных форм кислорода на дыхательную активность связано с их действием на кардиолипид, который необходим для нормального функционирования ферментных комплексов [11]. Кроме того, пероксидация липидов мембран и, прежде всего кардиолипина, приводит к набуханию митохондрий, выходу цитохрома С и, возможно, к индукции апоптоза [12].

Исходя из этого, можно было предположить, что препараты, предотвращающие токсическое действие ПАУ, вероятно, должны обладать антирадикальными и антиоксидантными свойствами. Мы предположили, что такими свойствами обладают антиоксиданты. В связи с этим в качестве объекта исследования были выбраны производные 3-гидроксипиридина (3-ОП), в частности N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ОП), ингибирование ПОЛ которым могло быть обусловлено наличием гидроксильной группы фенольного типа при сопряженной циклической системе связей:



N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина

Биологическая активность производных 3-ОП обусловлена, в частности, тем, что они являются структурными аналогами соединений группы пиридоксина (витамина В₆), имеющих значение в жизнедеятельности организма, в том числе выполняющих роль физиологических антиоксидантов. В связи с этим целью было проведено исследование антирадикальных свойств нового синтезированного водорастворимого ингибитора N-ацетилцистеината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина методом хемилюминесценции и изучение его влияния на энергетический статус крыс, длительно затравливаемых искусственной газо-воздушной смесью, содержащей такое же количество ПАУ, которое находится в воздухе промышленной зоны и вблизи оживленных автомагистралей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях печени крыс Вистар массой 120-130 г.

При исследовании влияния ПАУ на биологические показатели использовали искусственную газо-воздушную смесь, содержащую такое же количество ПАУ, которое содержится в воздухе промышленной зоны, вблизи оживленных автомагистралей и в накуранных помещениях [13, 14] (табл. 1).

Затравку животных осуществляли в камере объемом 10 л, куда подавалась газо-воздушная смесь. В камеру помещали по 4-5 животных, где они находились в течение 40 сек. Через каждые 30-40 мин процедура повторялась. Количество повторов 6 в сутки.

Для исследования антиоксидантной активности препарата использовали митохондрии 5-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L), сорт Флора-2.

Таблица 1. Состав искусственной газо-воздушной смеси (нг/м³)

ПАУ	Количество
Пирен	5,40
Бенз(а)пирен	5,50
Бенз(е)пирен	6,30
Перилен	1,70
Дибенз(а, h)антрацен	1,00
Дибенз(а, c) антрацен	1,20
Дибенз(g, h, i)перилен	5,00
Бензантрацен	1,10

При этом **семена гороха** промывали водой с мылом и 0,01 % раствором KMnO_4 и в течение 30 мин. замачивали в воде. Затем семена помещали на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте при температуре 24 °C в течение 5 суток. На пятые сутки выделяли митохондрии из эпикотилей проростков.

Выделение митохондрий из эпикотилей этиолированных проростков гороха проводили методом дифференциального центрифугирования (при 25000 g в течение 5 мин и при 3000 g в течение 3 мин) [15]. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4), 0,1 % БСА (свободный от жирных кислот) и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [16]. Первое центрифугирование при 600 g в течение 10 минут, второе – при 9000 g, 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань: среда – 1:25. Среда выделения: 0,25 М сахароза, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Скорости дыхания митохондрий печени крыс регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий содержала: 0,25 М сахарозу, 10 мМ Трис-HCl, 5 мМ MgSO_4 , 2 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ KCl (pH 7,5) (28 °C).

Перекисное окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [17]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvonGmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм.

Антирадикальную активность (АРА) N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ОП) оценивали хемиллюминесцентным методом (ХЛ) по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола (60°), которое инициировали термическим распадом азобисизобутиро-нитрила, (АИБИН). Интенсивность ХЛ усиливали 9,10-дибромантраценом. Эффективную константу ингибирования k_{INH} рассчитывали из серии ХЛ кривых с разной концентрацией 3-ОП [18]. Полученные результаты соотносили с данными, полученными с использованием известных антиоксидантов α -токоферола и хромана C1 (аналога α -токоферола).

В ткани печени исследуемых групп животных измеряли амплитуду сигналов ЭПР с g-фактором 2,25 (цитохром P450) и с g-фактором 1,94, обусловленным железосерными белками, локализованными в электрон-транспортных цепях митохондрий. Измерения проводили на ЭПР спектрометре фирмы "Bruker" (Германия), при 77 К. Амплитуду сигналов ЭПР относили к весу образца и сравнивали с аналогичными параметрами контрольной группы животных.

В эксперименте использовали реактивы следующих фирм: метанол, хлороформ (Merck, Германия), сахароза, Трис, ЭДТА, FCCP, малат, глутамат, сукцинат ("Sigma Aldrich," США); БСА, (свободный от ЖК) ("Sigma Aldrich," США); HEPES ("MP Biomedicals", Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку при биологическом окислении полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) инициируется свободнорадикальное окисление, приводящее к активации ПОЛ в том числе и в мембранах митохондрий, антирадикальную и антиоксидантную активности 3-ОП исследовали на модели «старения» (инкубация митохондрий печени крыс или митохондрий проростков гороха в гипотонической среде при комнатной температуре). Чтобы активировать ПОЛ митохондрии печени на 15 мин помещали в 0,5 мл среды, содержащей 70мМ KCl, 10 мМ HEPES и 1мМ KH_2PO_4 , pH 7,4. В мембранах митохондрий проростков гороха использовали среду, содержащую 0,2 М сахарозу, 10 мМ HEPES и 1 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4.

Инкубация митохондрий в гипотонических растворах вызывала слабое набухание митохондрий и рост генерации АФК, что нашло отражение в увеличении интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в 3-4 раза (рис. 2). Введение препарата в среду инкубации митохондрий приводило к снижению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ как в мембранах митохондрий печени крыс, так и в мембранах митохондрий проростков гороха, что указывало на наличие у исследуемого препарата антирадикальной и, следовательно, антиоксидантной активности. Действительно, измеренные методом хемиллюминесценции значения антирадикальной активности ингибитора N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (3-ОП) - k_{INH} составляют $3,3\text{--}3,84 \cdot 10^4 \text{ (Mc)}^{-1}$. На основании полученных данных можно предположить, что данный препарат можно использовать и как адаптоген, и как регулятор роста и развития растений. При этом наиболее эффективными концентрациями являлись $10^{-6}\text{--}10^{-16}\text{M}$. В связи с этим в наших последующих экспериментах мы использовали препарат в концентрации 10^{-6}M .

В следующей серии экспериментов исследовали антиоксидантные свойства 3-ОП. Для этого изучали содержание цитохрома P450 в ткани печени крыс, длительно затравливаемых искусственной газо-воздушной смесью и крыс, которым одновременно с затравкой 2 раза в сутки вводили препарат 10^{-6} моль/кг. Спустя 1-1,5 месяца затравки крыс этой смесью содержание цитохрома P450 в ткани печени снижалось на 30 %, что свидетельствует о токсическом эффекте [8] (рис. 3).

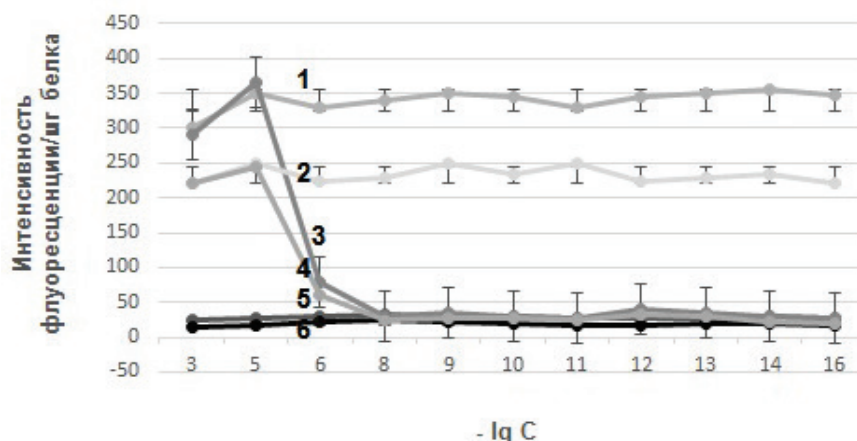


Рисунок 2. Влияние «старения» митохондрий печени, митохондрий проростков гороха и различных концентраций 3-ОП на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (Основания Шиффа). 1 – «старение» митохондрий проростков гороха; 2 – «старение» митохондрий печени; 3 – «старение» митохондрий проростков гороха + 3-ОП; 4 – «старение» митохондрий печени + 3-ОП; 5 – контроль (митохондрии проростков гороха); 6 – контроль (митохондрии печени)

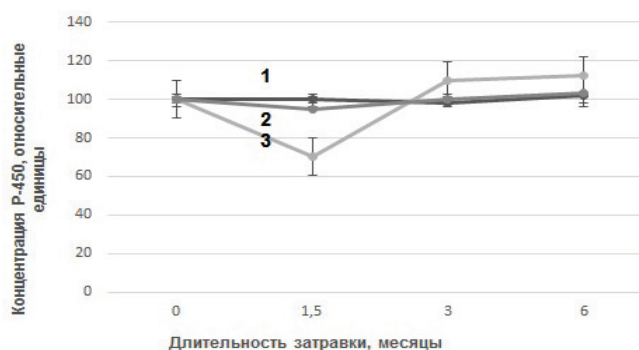


Рисунок 3. Содержание P450 в ткани печени крыс при затравке газо-воздушной смесью. Условные обозначения: 1 – контроль; 2 – газо-воздушная смесь+3-ОП; 3 – газо-воздушная смесь

3-6 месячная экспозиция крыс газо-воздушной смесью приводит к повышению содержания цитохрома P450 в ткани печени на 10-12 %. Увеличение концентрации цитохрома P450 при длительном воздействии токсикантов, в частности ПАУ, отражает индукцию фермента этими веществами и может иметь следствием биоактивацию проканцерогенов. В печени группы крыс, которым до затравки вводили N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин снижение содержания цитохрома P450 после 1,5-месяцев составило 5 %, а спустя 3-6 месяцев его содержание в ткани печени почти не отличалось от контроля. Полученные данные могут свидетельствовать о наличии антиоксидантных свойств у исследуемого препарата.

Данные по влиянию длительной затравки газо-воздушной смесью крыс на энергетику митохондрий печени подтверждают данный вывод. Месячная затравка животных не очищенной газо-воздушной смесью приводила к некоторым изменениям в энергетике митохондрий печени. Почти в 2 раза снижались максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов с $26,7 \pm 2,0$ до $13,6 \pm 1,7$ нмоль O_2 /мг белка $\times$ мин (в присутствии АДФ) и с $28,5 \pm 1,8$ до $14,6 \pm 1,9$ (в состоянии покоя) (табл. 2).

Таблица 2. Влияние месячной затравки крыс искусственной газо-воздушной смесью на скорости окисления над-зависимых субстратов и сукцината митохондриями печени белых крыс (Приведены данные 8 экспериментов. Скорости дыхания в нмолях O_2 /мг белка $\times$ мин)

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	V_{FCCP}
4 мМ глутамат, 1 мМ малат					
Контроль	$7,3 \pm 0,9$	$26,7 \pm 2,0$	$8,5 \pm 0,8$	$3,14 \pm 0,03$	$28,5 \pm 1,8$
ГВС	$8,6 \pm 1,0$	$13,6 \pm 1,7$	$6,3 \pm 0,9$	$2,16 \pm 0,03$	$14,6 \pm 1,9$
ГВС+3ОП	$6,9 \pm 1,4$	$27,3 \pm 2,1$	$8,40 \pm 0,7$	$3,25 \pm 0,02$	$29,0 \pm 1,8$
5 мМ сукцинат					
Контроль	$9,4 \pm 1,2$	$22,3 \pm 1,7$	$12,9 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,01$	$22,9 \pm 2,2$
ГВС	$4,1 \pm 1,4$	$19,9 \pm 1,8$	$11,7 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,01$	$21,7 \pm 0,6$
ГВС+3ОП	$8,0 \pm 1,5$	$24,2 \pm 2,0$	$12,1 \pm 1,3$	$2,0 \pm 0,02$	$25,8 \pm 1,9$

Таблица 3. Влияние 6-месячной затравки крыс искусственной газо-воздушной смесью на скорости окисления над-зависимых субстратов и сукцината митохондриями печени белых крыс (Приведены данные 10 экспериментов. Скорости дыхания в нмолях O_2 /мг белка х мин)

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	V_{FCCP}
4 мМ глутамат, 1 мМ малат					
Контроль	8,2±1,7	28,7±2,0	8,0±0,8	3,61±0,03	29,7±1,9
ГВС	5,6±2,3	27,6±1,7	8,0±0,9	3,45±0,03	28,6±2,1
ГВС+ЗОП	7,8±1,6	28,3±2,2	7,93±0,9	3,57±0,02	29,0±1,8
5мМ сукцинат					
Контроль	8,6±1,5	30,4±1,4	11,3±0,8	2,70±0,04	29,8±1,8
ГВС	6,6±1,0	18,9±2,7	11,8±1,3	1,6±0,02	22,4±1,9
ГВС+ЗОП	8,1±1,2	31,0±2,7	10,9±2,2	2,85±0,03	31,8±1,7

Состав среды инкубации и условные обозначения как в таблице 2.

Среда инкубации содержала: 0,2 М сахарозу, 10мМ трис-HCl, 2 мМ $MgSO_4$, 2 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ KCl, pH 7,5. Дополнительные добавки: 200 мкМ ADP, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон). V_0 – скорости окисления субстратов; V_3 – скорости дыхания митохондрий в присутствии АДФ; V_4 – скорости дыхания в состоянии покоя (после истощения АДФ); ГВС – газо-воздушная смесь.

При этом уменьшалась и эффективность окислительного фосфорилирования: величина дыхательного контроля (V_3/V_4) падала с $3,14 \pm 0,03$ до $2,16 \pm 0,03$. Однако скорости окисления сукцината не изменялись. Спустя 3-6 месяцев от начала затравки максимальные скорости окисления НАД-зависимых субстратов возвращались к норме, а скорости окисления сукцината снижались в 1,5 раза (табл. 3).

Кроме того, в ткани печени на 14 % падал сигнал ЭПР с $g = 1,94$, обусловленный железосерными белками, входящими в состав мембран митохондрий. Можно предположить, что при действии ПАУ активируются процессы деградации митохондрий, что свидетельствует об индукции апоптоза. [19, 20]. Введение крысам З+ОП предотвращало падение сигнала ЭПР с g -фактором 1,94 и изменения биоэнергетических характеристик митохондрий печени крыс. Полученные нами и литературные данные свидетельствуют, что ПАУ, вероятно, индуцируют апоптоз за счет токсического влияния на функциональное состояние митохондрий [20]. Свидетельством этому является снижение мембранного потенциала митохондрий и 15-50 % снижение максимальных скоростей окисления как НАД-зависимых субстратов, так и сукцината митохондриями скелетных мышц, печени и кожи при затравке животных этими токсикантами [21]. Отметим, что митохондрии крыс, которым одновременно с затравкой 2 раза в сутки вводили N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, по энергетическим характеристикам не отличались от митохондрий контрольной группы.

Изменения в энергетике митохондрий могут быть обусловлены активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ). Действительно, в мембранах митохондрий, затравливаемых искусственной газо-воздушной смесью крыс интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ была почти в 6,5 раз выше, чем в мембранах митохондрий контрольной группы животных (рис. 4). Затравка крыс, которым одновременно с затравкой газо-воздушной смесью вводили препарат 10^{-6} моль/кг, не вызывает значительной активации ПОЛ в мембранах митохондрий печени.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что протекторная активность N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина обусловлена его антирадикальными, антиоксидантными и противотоксическими свойствами. Препарат, предотвращая активацию ПОЛ, вероятно, предохраняет ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов мембран митохондрий, от перекисного окисления, таким образом предупреждая снижение содержания кардиолипина во внутренней мембране митохондрий и активацию апоптоза [21].

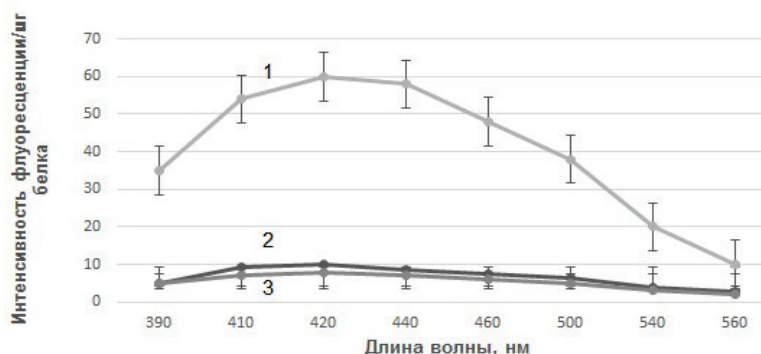


Рисунок 4. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени при затравке крыс газо-воздушной смесью, содержащей ПАУ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (0082-2018-0006, № АААА-А18-118020890097-1; 0084-2014-0004). Регистрации в ЦИТиС (01201-253-310).

Список литературы / References:

1. Пшенин В.Н. Транспорт как источник полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде. *Наука, техника и управление. Транспорт*, М.: ВИНТИ, 1995, с. 27-42. [Pshenin V.N. Transport as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Science, technology and management. Transport*, M.: Institute of Scientific and Technical Information, 1995, pp. 27-42. (In Russ.)]
2. Proctor R.N. Tobacco and Health. *Journal of Philosophy. Science & Law*, 2004, no. 4, pp. 2-32.
3. Estabrook R., Lanirigan Ph., Cohn V. [et al.] *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evolution of Sources and Effects*, Washington: National Academy Press, 1983, 476 p.
4. Зилов А. Гидробиология и водная экология. *Организация, функционирование и загрязнение водных экосистем*, Иркутск: Иркут. ун-т, 2008, 138 с. [Zilov A. Hydrobiology and water ecology. *Organization, functioning and pollution of aquatic ecosystems*, Irkutsk: Irkut. University, 2008, 138 p. (In Russ.)]
5. Ларин С.А., Громов К.Г., Мун С.А. Вклад приоритетных канцерогенов в развитии злокачественных новообразований среди населения г. Кемерово. *Фундаментальные и прикладные исследования в медицине, 1-8 октября 2005г.*, Лутраки (Греция): Наука, 2005, с. 235-236. [Larin S.A., Gromov K.G., Moon S.A. The contribution of priority carcinogens in the development of malignant neoplasms among the population of Kemerovo. *Fundamental and applied research in medicine, October 1-8, 2005*, Loutraki (Greece): Science, 2005, pp. 235-236. (In Russ.)]
6. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, vol. 59, pp. 65-85.
7. Burczynski M.E., Penning T.M. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, pp. 908-915.
8. Куценко С.А. *Основы токсикологии*. СПб.: Фолиант, 2002, 720 с. [Kutsenko S.A. *Fundamentals of Toxicology*. St. Petersburg: Folio, 2002, 720 p. (In Russ.)]
9. Ying Yin, Haixia Jia, Yuanyuan Sun, Hongxia Yu, Xiaorong Wang, Jichun Wu, Yuqun Xue. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, vol. 145, iss. 2, pp. 288-293.
10. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Евсеенко Л.С., Кривошеева Л.В., Буланова Е.Г., Никонова М.Ф., Литвина М.М., Христианович Д.С., Воронков М.Г. Гуморальный иммунитет. Полициклические ароматические углеводороды и нитрозамины. *ДАН*, 2002, т. 383, № 6, с. 834-837. [Zhigacheva I.V., Burlakova E.B., Evseenko L.S., Krivosheeva L.V., Bulanova Ye.G., Nikonova M.F., Litvina M.M., Khristianovich, D.S., Voronkov M.G.. Humoral immunity. Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrosamines. *Doklady Akademii Nauk*, 2002, vol. 383, no. 6, pp. 834-837. (In Russ.)]
11. Vladimirov Yu.A., Olenov V.I., Suslova T.V., Cheremisina Z.V. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.*, 1980, vol. 17, no. 1, pp. 173-249.
12. Проскурнина, Е.В., Владимиров Ю.А. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов. *Биофизические медицинские технологии*. М: МАКС Пресс, 2015, с. 38-71. [Proskurnina, E.V., Vladimirov Yu.A. Free radicals as participants in regulatory and pathological processes. *Biophysical medical technologies*. M: MAX Press, 2015, p. 38-71. (In Russ.)]
13. Заридзе Д.Г. Эпидемиология, механизмы канцерогенеза и профилактика рака. *Архив патологий*, 2002, № 2, с. 53-61. [Zaridze D. G. Epidemiology, mechanisms of carcinogenesis and cancer prevention. *Archives of pathology*, 2002, no. 2, с. 53-61. (In Russ.)]
14. Заридзе Д.Г. *Канцерогенез*. М.: Медицина, 2004, 500 с. [Zaridze D.G. *Carcinogenesis*. M.: Medicine, 2004, 500 p. (In Russ.)]
15. Попов В.Н., Руге Э.К., Старков А.А. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия*, 2003, т. 68, № 7, с. 910-916. [Popov V.N., Ruge E.K., Starkov A.A. Effect of inhibitors of electronic transport on the formation of reactive oxygen species during the oxidation of succinate by pea mitochondria. *Biochimia (Biochemistry)*, 2003, vol. 68, no. 7, pp. 910-916. (In Russ.)]
16. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. Activation of external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of old adapted rats. *BBA*, 1977, vol. 501, pp. 415-423.
17. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.*, 1973, vol. 52, pp. 1-9.
18. Шляпинтох В.Я., Карпукhin О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. Хемилуминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966, 300 с. [Shlyapintok V.Ya., Karpukhin O.N., Postnikov L.M., Zakharov I.V., Vichutinsky A.A., Tsepalov V.F. Chemiluminescent methods for studying slow chemical processes. Moscow: Nauka, 1966, 300 p. (In Russ.)]
19. Solhaug A., Refsnes M., Låg M.T., Schwarze P. E., Husøy T., Holme J. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis*, 2004, vol. 25, no. 5, pp. 809-819.

20. Hiura T.S., Li N., Kaplan R., Horwitz M., Jean-Clare Seagrave, Nel A.E. The Role of a Mitochondrial Pathway in the Induction of Apoptosis by Chemicals Extracted from Diesel Exhaust Particle. *The Journal of Immunology*, 2000, vol. 165, pp. 2703-2711
21. Reed L.K, Carroll J. R, McGirk M. E, Stabenau E.K. Mitochondrial oxygen consumption and ATP content in control and pyrene-exposed frogs. *Journal of Environmental Science and Health*, part A, 2006, vol. 43, no. 6, pp. 576-583.

3-OXYPYRIDINES PREVENT THE MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION DUE TO THE INFLUENCE OF THE MICRO-DOSES OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

Zhigacheva I.V.¹, Rusina I.F.², Generosa I.P.³

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences,
Kosygin St., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: zhigacheva@mail.ru

² Semenov Institute of Chemical Physics Russian Academy of Sciences
Kosygin St., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: rusina939@mail.ru

³ K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences
Botanicheskaya St., 35, Moscow, 127276, Russia; e-mail: igenerozova@mail.ru

Abstract. Antiradical, antioxidant and anti-toxic properties of 3-hydroxypyridine derivatives (3-OP), in particular N-acetylcysteine 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (3-OP), were studied. High values of antiradical activity of this preparation are shown. In model experiments, the drug prevented the activation of lipid peroxidation in the membranes of rat liver mitochondria and pea seedlings mitochondria in the concentration range 10^{-6} - 10^{-16} M. He reduced the intensity of LPO up to control values under conditions of treatment animals with a gas-air mixture, containing polycyclic aromatic hydrocarbons PAH, which caused a 6-fold increase in fluorescence intensity of LPO products in membranes of liver mitochondria. Averting of LPO contributed to the preservation of the functional activity of mitochondria Possessing antiradical and antioxidant activity, the preparation prevented the induction of cytochrome P-450 in liver tissue in case of processing animals with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), indicating the presence at him of detoxification properties.

Key words: 3-hydroxypyridine derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons, mitochondria, LPO.

SENSITIVITY OF *E. COLI* CELLS TO LOW STATIC MAGNETIC FIELDS

Letuta U.G., Shailina D.M.

Orenburg State University

Pobeda dis., 13, Orenburg, 460018, Russia; e-mail: shevulyana@yandex.ru

Received by the Editor: 11.04.2018

Abstract. The aim of this work was to study low static external magnetic field effects 0-100 mT on the growth and development of *E. coli* bacteria. A large number of experimental points in this range, ongoing growth of bacteria in a magnetic field and the registration of changes in the physiological characteristics (CFU, growth rate) and biochemical parameters (ATP pool) guaranteed an obtainment reliable results. The colony-forming ability, growth rate constant and ATP pool in *Escherichia coli* bacteria are the magnetic-dependent characteristics of microorganism vital activity. They depend on the external static magnetic field and increase when its value lies in ranges 0-10 mT and 15-50 mT. The magnetic field rising from 50 to 100 mT leads to bacterial growth inhibition. All observed effects in bacteria *E. coli* are in good agreement with a theory of the enzymatic magnetosensitivity and determined by the spin dependent stages of intracellular enzymatic processes.

Key words: *E. Coli*, magnetic field, ATP.

INTRODUCTION

Living organisms are continuously exposed to static magnetic and variable electromagnetic fields, most of which are technogenic ones: power lines, cell phones, electronic equipment, and others. Numerous studies have shown that living organisms, including bacteria, respond in a different way to a magnetic field action [1-4]. The specific biological response of living cells depends on the type of microorganisms and the method of its registration [2]. The nature of the observed magnetic field effects at the cellular and molecular level is usually obscure and has not always reliable physicochemical mechanism, in particular, due to the conflicting experimental results [4-5]. For example, the magnetic fields effect on *E. coli* bacteria can cause the increase and reduction of the cell division rate. It's depending on the physiological conditions of bacterial growth [6-7].

The experimental data accumulation and the hypotheses search about mechanisms of magnetic field effects in living cells is the beginning of the twentieth century [8]. During this time, the different parameters of the magnetic fields influence on living systems have been varied: magnetic field strength (from 10^{-6} to 10 T); exposure time (from several minutes to several days); types of studied systems (from molecular complexes to multicellular organisms) [4]. However, most of the researches are a blind attempt to find the patterns of response occurrence in living systems to the magnetic fields action. This is due to the lack of rigorous theoretical bases of biological magnetic field effects. There are various mechanisms of living organism magnetosensitivity [9-14]. Some of them could explain the magnetic orientation of birds and fishes [11-13]; the other – the magnetic field effects in biopolymers [14], etc. The universal mechanism of magnetosensitivity that would be true for all living systems, have not been suggested. The most likely candidate for the universal "receiver" of the external magnetic field in cells is spin-dependent enzymatic reactions, which have a strict theoretical basis [15-17] and experimental confirmations *in vitro* [18-19]. Magnetosensitive stages in these reactions are stages with one or more electrons transfer, which lead to the ion-radical pair's formation in the enzyme active site. An external magnetic field or the magnetic isotopes of chemical elements, such as ^{31}P , ^{25}Mg , ^{43}Ca having nuclear magnetic moment and participating in the reaction, can change the spin state of ion-radical pairs by inducing the singlet-triplet conversion. This leads to changes probabilities of direct and back electron transfer and, in turn, increases or decreases the reaction products yield.

The first spin-dependent enzymatic reactions were discovered in experiments with phosphorylating enzymes and magnesium isotopes: magnesium nucleus ^{25}Mg , having the magnetic moment ($S=5/2$), increased the ATP yield in the reaction of ATP synthesis compared with non-magnetic nucleus $^{24,26}\text{Mg}$ [20-21]. The proposed mechanism of this reaction involves electron transfer from the terminal phosphate group of ADP with the ion-radical pair formation in the enzyme active site. Later, similar effects in enzymatic ATP synthesis were first predicted and then obtained for the magnetic isotope of zinc ^{67}Zn and calcium ^{43}Ca [22-23]. Enzymatic reactions of DNA synthesis are also sensitive to the nuclear magnetic moment of magnesium ^{25}Mg , zinc ^{67}Zn and calcium ^{43}Ca isotope presence [24]. The effectiveness of magnetic isotopes in these reactions increased with an external magnetic field inclusion [25-27]. Obtained magnetic isotope and magnetic field effects in ATP and DNA synthesis have laid a reliable experimental foundation of the theory of living organism magnetosensitivity due to spin-dependent stages of enzyme reactions elementary acts presence. The strong theory, which illustrated the magnetic field dependence of the rate constant of enzyme reactions going with one or more electrons transfer, outlined in [15-17]. The main magnetosensitive stage of this process is the singlet-triplet conversion of ion-radical pairs in the enzymes active sites induced by Zeeman and hyperfine interactions (HFI) of electron and nuclear spins with the magnetic field. The products of these reactions "transform" the nuclear spin and the magnetic field effects into "biochemical response" of living organisms available for registration *in vivo*. The amplitude of magnetic field effects, in accordance with this theory, depends on the ratio between HFI constants of magnetic

isotope involved in the reaction and the rate constants of enzymatic reactions. Moreover, the strongest effects should be observed in a low magnetic field, the intensity of which does not exceed the values of the HFI constants 0-50 mT.

Magnetic field effects in living organisms, predicted by this theory, were not obtained previously due to used range of magnetic fields more than 0.1 T [4, 28], and also due to the limited number of experimental points and short magnetic field exposure. As a rule, the choice of specific values of the external magnetic field caused by experimental setup features or researchers preferences. The aim of this work was to study a low static external magnetic field effects 0-100 mT on the growth and development of *E. coli* bacteria. A large number of experimental points in this range, continuous growth of bacteria in a magnetic field and the registration of changes in the physiological characteristics (colony-forming units (CFU), growth rate) and biochemical parameters (ATP pool) allow us to make conclusions about the reliability and mechanism of the discovered effects.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria cultivation and magnetic field exposure conditions. The study object was the *E. coli* cells culture, viz., a museum strain K12TG1 (from collection of Institute of Cellular and Intercellular Symbiosis, Ural branch of RAS, Orenburg, Russia), which was grown in the LB broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The density of the seed culture was monitored photometrically with the SOLAR (CM2203, SOLAR Technical Service, Minsk, Belarus) spectrofluorimeter (wavelength 620 nm, absorbance $0,61 \pm 0,01$ rel. units). Then the cells of *E. coli* were re-sowed into the LB media. 200 μ l of the medium with *E. coli* cells was added to each well of a 96-well plate (Apexlab, Moscow, Russia); volume of each well was 346 μ l.

All the samples were placed in a static magnetic field (SMF), which was induced by the electromagnet with an iron yoke (TR-309, Takeda Riken, Tokyo, Japan) with the cooling system, and the temperature was continually monitored for 7 h to ensure a constant temperature of 37 °C. The scheme and photo of the experimental setup are presented in Fig. 1a-b. The electromagnet has two coils with an outside diameter of 28 cm and an internal diameter of 16 cm, the length of the coils 11 cm, and the distance between the coils 12 cm. The diameter of the pole pieces 8 cm. The current source allows adjusting the magnetic field strength from 0 to 1.5 T in the central region between the pole pieces. Coils have the total resistance 10 Ω . Long-term stability of the current and the magnetic field was less 10^{-3} . The direction of the magnetic field coincides with the direction of the Earth magnetic field. The combination of the coils and the iron yoke produce the inhomogeneous magnetic field inside a thermostated box with dimensions: length 68 cm, width 9 cm, height 8 cm.

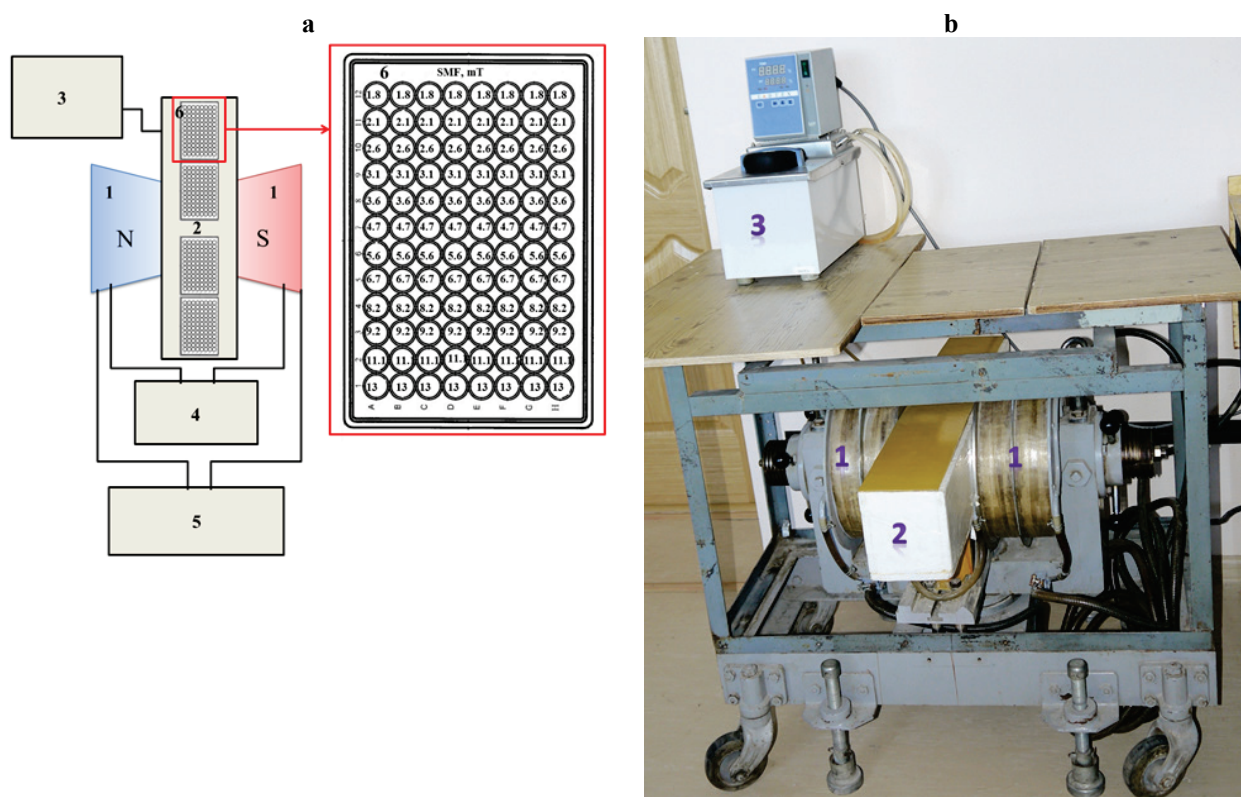


Figure 1. Scheme (a) and photo (b) of experimental setup: 1 – poles of electromagnet; 2 – thermostated box, in which 96-well plates with *E. coli* bacteria were placed for cultivation in static magnetic field, temperature of box was maintained at 37 °C; 3 – thermostat controlling temperature in box; 4 – magnet power supply; 5 – cooling system of electromagnet; 6 – example of scheme of static magnetic field points for 96-well plates, range of magnetic field for whole box for this example is from 1,8 to 100 mT

The 96-well plates with *E. coli* bacteria were placed in the thermostatic box for exposure to the magnetic field. The temperature in the box was maintained at $37 \pm 0,4$ °C using a circulating thermostat (LT-TWC/7, Labteh, Moscow, Russia). Aerobic cultivation conditions were provided by placing samples with growing bacterial culture on the ST-3 ELMI shaker (ST-3, ELMI, Riga, Latvia) every hour for 5 min. (rotation velocity of the platform 200 rpm). Thus the amount of oxygen was sufficient to ensure aerobic conditions of cultivation given that the shaking was performed every hour. However, the magnetic field in small wells of the 96-well plates can be thought as homogeneous one as far as it was averaged due to movement of bacteria and due to placing samples with growing bacterial culture on the shaker, which was independent from incubator. The magnetic field of the shaker was $0,30 \pm 0,05$ mT that coincides with the laboratory background magnetic field.

The range of the chosen low magnetic fields was 0-100 mT. The bacteria were cultivated simultaneously in 96 control points corresponding to 22 stationary magnetic fields, whose values were measured by the milliteslameter (TP2-2U, Fela-control, St. Petersburg, Russia). The magnetic fields fluctuations at each point were monitored throughout the experiment and did not exceed 0,1 mT.

Growth curves. The growth curves (the dependencies of the suspensions optical density, which characterize the growth of the bacterial culture, on the cultivation time) were measured by the turbidimetric method every hour with the photometer UNIPLAN "Pikon" (ZAO "Pikon", Moscow, Russia) at 492 and 620 nm. The experimental growth curves recorded at the different wavelengths were qualitatively identical, so the data for one wavelength 492 nm is only shown.

The initial part of the curves (prior to the stationary phase, the first 5 h of cultivation) was processed using linear approximation adopted in biology and microbiology for determining the growth rate.

The linear portion of the growth curves, corresponding to the phase of active cell division, was approximated by the formula [29]:

$$D_{492} = D(0) + \mu t,$$

where $D(0)$ is the initial optical density, μ is the growth rate constant (in h^{-1}), also known as the reproductive potential of the bacterial culture.

CFU measurements. The colony-forming ability of bacteria, which was measured after 7 h of cell incubation in a static external magnetic field, was chosen as the main indicator of growth. The method of serial dilutions was applied for measuring CFU: three dilutions of the medium containing *E. coli* cells in the physiological solution [30].

The cell concentration in each sample was determined photometrically by using the SOLAR CM2203 spectrofluorimeter according to the calibration curve. Equal amounts of *E. coli* cells diluted in the corresponding concentrations were sowed on the solid nutrient medium LB agar in Petri dishes. The CFU values were calculated after 16 h of incubation at 37 °C.

Measurements of intracellular ATP. For the measurement of the intracellular ATP in the *E. coli* bacteria, the bioluminescence method was used. It was performed by the luminometer "LUM-01" (LUM-01, Lumtek, Moscow, Russia) – high sensitivity photon counter, which registers the intensity of luminescence in the range of 10 to 800 thousand pulse/s. The ATP concentrations were measured using the Lumtek set (measurement of the total concentration of ATP in extracts of cells and tissues) (Lumtek, Moscow, Russia). The set includes 4 solutions: the ATP-reagent "Lumtek", lyophilized [31]; the solution for reconstruction of the ATP-reagent; ATP-control, lyophilized; the solution for cell destruction. For measuring the ATP pool the ATP-reagent reconstruction was carried out by adding 4 ml of solution for reconstruction (solution aged for 0,5-1 h at room temperature). Bacterial cells were destroyed using the appropriate solution (DMSO) to release the ATP (0,05 ml homogenate of bacteria was added to 0,45 ml of DMSO). 0,1 ml of the extract was transposed into the luminometer cuvette. Then 0,02 ml of the ATP reagent was added into the cuvette. The bioluminescent intensity of the received signal $I_{\max}$ was compared with the signal intensity of the ATP control I_{Contr} . To measure the intensity of the ATP control a 1 ml solution for cell destruction was placed in a bottle and the ATP control added. The ATP concentration of the bacterial population was calculated by the formula:

$$[\text{ATP}]_{\text{cells}} = 10 \cdot 10^{-8} (I_{\max} / I_{\text{Contr}}), \text{ mol/l.}$$

To calculate the intracellular ATP pool in single bacteria the ATP concentration measured by using the bioluminescent method was divided by the number of bacterial cells measured using the CFU method.

Statistical Analysis. Data were expressed as mean $\pm$ SD. The Shapiro-Wilk normality test was used to determine whether experimental data have been drawn from a normally distributed population. Student's tests were used to determine statistical differences by the Origin 8,0 software (Version 8,0; Micro-cal Software, Northampton, USA). The differences between groups were considered as statistically significant when $P < 0,05$.

RESULTS

As the result of performing series of six identical experiments (in each series, at least three replicates were performed), the cell growth curves for *E. coli* were obtained. The magnetic field dependencies of the growth rate constants, which were calculated after linear approximation of bacteria growth curves, are presented in figure 2. These dependencies reflected the different influence of the low magnetic field on the microorganisms' growth.

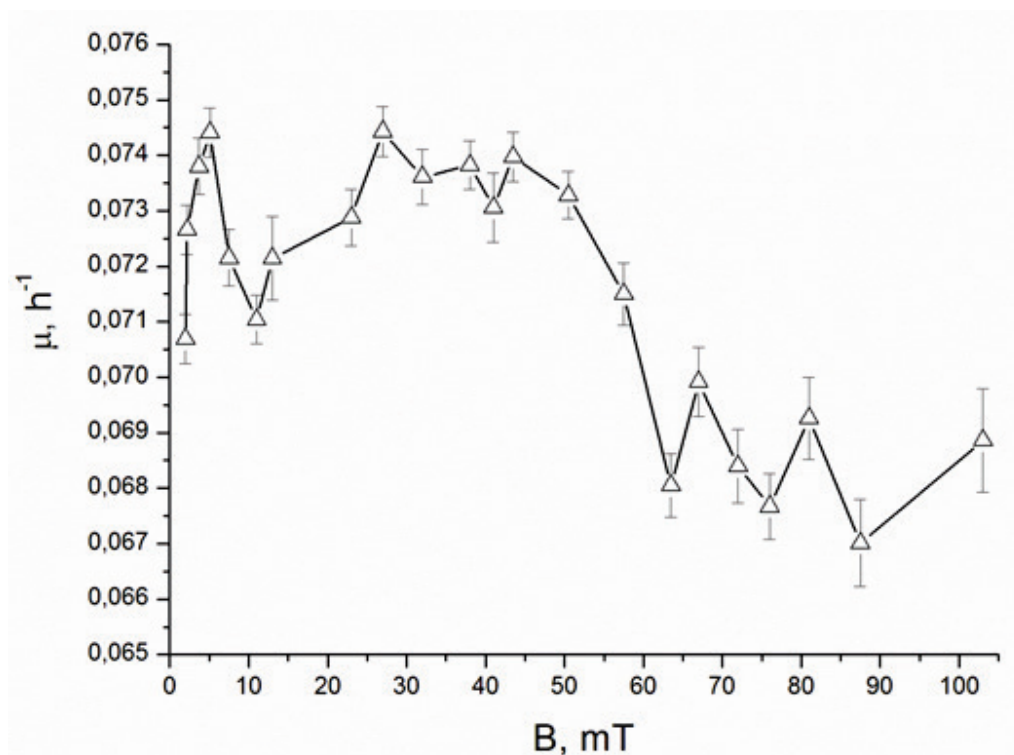


Figure 2. Magnetic field dependence of growth rate constants of *E. coli* cells. Rate constants were determined using various linear approximations of growth curves. Results were expressed as means $\pm$ SD. Significant difference was set at $P < 0.05$ ($n = 18$)

Magnetic field effects of the growth rate constant were observed for the microorganisms cultivated in the ranges 0-10 mT and 25-55 mT. When the magnetic field intensity increased from 0 to 6.5 mT, growth rate constant increases in 7 % and reaches the maximum value throughout the studied range. The magnetic field intensity increase from 55 to 100 mT leads to a significant inhibition of bacterial growth. The growth rate constant reduced by 11% compared with its maximum value.

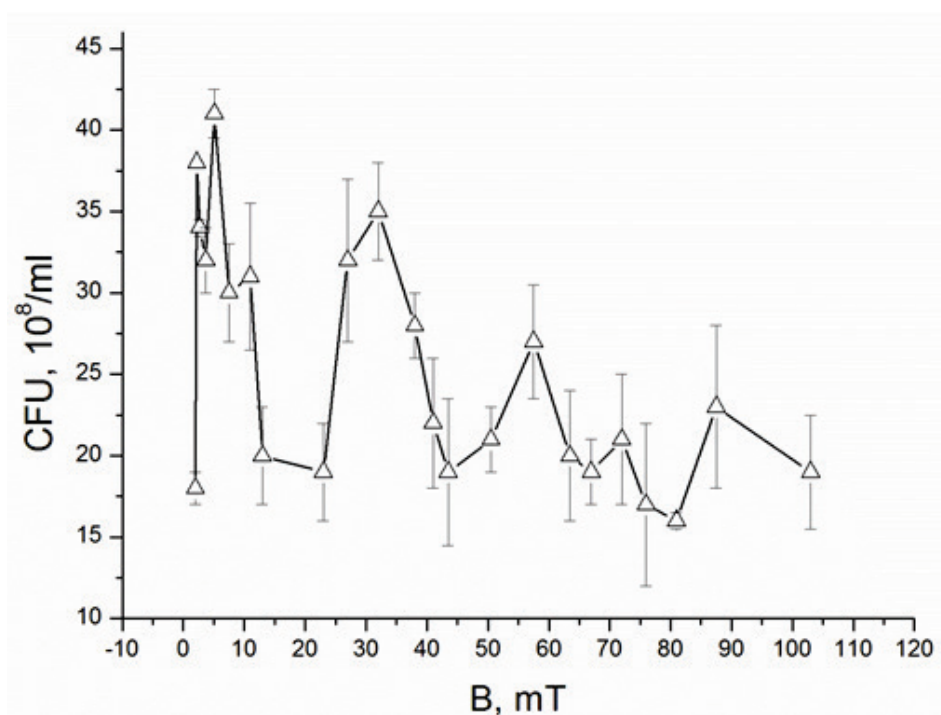


Figure 3. Magnetic field dependencies of *E. coli* cells CFU. Results were expressed as means $\pm$ SD. Significant difference was set at $P < 0.05$ ($n = 18$)

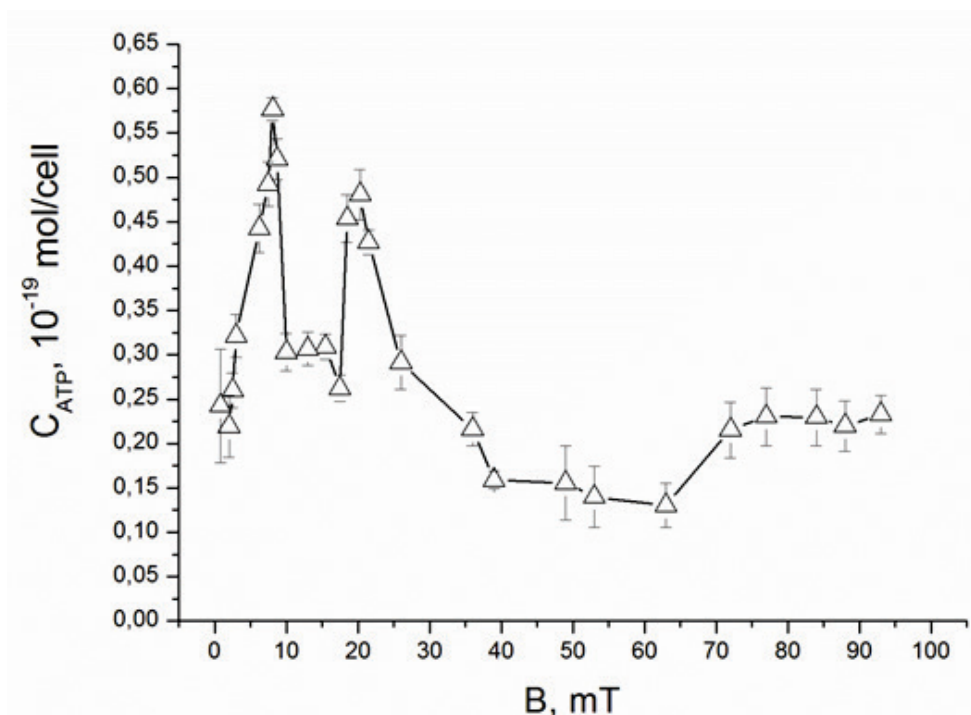


Figure 4. Magnetic-field dependence of ATP pool in *E. coli* bacteria cultivated in LB medium. Results were expressed as means $\pm$ SD. Significant difference was set at $*P < 0,05$ ($n = 12$)

Another important microbiological indicator of the bacterial culture's growth is its colony forming ability. The similar magnetic field dependence was observed for CFU of bacterial cells grown in the nutrient-rich medium LB. This dependence is presented in figure 3. When the magnetic field intensity increased from 0 to 7 mT, the colony-forming ability increases by 2-2.5 times and reaches the maximum value. The next range of magnetic fields where number of CFU increased was 23-40 mT. No reliable differences between the CFU of the bacteria subjected to the static external magnetic field in the range 43-100 mT were observed.

The dependence of the intracellular ATP concentration in the bacteria *E. coli* on the external magnetic field is presented in figure 4. There were 6 experimental series of which each was repeated twice or three times. The average ATP content in single bacterial cell in the selected growth conditions was 10^{-19} mol, which was consistent with the literature data [32]. It was observed three characteristic ranges of the magnetic-field dependencies of the ATP pool in *E. coli*: 0-10, 15-26, 30-100 mT. In the first range the ATP pool reaches the maximum value, 2 times higher than ATP concentration for bacteria cultivated in geomagnetic field. The external static magnetic field influence of the second range also promotes intracellular ATP concentration. A further increase of an external magnetic field to 100 mT (third range) leads to inhibition of the ATP synthesis and hydrolysis in bacterial cells. The value of bacterial ATP pool in this range is less than in previous ones.

DISCUSSION

The magnetic field effects in the physiological characteristics (CFU, growth rate) and biochemical parameters (ATP pool), which were obtained in the range 0-10 mT, are the most interesting effects accordingly to the theoretical predictions [15-17]. These fields are attractive because the HFI constants of the most organic radicals containing magnetic nuclei of natural isotopes ^1H and ^{13}C are in the range of 0,1-4 mT [33]. It is important to note that magnetic fields dependences of CFU, growth rate constants and ATP pool are correlated.

A large number of studies wrongly focused on the detection of magnetic field effects in strong magnetic fields, much larger than the Earth's magnetic field [34-36]. The effects usually detected in such cases cannot explain the magnetic sensitivity of living organisms in the low magnetic field of the Earth (about $0.5 \cdot 10^{-2}$ mT) and their reaction to variations of this field. Moreover, those results can hardly be used to understand a mechanism of intracellular enzymatic process magnetic control. The joint effects of external magnetic fields and magnetic moments of atomic nuclei can be observed and registered exactly in low magnetic fields, the strength of which is less than the value of hyperfine interactions constants [17]. The increase of the ATP pool, colony-forming ability and growth rate constant in all bacteria in the range of 0-10 mT registered in our experiments confirms the theoretical conclusions. In this range we expected the bright magnetic-field effects in living organisms according to the theory of enzymatic magnetosensitivity, where the primary receiver of an external magnetic field is a spin-dependent stage of elementary acts of enzymatic processes. The magnetosensitivity of these stages is due to the participation of particles with nuclear magnetic moments, such as magnetic isotopes ^1H , ^{13}C , ^{39}K and their hyperfine interaction with the electronic spin and the external magnetic field [15, 17]. A required condition of occurrence of such magnetosensitive enzyme reactions is the electron transfer and the formation of an ion-radical pair. The nuclear magnetic moments of stable isotopes and an external static

magnetic field are to induce the transition of ion-radical pairs from the initial singlet state into a triplet one. The probabilities of the forward and reverse electron processes depend on the total spin state of such pair. For example, the singlet-triplet conversion of the pair “magnesium ion $^{25}\text{Mg}^+$ - ADP radical” in the active site of ATP-synthase [18, 21] leads to increase the probability of a direct reaction (ATP formation).

The detected magnetic field effects in the growth rate constant, colony-forming ability and intracellular ATP concentration for all studied *E. coli* bacteria in the range 0-10 mT indicates validity of the theoretical predictions and the presence of magnetically sensitive enzymatic reactions occurring in the ion-radical mechanism.

The magnetic field effects, which were registered for the growth rate, CFU and ATP pool in the second range from 15 to 50 mT, may be related to the enzymatic reactions involving ion-radicals stages with high hyperfine interactions constants, for example, ^{23}Na , ^{31}P . On the other hand, these effects may be appeared due to magnetic fields influence on the intracellular processes with paramagnetic ions, Fe, Mn, etc.

The magnetic field increase from 50 to 100 mT leads to bacterial growth inhibition. This is manifested as the growth rate and the CFU number decrease and inhibition of ATP production by cells.

CONCLUSION

The colony-forming ability, growth rate constant and ATP pool in *Escherichia coli* bacteria are the magnetic-dependent characteristic of microorganism vital activity. It depends on the values of the external static magnetic field. It was obtained that two ranges of low magnetic fields 0-10 mT and 15-50 mT can affect the bacterial growth. All observed magnetic field effects in bacteria *E. coli* are determined by the spin dependent stages of intracellular enzymatic processes; synthesis of ATP is the most probable one.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-33-60021).

References:

1. Ahuja Y.R., Vijayashree B., Saran, R., Jayashri, E.L., Manoranjani, J.K., Bhargava S.C. In vitro effects of low-level, low-frequency electromagnetic fields on DNA damage in human leucocytes by comet assay. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1999, vol. 36, no. 5, pp. 318-322.
2. Kohno M., Yamazaki M., Kimura I., Wada M. Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Pathophysiology*, 2000, vol. 7, pp. 143-148.
3. Molouk M., Alkhazan K., Amna, A.N. The effect of magnetic field on the physical, chemical and microbiological properties of the lake water in Saudi Arabia. *J. Evol. Biol. Res.*, 2010, vol. 2, pp. 7-14.
4. Albuquerque, W.W., Costa, R.M., Fernandes, Tde. S., Porto A.L. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2016, vol. 121, no. 1, 16-28.
5. Nakasono S., Saiki H. Effect of ELF magnetic fields on protein synthesis in *Escherichia coli* K12. *Radiat Res.*, 2000, vol. 154, pp. 208-216.
6. Makarevich V. Effect of magnetic fields of magnetoplastics on the growth of microorganisms. *Biophysics*, 1999, vol. 44, pp. 65-69.
7. Okuno K., Tuchiya K., Ano T., Shoda M. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperature. *J. Ferment. Bioeng.*, 1993, vol. 75, pp. 103-106.
8. Kimball G.C. The growth of yeast in a magnetic field. *J. Bacteriol.*, 1938, vol. 35, no. 2, pp. 109-122.
9. Binh V.N. *Magnetobiology underlying physical problems*. Tokyo: Academic Press, 2002, 473 p.
10. Schuler D. *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*. Berlin: Springer, 2007, 319 p.
11. Rodgers C.T., Hore P.J. Chemical magnetoreception in birds: The radical pair mechanism. *PNAS*, 2009, vol. 106, no. 2, pp. 353-360.
12. Wiltshko W., Wiltshko R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal of Comparative Physiology A*, 2005, vol. 191, no. 8, pp. 675-693.
13. Lohmann K.J. Q&A: Animal behaviour: Magnetic-field perception. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7292, pp. 1140-1142.
14. Brocklehurst B. Magnetic fields and radical reactions: recent developments and their role in nature. *Chemical Society Reviews*, 2002, vol. 31, pp. 301-311.
15. Letuta U.G., Berdinskiy V.L., Udagawa C., Tanimoto, Y. *Enzymatic mechanisms of biological magnetic sensitivity. Bioelectromagnetics*, 2017. (In print)
16. Shevchenko, U.G., Berdinskii, V.L. Enzymic processes as a mechanism of biological magnetoreception. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2011, vol. 5, no. 3, pp. 519-524.
17. Letuta, U.G., Berdinskii, V.L. Enzymatic mechanisms of biological magnetic sensitivity: Nuclear spin effects. *Russian Chemical Bulletin*, 2015, vol. 64, no. 7, pp. 1547-1554.
18. Buchachenko A.L. *Magnetic isotope effect in chemistry and biochemistry*. New York: Nova Science Publishers, 2009, pp. 83-88.
19. Buchachenko, A.L. Magnetic field-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine. *Russian Chemical Reviews*, 2014, vol. 83, vol. 1, pp. 1-12.

20. Buchachenko, A.L., Kuznetsov, D.A., Arkhangelsky, S.E., Orlova, M.A., Markaryan, A.A. Magnetic isotope effect of magnesium in phosphoglycerate kinase phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, vol. 102, pp. 10793-10796.
21. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., Arkhangelsky S.E., Orlova M.A., Markaryan A.A. Dependence of mitochondrial ATP synthesis on the nuclear magnetic moment of magnesium ions. *Cell Biochemistry Biophysics*, 2005, vol. 43, pp. 243-252.
22. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N., Shchegoleva L.N., Arkhangelsky S.E. Calcium induced ATP synthesis: Isotope effect, magnetic parameters and mechanism. *Chemical Physics Letters*, 2011, vol. 505, no. 4-6, pp. 130-134.
23. Buchachenko A.L., Chekhonin V.P., Orlov A.P., Kuznetsov D.A. Zinc-related magnetic isotope effect in the enzymatic ATP synthesis: a medicinal potential of the nuclear spin selectivity phenomena. *International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences*, 2010, vol. 6, no. 3, pp. 34-37.
24. Buchachenko A.L., Orlov A.P., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Magnetic control of the DNA synthesis. *Chemical Physics Letters*, 2013, vol. 586, pp. 138-142.
25. Buchachenko A.L., Orlov A.P., Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Magnetic isotope and magnetic field effects on the DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, no. 17, pp. 8300-8307.
26. Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A. Magnetic field affects enzymatic ATP synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, vol. 130, pp. 12868-12869.
27. Buchachenko A.L. *Magneto-biology and medicine*. New York: Nova Science Publishers, 2014.
28. Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2005, vol. 87, pp. 213-222.
29. Gerhardt Ph. *Manual of methods for general bacteriology*. Washington: American Society for Microbiology, 1981, p. 1069.
30. Goldman, E., Green, L.H. *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition*. USA: CRC Press, 2008.
31. Ugarova N.N., Koksharov M.I., Lomakina, G.Y. *The reagent for determination of adenosine5' triphosphate*. RU Patent no. 2420594, 2009, (In Russ.)
32. Ugarova N.N., Brovko L.Y., Trdatyan I.Y., Rainina E.I. Bioluminescent methods of analysis in Microbiology. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1987, vol. 23, pp. 14-24.
33. Buchachenko A.L., Vasserman A.M. *Stable radicals. Electronic structure, reactivity and application*. Moscow, Russia: Khimiya, 1973, 408 p.
34. Horiuchi S., Ishizaki Y., Okuno K., Ano T., Shoda M. Drastic high magnetic field effect on suppression of *Escherichia coli* death. *Bioelectrochemistry*, 2001, vol. 53, pp. 149-153.
35. Zhang Q.M., Tokiwa M., Doi T., Nakahara T., Chang P.W., Nakamura N., Hori M., Miyakoshi J., Yonei S. Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in *Escherichia coli* sox R. *International Journal of Radiation Biology*, 2003, vol. 79, no. 4, pp. 281-286.
36. Yoshie S., Ikehata M., Hirota N., Takemura T., Minowa T., Hanagata N., Hayakawa T. Evaluation of mutagenicity and co-mutagenicity of strong static magnetic fields up to 13 Tesla in *Escherichia coli* deficient in superoxide dismutase. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2012, vol. 35, no. 3, pp. 731-736.

РЕФРАКТОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ СЕЛЕКТИВНОСТИ МАСЛЯНЫХ ЭКСТРАГЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Нечипоренко А.П., Нечипоренко У.Ю., Плотникова Л.В., Мельникова М.И.,
Успенская М.В.

Научно-исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики
пр. Кронверкский, 49, г. Санкт-Петербург, 197101, РФ; e-mail: allanech2513@yandex.ru,
od@mail.ifmo.ru

Поступила в редакцию: 02.05.2018

Аннотация. Методом рефрактометрии проведено исследование показателя преломления, йодного числа и относительного процента жирности серии промышленных растительных масел, их купажей и масляных экстрактов сухого измельченного лекарственного растительного сырья (травы зверобоя, чистотела и корня одуванчика). Показано влияние природы, соотношения и порядка смешивания компонентов на оптические свойства моделируемых масляных композиций. Отмечена селективность как индивидуальных масел-экстрагентов, так и их купажей в отношении растительного сырья разной природы и его анатомических частей.

Ключевые слова: растительные масла, масляные купажи, масляные экстракты, растительное сырье, метод рефрактометрии.

Как известно, основным критерием идентификации растительных масел, оценки их пищевой и биологической ценности является жирно-кислотный состав триглицеридов. Примерно 75 % растительных масел состоит, в основном, из триглицеридов четырех карбоновых кислот (ненасыщенной пальмитиновой, мононасыщенной олеиновой, полиненасыщенных линолевой и линоленовой). Подавляющее большинство триглицеридов являются разнокислотными (смешанными) [1, 2]. Обычно одна-две кислоты в структуре триглицеридов доминируют, и эта особенность является основой классификации растительных масел по йодному числу, характеризующему степень их ненасыщенности.

Способность масел растворять липофильные (жирорастворимые) вещества является основой традиционных технологий получения масляных экстрактов из лечебного и пряно-ароматического растительного сырья, давно и широко используемых в различных отраслях пищевой промышленности, косметологии, фармацевтической и медицинской практике [3-5]. Наряду с генной инженерией и работами селекционеров по созданию масличных культур с заданным жирно-кислотным составом, в последние полтора-два десятилетия эффективным технологическим приемом коррекции жирно-кислотного состава растительных масел считается их купажирование (получение смесей) с использованием в качестве основы оливкового и льняного, обеспечивающих основное содержание жирных кислот ω -6 и ω -3 [6-8]. В качестве дополнительных, корректирующих добавок рекомендуются – кукурузное, виноградное, кедровое, горчичное, кунжутное, подсолнечное масла.

Из инструментальных методов одним из ведущих в масложировой промышленности остается рефрактометрия [9]. Величина рефрактометрического показателя преломления является критерием качества масел, в состав которых входит определенный набор жирных кислот, каждая из которых обладает характерным для нее показателем преломления и йодного числа. Отсутствие литературных данных по исследованию купажей растительных масел, быстро входящих в сферу производства, а также появление новых технологий производства и новых видов промышленной продукции, предопределило цель данной работы – сравнительное исследование методом рефрактометрии экстрактивной способности природных жирных масел и их купажей в отношении растительного сырья разной природы.

Объектами исследования являлись растительные масла промышленного производства, их двухкомпонентные купажи и масляные экстракты измельченных ($< 0,5$ мм) образцов травы зверобоя продырявленного, чистотела большого и корня одуванчика. В качестве экстрагентов использованы масла I-III групп, классифицированных по йодному числу (таблица). Выбор экстрагентов осуществлялся на основании предварительного анализа серии масел на цифровом рефрактометре АВВЕМАТ-200 фирмы Anton Paar GmbH (США) для натриевой линии спектра $\lambda = 589$ нм с модулем автоматического термостатирования исследуемого образца, и основан на их доступности и максимальном различии по оптическим показателям в пределах одной группы. Модельные системы двухкомпонентных купажей составлялись из масел разных групп при объемном соотношении компонентов 1:1.

Масляные вытяжки получали горячей экстракцией на водяной бане при 90 °С в течение 1 час, при соотношении массы сухого сырья и экстрагента – $m(g)/V(мл) = 5/50$ и последующем выдерживании в течение 5 месяцев. Перед измерением растворы экстрактов центрифугировали. В таблице представлены рефрактометрические показатели (показатель преломления – n_D , йодное число – ИЧ, процент относительной жирности – %) для выборки жирных растительных масел из расширенной серии (22 наименования) с отнесением их к соответствующей группе (I–III) согласно классификации [1] по йодному числу, базирующейся на содержании доминирующей ненасыщенной кислоты: I – олеиновой, II – линолевой, III – линоленовой.

Таблица 1. Результаты рефрактометрического анализа серии промышленных масел растительного происхождения и их двухкомпонентных купажей

№	Образец	Группа	n_D	ИЧ	%
Растительные масла					
1	Оливковое	I	1,4617	74,8	53,1
2	Персиковое	I	1,4670	105,3	59,8
3	Виноградное	II	1,4681	111,0	62,3
4	Подсолнечное	II	1,4674	107,8	61,0
5	Кедровое	II	1,4681	112,0	62,7
6	Льняное	III	1,4739	147,3	73,0
7	Рыжиковое	III	1,4704	125,7	66,2
Двухкомпонентные масляные купажи (1:1)					
№ 1	Оливковое + льняное	I + III	1,4673	107,4	60,5
№ 2	Подсолнечное + льняное	II + III	1,4705	126,3	67,5
№ 3	Оливковое + подсолнечное	I + II	1,4643	89,0	56,0
№ 4	Льняное – оливковое	III – I	1,4635	85,2	55,6
№ 5	Льняное – подсолнечное	III – II	1,4695	120,5	65,5
№ 6	Подсолнечное – оливковое	II – I	1,4617	70,0	58,1

В таблице 1 представлены рефрактометрические показатели (показатель преломления – n_D , йодное число – ИЧ, процент относительной жирности – %) для выборки (7 наименований) жирных растительных масел из расширенной серии с отнесением их к соответствующей группе (I–III) согласно классификации [1] по йодному числу, базирующейся на содержании доминирующей ненасыщенной кислоты: I – олеиновой, II – линолевой, III – линоленовой. А также данные по исследованию двух- и трехкомпонентных купажированных масляных систем, составленных на основе масел из трех классификационных групп – оливкового, подсолнечного и льняного.

Графическая обработка данных, представленных в таблице (рис. 1), показала линейную зависимость между всеми рефрактометрическими показателями для выборки исследуемых масел. Аналогичная взаимосвязь между показателем преломления и йодным числом наблюдалась для двухкомпонентных купажей. Полученные линейные зависимости увеличения показателя преломления и йодного числа адекватно отражает прирост содержания С=С связей в составе жирных кислот триглицеридов с увеличением степени их ненасыщенности, при переходе исследуемых образцов от группы I к группе III.

Сопоставление данных, полученных для модельных композиций, показывает, что на оптические свойства купажированных систем влияет природа смешиваемых компонентов (рис. 1б). Однако характер изменения оптических свойств купажей говорит о том, что при составлении композиций не происходит механического смешивания масел, а возможно разрушение прежних и формирование новых ассоциатов триглицеридов, изменяющих не только оптические характеристики купажированных систем, но и их физико-химические и биофункциональные свойства. Данные представленные на рисунке 2, дают более наглядное представление о влиянии природы масел на изменение йодного числа модельных двухкомпонентных купажей по сравнению с рефрактометрическими показателями исходных масел (рис. 2а). На двухкомпонентных купажах (рис. 2б и 2в), полученных смешиванием масел в отношении 1:1, исследовалось влияние природы компонентов и порядок их смешивания.

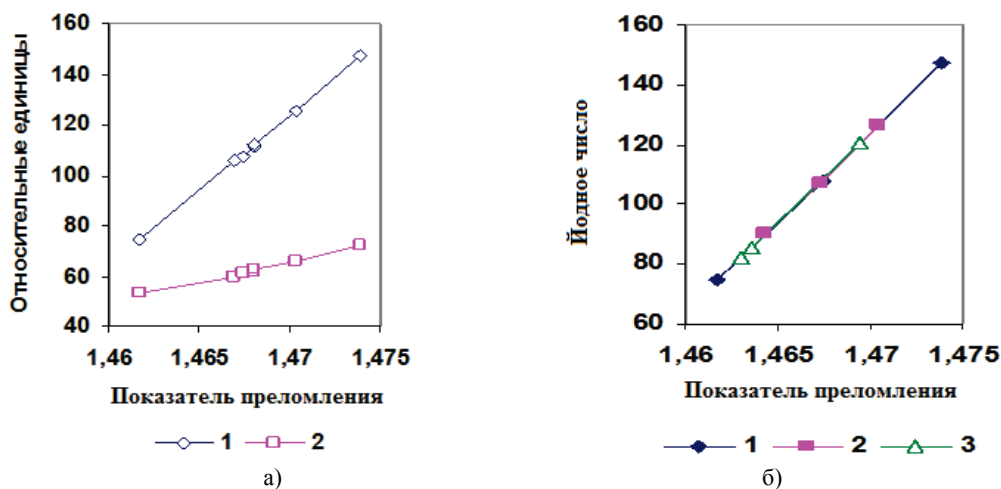


Рисунок 1. Рефрактометрические показатели масел и купажированных систем. Зависимости – а) Масла: 1 – ИЧ = $f(n_D)$, 2 – % (относ.) жира = $f(n_D)$; б) двухкомпонентные купажи: 1 – масла; купажи: 2 – № 1–№ 3; 3 – № 4–№ 6

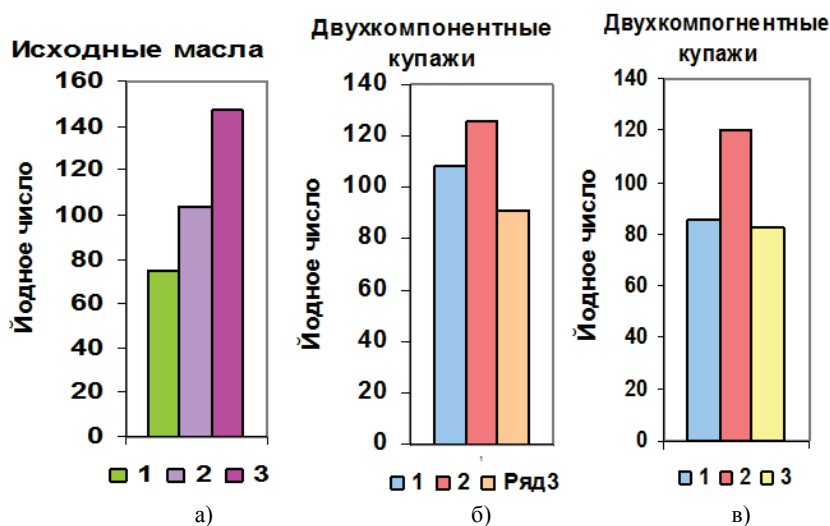


Рисунок 2. Зависимость йодного числа от природы масла и состава купажируемых систем-экстрагентов: а) исходные масла: 1 – оливковое, 2 – подсолнечное, 3 – льняное; двухкомпонентные купажи: б) 1 – № 1, 2 – № 2, 3 – № 3; в) 1 – № 4, 2 – № 5, 3 – № 6

Наиболее высокое значение йодного числа имели системы, в состав которых входило льняное масло (гр. III). Индивидуальный показатель йодного числа подсолнечного и льняного масел резко понижало присутствие оливкового (гр. I). Однако, как следует из сопоставления данных, при сохранении тенденции, обусловленной составом купажей, порядок смешивания масел заметно проявляется в различии значений йодного числа двухкомпонентных систем.

Данные, полученные для модельных смесей, показали, что на оптические свойства купажируемых масляных систем влияет не только природа компонентов, но и порядок смешивания. Это может говорить о структурно-химических преобразованиях индивидуальных масел в составе купажей, которые обусловлены энергетической целесообразностью формирования новых смешанных триглицеридных надмолекулярных ассоциатов. Причем структурные трансформации, очевидно, не определяются принадлежностью масел к конкретной группе, а скорее связаны с индивидуальным природным различием масел по общему спектру жирных кислот и прочности межмолекулярных связей их триглицеридов, которые проявляются в составе купажей.

Результаты исследования экстрактов травы зверобоя, чистотела и корня одуванчика, полученных при стандартных условиях с использованием в качестве экстрагентов пяти индивидуальных масел из I–III групп, представлены на рисунке 3. Их анализ показал не только индивидуально-избирательные экстрактивные свойства, но и позволил отметить наличие в исследуемых гетерофазных системах масло-растительное сырье второго, противоположно направленного процессов – адсорбции растительным сырьем липофильных компонентов из масел-экстрагентов. Причем процессы адсорбции разным сырьевым материалом по отношению к маслам разной природы также носили избирательный характер.

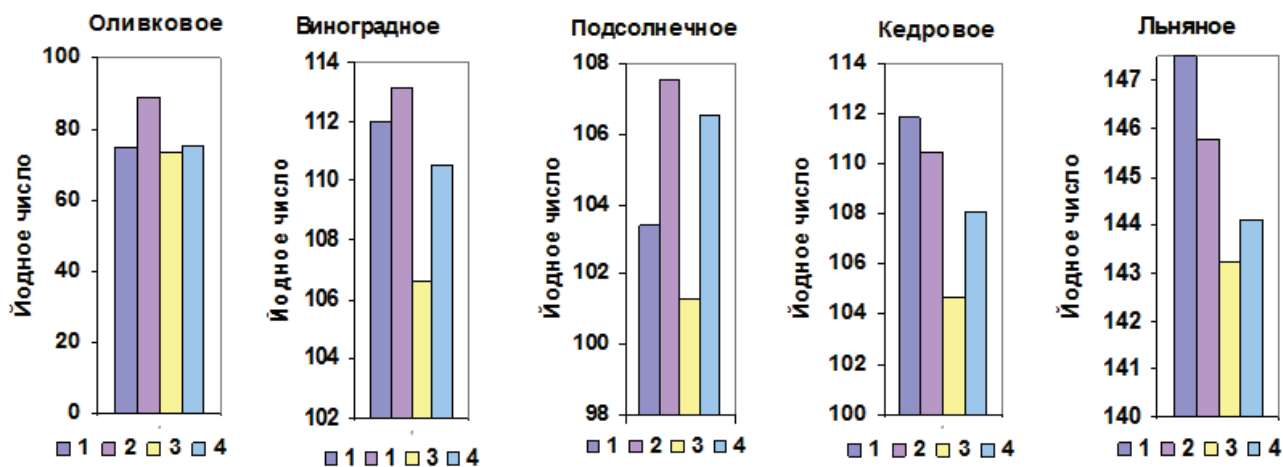


Рисунок 3. Результаты рефрактометрического анализа масляных экстрактов растительного сырья: 1 – масло, 2 – трава зверобоя, 3 – трава чистотела, 4 – корень одуванчика

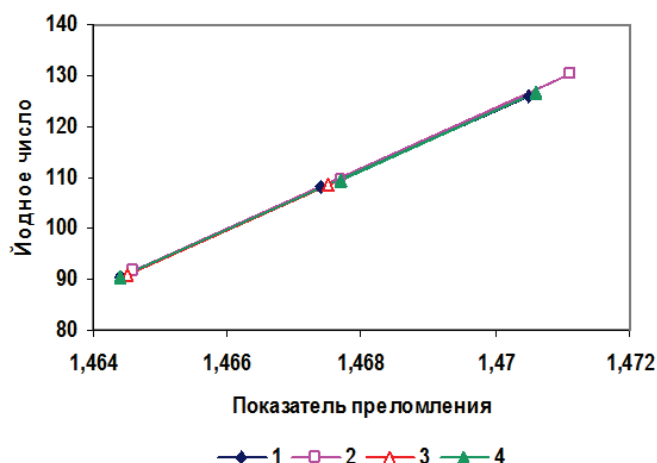


Рисунок 4. Результаты рефрактометрического анализа экстрактов растительного сырья двухкомпонентными масляными купажами: 1 – купажи; экстракты: 2 – травы зверобоя, 3 – травы чистотела, 4 – корня одуванчика

Так в оливковое масло (гр. I) заметно экстрагируются практически только вещества из зверобоя. Интересно сопоставление экстрактов сырья для трех масел, относящихся к группе II – виноградного, подсолнечного и кедрового. Экстрактивный процесс наблюдается для зверобоя в виноградном и подсолнечном маслах, для одуванчика – только в подсолнечном. Для травы чистотела в обоих случаях доминирует процесс адсорбции, что проявляется в снижении йодного числа его экстракта по сравнению с маслом-экстрагентом. Примечательно, однако, что в случае кедрового масла, с оптическими показателями достаточно близкими к виноградному, экстракция не наблюдалась ни из одного сырьевого образца. Аналогичная ситуация имела место и для льняного масла (гр. III).

Результаты исследования экстрактивных свойств двухкомпонентных масляных купажей № 1-3 представлены на рисунках 4 и 5. Линейная зависимость на рисунке 4, показывает, что экстракты по показателям йодного числа, как и в случае индивидуальных масел, группируются вблизи купажа-экстрагента, но располагаются несколько выше.

Гистограммы на рисунке 5, иллюстрирующие данный эксперимент, наглядно показывают более высокую, но разную эффективность купажей-экстрагентов по сравнению с индивидуальными маслами. Во все рассматриваемые купажируемые системы опять же лучше всего извлекаются липофильные компоненты из травы зверобоя. В отношении травы чистотела и корня одуванчика масляные композиции более избирательны. Если в рассматриваемом ряду купажей относительная экстракция из корня одуванчика заметно падает, то для травы чистотела несколько возрастает. Следует отметить, что все масляные экстракты травы зверобоя и чистотела, в том числе и те, для которых наблюдался процесс адсорбции компонентов экстрагента, были интенсивно окрашены в зеленый цвет – цвет извлекаемого хлорофилла.

Экспериментальные факты, полученные в данной работе, свидетельствуют о протекании двух параллельных противоположно направленных селективных процессах – экстракции маслами липофильных компонентов из растительного сырья и адсорбции растительным сырьем компонентов масляных экстрагентов. Это означает, что не только масляному экстракту, но и шроту (продукту растительного сырья после экстрактивного процесса) могут быть целенаправленно приданы нужные свойства.

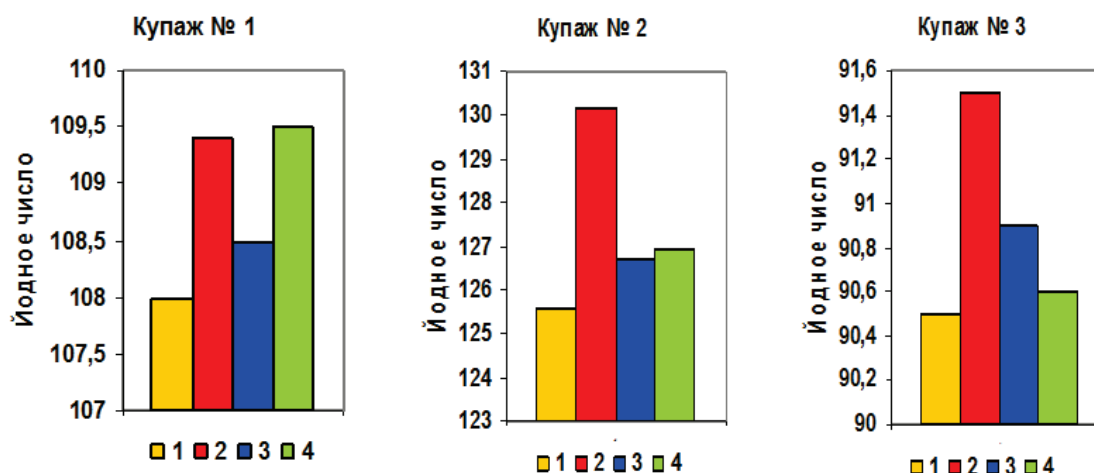


Рисунок 5. Результаты рефрактометрического анализа экстрактов растительного сырья двухкомпонентными масляными купажами (1). Экстракты: 2 – травы зверобоя, 3 – травы чистотела, 4 – корня одуванчика

Полученные данные могут быть полезны не только для пищевых производств, но еще и в большей степени для медицины, косметологии, фармакопеи. Поскольку оптические, а значит реакционные и биохимические свойства масляных купажей и экстрактов, будут различаться так же, как и сами исходные масла, очевидно, следует учитывать природные особенности индивидуальных масел при получении композиций целевого назначения. Актуальность изучаемого вопроса обусловлена недостатком информации в литературе не только о характере «ассоциативных взаимодействий» между купажируемыми маслами, но и между компонентами в составе индивидуальных растительных масел.

Список литературы / References:

1. Шиков А.Н., Макаров В.Г., Рыженков В.Е. Растительные масла и масляные экстракты. *Технология, стандартизация, свойства*, М.: Русский врач, 2004, 264 с. [Shikov A.N., Makarov V.G., Ryjenkova V.E. Vegetable oils and oils extracts. *Technology, standardization, properties*, Moscow: Russian doctor, 2004, p. 264. (In Russ.)]
2. Прокопенко Л.Г., Бойняжева Л.И., Павлова Е.В. Полиненасыщенные жирные кислоты в растительных маслах. *Масложировая промышленность*, 2009, № 2, с. 11-12. [Prokopenko L.G., Boynayeva L.I., Pavlova E.V. Polyunsaturated fatty acids in vegetable oils. *Fat and oil industry*, 2009, no. 2, pp. 11-12. (In Russ.)]
3. Леонова М.В., Климошкин Ю.Н. *Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие*. Самара, Самар. гос. техн. ун-т, 2012, 118 с. [Leonova M.V., Klimochkin Yu.N. *Extraction methods for manufacturing medicines of plant raw materials: a teaching aid*. Samara, Samara state technical university, 2012, p. 118. (In Russ.)]
4. Паромчик И.И. Пряно-ароматические и лекарственные растения в технологиях получения биологически активных добавок и CO₂-экстрактов. *Мясная индустрия*, 2009, № 3, с. 45-49. (Paromchik I.I. Spicy-aromatic and medical plants in the technologies of obtaining biologically active additives and CO₂-extracts. *Meat industry*, 2009, no. 3, pp. 45-49. (In Russ.)]
5. Мизина П.Г. Фитопленки в фармации и медицине. *Фармация*, 2000, № 5, с. 38-40. [Mizina P.G. Phytofilms in pharmacy and medicine. *Pharmacy*, 2000, no. 5, pp. 38-40. (In Russ.)]
6. Степычева Н.В., Фудько А.А. Купажированные растительные масла с оптимизированным жирно-кислотным составом. *Химия растительного сырья*, 2011, № 2, с. 27-33. (Stepycheva N.V., Fudko A.A. Blended vegetable oils with optimized fatty oils composition. *Chemistry of plant raw materials*, 2011, no. 2, pp. 27-33. (In Russ.)]
7. Никонович С.Н., Тимофеев Т.И., Спильник И.В., Скакалин Е.В. Новые типы растительных масел «идеального» состава. *Известия вузов. Пищевая технология*, 2005, № 2-3, с. 108-109. (Nikonovich S.N., Timofejenko T.I., Spilnik I.V., Skakalin Ye.V. New types of vegetable oils with «perfect» composition. *High school proceedings. Food technology*, 2005, no. 2-3, pp. 108-109. (In Russ.)]
8. Табакаева О.В., Каленик Т.К. Обогащенные растительные масла с оптимизированным жирно-кислотным составом. *Масложировая промышленность*, 2007, № 2, с. 34-35. (Tabakayeva O.V., Kalenik T.K. Enriched vegetable oils with optimized fatty acids composition. *Fat and oil industry*, 2007, no. 2-3, pp. 108-109. (In Russ.)]
9. Глазырина Ю.А., Сараева С.Ю., Козицина А.Н., Герасимова Е.Л., Матерн А.И. *Оптические методы в фармацевтическом анализе: лабораторный практикум*. Екатеринбург: Изд-во Урал. ГУ, 2015, 96 с. (Glazyrina Yu.A., Sarayeva S.Yu., Kozicyn A.N., Gerasimova Ye.L., Matern A.I. *Optical methods in pharmacological analysis: laboratory practice*. Ekaterinburg: Ural State university publishing house, 2015, p. 96. (In Russ.)]

REFRACTOMETRY IN THE STUDY OF SELECRIVITY OF VEGETABLE EXTRACTANTS

Nechiporenko A.P., Nechiporenko U.Yu., Melnikova M.I., Plotnikova L.V., Uspenskaya M.V.

Research University of information technologies, mechanics and optics

Kronverskiy Av., 49, St. Petersburg, 197101, Russia; e-mail: allanech2513@yandex.ru,

od@mail.ifmo.ru

Abstract. The refraction index, iodine number and relative percentage of fat content of a series of industrial vegetable oils, their blends and oil extracts of dry crushed medicinal plant raw materials (St. John's wort, celandine and dandelion root) were studied by the method of refractometry. The influence of the nature, ratio and mixing order of components on the optical properties of the simulated oil compositions is shown. The selectivity of both individual extractant oils and their blends with respect to vegetable raw materials of different nature and its anatomical parts was noted.

Key words: vegetable oils, oil blends, oil extracts, vegetable raw materials, refractometry method.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Плотникова Л.В., Нечипоренко А.П., Нечипоренко У.Ю., Мельникова М.И.

Научно-исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики
пр. Кронверкский, 49, Санкт-Петербург. 197101. РФ; e-mail: od@mail.ifmo.ru, allanech2513@yandex.ru
Поступила в редакцию: 02.05.2018

Аннотация. Методами рефрактометрии и инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ИКС НПВО) проведено сравнительное исследование серия промышленных животных жиров и растительных масел разной природы. Отмечена общая линейная зависимость рефрактометрических показателей – преломления и йодного числа для всех рассматриваемых категорий липидов в диапазоне изменения йодного числа от 6,7 до 157,5 единиц. Исследование ИК-спектров растительных масел показало линейную связь между йодным числом и интенсивностью полос, ответственных за валентные колебания С=С-связей (1653 см^{-1}), СН-группировок при двойной связи ($\nu_{\text{CH}} = 3008\text{ см}^{-1}$), ассиметричных (2923 см^{-1}) и симметричных (2853 см^{-1}) колебаний метиленовых групп, убывающих по мере увеличения степени ненасыщенности жирных масел. Баттеры из этой зависимости выпадают. При анализе спектральных характеристик липидов животного происхождения такой закономерности не отмечено. Наблюдаемый экспериментальный факт объяснен агрегатным состоянием животных жиров, различием их видовой природы, предопределяющей различие в наборе карбоновых кислот, формирующих разные по составу, строению, устойчивости и физико-химическим свойствам триглицеридные ассоциаты.

Ключевые слова: животные жиры, растительные масла, рефрактометрия, инфракрасная спектроскопия.

Недостаток литературных данных по жирно-кислотному составу животных жиров, являющемуся базовым критерием оценки их пищевой и биологической ценности, и отсутствие классификации по йодному числу, характеризующему ненасыщенность карбоновых кислот в составе триглицеридов, предопределило параллельное исследование ряда образцов двух категорий липидов – животных жиров и растительных масел. Исследования проводились двумя оптическими методами – рефрактометрии и инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ИКС НПВО).

Колебательные спектры образцов получали на Фурье-спектрометре Tensor 37 фирмы Bruker (Германия), управляемым программным пакетом OPUS со стандартными градуировочными возможностями, в диапазоне частот $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$ в формате поглощения. Измерение методом рефрактометрии показателя преломления (n_D), % (относ.) жирности и йодного числа (ИЧ) для натриевой линии спектра с $\lambda = 589\text{ нм}$ проводили при 40 °C на цифровом рефрактометре АВВЕМАТ-200 фирмы Anton Paar GmbH (США) с модулем автоматического термостатирования исследуемого образца.

В таблице 1 представлены результаты исследования методом рефрактометрии оптических характеристик животных жиров разной природы и растительных масел (жирных и баттеров) из четырех групп, классифицированных по йодному числу в зависимости от доминирующей карбоновой кислоты в составе триглицеридов (I – олеиновая, II – линолевая, III – линоленовая, IV – пальмитиновая) [1-3]. Баттеры включены в состав исследуемой серии как твердые липиды растительного происхождения для сравнения с твердыми животными жирами. Все исследуемые образцы промышленного производства.

Обработка полученных данных (рисунок 1) показала, общую линейную зависимость увеличения показателя преломления и йодного числа для животных жиров и растительных масел, характеризующую увеличение степени ненасыщенности карбоновых кислот в составе их триглицеридов. Все исследуемые жиры, имея значительно меньшие значения показателя преломления и йодного числа, располагаются на зависимости $\text{ИЧ} = f(n_D)$ в достаточно узком интервале и существенно ниже наименее ненасыщенного оливкового масла (группа I), но заметно выше баттеров (группа IV). Несколько более высокие показатели имел жир норки.

Таблица 1. Результаты рефрактометрического анализа серии промышленных животных жиров и масел растительного происхождения

Животные жиры				Растительные масла				
Образец	n_D	ИЧ	%	Образец	Группа	n_D	ИЧ	%
Норковый	1,4625	78,9	54,3	Льняное	III	1,4756	157,5	74,7
Свиной	1,4595	62,2	49,8	Кедровое	II	1,4681	119,8	62,7
Бараний	1,4576	51,7	47,0	Оливковое	I	1,4617	74,5	52,9
Молочный	1,4545	35,0	42,6	Бабассу	IV	1,4508	15,3	37,5
				Кокосовое	IV	1,4402	6,7	35,2

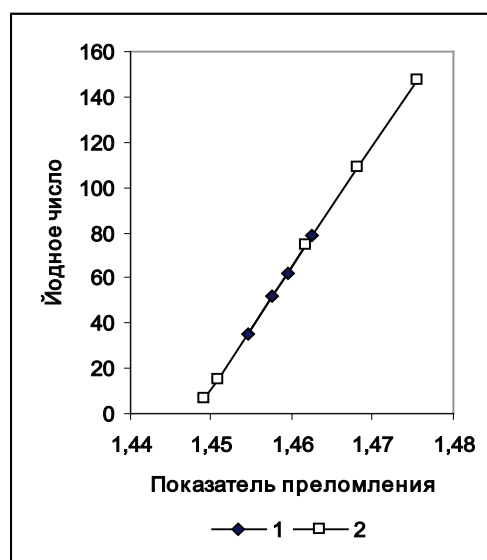


Рисунок 1. Зависимость ИЧ = $f(n_D)$ для животных жиров (1) и растительных масел (2)

На рисунке 2 приведен общий вид ИК-спектров исследуемых растительных масел из четырех групп: оливкового, кедрового, льняного и бабассу. Их спектры по положению максимумов практически накладываются друг на друга, снижая информативность.

Однако, наблюдаемые различия в интенсивности большинства полос, особенно слабых, и уширение полосы 722 см^{-1} , дают основания для более четкого их проявления в рассматриваемом ряду образцов при увеличении наиболее важных по информативности фрагментов электромагнитного спектра (рис. 3). Первое, на что следует обратить внимание, это логически ожидаемое увеличение интенсивности наиболее слабой полосы, ответственной за проявление колебаний связи $\text{C}=\text{C}$ (1653 см^{-1}) с увеличением в масле содержания ненасыщенных жирных кислот, а также полос валентных и деформационных колебаний CH группировок при двойной связи: $\nu_{=\text{CH}}$ (3008 см^{-1}) и $\sigma_{=\text{CH}}$ (722 см^{-1}), соответственно. Напротив, увеличение количества кратных $\text{C}=\text{C}$ -связей с ростом ненасыщенности жирно-кислотных остатков в составе триглицеридов, приводящее к уменьшению количества метиленовых CH_2 -групп, выражается в снижении интенсивности достаточно сильных полос их валентных асимметричных (2923 см^{-1}) и симметричных (2853 см^{-1}) колебаний [4,5]. Следует отметить, что наряду с увеличением интенсивности полосы 722 см^{-1} (рис. 3б) имеет место ее уширение со сдвигом правой ветви в область более низких частот, и небольшим смещением максимума в высокочастотную область в ряду рассматриваемых масел. Более заметны высокочастотные сдвиги максимума 3008 см^{-1} (рис. 3а). Это, наряду с увеличением числа $=\text{CH}$ -группировок, может указывать на формирование более объемных структур ассоциатов триглицеридов при переходе от твердого масла бабассу, относящегося к пальмитиновой группе, к наиболее ненасыщенному льняному.

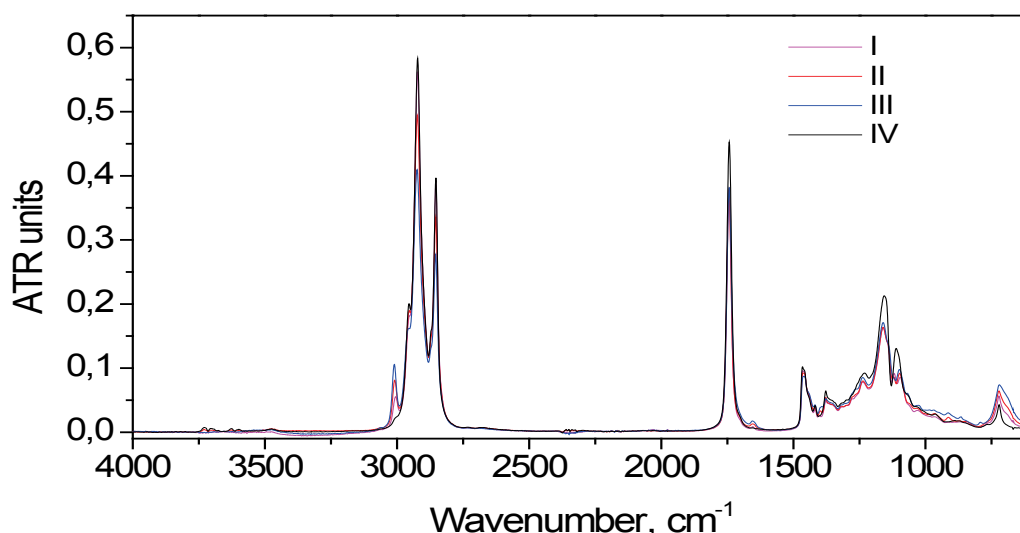


Рисунок 2. ИК-спектры промышленных масел из четырех групп: I - оливковое, II - кедровое, III - льняное, IV - бабассу

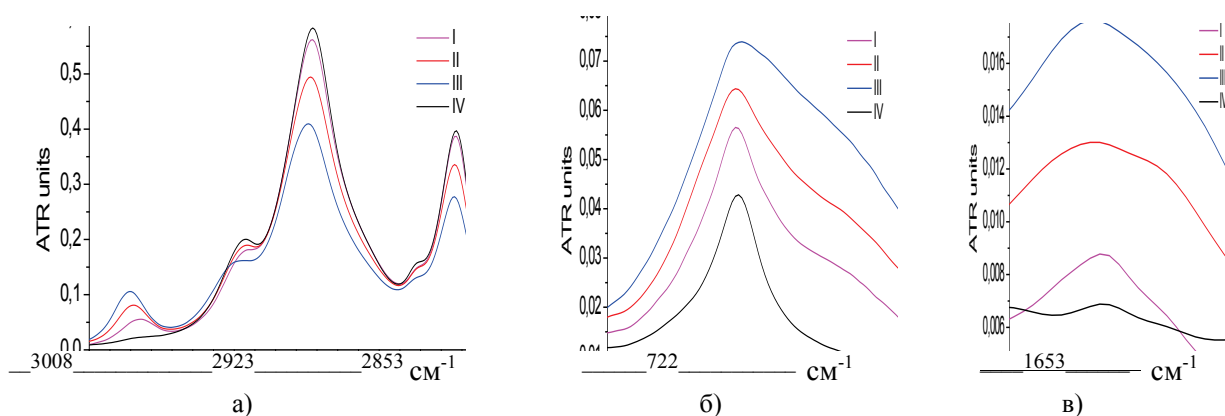


Рисунок 3. Фрагменты ИК-спектров растительных масел: I – оливковое; II – кедровое; III – льняное; IV – бабассу; а) CH_2 -группировки (2923 и 2853 см^{-1}), $=\text{CH}$ при двойной связи (3008 см^{-1}); б) $=\text{CH}$ -группы при двойной связи ($\sigma_{(\text{CH})} = 722 \text{ см}^{-1}$); в) $\text{C}=\text{C}$ -связь (1653 см^{-1})

Сопоставление данных, полученных двумя оптическими методами (рис.4), показало, что для жидких масел при переходе от оливкового к льняному наблюдается линейный рост полос, обусловленных увеличением числа кратных $\text{C}=\text{C}$ связей (рис. 4а) с повышенным содержанием ПНЖК, и линейное снижение интенсивности полос, за появление которых ответственны колебания CH_2 -группировок (рис. 4б). Масло бабассу (гр. IV), относясь к другой категории растительных масел – баттеров, нарушает линейность на данных зависимостях.

Результаты исследования методом ИКС НПВО четырех животных жиров и растительного баттера – кокосового масла иллюстрирует рисунок 5. Спектры животных жиров также накладываются друг на друга и, в общем, по положению максимумов близки к растительным маслам. Анализ увеличенных фрагментов их спектров (рисунок. 6) показал отсутствие линейности между рефрактометрическим показателем преломления, йодным числом и величинами поглощения, наблюдавшейся для растительных масел. Это видно из относительного расположения спектральных кривых в составе всех анализируемых полос. Одинаковая последовательность наблюдалась только для полос валентных колебаний $\text{C}=\text{C}$ -связей (1653 см^{-1}) и $=\text{CH}$ -группировок (3008 см^{-1}), но для полосы деформационных колебаний $=\text{CH}$ -связей (722 см^{-1}) расположение кривых меняется. Совершенно иная картина наблюдается для полос, характеризующих валентные колебания $\text{C}-\text{O}$ -связей (1160 см^{-1}) и валентные колебания карбониллов (1747 см^{-1}), остатков карбоновых кислот в структуре триглицеридов. Нет связи и для полос валентных ассиметричных и симметричных колебаний CH_2 -групп.

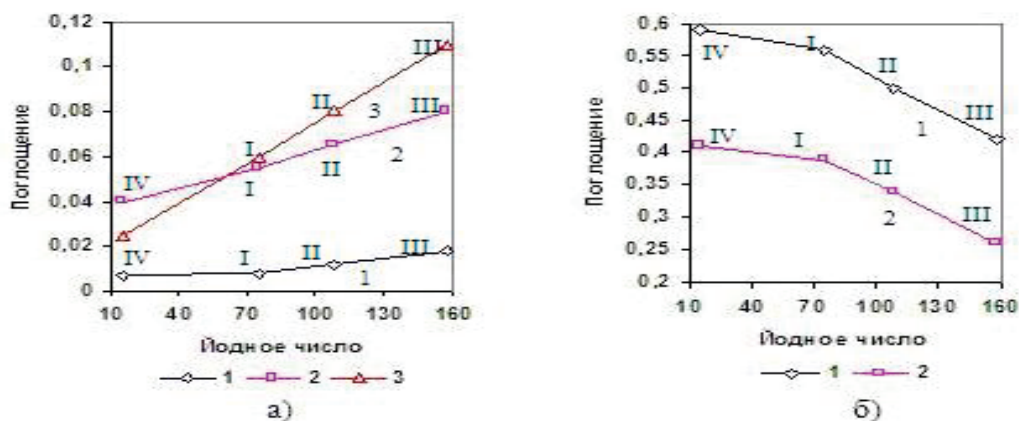


Рисунок 4. Изменение интенсивности характеристических полос в ИК-спектрах растительных масел: I – оливковое; II – кедровое; III – льняное; IV – бабассу; а) 1 – 1653 ; 2 – 722 ; 3 – 3008 см^{-1} ; б) 1 – 2923 ; 2 – 2853 см^{-1}

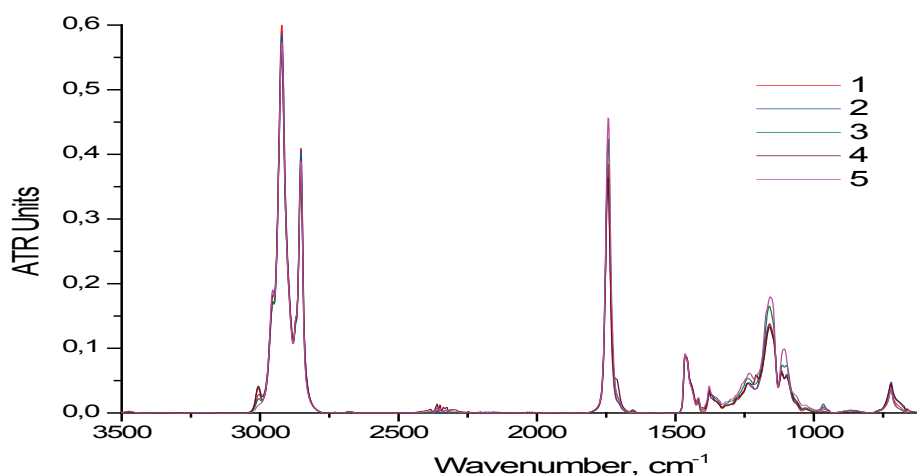


Рисунок 5. ИК-спектры животных жиров: 1 – молочный, 2 –бараний, 3 –свиной, 4 – норковый; 5 – кокосовое масло

Отмеченные экспериментальные факты, а также разнонаправленный сдвиг полос и их уширение, могут говорить о различной структуре, конформации и прочности межмолекулярных связей в ассоциатах триглицеридов исследуемых жиров. На физико-химические свойства триглицеридных ассоциатов влияют качественные и количественные различия в общем спектре карбоновых кислот, не только доминирующих, которые, в свою очередь, предопределяются видовой природой жира и историей его термической обработки. Однако данные по индивидуальным ассоциативным взаимодействиям, как для жиров, так и для масел отсутствуют.

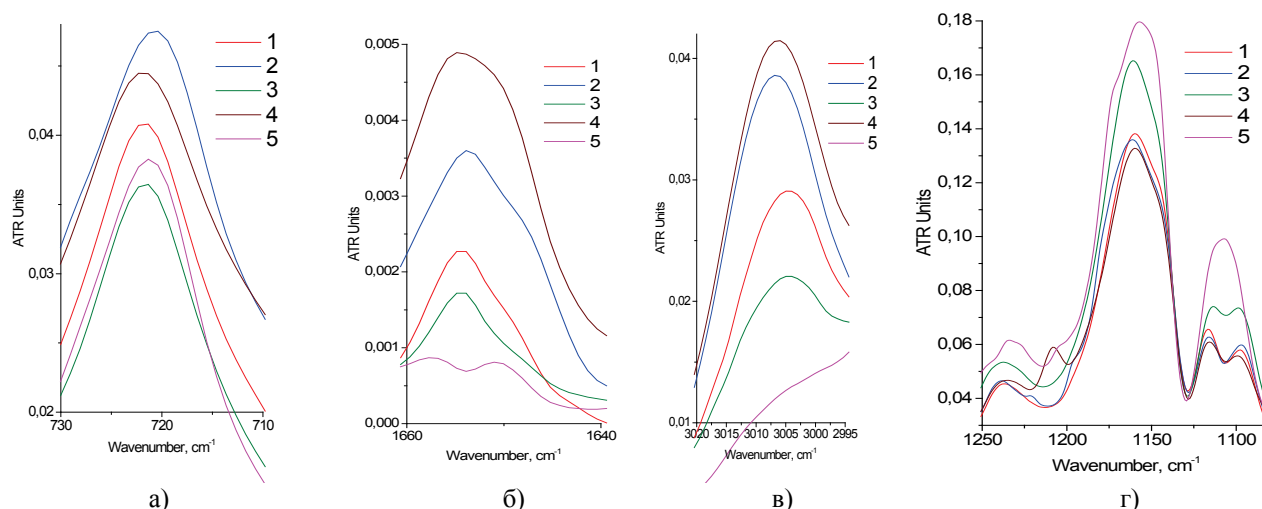


Рисунок 6. Фрагменты ИК-спектров животных жиров: 1 – молочный, 2 –бараний, 3 –свиной, 4 – норковый; 5 – кокосовое масло. а) 722 cm^{-1} ($\sigma(\text{C-H})$); б) 1653 cm^{-1} ($\nu\text{C=C}$); в) 3008 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$); г) 1160 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$)

Список литературы / References:

1. Тютюнников Б.Н. *Химия жиров*. М.: Пищевая промышленность, 1974, 448 с. [Tyutyunnikov B.N. *Lipid chemistry*. Moscow: Food industry, 1974, 448 p. (In Russ.)]
2. Прокопенко Л.Г., Бойняжева Л.И., Павлова Е.В. Полиненасыщенные жирные кислоты в растительных маслах. *Масложировая промышленность*, 2009, № 2, с. 11-12. [Prokopenko L.G., Boynayeva L.I., Pavlova E.V. Polyunsaturated fatty acids in vegetable oils. *Fat and oil industry*, 2009, no. 2, pp. 11-12 (In Russ.)]
3. Верещагин А.Г. Биохимия триглицеридов. М.: Наука, 1972, 308 с. [Vereshchagin A.G. Biochemistry of triglycerides. Moscow: Science, 1972, 308 p. (In Russ.)]
4. Тарасевич Б.Н. *ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы*. М.: МГУ, 2012, 55 с. [Tarasevich B.N. *IR spectra of base organic substances classes. Reference material*. Moscow: MSU, 2012, 55 p. (In Russ.)]
5. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффолтер К. *Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных*. Пер. с англ. Б.Н. Тарасевича, Бинум. Лаборатория знаний, 2006, с. 251-318. [Prech E., Bulmann F., Affolter K. *Determination of organic chemicals structure. Tables of spectral data*. Trans. from eng. of B.N. Tarasevich, Binom. Laboratory of knowledge, 2006, pp. 251-318. (In Russ.)]

THE OPTICAL PROPERTIES OF THE LIPIDS OF ANIMAL AND VEGETABLE ORIGIN

Plotnikova L.V., Nechiporenko A.P., Nechiporenko U.Yu., Melnikova M.I.

Research University of information technologies, mechanics and optics

Kronverskiy Ave., 49, St. Petersburg, 197101, Russia; e-mail: od@mail.ifmo.ru, allanech2513@yandex.ru

Abstract. A comparative study of a series of industrial animal fats and vegetable oils of different nature was carried out using refractometry and infrared spectroscopy of disturbed total internal reflection (FTIR). The General linear dependence of refractometric indicators – refractive index and iodine number for all considered categories of lipids in the range of iodine number from 6,7 to 157,5 units-is noted. The study of IR spectra of vegetable oils showed a linear relationship between the iodine number and intensity of bands responsible for valence vibrations of C=C-bonds (1653 cm^{-1}), CH-groups with double bonds ($\nu_{\text{CH}} = 3008\text{ cm}^{-1}$), asymmetric (2923 cm^{-1}) and symmetric (2853 cm^{-1}) oscillations of methylene groups, decreasing as the degree of unsaturation of fatty oils increases. Butters fall out of this dependence. No such regularity was observed in the analysis of the spectral characteristics of animal lipids. The observed experimental fact is explained by the aggregate state of animal fats, by the difference of their species nature, which determines the difference in the set of carboxylic acids forming triglyceride associates different in composition, structure, stability and physico-chemical properties.

Key words: animal fats, vegetable oils, refractometry, infrared spectroscopy.

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СОСТОЯНИЯ ДЕФИЦИТА ИОНОВ ЦИНКА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В.

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”
ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Беларусь; e-mail: garmaza@yandex.ru
Поступила в редакцию: 25.05.2018

Аннотация. Установлено, что инкубация эритроцитов человека с внутриклеточным хелатором – N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамин (TPEN), в субгемолитических концентрациях приводит к достоверному снижению внутриклеточного пула Zn^{2+} и увеличению эстеразной активности клеток. Продemonстрировано, что одним из возможных механизмов развития окислительного стресса в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка является ингибирование активности основных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы и изменение концентрации восстановленного глутатиона. Выявлено, что именно ингибирование фермента глутатионпероксидазы вносит вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка. Более того, обнаруженное усиление экспрессии цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro* подтверждает предположение о функционировании данных белков в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клеток.

Ключевые слова: эритроциты человека, дефицит цинка, редокс-статус, лабильный пул цинка, эстеразная активность, антиоксидантная система, металлотионеины

Известно, что цинк является единственным ионом среди переходных металлов, который не имеет биологической окислительно-восстановительной активности. Именно отсутствие редокс-активности наряду с его относительно сильным сродством к белкам позволили цинку стать подходящим ионом в качестве структурного кофактора [1]. Из 2800 белков, содержащих Zn-связывающие участки, более 800 являются ферментами, которые принадлежат ко всем классам – гидролазы, лигазы, трансферазы, оксидоредуктазы и лиазы/изомеразы (алкогольдегидрогеназа, Cu/Zn-СОД, карбоксипептидаза и др.) [2]. Также цинк является компонентом многих транскрипционных факторов, сигнальных белков, “цинковых пальцев” неизвестной функции [2]. Во всех металлоферментах цинк выполняет три основные функции: участие в каталитических процессах, поддержание структурной стабильности и регуляцию [3].

Распространенность цинка во внутриклеточном метаболизме указывает на то, что он принимает участие во многих жизненно важных процессах, а негативные последствия нарушения цинкового гомеостаза свидетельствуют о важности этого микроэлемента для организма. Первое концептуальное подтверждение появилось в 1961 году вместе с гипотезой, что дефицит цинка был главным фактором в пищевом синдроме, описанном в странах Среднего Востока [4]. В 1974 году в ходе фенотипической экспрессии редкого аутосомно-рецессивного наследственного заболевания – энтеропатического акродерматита, был обнаружен дефект в метаболизме цинка [5]. *ZIP4*, который кодирует белки-транспортёры ионов цинка ZIP/SLC39 и экспрессируется в кишечнике, был в дальнейшем идентифицирован как ген, ответственный за развитие этого заболевания. Этот факт явился генетическим доказательством того, что цинк, абсорбированный в кишечнике, имеет огромное физиологическое значение [6].

Так как дефицит цинка в организме человека чаще всего является проблемой питания и сопровождается многими хроническими заболеваниями, было проведено большое количество исследований, в которых оценили влияние недостаточности цинка на функционирование иммунной системы, как на клеточном, так и на молекулярном уровнях [7]. Наиболее очевидной взаимосвязью между дефицитом ионов цинка и развитием заболеваний считается функция Zn^{2+} как антиоксиданта [8].

Проведенные исследования продемонстрировали, что дефицит цинка сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), но большинство из них были сфокусированы на недостатке этих ионов в клеточных культурах. Так, *Oteiza et al.* [9] показали, что рост клеточной линии мышей 3T3 в условиях низкого содержания Zn^{2+} сопровождается усиленной продукцией АФК. Схожие результаты представлены в работе [10] – содержание АФК оказалось повышенным в Zn-дефицитных клетках глиомы крыс С6, что сопровождалось усиленным повреждением ДНК. Авторы заключили, что эффекты такого повреждения, вероятнее всего, являлись последствием потери ключевых ДНК-репарирующих механизмов. Гиперпродукция АФК и сопутствующие последствия (повреждение ДНК) были обнаружены и у экспериментальных животных в условиях Zn-дефицитной диеты [11]. При субоптимальной цинковой диете добровольцев также выявили схожие изменения [11]. Все Результаты исследований доказывают, что снижение концентрации ионов цинка в организме человека приводит к развитию окислительного стресса. Однако до сих пор первоначальный источник окислительного стресса при дефиците цинка остается неизвестным. Лишь в 2009 г. появились первые работы, выполненные на нейрональных клетках, в которых выдвинуто предположение, что одним из

возможных механизмов продукции АФК при Zn-дефицитном состоянии является повышение активности мембраносвязанного фермента NADPH-оксидазы [12, 13].

Цель работы – оценить редокс-статус эритроцитов человека (активность ключевых антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы и каталазы, содержание низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона и низкомолекулярных цистеин-содержащих белков металлотионеинов) при моделировании состояния дефицита ионов цинка в клетках *in vitro* и выяснить возможные пути развития окислительного стресса при этих условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров, полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" МЗ РБ. В качестве консерванта был использован гепарин.

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500g в течение 15 мин и трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl (155 mM). Инкубацию эритроцитов (0,1 %-ый гематокрит) с внутриклеточным хелатором цинка – N',N'-тетракис-(2-пиридил-метил)-этилендиамин (TPEN) и внеклеточным хелатором – диэтилен тридиаминпентауксусная кислота (DTPA) в концентрациях 10–100 мкМ проводили при 37°C в течение 30 или 60 мин в 10 mM трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 0,155 mM NaCl.

Оценку внутриклеточной концентрации лабильного пула ионов цинка проводили с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM [14]. За 100 % принимали значения интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в интактных эритроцитах.

Внутриклеточную эстеразную активность оценивали с использованием флуоресцирующего красителя кальцеина-AM согласно методу [15]. За 100 % принимали значения интенсивности флуоресценции кальцеина в интактных эритроцитах.

Содержание восстановленного глутатиона (GSH), активность ферментов антиоксидантной защиты: глутатионпероксидазы и каталазы определяли спектрофотометрически по методам [16-18] соответственно.

Оценку содержания металлотионеинов в эритроцитах проводили с помощью моноклональных антител UC1MT (Abcam), а в качестве изотипического контроля был использован IgG1 [19].

Флуоресцентные измерения проводились на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson), а фотометрические на спектрофотометре M40 (Specord, Германия).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Уилкоксона и Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. В работе представлены средние значения 4-6 независимых экспериментов в виде $\bar{x} \pm S_x$, где $\bar{x}$ – среднее значение, S_x – стандартное отклонение. Достоверными (*) считали различия по сравнению с интактными эритроцитами (контроль) при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для моделирования Zn-дефицитного состояния в эритроцитах человека *in vitro* были выбраны хелаторы двух типов: мембранопроницаемый (внутриклеточный) хелатор TPEN, который обладает высокой аффинностью к ионам цинка (Zn^{2+}) ($3,8 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$) и мембранонепроницаемый (внеклеточный) хелатор – DTPA. Специфичность TPEN к ионам цинка была продемонстрирована ранее на различных клетках и клеточных культурах путем изучения конкуренции с экзогенным Zn^{2+} и другими двухвалентными металлами [20].

Оценка изменения цитозольной концентрации лабильного пула цинка в эритроцитах человека после инкубации с внутриклеточным хелатором TPEN в концентрациях 10, 25, 50 и 100 мкМ выявила статистически достоверное дозозависимое его снижение (рис. 1А). Полученный эффект зависел также от времени инкубации с TPEN – если после 30-минутного выдерживания эритроцитов с хелатором внутриклеточное содержание Zn^{2+} снижалось в среднем на 10-50 %, то после 60 мин – на 15-85 %, по отношению к контрольным клеткам (клетки, нагруженные FluoZin-3-AM, но не обработанные TPEN) (рис. 1А). При проведении сравнительного анализа хелатирующего эффекта TPEN и DTPA выявлены существенные различия в степени снижения внутриклеточного пула цинка (рисунки 1Б). Если 30-минутная инкубация эритроцитов с TPEN в концентрации 10 мкМ приводила к снижению цитозольного содержания Zn^{2+} в среднем на 5-10 %, то эффект DTPA в той же концентрации составлял не более 4 %; 25 мкМ TPEN вызывало 10-14 % истощение внутриклеточного Zn^{2+} , а 25 мкМ DTPA – 5-7 %; 50 мкМ TPEN – снижало уровень Zn^{2+} на 20-27 %, а 50 мкМ DTPA – на 10-15 %; 100 мкМ TPEN – снижало уровень Zn^{2+} на 40-50 %, а 100 мкМ DTPA – на 22-30 %.

Ранее нами было показано [21], что при добавлении внеклеточного хелатора DTPA к суспензии эритроцитов, предварительно нагруженных флуоресцентным красителем FluoZin-3, происходит нарастание интенсивности его флуоресценции, что свидетельствует об увеличении цитозольной концентрации лабильных ионов цинка, т.е. при добавлении мембранонепроницаемого хелатора, который связывает эти ионы на поверхности мембраны, происходит высвобождение Zn^{2+} из клеточных депо для восполнения его недостатка на мембране и лишь на 20 мин инкубации наблюдалось плавное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3. А при добавлении внутриклеточного хелатора TPEN к суспензии эритроцитов происходило резкое скачкообразное снижение интенсивности флуоресценции FluoZin-3 до базального уровня, что свидетельствует о необратимом истощении эритроцитов по Zn^{2+} .

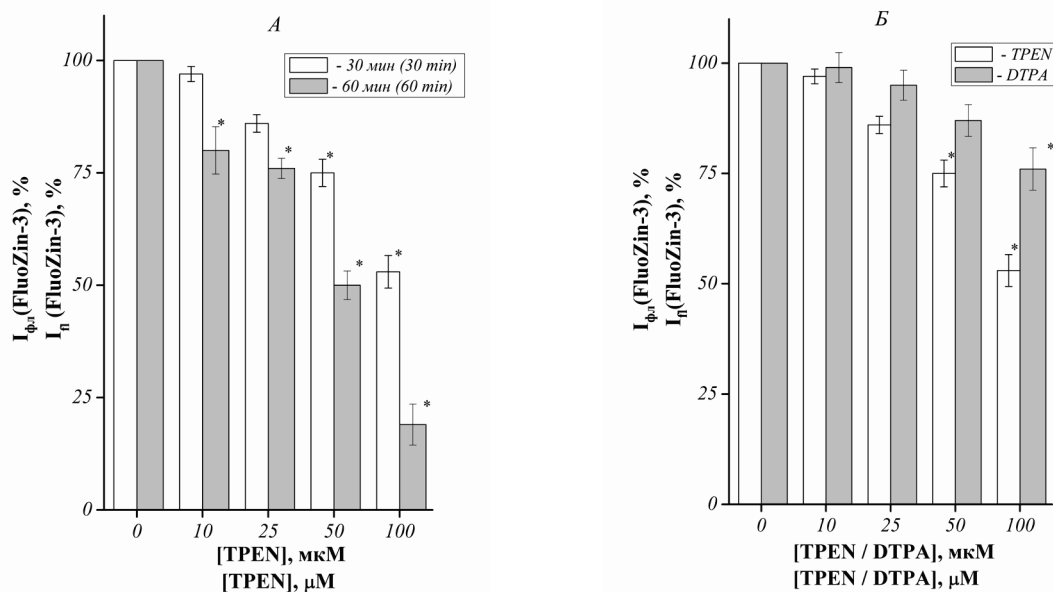


Рисунок 1. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции FluoZin-3 от типа хелатора, его концентрации и времени экспозиции с эритроцитами человека (А, Б)

Таким образом, полученные результаты подтверждают сформулированное нами ранее предположение, что на поверхности эритроцитов находятся специфические рецепторы, отвечающие за поддержание цинкового гомеостаза.

Параллельно была проведена оценка эстеразной активности эритроцитов человека (маркера их жизнеспособности) с помощью высоколипофильного красителя кальцеина АМ, который быстро проникает сквозь клеточную мембрану и подвергается деацетилированию внутриклеточными эстеразами до флуоресцирующего кальцеина [15, 22]. Инкубация клеток с внутриклеточным хелатором TPEN в концентрациях 10-100 мкМ в течение 30 минут позволила обнаружить статистически достоверное дозозависимое увеличение интенсивности флуоресценции зонда в среднем на 20-75 % (рис. 2). При этом, как было показано ранее, внутриклеточное содержание лабильного пула цинка снижалось на 10-50 % (рис. 1А, Б). Однако, при воздействии на эритроциты мембранонепроницаемого хелатора DTPA в таких же концентрациях, что приводит к снижению внутриклеточного пула лабильного цинка до 20-25 %, не обнаружено достоверного изменения активности эритроцитарных эстераз по отношению к интактным клеткам (рисунок 2). Проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную зависимость между внутриклеточным содержанием лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активностью эритроцитов, подвергшихся воздействию мембранопроницаемого хелатора TPEN (коэффициент Спирмена, $r_s = -0,866$, $p = 0,049$), а в условиях моделирования Zn-дефицитного состояния в клетках *in vitro* путем воздействия DTPA не наблюдалось достоверных зависимостей.

В работе [22] нами было продемонстрировано, что увеличение цитозольного пула лабильного Zn^{2+} свыше 100 нМ приводит к ингибированию цитозольной эстеразной активности эритроцитов, что свидетельствует о ранних стадиях процесса запрограммированной гибели (эриптоза). Более того, нами была выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и эстеразной активностью эритроцитов при моделировании окислительного стресса, используя пероксид водорода *in vitro* [23], что свидетельствует о прямом участии Zn^{2+} в запуске эриптоза и о том, что дисбаланс “прооксиданты / антиоксиданты” в пользу первых выступает в качестве триггера данного процесса. На основании вышеизложенных результатов мы сделали предположение, что статус ионов цинка в эритроцитах человека может напрямую определяться активностью ключевых ферментов системы антиоксидантной защиты клетки (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза), а также содержанием низкомолекулярного антиоксиданта – восстановленного глутатиона, и низкомолекулярных цитозольных белков – металлотионеинов.

Известно, что наиболее важным элементом системы глутатиона является фермент глутатионпероксидаза, которому принадлежит основная роль в утилизации липидных гидроперекисей и пероксида водорода. Результаты проведенных нами исследований по определению активности данного фермента в эритроцитах человека в условиях моделирования дефицита цинка выявили статистически значимое снижение его активности, как при внутриклеточном хелатировании цинка, так и при использовании мембранонепроницаемого хелатора DTPA (рис. 3А). При внутриклеточном хелатировании максимальный эффект наблюдался при действии TPEN в концентрации 25 мкМ – ингибирование фермента в среднем на 50-60 %, тогда как при действии TPEN в концентрациях 50 и 100 мкМ – 30-45 % (рис. 3А).

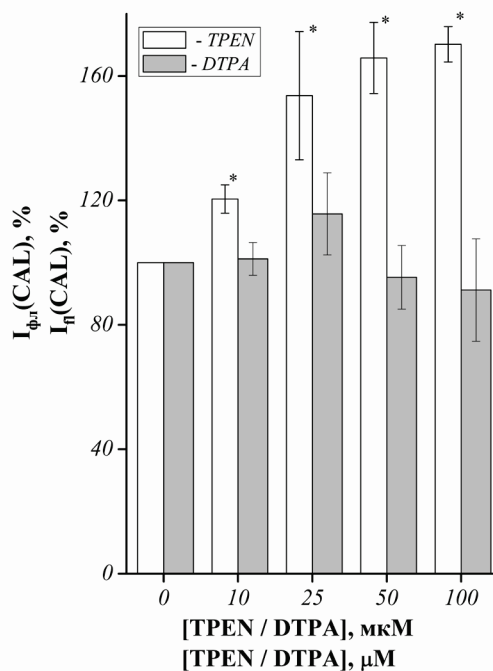


Рисунок 2. Интенсивность флуоресценции кальцеина в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию хелаторов ионов цинка: TPEN и DTPA

При внеклеточном хелатировании данного микроэлемента происходило более выраженное ингибирование активности глутатионпероксидазы – максимальный эффект наблюдался при воздействии DTPA в концентрации 100 мкМ – 60-70 %-ое снижение активности фермента, тогда как действие 10-50 мкМ DTPA снижало активность фермента в среднем на 30-50% (рис. 3А).

При этом, активность каталазы – функция, которой также заключается в утилизации пероксида водорода, была также снижена, как при действии TPEN, так и при действии DTPA, но в меньшей степени (рисунок 3Б). Инкубация эритроцитов в течение 30 мин с TPEN в концентрациях 10-100 мкМ вызывала 20-35 % ингибирование каталазы, а с DTPA в тех же концентрациях – 10-35 % снижение активности фермента (рис. 3Б). Более того, не было обнаружено концентрационной зависимости ингибирования данного фермента. Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что в эритроцитах при высокой скорости образования пероксида водорода преобладает каталазная активность, а при низкой скорости образования H_2O_2 – пероксидазная [23].

Оценка концентрации восстановленного глутатиона – главного антиоксиданта эритроцитов, выявила разнонаправленное изменение ее содержания в эритроцитах в зависимости от концентрации TPEN, находящегося в среде инкубации клеток (рис. 4А, Б). Если воздействие TPEN в концентрациях 10 и 25 мкМ приводило к незначительному снижению, то инкубация клеток с 50 мкМ – к статистически значимому увеличению содержания GSH в среднем на 10 %. В то же время 60-минутная инкубация эритроцитов с TPEN вызывала достоверное дозозависимое снижение концентрации GSH. При этом инкубация клеток с мембранонепроницаемым хелатором цинка DTPA в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ не приводила к значительному изменению концентрации исследуемого показателя, но, в то же время, воздействие DTPA в концентрации 25 мкМ сопровождалось увеличением концентрации GSH на 8-10 % при 30-минутной и на 20-25 % при 60-минутной инкубации (рис. 4Б). Объяснением этого факта может явиться продемонстрированный нами ранее механизм действия мембранонепроницаемого хелатора цинка – а именно рецепторный запуск высвобождения ионов цинка из депо клетки из-за их хелатирования на поверхности мембраны [21]. Более того, как было показано нами в работе [23], инкубация эритроцитов с хлоридом цинка в концентрации 50 мкМ в течение 30 мин приводит к увеличению уровня восстановленного глутатиона в среднем на 10 %.

Проведенный корреляционный анализ выявил обратные зависимости между уровнем внутриклеточного пула лабильного цинка и содержанием восстановленного глутатиона в эритроцитах, подвергшихся 30-минутному воздействию внутриклеточного и мембранного хелаторов Zn^{2+} (коэффициент Спирмена, $r_{s1} = -0,809$; $r_{s2} = -0,417$, соответственно после инкубации с TPEN и DTPA).

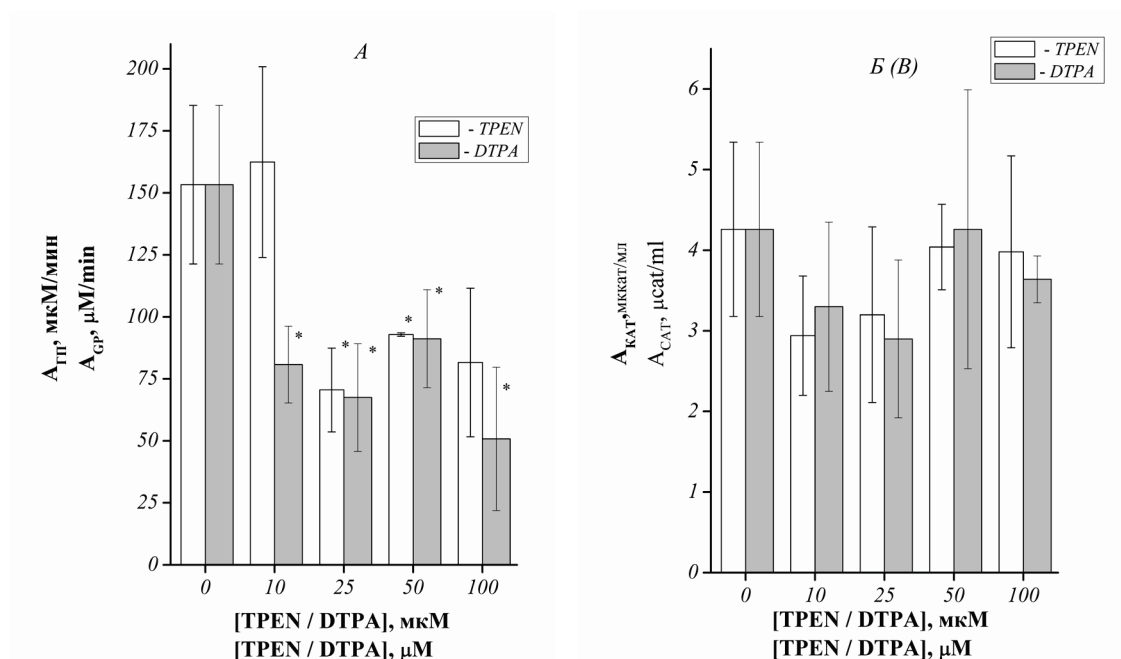


Рисунок 3. Активность глутатионпероксидазы (А) и каталазы (Б) в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию внутриклеточного хелатора TPEN и внеклеточного хелатора DTPA

Однако при увеличении времени воздействия TPEN на эритроциты до 60 мин мы наблюдали положительную статистически значимую корреляцию (коэффициент Спирмена $r_s = 0,996$, $p = 0,004$). Положительные корреляции были выявлены также между изменением внутриклеточного пула лабильного цинка и активностью глутатионпероксидазы (коэффициент Спирмена, $r_{s1} = 0,723$, $r_{s2} = 0,63$, соответственно после 30-минутной инкубации с TPEN и DTPA). В то же время между изменением внутриклеточного содержания лабильного пула цинка в эритроцитах после воздействия TPEN / DTPA и активностью каталазы зависимости выявлено не было. Однако, была установлена достоверная обратная взаимосвязь между эстеразной активностью эритроцитов и активностью глутатионпероксидазы при истощении в клетках ионов цинка, используя хелатор TPEN (коэффициент Спирмена $r_s = -0,888$, $p = 0,044$).

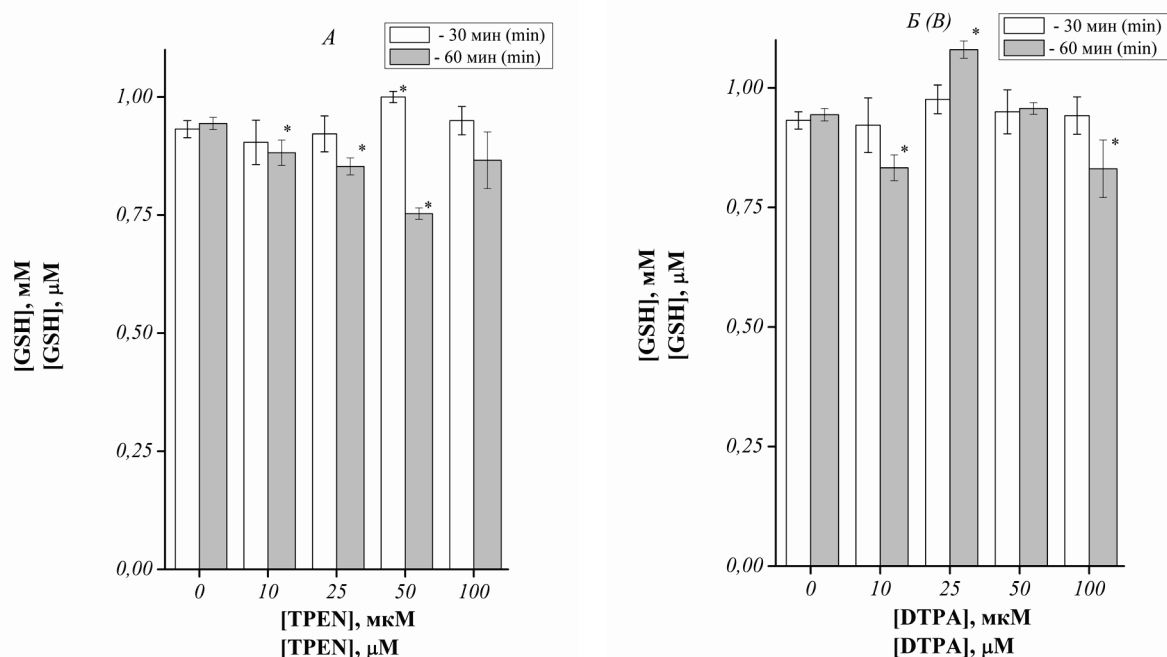


Рисунок 4. Зависимость содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах человека от концентрации и времени экспозиции с хелаторами цинка TPEN (А) и DTPA (Б)

Исходя из этих результатов, мы заключили, что критическое снижение активности именно этого фермента вносит значительный вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка, но сам механизм запуска этого процесса до сих пор не выявлен.

Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу, что одним из возможных механизмов развития окислительного стресса в клетках при Zn-дефицитном состоянии может являться ингибирование основных ферментов антиоксидантной защиты и изменение уровня восстановленного глутатиона, что свидетельствует о модификации внутриклеточных тиольных групп. Известно, что наряду с GSH в поддержании клеточного редокс-состояния принимают участие металлотионеины (MTs, суперсемейство неэнзиматических полипептидов, которые характеризуются небольшой молекулярной массой, характерным аминокислотным составом (большим содержанием цистеина) и высоким содержанием серы и металлов (тиолатные кластеры металлов) [24]), которые могут функционировать в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клетки и проявлять свои антиоксидантные свойства только в экстремальных условиях окислительного стресса [25]. В ряде статей, посвященных исследованию взаимосвязи MTs с регуляцией клеточного цикла и пролиферацией, был продемонстрирован контроль ими внутриклеточного уровня Zn^{2+} [26] и показано, что они регулируют цитозольный пул ионов цинка путем высвобождения и передачи их другим металлопротеинам и транскрипционным факторам [27]. При этом MTs являются маркерами окислительного стресса, как на уровне мРНК, так и на белковом уровне.

Исходя из вышеизложенного, мы изучили экспрессию цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка, смоделированного *in vitro* путем инкубации эритроцитов человека с хелаторами данного микроэлемента TPEN и DTPA в концентрации 50 мкМ.

Как видно из рисунка 5, после 60-минутного воздействия DTPA в концентрации 50 мкМ происходит увеличение экспрессии металлотионеинов в эритроцитах в среднем на 10-20 %, а инкубация эритроцитов с внутриклеточным хелатором TPEN при тех же условиях приводит к увеличению экспрессии данного белка на 20-30 %, по сравнению с интактными клетками. Как было показано выше, уровень GSH в данных условиях (60-минутная инкубация) при воздействии TPEN достоверно снижается с 0,95 мМ – значение, характерное для интактных эритроцитов, до 0,75 мМ (рис. 4А), но в то же время, воздействие мембранного хелатора DTPA не оказывало заметного ингибирующего действия на уровень GSH в эритроцитах (рис. 4Б).

Полученные результаты, с одной стороны, подтверждают предположение о функционировании MTs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клетки и проявлении своих антиоксидантных свойств в условиях окислительного стресса [23, 24], но, с другой стороны, не согласуются с гипотезой о снижении экспрессии MTs в условиях дефицита цинка, выдвинутой в работе [28].

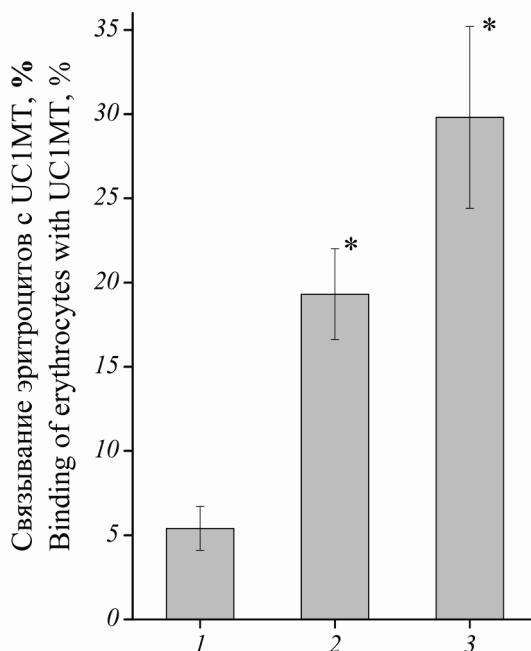


Рисунок 5. Процент связывания антител UC1MT с металлотионеинами в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro*.

1 – интактные эритроциты;

2 – эритроциты, обработанные DTPA в концентрации 50 мкМ;

3 – эритроциты, обработанные TPEN в концентрации 50 мкМ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что моделирование Zn-дефицитного состояния в эритроцитах человека с помощью внутриклеточного хелатора TPEN в субгемолитических концентрациях приводит к достоверному снижению внутриклеточного пула Zn^{2+} и увеличению эстеразной активности клеток, что не наблюдалось при истощении ионов цинка с помощью внеклеточного хелатора ДТРА.

Впервые продемонстрировано, что одним из возможных механизмов развития окислительного стресса в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка является ингибирование активности основных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы, на фоне разнонаправленного изменения уровня восстановленного глутатиона. Выявлено, что именно снижение активности глутатионпероксидазы вносит вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка.

Более того, обнаружено увеличение экспрессии цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro*, что подтверждает предположение о функционировании MTs в качестве вспомогательного антиоксиданта в защитной системе клеток.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б14М-066.

Список литературы / References:

1. Maret W., Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem. Rev.*, 2009, vol. 109, pp. 4682-4707.
2. Andreini C., Banci L., Bertini I., Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome. Res.*, 2006, vol. 5, no. 1, pp. 196-201.
3. Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты. Биофизика, 2014, т. 59, вып. 2, с. 322-337. [Garmaza Yu.M., Slobozhanina E.I. Zinc essentiality and toxicity. Biophysical aspects. *Biophysics*, vol. 59, iss. 2, pp. 322-337. (In Russ.)]
4. Prasad A.S., Halsted J.A., Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am. J. Med.*, 1961, vol. 31, pp. 532-546.
5. Moynahan E.J. Letter: Acrodermatitis enteropathica: A lethal inherited human zinc-deficiency disorder. *Lancet*, 1974, vol. 2, pp. 399-400.
6. Wang K., Zhou B., Kuo Y.M., Zemansky J., Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, vol. 71, pp. 66-73.
7. Prasad A.S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2014, vol. 28, no. 4, pp. 357-363.
8. Zago M.P., Oteiza P.I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, vol. 31, no. 2, pp. 266-274.
9. Oteiza P.I., Clegg M.S., Zago M.P., Keen C.L. Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biol. Med.*, 2000, vol. 28, pp. 1091-1099.
10. Ho E., Ames B.N. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NfκB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, vol. 99, pp. 16770-16775.
11. Song Y., Leonard S.W., Traber M.G., Ho E. Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J. Nutr.*, 2009, vol. 139, pp. 1626-1631.
12. Brennan A.M., Suh S.W., Won S.J., Narasimhan P., Kauppinen T.M., Lee H., Edling Y., Chan P.H., Swanson R.A. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.*, 2009, vol. 12, pp. 857-863.
13. Paoletti A.M., Vergnano A.M., Barbour B., Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 2009, vol. 158, pp. 126-136.
14. Gee K.R., Zhou Z.L., Ton-That D., Sensi S.L., Weiss J.H. Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*, 2002, vol. 31, no. 5, pp. 245-251.
15. Bratosin D., Mitrofan L., Palli C., Estaquier J. Novel fluorescence assay using Calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*, 2005, vol. 66A, pp. 78-84.
16. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.*, 1959, vol. 82, no. 1, pp. 70-77.
17. Мойн В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. Дело*, 1986, № 12, с. 724-727. [Moin V.M. A simple and specific method for determining of the glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Laboratory diagnostics*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
18. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е. Метод определения каталазной активности. *Лаб. дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Koroluk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokareva V.E. Method for the determination of catalase activity [Metod opredeleniya katalaznoy aktivnosti]. *Laboratory diagnostics*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (in Russ.)]
19. Anti-Metallothionein antibody [UC1MT]. 04.10.2015, URL: abcam.com/metallothionein-antibody-uc1mt-ab12228.html.
20. McCabe M.J., Jiang S.A., Orrenius S. Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes. *Lab. Invest.*, 1993, vol. 69, pp. 101-110.

21. Harmaza Y., Slobozhanina E. Zinc homeostasis and eryptosis. *FEBS J.*, 2013, vol. 280, suppl. 1, p. 218.
22. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Гончарова Н.В., Слобожанина Е.И. Влияние внутриклеточного уровня цинка в эритроцитах человека на перераспределение фосфатидилсерина и их жизнеспособность. *Новости медико-биологических наук*, 2011, т. 3, № 1, с. 90-95. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Goncharova N.V., Slobozhanina E.I. Influence of intracellular level of zinc in human erythrocytes on the redistribution of phosphatidylserine and their viability. *News of biomedical sciences*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 90-95. (in Russ)]
23. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Канаш Ю.С., Зубрицкая Г.П., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И. Внутриклеточный цинк: роль в H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека. *Биофизика*, 2016, т. 61, вып. 6, с. 1149-1158. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Kanash J.S., Zubritskaya G.P., Kutko A.G., Slobozhanina E.I. Intracellular Zinc: a Role in H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Biophysics*, 2016, vol. 61, iss. 6, pp. 1149-1158. (in Russ)]
24. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль. Известия НАН Беларуси. *Серия биол. наук*, 2016, no. 1, с. 107-116. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Mammalian metallothioneins: structure and biological role. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus*, 2016, no. 1, pp. 107-116. (in Russ.)]
25. Min K.S., Tanaka N., Horie T., Kawano H., Tetsuchikawahara N., Onosaka S. Metallothionein-enriched hepatocytes are resistant to ferric nitriloacetate toxicity during conditions of glutathione depletion. *Toxicol. Lett.*, 2005, vol. 158, pp. 108-115.
26. Gumulec J., Masarik M., Krizkova S., Adam V., Hubalek J., Hrabeta J., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr. Med. Chem.*, 2011, vol. 18, pp. 5041-5051.
27. Formigari A., Santon A., Irato P. Efficacy of zinc treatment against iron-induced toxicity in rat hepatoma cell line H4-II-E-C3. *Liver Int.*, 2007, vol. 27, pp. 120-127.
28. Eide D.J. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics*, 2011, vol. 3, pp. 1124-1129.

MECHANISMS OF THE OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT UNDER ZINC IONS DEFICIENT STATE MODELING IN HUMAN ERYTHROCYTES *IN VITRO*

Harmaza Y.M., Tamashevski A.V.

*Institute of biophysics and cell engineering of National academy of sciences of Belarus
Akademicheskaya st., 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: garmaza@yandex.ru*

Abstract. It was established that incubation of human erythrocytes with an intracellular chelator N',N'-tetrakis(2-methyl-pyridyl)ethylenediamine (TPEN) in subhemolytic concentrations leads to a significant decrease in the Zn²⁺ intracellular pool and cells esterase activity rise. It was demonstrated that one of the possible mechanisms of an oxidative stress development in zinc deficient human erythrocytes is the inhibition of the main antioxidant enzymes activity – catalase and glutathione peroxidase as well as changes in the reduced glutathione concentration. It was found that decreased glutathione peroxidase activity exactly contributes to the erythrocyte esterases activation under zinc ions deficiency. An increased expression of the cysteine-rich proteins metallothioneins in human erythrocytes under simulation of the Zn-deficient state *in vitro* was revealed. It confirms the hypothesis about the functioning of these proteins as an auxiliary antioxidant in a protective cell system.

Key words: human erythrocytes, zinc deficiency, redox-state, zinc labile pool, esterase activity, antioxidant system, metallothioneins

ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ

Алексеева О.М.¹, Кременцова А.В.¹, Кривандин А.В.¹, Шаталова О.В.¹, Ким Ю.А.²

¹Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, РФ; e-mail: olgavek@yandex.ru

²Институт биофизики клетки РАН
ул. Институтская, 3, Пущино, Московская обл., 142290, РФ

Поступила в редакцию: 05.06.2018

Аннотация. В статье сделана попытка на основании данных, полученных при исследовании действия биологически активных веществ (БАВ) с привлечением современных экспериментальных модельных и биообъектов переосмыслить вероятностные возможности формирования пребиотических и биотических процессов, приводящих к возникновению, дальнейшему усовершенствованию и приспособлению к окружающей среде предшественников живых существ. Экспериментальные объекты использовали последовательно по мере усложнения их структурных свойств и соответственно появлению функциональных свойств. В качестве экспериментальных объектов для структурных исследований липид-липидных взаимодействий использовали липосомы, сформированные, как из искусственного индивидуального фосфолипида, так и из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина. Для выявления структурных перестроек при участии белок-липидных взаимодействий использовали тени эритроцитов и изолированные эритроциты. Влияние БАВ на функционирование клеток изучали, как на трансформированных с неконтролируемым ростом клетках асцитной карциномы Эрлиха, так и на нормальных клетках – тимocyтах и лимфоцитах. Для изучения действия БАВ в роли модификаторов структуры и функций модельных и биообъектов, применяли уже известные гидрофильные вещества – регулятор роста растений мелафен, антиоксидант феноксан и гидрофобные антиоксиданты – ИХФАНЫ. Так удалось проследить влияние БАВ, как вероятных факторов естественного отбора различной природы, на все более усложняющиеся по своей организации объекты, имитирующие этапы развития на ранних стадиях истории жизни. БАВ могут выступать, как фактор эволюции для элиминации неустойчивых структур, а также как фактор для появления новых образований или модифицирования уже существующих в результате встраивания БАВ. Полученные данные могли бы помочь также анализу функционирования предшественников современных клеточных структур.

Ключевые слова: мембраны; эритроциты; биологически активные вещества, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, гемолиз.

Рассмотрим некоторые компоненты как первичных пребиотических, так и современных организмов. Это мембраны. Они отделяют и защищают от окружающей среды, внутри формируют компартменты, способствуя созданию локальных концентраций веществ, локальных зарядов. Таким образом, возникают градиенты, во многих случаях являющиеся движущей силой биологических процессов. Мембраны также предоставляют твердую подложку для концентрирования или создания определенного порядка молекул, обеспечивают стереоспецифическое расположение молекул, необходимое для химического взаимодействия, переноса электронов. Внутри мембран возможно формирование и модификации интегральных белков, которые впоследствии осуществляют функции ионных насосов, рецепторов, ферментов.

На конференции «Проблема происхождения жизни» в докладе Четверина А.Б. [1] был отмечен пример возможной роли мембран. Обсуждались экспериментальные модели «мира РНК». По предположению автора многослойные липосомы обеспечивают концентрирование РНК, для которого необходимы, как минимум, 2 параллельные близкорасположенные мембраны [1]. Но формирование упорядоченных структур многослойных липидных мембран будет затруднено в присутствии молекул другого типа. Возникает вопрос, возможно ли молекулам РНК проникнуть в уже сформированные липосомы в поры диаметром от 1 до 3 нм. Это размер короткоживущих нанопор и дефектов в фосфолипидных мембранах, возникающие при фазовых переходах, происходящих при изменениях температуры, как показано в работах Антонова В.Ф. [2]. Прохождение молекул микроРНК (miR122a) через нанопоры в мембранах из нитрида кремния было продемонстрировано в работах Drndic M. [3]. Следовательно, многослойные липосомы могли бы служить «подложкой» для локализации РНК. В связи с этим, подчеркнем актуальность в русле первой темы конференции «Проблема происхождения жизни» наших исследований, проводимых на экспериментальных моделях - многослойных липосомах.

Липосомальные мембраны в водных средах образуются из молекул, содержащих гидрофобные и гидрофильные части. Формирование происходит в результате процесса кристаллизации путем самосборки. Кристаллизация широко распространена в «неживой - минеральной» природе. Объединение единообразных молекул в конгломерат (мембрану) из раствора или суспензии происходит в результате гидрофобных и гидрофильных взаимодействий между молекулами. Кристаллизация мембран во многих случаях происходит на

границе раздела фаз. В случае «первичных мембран» такой раздел фаз могли предоставлять - минералы с ячеистой структурой, образующиеся в результате вулканической деятельности, или пористые глины в приливно-отливной зоне первичного океана, где также могло происходить перемешивание и концентрирование веществ. В таких порах и ячейках могли накапливаться предшественники клеток - коацерваты. Возможно, молекулы, имеющие неполярные и полярные части, выстилали поверхности в ячейках минералов, которые в свою очередь могли быть нейтральными или заряженными. Заполнение же полостей химически активным содержимым, как жидким, так и газообразным могло дать начало появлению коацерватов и постепенному формированию пребиотических организмов.

Переходя к нашему времени, когда биогенные процессы преимущественно происходят в водной среде, мы можем промоделировать некоторые виды формирования мембран в присутствии границ раздела фаз: вода - воздух, вода - твердое вещество. Первой моделью, предоставляющей большие возможности для исследований, были выбраны липосомы. Липосомы являются достаточно интересным экспериментальным объектом для изучения формирования первичных био-подобных структур и влиянию на их организацию различных веществ, называемых биологически-активными веществами (БАВ). В качестве БАВ могут выступать, как ионы, так и вещества простые и комплексные - неорганические и органические.

Липосомы образуются в результате спонтанного процесса самосборки амфифильных липидных молекул. В зависимости от способа обработки липидов и степени гидратации гидрофобные и гидрофильные взаимодействия обуславливают формирование различных видов мицелл и липосом. Липиды являются структурной основой всех биологических мембран. В наших исследованиях для формирования модельных экспериментальных объектов использовались липиды одного из 8 важнейших классов липидов живых организмов - глицерофосфолипиды (фосфолипиды) [4]. Молекулы фосфолипидов состоят из гидрофильной полярной головки с заряженными фосфатными группами, и гидрофобной неполярной части. Суммарно молекула может быть нейтральной или заряженной отрицательно. Гидрофобная часть состоит из жирнокислотных остатков. Такое строение молекулы позволяет фосфолипидам в зависимости от стереоспецифических параметров - соотношения размеров полярной головки и неполярных жирнокислотных остатков, формировать в водных средах бислойные или гексагональные образования, которые и встречаются в клетках живых организмов.

Структурные особенности клеточных органелл в нашей работе промоделированы с помощью мультислойных - мультиламеллярных липосом. С применением таких липосом исследовалось влияние БАВ на липид-липидные взаимодействия в структуре мембран. Мультиламеллярные липосомы представляют собой множество вложенных друг в друга концентрических бислойных липосом, убывающих по размеру (рис. 1).

Строение таких структур было подтверждено их электронно-микроскопическое изображением, полученным методом замораживания-скалывания [5] Расстояния между полярными областями (фосфолипидными головками) двух соседних бислойных липосом в таком мультислойе, рассчитанные с помощью метода малоуглового дифракционного рассеяния составляют около 3 нм [6], что достаточно хорошо имитирует расстояния во внутренних пространствах между мембранами в клетке. Так взаимно расположены терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума и саркоlemma – внешняя плазматическая мембрана, в клетках поперечнополосатых мышц. Хорошими примерами многослойного расположения мембран в клетках могут также служить органеллы: митохондрии, аппарат Гольджи и ретикулум.

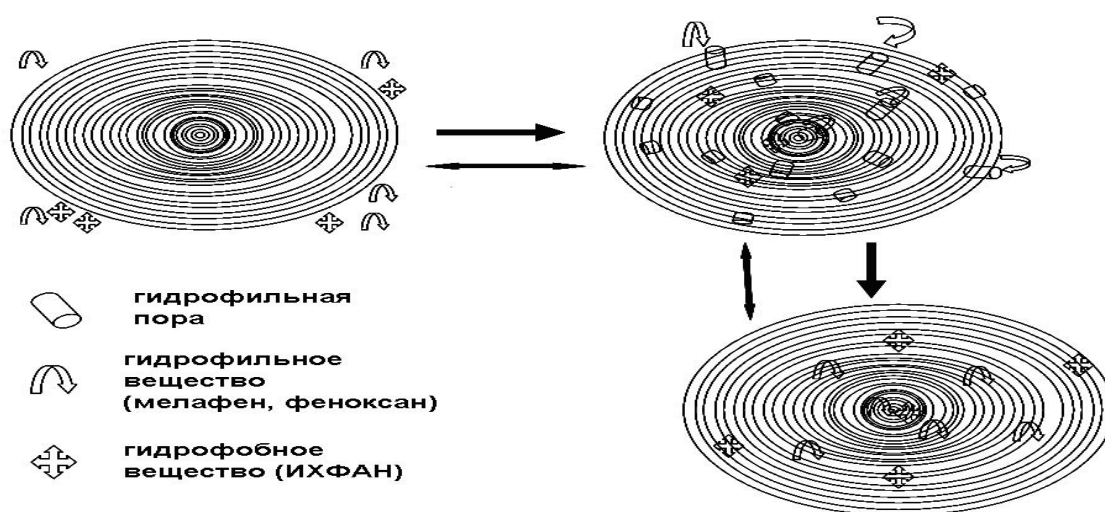


Рисунок 1. Схема мультиламеллярных липосом и проникновение БАВ

Переформирование клеточных компартментов моделируется с помощью фосфолипидных мицелл, формирующих гексагональные, а также стопкообразные структуры. Влияние БАВ на такие образования может быть предметом дальнейших исследований. Гексагональные структуры появляются в моменты слияния или образования пор и расхождения бислоев. Формирование стопкообразных структур характерно для веществ, имеющих в составе своих молекул кольца, например, широко распространенный в растительном мире метилксантин кофеин. Отметим, что для кофеина в клетках животного происхождения имеются рианодиновые рецепторы кальциевых каналов, обладающие чувствительностью к кофеину. Это яркий пример влияния растительных БАВ на активацию функций животного организма. В случае «первичных мембран» такое влияние могли осуществлять окружающие химические вещества.

Строение молекулы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), в нашей работе выбранного в качестве вещества для получения липосом, позволяет сформировать бислойные липосомы с небольшой кривизной мембраны [5]. Молекулы ДМФХ имеют форму цилиндра, с фосфатной головкой небольшого размера и двумя углеводородными цепями - остатками насыщенной миристиновой кислоты. Процесс приготовления мультиламелярных липосом представляет собой гидратирование тонких пленок фосфолипида, высушенных на твердой поверхности. Гидратирование происходит при интенсивном встряхивании в фосфатном буфере нейтрального pH при температуре выше фазового перехода фосфолипида из твердой гелевой фазы в фазу жидкого кристалла, т.е. бислой формируется в фазе жидкого кристалла. Образуются мультиламелярные липосомы диаметром около 1000 нм [5]. Подобные пребиотические кристаллические процессы могли происходить и при сольватации молекул, расположенных на твердой подложке в порах глин и минеральных отложений.

БАВ могут оказывать существенное влияние на липидный бислой, т.к. проникают ко всем бислойным липосомам, формирующим мультислойную большую липосому. Мембранотропные гидрофобные БАВ легко насытят первый бислой и через дефекты и перемычки между бислоями проникнут к следующим бислоям. Для гидрофильных БАВ возможность проникновения ко всем слоям в мультиламелярной липосоме возникает в риппл-фазе (рис. 1). При переходах твердой гелевой фазы в фазу жидкого кристалла одновременно сосуществуют микродомены гелевые и жидкие, поэтому образуются дефекты и короткоживущие гидрофильные нанопоры [2]. В случае «первичных мембран» такой путь воздействия химических факторов через дефекты и поры также мог осуществляться.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в нашей работе определялась зависимость теплоемкости микродоменов липидов в суспензии мембран от температуры при постоянном давлении в зависимости от присутствия БАВ. Изменения параметров фазовых переходов липидов дают информацию о месте локализации вещества в бислое. Сдвиг температуры фазового перехода, свидетельствует о преимущественном взаимодействии БАВ с твердым или жидким состоянием мембраны. Понижение температуры главного фазового перехода в мембранах указывает на связывание БАВ в поверхностном слое мембраны, преимущественно с жидкой фазой. БАВ, сдвигающие температуру фазового перехода, увеличивают и ширину перехода, меняя кооперативность плавления микродоменов. В жидкой фазе легко происходят все конформационные перестройки белков, формирование олигомеров, флип-флоп липидов, латеральные перемещения. В твердой фазе все эти виды биологической подвижности затруднены, соответственно, и все структурные и функциональные активности заторможены. В состоянии жидкого кристалла и структура мембраны сохранена, и торможение всех конформационных процессов отсутствует. Поэтому исследование действия БАВ на термоиндуцированные переходы липидной фазы - важнейшее звено в цепи тестирования биологических эффектов. В нашем исследовании мы применяли БАВ, как гидрофильные, так и гидрофобные: мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)фосфиновой кислоты) - гидрофильный предпосевной стимулятор роста растений [7], антиоксидант фенозан (-β-(4-гидроксис-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота) [8] и его производные: калиевая соль - гидрофильный феноксан, и гидрофобизованные - ИХФАНЫ. ИХФАНЫ - это сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил-4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов [9]. В случае «первичных мембран» присутствие заряженных и незаряженных химических веществ во внешней среде могло осуществлять разные пути воздействия на формирование или разрушение первичных структур.

Для того чтобы подробнее изучить действие растворов мелафена на структуру фосфолипидной мембраны ДМФХ методом ДСК, применили разную скорость подачи тепла (1 град. в мин.; 0,5 град. в мин.; 0,25 град. в мин.; 0,125 град. в мин.) к ячейкам с контрольным и опытным образцами. Такой подход используют для того, чтобы выявить возможные перестройки аддитивных кооперативных единиц в микродоменах мембраны. Кроме того, это способ моделирования сочетанного влияния химического вещества и температурных условий среды. По данным зарегистрированных термограмм при различных скоростях плавления мембран, были построены концентрационные зависимости максимальной температуры плавления, энтальпии и кооперативности перехода в широком диапазоне концентраций мелафена. Ярко выраженные экстремумы наблюдались в области концентраций мелафена 10^{-14} - 10^{-10} М при всех исследованных скоростях плавления. Водные растворы мелафена оказывают значительное действие на структуру липидного бислоя со сложной дозовой зависимостью. В больших концентрациях (10^{-4} - 10^{-6} М), в малых (10^{-13} - 10^{-14} М) и сверхмалых дозах (10^{-16} М) мелафен вызывает полимодальные изменения микродоменной структуры бислоев синтетического фосфолипида. Воздействия гидрофильного мелафена могут происходить только на поверхности каждого бислоя. По-видимому, мелафен

либо действует на свойства воды у поверхности бислоя, либо непосредственно оказывает влияние на фосфолипидные головки ДМФХ.

Второе гидрофильное примененное БАВ - феноксан (калиевая соль антиоксиданта фенозана). Фенозан и феноксан – адаптогены, но они не имеют определенной мишени в мембране, действуют во всей области поверхностных слоев биомембраны, как во внешнем, так и во внутреннем листке бислоя, по-видимому, проходя через дефекты биомембраны к внутренней поверхности бислойной плазматической мембраны на примере эритроцитов [10]. На рисунке 2 (слева) показаны пути распределения БАВ в клетке. Гидрофильные БАВ, примененные в нашей работе, воздействовали по механизму А (рис. 2).

Влияние гидрофобных БАВ на структуру мультислойных липосом моделировали с применением гибридных антиоксидантов ИХФАНов. Они усиливают устойчивость биомембран к различным воздействиям, структурно укрепляя их в результате антиоксидантного воздействия, а также закрепляясь в области фосфолипидных головок с помощью заряда на четвертичном азоте и встраиваясь алкильных заместителей в бислой. В зависимости от концентраций (10^{-13} - 10^{-3} М) ИХФАНы могут укреплять структуру или вносить хаотропность в бислой. Было показано, что большие концентрации полностью разрушали микродоменную организацию ДМФХ бислоев - исчезал пик основного перехода, а малые - напротив укрепляли, повышая температуру плавления. ИХФАН-С16, обладающий самым длинным жирно-кислотным остатком, встраиваясь в средних концентрациях (10^{-5} - 10^{-6} М) в бислой, формировал собственную фазу с более высокой температурой фазового перехода и снижал кооперативность собственной фазы ДМФХ (рис. 2 справа).

Роль липидных микродоменов очень важна физиологически. Их структура может влиять на окружение интегральных и ассоциированных в клеточных мембранах рецепторов и ферментов, регулируя их функции. Обнаруженное формирование собственной фазы в мембранах указывает на вероятность встраивания и модификации мембран веществами, в молекулах которых имеются гидрофобные компоненты. При применении в малых и сверхмалых концентрациях водных эмульсий гидрофобных веществ, возможно накопление их в мембранах. Таким образом, на мембрану уже оказывает влияние не сверхмалое или малое количество вещества, а гораздо большее – увеличенное на несколько порядков. При накоплении, как мы видели в случае применения ИХФАН-С-16, вполне вероятно, также и формирование собственного домена БАВ. В этом случае существенное влияние будет оказано на функционирование встроенных в мембрану белковых молекул-каналов, ферментов, ионных насосов и обменников. И соответственно будет изменяться судьба клетки по механизму Б (рис. 2 справа).

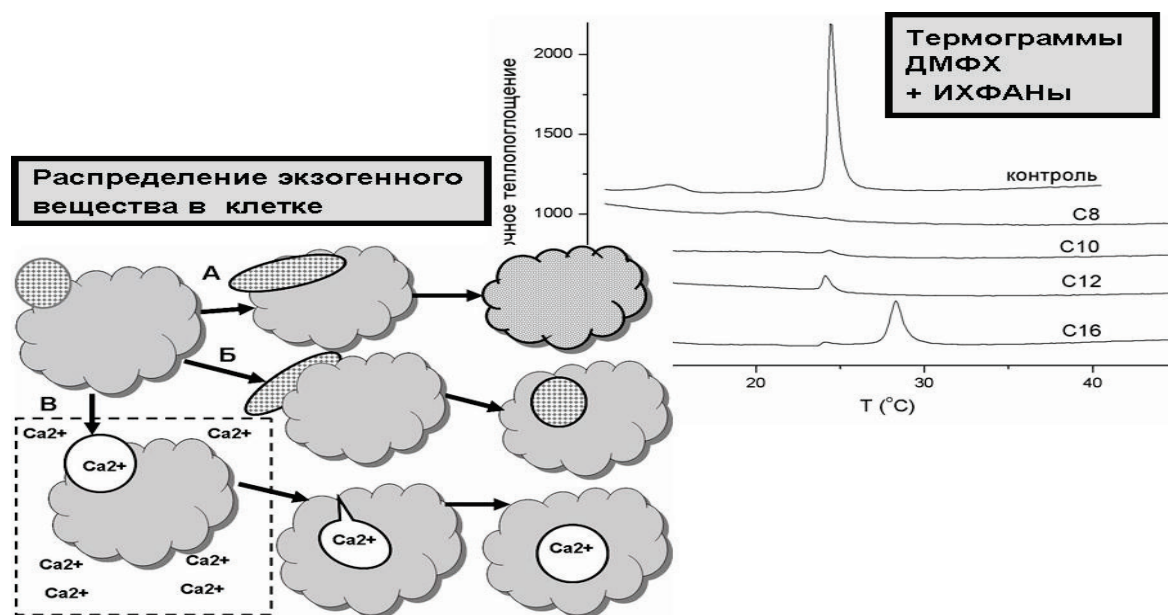


Рисунок 2. Справа: ДСК термограммы ДМФХ в присутствии ИХФАНов. Слева: три вида предполагаемых путей действия веществ из внешней среды (экзогенных веществ) на пред-биотическую «клетку». А – встраивание экзогенного вещества в клеточную оболочку и распределение во всей клеточной поверхности или внедрение во внутрь клетки и распределение во всем клеточном объеме; Б - встраивание экзогенного вещества в клеточную оболочку и локальное концентрирование в клеточной поверхности, или внедрение во внутрь клетки и локальное концентрирование в клеточном объеме; В - внедрение экзогенного вещества путем впячивания клеточной оболочки во внутрь клетки, образования вакуоли на ножке. Затем ножка прерывается и образуется отдельная вакуоль в клеточном объеме с локально сконцентрированным экзогенным веществом

В клетке в результате ее жизнедеятельности расположение мембран меняется, мембраны сближаются, удаляются, структура самой мембраны упорядочивается или становится разупорядоченной. Действие БАВ может не иметь определенной мишени и, тем не менее, значительно затрагивать все процессы, влияя на упорядоченность структуры на разных организационных уровнях от степени регулярности мембран и толщины бислоя до взаимного расположения бислоев. Как было показано методом рентгенодифракционного анализа – малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) [6] водные растворы мелафена в широком диапазоне концентраций не меняют размеры бислоевых мембран и их взаимное расположение (укладку) в мультислойных липосомах, состоящих из смеси природных липидов яичного лецитина. Однако фенотан и ИХФАН-10 значительно меняли значения среднего периода укладки мембран и толщины бислоев [11,12].

Итак, водные растворы мелафена доза-зависимо изменяют организацию микродоменов в единообразном бислое, не разрушая его. Фенотан и ИХФАНЫ перестраивают микродомены, а при больших концентрациях разрушают микродоменную организацию и даже могут сформировать собственную фазу. На следующем уровне организации структуры – порядке мультислоев в мультислойных природных липосомах, гидрофильный мелафен не действовал. Фенотан и ИХФАН-10 разрыхлили структуру и увеличили расстояние между отдельными липосомами в мультислое. Следующим шагом в усложнении био-структур могло бы быть встраивание гидрофобных пептидных молекул в мембраны липосом, или же захватывание гидрофильных молекул во внутреннее пространство (рис. 2А, Б, В). Могут встраиваться и целые липосомы. При слиянии разных объектов модифицируется структура или формируется новая. Также могло происходить локальное искривление внешней мембраны с образованием впячивания во внутреннее пространство в виде капли на ножке. В результате прерывания ножки такие части внешней мембраны могли отсоединиться и образовать малые внутренние липосомы. Так внутри большой оболочки могли возникать и малые мембранные пузырьки, и вакуоли смешанного состава, как предшественники клеточных компартментов и органелл (рис. 2В). Изменения толщины бислоев и порядка их укладки может способствовать образованию впячивания клеточной оболочки во внутрь клетки и образованию вакуоли. В результате с помощью ДСК и МУРР рассмотрены все указанные пути судьбы клетки при воздействии экзогенных веществ. Отдельные вакуоли или сеть вакуолей в клеточном объеме с локально сконцентрированным экзогенным веществом могли быть предшественниками клеточных органелл и компартментов. Образование клеточных компартментов приводило к формированию ионных и электростатических градиентов, что могло уже способствовать появлению некоторых функций. В качестве примера можно привести вероятное образование саркоплазматического ретикулума. В составе мембран ретикулума есть компоненты, подобные таковым в плазматической мембране. Внутри, в люменальном пространстве, ретикулума содержится основной внутриклеточный запас ионов кальция. Причем значения концентрации ионов кальция внутри ретикулума и вне клетки совпадают (10^{-3} М). Вероятно, люмен ретикулума является продолжением внешней среды, замкнутой во внутреннем компартменте в результате локального впячивания внешней мембраны и отрезания этого локуса (рис. 2В).

При изучении действия БАВ на более сложных моделях было показано, что с появлением белковых компонентов в составе мембраны меняются как структурные свойства, так и появляются возможности для возникновения функций. Также появляются новые мишени для воздействия БАВ. В качестве экспериментального объекта со смешанным липид-белковым составом - для исследования влияния БАВ на белок-липидные взаимодействия в структуре мембран использовали тени эритроцитов и целые изолированные эритроциты. Конформационные перестройки белковых микродоменов в мембранах теней эритроцитов выявляли методом ДСК. Структурную организацию мембраны целого эритроцита с учетом и липидной, и белковой фазы исследовали, измеряя микровязкость мембраны.

Тени эритроцитов получают при осмотическом шоке изолированных эритроцитов. В гипоосмотической среде мембраны эритроцитов повышают проницаемость для гемоглобина, и гемоглобин выходит из клетки и далее, поддерживая холодовой температурный режим (4°C), без замерзания, с помощью центрифугирования получают бесцветный осадок мембран теней, легко суспендирующийся в фосфатном буфере [13]. Необходимо отметить, что тени эритроцитов являются адекватной моделью для изучения белок-липидных взаимодействий в клеточной мембране и в цитоскелете. Основные компоненты характерны для большинства клеток животного организма. Микрокалориметрическое исследование в изотонических условиях выявляет пять термоденатурационных структурных переходов белковых микродоменов в мембранах теней (рис. 3): A –, B_1 –, B_2 –, C – и D – переходы [14].

A –переход обусловлен денатурацией домена цитоскелета, образованного комплексом α - и β -спектрина и актина. Денатурация спектрин-актинового комплекса, приводящая к исчезновению A –перехода, сопровождается полной потерей деформируемости эритроцитов и мембран теней. B_1 –переход связан с денатурацией мембранного домена, образованного анкирином и белками полос 4.1, 4.2 и дематином. B_2 –переход - с денатурацией цитоплазматического фрагмента белка полосы-3, C –переход - с денатурацией мембранного фрагмента 55 кДа белка полосы-3, представляющего собой ионные каналы. D –переход связан с неидентифицированными белками и везикуляцией мембраны. Как видно на термограммах (рис. 3) микродоменная структура теней значительно изменяется под действием ИХФАН-10 и незначительно под действием фенотана. При хранении теней – меняются термоденатурационные характеристики белковых микродоменов цитоскелета теней. ДСК теней в присутствии мелафена не выявило изменений амплитуды и температурного сдвига пиков переходов. Т.е. мелафен не оказывает значительного воздействия

непосредственно на белковые компоненты мембраны как в свежевыделенных телях, так и в состаренных. Необходимо отметить, что при патологии поврежденные (например, окисленные) эритроциты в кровотоке отсутствуют, так как фагоцитируются макрофагами. Поэтому все перестройки можно увидеть только в опытах *in vitro* (в пробирке). Метод ДСК совместно с полиакриламидным электрофорезом белков позволяет определить возникающие при патологиях изменения в клеточной оболочке и цитоскелете эритроцитов.

Вышеуказанные данные показали, как влияют гидрофильные и гидрофобные БАВ на компоненты клеточных мембран. Но мембраны модельные и изолированные биомембраны отличаются по своим свойствам от мембран, находящихся в составе целых клеток. Поэтому следующим исследованием влияния БАВ было тестирование их действия на свойства мембран (микровязкость) целых эритроцитов и клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) помощью ЭПР по времени вращательной корреляции включенных в мембрану спиновых зондов. Зонды: 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоил-оксиперидин-1-оксила и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксила, различаются по своим гидрофобным свойствам. 1-й локализуется в поверхностных областях липидной мембраны в области bulk-липидов на расстоянии 2-4 Å, а 2-й – в зоне приповерхностных анулярных липидов на глубине 6-8 Å от поверхности [15]. Микровязкость мембран клеток изменялась в присутствии, как гидрофильного мелафена, так и гидрофобного ИХФАН-10 [16,17]. Было показано, что водные растворы мелафена в очень высоких концентрациях существенно (до 25 %) действуют на липид-липидные взаимодействия в поверхностных областях мембран, а на липид-белковые взаимодействия в более глубоких областях мембран целых эритроцитов незначительно влияют (до 10 %) как очень большие, так и малые концентрации мелафена. ИХФАН в больших и сверх малых концентрациях увеличивал микровязкость мембран по всей толщине мембран и в эритроцитах, и в клетках АКЭ, встраиваясь жирнокислотными хвостами в бислой и закрепляясь положительным зарядом на четвертичном азоте среди фосфолипидных головок. Однако, средние концентрации резко снижали вязкость бислоя, что указывает на то, что такое БАВ, как ИХФАН может и укреплять клеточную оболочку, и разрыхлять ее. Таким образом, БАВ может влиять на функционирование мембраны и ее компонентов, встраиваясь в разных количествах и на разную глубину в бислой.

Выше указанные воздействия примененных БАВ на структурные параметры должны находить отражение и на жизнедеятельности клетки. Поэтому далее было прослежено влияние на некоторые функции целых клеток. Так функциональные изменения под действием водных растворов мелафена и эмульсий ИХФАН-10 регистрировали по гемолизу эритроцитов, спонтанному и индуцированному. Для тестирования применили модель гемолиза эритроцитов в гипертонической среде по сравнению со спонтанным гемолизом [18]. Такая модель отражает влияние мелафена на степень устойчивости мембраны к повреждающим факторам окружающей среды. Гемолиз при непосредственном добавлении к суспензии эритроцитов малых количеств водных растворов мелафена разных концентраций характеризует меру повреждения плазмолеммы исследуемым препаратом. Мелафен во всем диапазоне концентраций (10^{-13} - 10^{-3} М) не вызывает дополнительного гемолиза и не защищает от спонтанного гемолиза. Добавление ИХФАН-10 при концентрации 10^{-4} М вызывает полный гемолиз эритроцитов, что вызывает еще и выход ионов K^+ . При более низких концентрациях ИХФАН-10 мембрана, напротив укрепляется, и существенных потоков ионов калия не наблюдается. Т.е. происходит нарушение целостности мембраны эритроцитов при высоких концентрациях ИХФАН-10 (10^{-5} - 10^{-4} М) при низких дозах (10^{-17} - 10^{-6} М) повреждающего действия нет. На этом примере хорошо прослеживается роль концентрационных флуктуаций БАВ в судьбе клетки.

Исследовали также сочетанное влияние БАВ и изменения условий окружающей среды. На примере гемолиза эритроцитов в гипо и гипертонической среде, что достигалось добавлением NaCl от 1 М до 4 М, мелафен ускорял разрушение мембраны при локальных неблагоприятных факторах среды [18]. Такая модель отражает влияние БАВ на степень устойчивости мембраны к повреждающим факторам окружающей среды. Как видно из данных (рис. 4), общая тенденция увеличения степени гемолиза эритроцитов при увеличении осмолярности среды усиливается в присутствии мелафена в диапазоне концентраций (10^{-7} - 10^{-5} М). Добавление мелафена в малых концентрациях 10^{-12} М и 10^{-11} М не меняло общей картины гемолиза эритроцитов спонтанного и индуцированного изменением ионной силы среды.

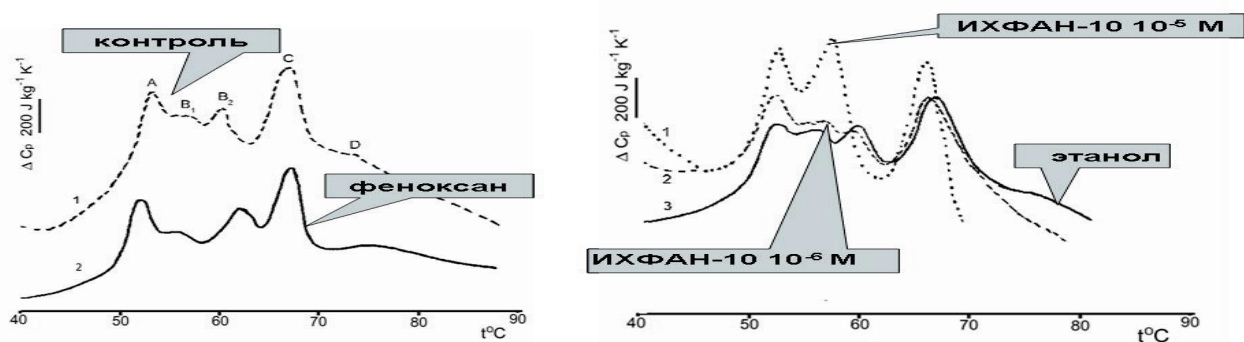


Рисунок 3. Влияние ИХФАН-10 и феноксана на термоиндуцированную денатурацию белковых доменов суспензии мембран телей эритроцитов

степень гемолиза сочетанное влияние мелафена и NaCl на гемолиз эритроцитов

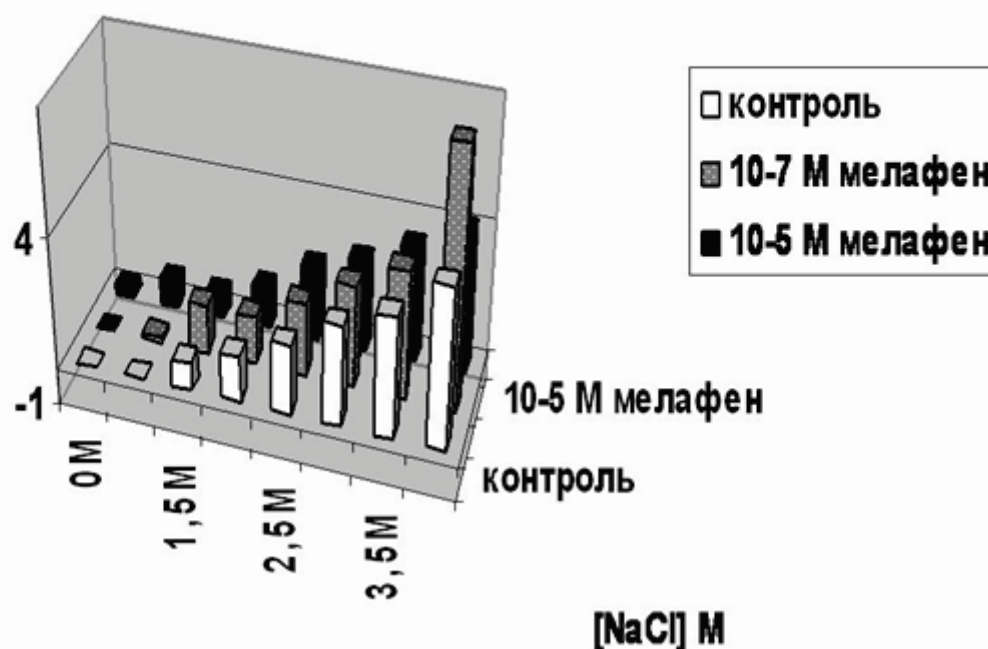


Рисунок 4. Влияние мелафена (10^{-5} М и 10^{-7} М) в зависимости от ионной силы (добавление NaCl 0 М; 1 М; 1,5 М; 2 М; 2,5 М; 3 М; 3,5 М; 4 М) среды на гемолиз эритроцитов

Полученные данные указывают на то, что БАВ одновременно с изменением окружающей среды, в данном случае – проявление осмотического стресса, может дополнительно воздействовать на такой важный параметр, как проницаемость клеточной оболочки.

Необходимо отметить, что фенозан и его производные - гидрофобные ИХФАНЫ, оказывают значительное действие, как на структуру мембран, сформированных из искусственного и природных фосфолипидов [9, 12], так и на природные белок-липидные мембраны - тении эритроцитов и эритроциты [16].

Мелафен влияет только на организацию лабильных структур – липосом, сформированных из индивидуального нейтрального фосфолипида ДМФХ [6] и на конформационные изменения бычьего сывороточного альбумина [19]. На более устойчивые структуры, такие, как липосомы, сформированные из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина [6], или же на тении эритроцитов мелафен не оказывает влияния [17]. Однако, структуры, которые уже сопряжены с функционированием клетки, меняются, что было показано для морфологии целых эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии [20]. Это указывает на то, что, как био-подобные мембраны (мультиламеллярные липосомы, сформированные из ДМФХ или из яичного лецитина), так и био-мембраны подвержены воздействию активных веществ в зависимости от степени усложнения структуры. Так простейшие мембраны, состоящие из одинаковых молекул, оказались очень уязвимы для всех примененных БАВ. По мере усложнения структуры степень защищенности возрастала. Однако на функционирующие клетки все вещества уже оказывали влияние, как на структуру, так и на функцию. Это влияние в значительной степени зависело от концентрации действующего вещества. Можно предположить, что экзогенные БАВ могли действовать, как фактор эволюции для элиминации неустойчивых структур, или в результате встраивания, как фактор, укрепляющий существующие структуры, для появления новых образований.

Последним звеном было исследование влияния примененных БАВ на функционирование клеток. Было протестировано влияние на клеточные системы передачи сигнала. Так как эритроциты лишены полной системы передачи сигнала до внутриклеточных органелл, то были проведены исследования на клетках АКЭ [21]. Это адекватная модель – 7-8 сутки развития карциномы на поверхности клеток демаскированы метаболитные пуриновые рецепторы и работает вся система кальций-зависимой передачи сигнала. Так при активации Ca^{2+} -сигнальной системы добавками АТФ происходит набухание клеток и пропорционально изменяется интенсивность светорассеяния в суспензии клеток. Взаимодействие АТФ с пуриновыми рецепторами на поверхности клетки приводит к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , активации Са-зависимых К каналов и Са-зависимых Cl каналов, изменяющих объем клеток. Общий клеточный ответ отражался в двухфазном изменении объема клетки, в первой фазе происходит освобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула, во второй – компенсаторный вход внеклеточного Ca^{2+} . Оказалось, что все примененные вещества изменяли

объем клеток. Зависимость величины первого ответа от концентрации ИХФАНов имеет доза-зависимый характер, а второго - бимодальный вид характерный для эффекта веществ, действующих в сверхмалых дозах. Ca^{2+} -сигнальная система клеток АКЭ подвергается угнетению ИХФАНами и фенозаном 10^{-7} - 10^{-5} М.

Мелафен в малых концентрациях 10^{-10} М начинает оказывать угнетающее действие на один из Ca^{2+} -сигнализацию при активации поверхностных пуринорецепторов. С увеличением концентрации эффект усиливается, и при 10^{-4} М ингибирование достигает 80 %, 10^{-3} М вызывает 100% - полное ингибирование всех фаз прохождения сигнала. Обнаруженное в присутствии мелафена угнетение Ca^{2+} -сигналикации в клетках АКЭ, являющихся клетками, трансформированными с неконтролируемым ростом, явилось дополнительным интересным фактом для дальнейших исследований. Трансформированные клетки ведут себя как одноклеточные, поэтому могли служить хорошей моделью первичных клеток с уже развитой системой передачи сигналов с поверхности клеток через рецепторы внутрь для регуляции метаболических путей. Таким образом, БАВ могут, влияя на сигнализацию в клетках (в нашем случае на кальциевую сигнализацию), менять жизнеспособность клеток в окружающей среде. Выступая, как эволюционный фактор или как фактор предбиологической эволюции, БАВ способствуют элиминированию неустойчивых структур. И могут вызывать модификации пре биотических структур при взаимодействии с внешним миром - миром окружающих химических веществ.

В заключении отметим, на моделях возможно проследить «эволюцию» воздействия внешней среды (активных веществ) на структуру и функции в био-подобных и биообъектах, что могло бы помочь анализу действия естественного отбора на ранних стадиях истории жизни. По мере усложнения био-подобного объекта усиливается и защищенность его структур от внешней среды. Но функции биообъекта остаются достаточно уязвимыми для БАВ, действующими из внешней среды. Концентрационные зависимости воздействия гидрофильного БАВ – мелафена, на термодинамические параметры липосом или микровязкость эритроцитов - полимодальные. Причины появления на кривых концентрационных зависимостей доза-эффект трех или двух экстремумов с молчащими зонами между ними неясны. Вероятно, водные растворы или водные эмульсии БАВ структурно варьируют в разных концентрационных диапазонах. Воздействие на экспериментальный объект зависит как от природы, так и от концентрации БАВ. В литературе описаны физико-химические характеристики растворов и эмульсий, указывающие, по мнению авторов, на формирование супрамолекулярных комплексов БАВ - вода [22, 23]. Предполагается, что эти комплексы воздействуют на биообъекты в растворах и эмульсиях БАВ в сверхнизких концентрациях. Однако существование супрамолекулярных комплексов «БАВ-вода» - дискуссионно, так как подобные физико-химические характеристики растворов могут отражать присутствие в растворах и эмульсиях газовых пузырьков [24, 25], свойства которых и меняют мицеллярные или растворенные БАВ и ионы, освобождающиеся при их диссоциации. Вероятно, механизм влияния БАВ на биообъекты можно объяснить, как непосредственным электростатическим или гидрофобным взаимодействием, так и тем, что воздействие БАВ может быть опосредовано водной средой, на свойства которой тем или иным образом влияет присутствие БАВ. Возможно, изменяется растворимость газов в окружающей водной среде, что действует на свойства мембраны. Таким образом, можно прийти к выводу, что БАВ не только саму клетку или ее компоненты могут изменять, но и окружающую среду: насыщение газами, образование газовых пузырьков, концентрирование ионов на их поверхности, формирование гидратных оболочек вокруг молекул, двойного электрического слоя около мембраны и т.п. И это также может служить фактором для естественного отбора.

Список литературы / References:

1. Chetverin A.B. Molecular colonies: a plausible form of compartmentalization in the RNA world. *Сборник тезисов Международной конференции «Проблема происхождения жизни» и ассоциированной с ней Молодежная научная школа «Молекулярные и клеточные основы ранней эволюции жизни»*, 22-26 сентября 2014, Москва, с. 8-9. [Chetverin A.B. Molecular colonies: a plausible form of compartmentalization in the RNA world. Proceedings of the International conference «Problems of life origination» September 22-26 2014, Moscow, pp. 8-9]
2. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. *Липидные мембраны при фазовых превращениях*. Москва: Наука, 1992, 125 с. [Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. *Lipids membranes when phase transitions*. Moscow: Nauka, 1992, 125 p. (In Russ.)]
3. Wanunu M., Bhattacharya S., Xie Y., Tor Y., Aksimentiev A., Drndic M. Nanopore analysis of individual RNA/antibiotic complexes. *ACS Nano*, 2011, vol. 5, no. 12, pp. 9345-53.
4. Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H., Jr., Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M.S., White S., Witztum J.L., Dennis E.A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.*, 2005, vol. 46, pp. 839-861.
5. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцитина) с мультламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилхолина. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 1, с. 78-84. [Tarachovsky Yu.S., Vasilieva N.A., Egorochkin M.A., Kim Yu.A. Interrelationship of taxipholine (digidrokvercitine) with multilammellar liposomes formed from dimyristoilphosphatidylcholine. *Biophysics*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 78-84. (In Russ.)]
6. Алексеева О.М., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Рыков В.А., Фаттахов С.Г., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. Исследование взаимодействия мелафена с фосфолипидными мембранами. *Доклады академии наук*, 2009, т. 427, № 6, с. 837-839. [Alekseeva O.M., Krivandin A.V., Shatalova O.V., Rykov V.A., Fattakhov S.G.,

- Burlakova E.B., Kononov A.I. The Melafen-Lipid- interaction Determination in phospholipid membranes. *Reports of Russian Academy of Sciences*, 2009, vol. 427, no. 6, pp. 837-839. (In Russ.)]
7. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафен) как регулятор роста и развития растений нового поколения. *Сборник докладов 13-ой Международной конференции по химии соединений фосфора*, Санкт-Петербург, 2002, с. 80. [Fattachov S.G., Reznik V.S., Kononov A.I. Melamine salt of bis (hydroxymethyl) phosphinic acid (melaphene) as a new generation regulator of plant growth. *Proceedings of 13 International conference on chemistry of phosphorus compounds*, St. Petersburg, 2002, p. 80. (In Russ.)]
8. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. *Пространственно-затруднённые фенолы*. М.: Химия, 1972, 352 с. [Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volod'kin A.A. *Space hampered phenols*. Moscow: Chemistry, 1972, 352 p. (in Russ.)]
9. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Круглякова К.Е. Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-1. *Известия РАН. Сер. Биол.*, 1996, № 4, с. 508-512. [Gendel L.J., Kim L.V., Luneva O.G., Fedin V.A., Kruglakova K.E. Changes of cursory architectonics of erythrocytes under the impact of synthetic antioxidant Fenosan-1. *Reports of Russian Academy of Science. Series Biol.*, 1996, vol. 4, pp. 508-512. (In Russ.)]
10. Burlakova E.B., Molochkina E.M., Nikiforov G.A. Hybrid antioxidants. *Chemistry and Chemical Technology*, 2008, vol. 2, no. 3, pp. 163-171.
11. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Кривандин А.В., Погорецкая И.Л. Влияние фенозана на структуру фосфолипидных мембран. *Нейрохимия*, 1996, т. 13, с. 128-132. [Archipova G.V., Burlakova, E.B., Krivandin, A.V., Pogoretskaya I.L. Phenosan-acid influence to phospholipid membrane. *Neurochemistry*, 1996, vol. 13, pp. 128-132. (In Russ.)]
12. Кривандин А.В., Фаткуллина Л.Д. Исследование встраивания антиоксиданта ИХФАН в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Химическая физика*, 2013, т. 32, № 5, с. 91-96. [Krivandin A.V., Fatkullina L.D. Investigation of antioxidant IHFAN incorporation to liposomes by method of small angle roentgen scattering. *Chemical physics*, 2013, vol. 32, no. 5, pp. 91-96. (In Russ.)]
13. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, vol. 16, no. 5, pp. 506-512.
14. Jackson W.M., Kostyla J., Nordin J.H., Brandts J.F. Calorimetric study of protein transitions in human erythrocyte ghosts. *Biochemistry*, 1973, vol. 12, pp. 3662-3667.
15. Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Исследования микровязкости и структурных переходов в липидах и белках клеточных мембран методом спиновых зондов. *Биофизика*, 1975, т. 20, № 5, с. 816-821. [Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Microviscosity definition and structural transitions into lipids and proteins of cell membranes by the method of spin probes. *Biophysics*, 1975, vol. 20, no. 5, pp. 816-821. (in Russ.)]
16. Векшина (Алексеева) О.М., Фаткуллина Л.Д., Ким Ю.А., Бурлакова Е.Б. Изменения структуры и функций мембран эритроцитов и клеток асцитной карциномы Эрлиха при действии гибридного антиоксиданта нового поколения ИХФАН-10. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2007, № 4, с. 402-406. [Vekshina (Alekseeva) O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu.A., Burlakova E.B. Structural and functional changes of erythrocytes and cells of Erlich ascetic carcinoma under the actions of hybrid antioxidants of new generation IHFAN-10. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2007, no. 4, pp. 402-406. (In Russ.)]
17. Alekseeva O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The melafen influence to the erythrocyte's proteins and lipids. *Вестник Казанского технологического Университета*, 2014, т. 17, вып. 9, с. 176-181. [Alekseeva O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The melafen influence to the erythrocyte's proteins and lipids. *Digest of Kazan Technology University*, vol. 17, iss. 9, pp. 176-181. (In Russ.)]
18. Ким Ю.А., Елемесов Р.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из *Panax Ginseng* С.А. Мейер. *Биологические мембраны*, 2000, т. 17, № 2, с. 15-26. [Kim Yu.A., Elemesov R.E., Akoev V.R. Hyper osmotic hemolysis of erythrocytes and antihemolytic activity of saponins faction and triterpens glycosides from *Panax Ginseng* C.A. Meyer. *Biological Membrane*, 2000, vol. 17, no. 2, pp. 15-26. (In Russ.)]
19. Alekseeva O.M., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The interactions melafen and ihfans with animal's soluble protein. *Вестник Казанского технологического Университета*, 2014, т. 17, вып. 7, с. 167-170. [Alekseeva O.M., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The interactions melafen and ihfans with animal's soluble protein. *Digest of Kazan Technology University*, vol. 17, iss. 7, pp. 167-170. (In Russ.)]
20. Бинюков В.И., Алексеева О.М., Миль Е.М., Албантова А.А., Фаттахов С.Г., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. Изучение влияния фенозана, ИХФАН-10 и мелафена на эритроциты *in vivo* методом АСМ. *ДАН. Сер. Биол.*, 2011, т. 441, № 1, с. 114-117. [Binukov V.I., Alekseeva O.M., Mill. E.M., Albantova A.A., Fattachov S.G., Kononov A.I. Investigation of phenosan, IHFAN-10 and melafen influences to erythrocytes *in vivo* by AFM method. *Reports of Russian Academy of Science. Series. Biol.*, 2011, vol. 441, no. 1, pp. 114-117. (In Russ.)]
21. Alekseeva O.M. Melafen - Plant Growth Regulator and Pathways of cells. *Polymers Research Journal*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 117-128.
22. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Тимошева А.П., Шагидуллин Р.Р., Чернова А.В., Аввакумова Ж.Б., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Супрамолекулярные структуры на базе гидрофильного производного меламина

и бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафен) и поверхностно активные вещества. Структура и самоассоциация Мелафена в воде и хлороформе. *Известия академии наук. Сер. Биол.*, 2008, № 6, с. 1207-1214. [Ryshkina I.S., Murtasina L.I., Timosheva A.P., Shagidullin R.R., Chernova A.V., Avvakumova G.B., Fattakhov S.G., Kononov A.I. Supramolecular structures at bases of hydrophilic derivatives of melamine and bis(oximethyl)phosphinic acid (Melafen) and detergents. Structure and selfassociation of Melafen in water and chloroform. *News of Russian Academy of Science. Series. Biol.*, 2008, no. 6, pp. 1207-1214. (In Russ.)]

23. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Манжукова Д.Н., Тимошева А.П., Пальмина Н.П., Коновалов А.И. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ. *ДАН. Сер. Биол.*, 2009, т. 428, № 4, с. 487-491. [Ryshkina I.S., Murtasina L.I., Kiseleva Yu.V., Mangukova D.P., Timosheva A.P., Palmina N.P., Kononov A.I. Properties of supramolecular associates, formed at water solutions at low and super low concentrations of biological active substances. *Reports of Russian Academy of Science. Series. Biol.*, 2009, vol. 428, no. 4, pp. 487-491. (in Russ.)]

24. Гаврилов Л.Р. *Физические основы процессов ультразвуковой технологии*. М.: Наука, ред. Л.Д. Розенберг, 1970, с. 395-426. [Gavrilov L.R. *Physical bases of ultrasonic technology*. Moscow: Nauka, ed. L.D. Rosenberg, 1970, pp. 395-426. (In Russ.)]

25. Сиротюк М.Г. Влияние температуры и газосодержания жидкости на кавитационные процессы. *Акустич. Журнал*, 1966, т. 12, № 1, с. 87-92. [Sirotuk M.G. Influence of liquids temperature and gas composition on cavitation process. *Acoustic Journal*, 1966, vol. 12, no. 1, pp. 87-92. (In Russ.)]

THE ACTIONS OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES TO EXPERIMENTAL MODELS OF FIRST LIVING OBJECTS

Alekseeva O.M.¹, Kremmentsova A.V.¹, Krivandin A.V.¹, Shatalova O.V.¹, Kim Yu.A.²

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: olgavek@yandex.ru

²Institute of Cell Biophysics, RAS

Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, Russia.

Abstract. The re-understand of the probabilistic possibilities of creating pre-biotic and biotic processes, resulting in initiation, further development and adaptation to environment of predecessors of living subjects are presented at this work. For these purposes the certain data were obtained, when studying the actions of biologically active substance (BAS) with engagement of modern experimental models and bio-objects. The experimental objects used consistently as of complicating of their structural properties and respectively of emergence of functional properties. The liposomes, which are formed, from artificial individual phospholipid, and from mixture of nature phospholipids, were used as the experimental objects for structural studies of lipid-lipid interactions. To identify of structural rearrangements, which involved of the protein-lipid interactions, the erythrocyte ghost and the insulated erythrocytes were used. The investigations of BAS influences on cells functioning were provided with study of calcium signalizations ways of the transformed with uncontrolled growth cells of ascetic Ehrlich carcinoma, and of the normal cells - thymocytes and lymphocytes. For inspection of actions of BAS as the modifiers of structures and functions of model and bio-objects, we used hydrophilic substances: the plant growth regulator melafen, the antioxidant phenoksan, and the hydrophobe antioxidants - IHFANs. So has managed to trace influence BAS, as probable factors of natural selection of different nature on increasingly becoming complicated on its organization the objects, simulating the development stages at an earlier stages of life-history. BAS may be regarded, as the factors of evolution. BAS may be factors for elimination of instable structures. And BAS may be also as strong factors for emergence of new subjects or updating of existence subjects due to BAS incorporating to its structures. The obtained data could help also to performance analysis of predecessors of modern cellular structures.

Key words: membranes; erythrocyte; biologically active substances; differential scanning microcalorimetry; hemolysis.

О ПРИРОДЕ ЭМИТТЕРА В ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ СИСТЕМЕ СВЕТЛЯКОВ

Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю.

МГУ имени М.В.Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр.3, Москва, 119992, РФ; e-mail: nugarova@gmail.com

Поступила в редакцию: 05.06.2018

Аннотация. Отличительной особенностью биолюминесценции люцифераз светляков являются сложные спектральные изменения в форме и максимумах биолюминесценции при варьировании pH, температуры, структуры фермента. Анализ литературных данных и собственных результатов авторов о природе эмиттера в люциферин-люциферазной системе светляков приводит к заключению, что кето-енольная таутомерия молекулы оксилуциферина наиболее достоверно объясняет наблюдаемые сложные спектральные изменения. Каждая молекула люциферазы может содержать лишь одну молекулу эмиттера в момент биолюминесценции, поэтому можно рассматривать эмиттер как внутримолекулярную метку, характеризующую свойства ее микроокружения в активном центре фермента. Суперпозиция двух или трех форм эмиттера, фиксируемых в спектрах биолюминесценции, указывает на то, что в реакционной среде сосуществуют различные конформационные формы фермента, находящиеся в динамическом равновесии, каждая из которых генерирует одну из форм эмиттера.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза светляков, кето-енольная таутомерия, оксилуциферин.

Люцифераза жуков [люциферин 4-монооксигеназа (гидролиз АТФ); люциферин: кислород 4-оксидоредуктаза (декарбоксилирование, гидролиз АТФ), КФ 1.13.12.7] катализирует окисление люциферина светляков кислородом воздуха в присутствии MgATP [1-3]. Свечение сопровождается излучением видимого света с высоким квантовым выходом (более 40 %) [4, 5]. Как показано на рисунке 1, на первой стадии фермент связывается со своими субстратами – люциферин(ом) (1) и АТФ.

В тройном комплексе люциферин ковалентно взаимодействует с АТФ, образуя смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот – люциферил-аденилат (2) и пирофосфат (PP_i). Люциферил-аденилат через ряд промежуточных стадий окисляется кислородом воздуха, превращаясь в циклический пероксид – диокситанон (3). Разложение диокситанона приводит к его декарбоксилированию. В результате внутримолекулярной рекомбинации радикалов образуется продукт реакции – оксилуциферин (4) в синглетном электронно-возбужденном состоянии, который дезактивируется с излучением кванта света ($\lambda_{\text{макс}}$ = от 540 до 612 нм, в зависимости от структуры люциферазы, pH и температуры).

Молекулы люцифераз светляков состоят из одной полипептидной цепи (542-552 остатков), не содержат кофакторов и имеют сходный аминокислотный состав. Гомология аминокислотных последовательностей для различных люцифераз соответствует отношениям, основанным на их биологической классификации. Для люцифераз рода *Luciola* гомология составляет около 80 %, а начиная с 200 остатка - более 90 %. Люцифераза *L. mingrelica* наиболее близка по структуре к люциферазе японских светляков *Hotaria parvula* (98 % гомологии).

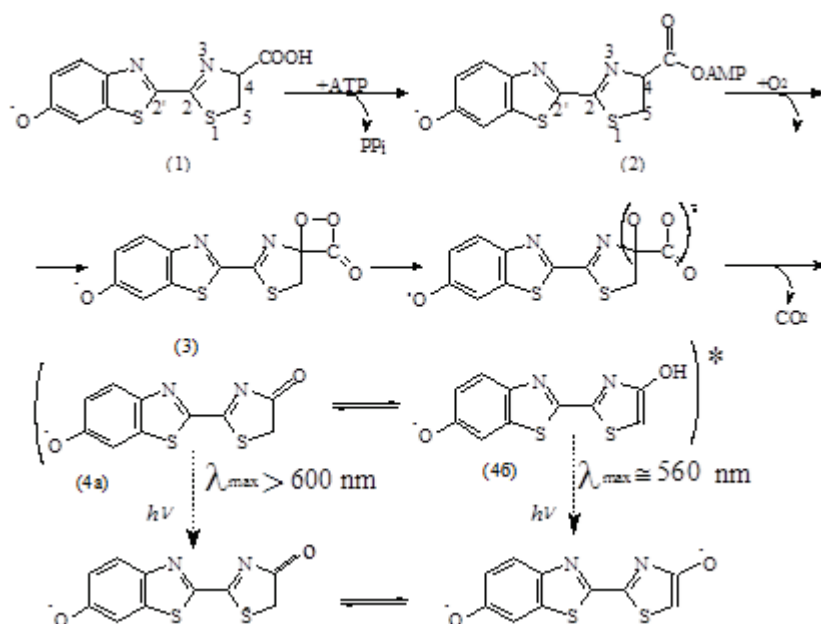


Рисунок 1. Схема люциферазной реакции

имеют $\lambda_{\max}$ в красной области спектра, в то время как для оксильюциферина и метилоксильюциферина наблюдается зависимость спектров флуоресценции от pH [15, 16]. В последние годы и другие авторы приходят к заключению, что различия в спектрах биолюминесценции люцифераз светлячков трудно объяснить без использования представлений о кето-енольной таутомерии оксильюциферина [17].

Новые интересные результаты были получены группой авторов при изучении стационарных и время-разрешенных спектров флуоресценции оксильюциферина в различных системах: в кристаллах, водных растворах, а также в комплексах люциферазы светлячков *L. cruciata* с оксильюциферинном. Результаты по пико-нано-секундной динамике оксильюциферина и его аналогов в модельных системах позволили установить, что фотоокислотность енольной группы превосходит таковую для фенольной группы. Это указывает на то, что перенос протонов в возбужденном состоянии эмиттера может инициировать кето-енольную таутомерию [18]. Были определены спектральные характеристики различных форм оксильюциферина в водных растворах в основном состоянии (рис. 2), которые поглощают в относительно узком интервале (367-486 нм) при pH 6-11 [19, 20]. Близкие значения двух рКа (9.10 ± 0.12 и 7.40 ± 0.15 для фенола/фенолят и енол/енолят, соответственно) приводят к тому, что при pH 7 соотношение популяций фенол-енол/фенол-кето/фенол-енолят равно 2:1:1. Каждая из этих форм может поглощать энергию, переходить в возбужденное состояние и претерпевать фотохимические трансформации. Суб-наносекундная время-разрешенная флуоресценция была использована и для изучения комплексов оксильюциферина с японской люциферазой *L. cruciata*. Этот подход подтвердил идентичность флуоресцентных и биолюминесцентных состояний, которые были установлены компьютерными методами [21]. Результаты показывают, что эмиссия электронно возбужденного оксильюциферина представляет собой каскад фотоиндуцированных переносов протона и может быть интерпретирована как pH-зависимость излучаемого света. Авторы приходят к заключению, что центральным событием в спектроскопии этой системы является перенос протона, и приписывать pH-зависимость спектров биолюминесценции к единственной химической структуре было бы слишком большим упрощением [18, 22]. Результирующие данные по фотоиндуцированной динамике в этой системе были нацелены на выяснение всех фотохимических путей, которые возможны в активном центре люциферазы, по крайней мере, в принципе. Следует отметить, что благодаря сложной химической структуре эмиттера все существующие в основном состоянии формы возбуждаются одновременно, поэтому данные по флуоресценции отражают скорее возможные, чем наиболее вероятные явления в активном центре фермента.

Таким образом, основным фактором, определяющим цвет биолюминесценции, являются свойства микроокружения эмиттера, локализованного в активном центре фермента. Как показано на рисунке 3, протон C-5 тиазольного цикла образует водородную связь с боковым остатком аминокислоты (B_1), который действует как основание, удаляя C-5 протон. Кислород кетонной группы взаимодействует с протонированным основанием (B_2), принимая от него протон. Таким образом, процесс кето-енольной таутомеризации – это синхронный переход двух протонов: одного – от C-5 атома оксильюциферина на основание B_1 , и другого – от основания B_2 к атому кислорода карбонильной группы. Результатом таутомеризации является образование енола. Эффективность этого процесса зависит от правильной фиксации оснований B_1 и B_2 вблизи тиазольной группы оксильюциферина. Взаимодействие гидроксильной группы енола с основанием (B_3) приводит к образованию енолят-иона. При отсутствии основания B_1 (независимо от pH), либо при его протонировании (например, при pH < 6,0) будет наблюдаться только кето-форма оксильюциферина с максимумом биолюминесценции в красной области спектра. При промежуточных значениях pH в спектре биолюминесценции наблюдаются все составляющие: кетона, енола и енолята.

Пока нет полной ясности, какие аминокислотные остатки фермента участвуют в процессе, показанном на рисунке 3. Однако, некоторые предположения можно сделать, анализируя кристаллографические данные по структуре активного центра люциферазы светлячков *L. cruciata* в комплексе с аналогом промежуточного продукта реакции аденилирования DLSA (аденилат люциферина, в котором атом фосфора заменен на атом серы) [23]. В этом комплексе атом кислорода тиазольной группы связан водородной связью с молекулой воды, которая в свою очередь координирована на боковую NH_2 группу остатка Lys531 и на боковую OH-группу остатка Thr529. Вполне возможно, что именно эта молекула воды является модератором цвета эмиссии. К такому же предположению пришли и авторы работы [24] на основании теоретических расчетов спектров для комплекса оксильюциферина с молекулой воды в вакууме.

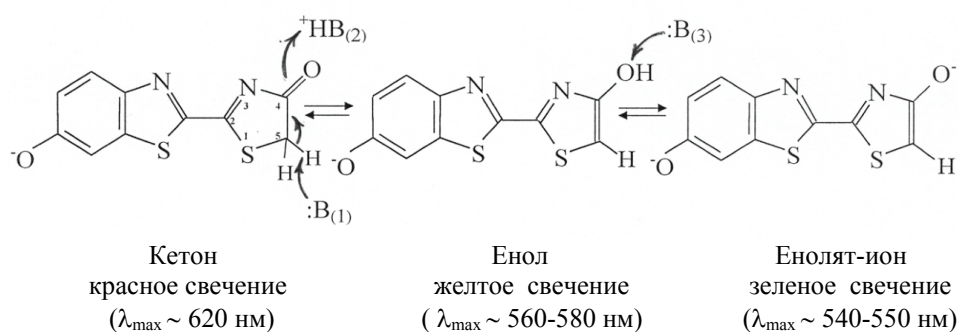


Рисунок 3. Схема взаимодействия эмиттера с микроокружением в активном центре фермента

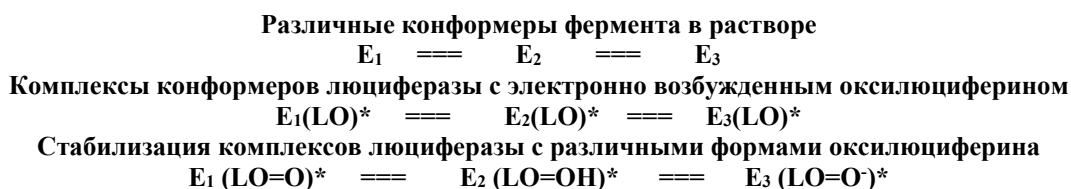


Рисунок 4. Модуляция микроокружения эмиттера в активном центре различных конформеров люциферазы

Эмиттер как маркер конформационного состояния активного центра люциферазы. В большинстве опубликованных работ авторы обращали внимание только на положение максимума биолюминесценции, но не анализировали наблюдавшиеся изменения формы спектров биолюминесценции. Изучение pH-зависимости спектров биолюминесценции при pH 7,8 нативной рекомбинантной люциферазы *Luciola mingrelica* и ее мутантной формы с заменой His433Tyr, количественная оценка вклада различных форм оксильюциферина в спектры биолюминесценции позволили выяснить решающую роль белка в наблюдаемых различиях в спектрах биолюминесценции нативной и мутантной люцифераз [25]. Данный мутант обладает высокой каталитической активностью, поскольку остаток His433 расположен на расстоянии 12 Å от активного центра фермента, и его мутация не оказала влияния на каталитические свойства фермента. Единичная замена His433Tyr привела к сдвигу $\lambda_{\max}$ на 40 нм в красную область спектра. Проведенный анализ спектров биолюминесценции нативной и мутантной люциферазы в интервале pH от 5,6 до 10,2 показал, что для нативной люциферазы при pH $\geq 7,0$ наблюдается только желто-зеленая, при pH = 5,6 – красная биолюминесценция, а при промежуточных pH – обе ее формы. Использование метода Гаусса для разложения спектров биолюминесценции позволило установить, что наблюдаемые спектры являются суперпозицией спектров не двух, а трех форм электронно-возбужденного оксильюциферина: энولات-иона ($\lambda_{\max}$ 556 нм), енола ($\lambda_{\max}$ 587 нм) и кетона ($\lambda_{\max}$ 618 нм). Было определено относительное содержание каждой из форм при различных pH, которое варьируется с изменением pH вследствие сдвига равновесий:



Изменение относительного содержания различных форм эмиттера с варьированием pH приводит как к сдвигу положения максимума, так и изменению формы спектра биолюминесценции [25].

В активном центре молекулы люциферазы может присутствовать только одна молекула эмиттера, которая является по сути дела внутримолекулярной люминесцентной меткой и характеризует свойства микроокружения эмиттера в момент эмиссии света. Если наблюдается суперпозиция двух или трех форм эмиттера, то это означает, что в реакционной среде присутствуют три различные конформационные формы фермента. В микроокружении каждой формы фермента образуется одна молекула электронно-возбужденного продукта, который стабилизируется в активном центре фермента в одной из трех форм – кетона, енола или енолята. Таким образом, идентификация трех форм эмиттера указывает на сосуществование в реакционной среде динамического равновесия между тремя различными конформерами люциферазы, соотношение между которыми изменяется при варьировании pH или температуры. На рисунке 4 показана схема, согласно которой люцифераза может модулировать микроокружение эмиттера:

Анализ спектров биолюминесценции для нативной и мутантной люциферазы, полученных в работе [25], позволил рассчитать соотношение между различными конформерами люциферазы при разных pH (табл. 1).

Для нативной люциферазы в pH оптимуме активности (pH 7,8) 50% составляет конформер, стабилизирующий форму енолята оксильюциферина. Для мутантной люциферазы при pH 6,8 преобладает конформер, стабилизирующий форму кетона, а при pH 7,8 появляются заметные количества конформера, стабилизирующего енол. Тем не менее при pH 8,3 доля конформера, стабилизирующего кетон, составляет еще 45 %. Сходные результаты были получены для комплексов оксильюциферина с нативной люциферазой *Luciola cruciata* в работе на основании измерения спектров флуоресценции [22]. Таким образом, эмиттеры биолюминесценции являются внутримолекулярными маркерами структуры микроокружения эмиттера в активном центре люцифераз, которое зависит от поляризуемости, ориентации и подвижности ключевых аминокислотных групп [6].

Таблица 1. Распределение конформеров люциферазы для нативной и мутантной люциферазы при различных pH (в %)

pH	E ₁ (LO=O)*		E ₂ (LO=OH)*		E ₃ (LO=O ⁻)*		Сумма	
	нативная	мутантная	нативная	мутантная	нативная	мутантная	нативная	мутантная
6,8	38	63	28	28	27	6	93	97
7,8	22	50	32	40	50	12	104	102
8,3	21	45	26	42	54	16	101	103

Сайт-направленный или случайный мутагенез белковой глобулы люциферазы позволяет модулировать физико-химические свойства микроокружения эмиттера в активном центре фермента и тем самым изменять соотношение между различными конформерами фермента, сдвигать равновесие в сторону «зеленой» или, наоборот, «красной» биолюминесценции. Например, единичная мутация T935His привела к образованию люциферазы *L. mingrelica*, спектры биолюминесценции для которой практически не изменяются в интервале pH 6,0-7,8 [26]. Мономодальный спектр с λ_{max} при 564 нм свидетельствует о том, что данный мутант существует в виде одного конформера.

Другой интересный результат был получен при изучении спектров биолюминесценции термостабильной люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантов по остатку глутаминовой кислоты (E457D, E457Q, E457V, E457K) при температурах 10, 25 и 42 °C [27]. Для всех люцифераз суммарные спектры биолюминесценции представляют собой суперпозицию спектров «зеленого» (λ_{max} 554 ± 3 нм) и «красного» эмиттера (λ_{max} 595 ± 5 нм), соотношение между которыми с повышением температуры сдвигается в сторону «красного» эмиттера. При 42 °C доля красного эмиттера увеличивается до 90 % для исходной люциферазы, а для мутантов – до 100 %. Исходная люцифераза и мутант E457D имеют сходные зависимости спектров биолюминесценции от температуры. Для мутантов E457Q, E457V «зеленый» эмиттер составляет всего ~ 20 % при 10 °C и ~ 10 % при 25 °C. Люцифераза с мутацией E457K имеет мономодальный спектр с максимумом при 600 нм во всем изученном интервале температур. Анализ спектров показывает, что для всех мутантов максимумы эмиссии «зеленого» и «красного» компонента совпадают с величинами для исходной люциферазы, а с температурой изменяется лишь соотношение между ними. Этот результат показывает, что природа эмиттера не зависит от температуры, но изменяется соотношение между различными конформерами белка при повышении температуры.

Список литературы / References:

1. Ugarova N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. *J. Biolum. Chemilum.*, 1989, vol. 4, pp. 406-418.
2. Devine J.H., Kutuzova G.D., Green V.A., Ugarova N.N., Baldwin T.O. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression*, 1993, vol. 1173, pp. 121-132.
3. Hastings J.W., Johnson C.H. Bioluminescence and chemiluminescence. *Meth. Enzymol.*, 2003, vol. 360, pp. 75-104.
4. Seliger H.H., McElroy W.D. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, vol. 88, pp. 136-141.
5. Ando Y., Niwa K., Yamada N., Enomoto T., Irie T., Kubota H., Ohmiya Y., Akiyama H. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nature Photon.*, 2008, vol. 2, pp. 44-47.
6. Ugarova N.N., Brovko L.Yu. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. *Luminescence*, 2002, vol. 17, pp. 321-330.
7. Viviani V.R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002, vol. 59, pp. 1833-1850.
8. White E.H., Rapaport E., Hopkins T.A., Seliger H.H. Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, vol. 91, pp. 2178-2180.
9. MacCapra F., Gilfoyle D.J., Young D.W., Church N.J., Spencer P. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence. *Proceedings of the 8th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1994, pp. 387-391.
10. Nakatani N., Hasegawa J.y., Nakatsuji H. Red light in chemiluminescence and yellow-green light in bioluminescence: color-tuning mechanism of firefly, *Photinus pyralis*, studied by the symmetry-adapted cluster-configuration interaction method. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 8756-8765.
11. Yang T., Goddard J.D. Predictions of the geometries and fluorescence emission energies of oxyluciferins. *J. Phys. Chem. A*, 2007, vol. 111, pp. 4489-4497.
12. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical principles and applications*. World Scientific, Singapore, 2008, pp. 151-153.
13. Branchini B.R., Southworth T.L., Murtiashaw M.H., Magyar R.A., Gonzalez S.A., Ruggiero M.C., Stroh J.G. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, pp. 7255-7262.
14. Gandelman O.A., Brovko L.Y., Ugarova N.N., Chikishev A.Y., Shkurimov A.P. Oxyluciferin fluorescence is a model of native bioluminescence in the firefly luciferin--luciferase system. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1993, vol. 19, pp. 187-191.
15. Leont'eva O.V., Vlasova T.N., Ugarova N. N. Dimethyl and monomethyloxyluciferins as analogs of the product of the bioluminescence reaction catalyzed by firefly luciferase. *Biochemistry (Moscow)*, 2006, vol. 71, no.1, pp. 51-55.
16. Ugarova N.N. Interaction of firefly luciferase with substrates and their analogs: a study using fluorescence spectroscopy methods. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, vol. 7, pp. 218-227.

17. daSilva L.P., Simkovitch R., Huppert D., daSilva J.C.G.E., Oxyluciferin photoacidity: the missing element for solving the keto-enol mystery? *Chem. Phys. Chem.*, 2013, vol. 14, pp. 3441-3446.
18. Solntsev K.M., Laptanok S.P., Naumov P. Photoinduced dynamics of oxyluciferin analogues: unusual enol. "Super" photoacidity and evidence for keto-enol isomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, vol. 134, pp. 16452-16455.
19. Naumov P., Ozawa Y., Ohkubo K., Fukuzumi S. Structure and Spectroscopy of Oxyluciferin, the Light Emitter of the Firefly Bioluminescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, vol. 131, pp. 11590-11605.
20. Rebarz M., Kurovec B.-M., Maltsev O.V., Ruckebusch C., Hintermann L., Naumov P., Sliwa M. Deciphering the protonation and tautomeric equilibria of firefly oxyluciferin in solution. *Chem. Sci.*, 2013, vol. 4, pp. 3803-3809.
21. Navizet I., Liu Y.-J., Ferre, N., Xiao H.-Y., Fang W.-H., Lindh R. Color-Tuning Mechanism of Firefly Investigated by Multi-Configurational Perturbation Method. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, vol. 132, pp. 706-712.
22. Snellenburg J.J., Laptanok S. P., DeSa R. J., Naumov P., Solntsev K.M. Excited-state dynamics of oxyluciferin in firefly luciferase. *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, vol. 138, pp. 16252-16258.
23. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 2006, vol. 440, pp. 372-376.
24. Stöckel K., Hansen C. N., Houmøller J., Nielsen L. M., Anggara K., Linares M., Norman P., Nogueira F., Maltsev O.V., Hintermann L., Nielsen S.B., Naumov P., Milne B.F. On the Influence of Water on the Electronic Structure of Firefly Oxyluciferin Anions from Absorption Spectroscopy of Bare and Monohydrated Ions in Vacuo. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, vol. 135, pp. 6485-6493.
25. Ugarova N.N., Maloshenok L.G., Uporov I.V., Koksharov M.I. Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, vol. 70, no. 11, pp. 1262-1267.

ON THE NATURE OF THE EMITTER IN LUCIFERIN-LUCIFERASE SYSTEM OF FIREFLIES

Ugarova N.N., Lomakina G.Yu.

Lomonosov Moscow State University

Lenin hills, 1, bld.3, Moscow, 119992, Russia; e-mail: nugarova@gmail.com

Abstract. The distinctive features of firefly luciferase bioluminescence are the complex spectral changes of the form and λ_{max} of bioluminescence under variation of pH, temperature, and enzyme structure. Analysis of the literature data and the own results of the authors on the nature of the emitter in luciferin-luciferase system leads to the conclusion that the keto-enol tautomerism of oxyluciferin molecule the most authentically explains observable complex spectral changes. Each molecule of luciferase can contain only one molecule of the emitter at the moment of bioluminescence. Hence, the emitter can be considered as the intramolecular label, characterizing the properties of its microenvironment in the active center of the enzyme. Superposition of two or three forms of the emitter recorded in bioluminescence spectra indicates that various conformational forms of the enzyme co-exist in the reaction medium, that are in a dynamic equilibrium, each of which generates one of the emitter forms.

Key words: bioluminescence, firefly luciferase, keto-enol tautomerism, oxyluciferin.

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АВТООКИСЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ ПАПРИКИ

Мишарина Т.А., Киселёва В.И.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию: 08.06.2018

Аннотация. Разработан спектрофотометрический метод оценки антиоксидантных свойств препаратов, основанный на ингибировании авто-окисления смеси каротиноидов экстракта красной паприки в присутствии этих препаратов. Каротиноиды наносятся на пористый инертный полисахарид, благодаря этому процесс автоокисления проходит быстрее, чем в любом другом методе определения эффективности антиоксидантов. Показана эффективность метода для сравнительной оценки антиоксидантной активности эфирных масел и экстрактов пряно-ароматических растений, ионола и аскорбил пальмитата. Важнейшим преимуществом метода является то, что каротиноиды практически идентичны полиненасыщенным жирным кислотам по способности взаимодействовать с кислородными радикалами, поэтому полученные результаты хорошо отражают поведение антиоксидантов в реальных липид содержащих модельных системах и пищевых продуктах.

Ключевые слова: спектрофотометрия, антиоксиданты, паприка, каротиноиды, эфирные масла и экстракты пряно-ароматических растений, ионол и аскорбил пальмитат.

Известно, что окисление полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов, проходит с участием эндогенных ферментов, а также под действием кислорода и активных форм кислородсодержащих радикалов, присутствующих в воздухе. Перекисное окисление липидов относится к цепным реакциям, в которых активные кислородсодержащие радикалы, а также образующиеся продукты окисления могут продлевать или обрывать реакционные цепи [1, 2]. Для снижения степени окисления полиненасыщенных жирных кислот необходимо сводить к минимуму контакты липидов с воздухом и светом, выдерживать оптимальный температурный режим хранения, а также использовать пищевые антиоксиданты.

Ключевым термодинамическим свойством веществ, отражающим их способность окисляться или восстанавливаться, то есть быть оксидантом или антиоксидантом, является редокс потенциал (E°). Величины E° для каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот близки и составляют около 800 мВ и 600 мВ, соответственно [3, 4]. Это означает, что оба класса этих веществ практически одинаково подвергаются авто-окислению и антиоксиданты будут ингибировать автоокисление и полиненасыщенных жирных кислот, и каротиноидов с близкой эффективностью. Поэтому мы предположили, что для изучения автоокисления кислот можно использовать системы на основе каротиноидов паприки. Каротиноиды – растительные тетратерпиноиды, они имеют интенсивную окраску от желтой до темно-красной благодаря наличию в их молекулах системы сопряженных двойных связей. При окислении активными радикалами из воздуха разрушается система сопряженности связей и каротиноиды быстро обесцвечиваются [5-8]. Наличие факторов защиты в виде антиоксидантов приводит к ингибированию обесцвечивания каротиноидов, которое фиксируют фотометрически.

Цель работы – на основе изучения кинетических характеристик процесса авто-окисления каротиноидов паприки по скорости их обесцвечивания разработать метод для оценки способности различных природных и синтетических антиоксидантов ингибировать автоокисление полиненасыщенных жирных кислот.

В работе использовали коммерческий препарат экстракта паприки («Plant Lipids», Индия), содержащий в качестве основных компонентов капсантин и капсорубин (красные каротиноиды), β -каротин, зеаксантин и β -криптоксантин (желтые каротиноиды) [9-11]. В качестве носителя был выбран нативный крахмал восковидной кукурузы («ROQUETTE», Франция). Исследовали антиоксиданты: ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол), аскорбил пальмитат, три дезодорированных экстракта розмарина компании «AKAY Flavours & Aromatics Pvt. Ltd.» (Индия), коммерческие эфирные масла гвоздики, орегано, чеснока и кориандра компании «Plant Lipids Ltd.» (Индия) и смеси антиоксидантов, состав которых и основные характеристики приведены в таблице 1.

Предлагаемый в настоящей работе метод является модификацией хорошо известного и часто используемого метода оценки антиоксидантных свойств веществ в модельной системе на основе окисления смеси линолевой кислоты и β -каротина [2]. Преимуществом этого метода, а также предлагаемой нами его модификации, является то, что кинетический подход позволяет определить общую ингибирующую способность индивидуальных антиоксидантов или их смесей и обеспечивает точную оценку антиоксидантной защиты [6, 12]. Недостатком метода является окисление модельной системы в неконтролируемых условиях, что затрудняет воспроизведение полученных ранее данных, но это не мешает проводить сравнение активности нескольких антиоксидантов в одном эксперименте при одинаковых условиях авто-окисления [2, 12].

Таблица 1. Основные характеристики изученных препаратов

Состав образца	Основные характеристики
Экстракт паприки	Вязкая маслянистая жидкость темно-красного цвета. Содержит основные красные каротиноиды капсантин и капсорубин, желтые β -каротин, зеаксантин и β -криптоксантин.
Эфирное масло гвоздики	Основные компоненты - эвгенол, метилэвгенол, эвгенил ацетат и β -кариофиллен
Эфирное масло орегано	Основные компоненты - карвакрол, γ -терпинен и тимол
Эфирное масло кориандра	Основные компоненты - линалоол, лимонен, γ -терпинен
Эфирное масло чеснока	Основные компоненты - диаллилди-, три- и тетрасульфиды
Экстракт красного перца	Маслянистая жидкость темно-красного цвета. Содержит каротиноиды и 6.6% капсаицина.
Экстракты розмарина P-126, P-127 и P-128	Дезодорированные экстракты розмарина EWSL4DF REL-126, EWSL4DFDS REL-127, EOSL4DF REL-128. Содержат 4% карнозиновой кислоты, флавоноиды, дитерпены и фенольные кислоты
Ионол	Синтетический антиоксидант ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол)
Аскорбил пальмитат	Синтетический антиоксидант
Смеси эфирных масел, экстрактов и антиоксидантов	
Эфирные масла гвоздики и орегано	1 : 1
Эфирные масла гвоздики и кориандра	1:1
Эфирные масла гвоздики, орегано и кориандра	1:2:1
Эфирные масла гвоздики, кориандра, чеснока и экстракт красного перца	1:1:1:1
Экстракт розмарина P-126 и ионол	1:1
Экстракт розмарина P-126 и аскорбил пальмитат	1:1
Экстракт розмарина P-126 и эфирное масло орегано	1:1

Раствор 100 мг экстракта паприки в 3 мл ацетона с добавлением 1, 2 или 4 % к массе экстракта антиоксидантов наносили на крахмал, после высушивания в вытяжном шкафу образцы имели ярко оранжевый цвет, их оставляли при комнатной температуре и естественном освещении для авто-окисления каротиноидов. Периодически отбирали навески по 30 мг, не окисленные каротиноиды экстрагировали 4 мл ацетона и регистрировали спектры поглощения в интервале длин волн 320-580 нм. Содержание каротиноидов в образцах рассчитывали как отношение оптической плотности хранившихся образцов к плотности свежеприготовленных (%). Метод имел хорошую воспроизводимость, стандартное относительное отклонение для 9 параллельных образцов составляло 5,7-8,3%.

В разработанном нами методе каротиноиды являются и субстратом для окисления, и индикатором этого процесса. Как видно из рисунка 1, в течение 17 суток самыми эффективными антиоксидантами были все эфирные масла. При дальнейшем авто-окислении масла орегано, кориандра и чеснока быстрее других теряли эффективность и через 26 суток только ионол и эфирное масло гвоздики сохраняли 50-60 % каротиноидов. Один из трёх розмариновых экстрактов (P-126) был более эффективен, чем два других препарата и имел активность близкую к активности аскорбил пальмитата. Экстракты розмарина содержали одно и то же количество (4 %) карнозиновой кислоты, основного антиоксиданта, но содержание флавоноидов и фенольных кислот, которые присутствуют в экстрактах [11, 12], вероятно, было разным, поэтому их эффективность значительно различалась. Самыми эффективными ингибиторами автоокисления каротиноидов были эфирное масло гвоздики и ионол. В эфирном масле гвоздики антиоксидантом был эвгенол, механизм реакций эвгенола и ионола с радикалами приведен в работах [13, 14].

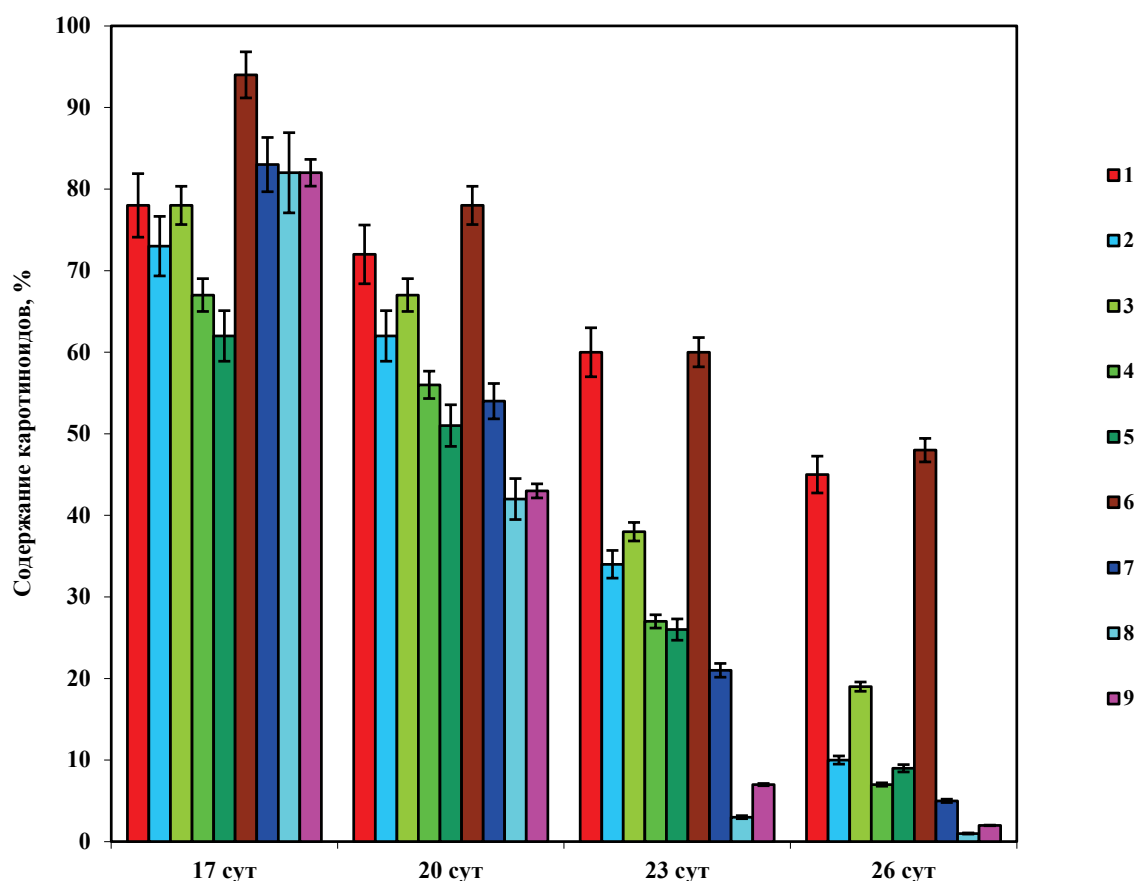


Рисунок 1. Относительное содержание каротиноидов при автоокислении образцов в присутствии антиоксидантов: ионола (1), аскорбил пальмитата (2), трех дезодорированных экстрактов розмарина Р-126 (3), Р-127 (4) и Р-128 (5), эфирных масел гвоздики (6), орегано (7), чеснока (8) и кориандра (9)

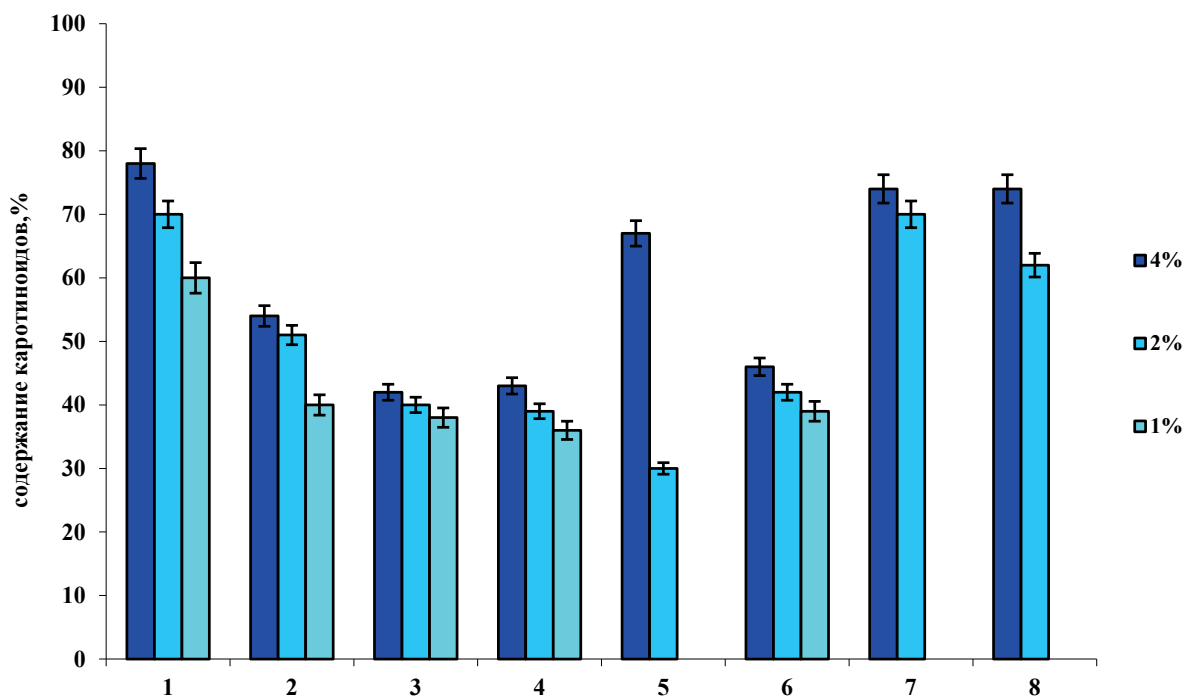


Рисунок 2. Влияние концентрации антиоксидантов (4, 2 или 1 % к массе экстракта паприки) на степень ингибирования автоокисления каротиноидов (20 дней). Антиоксиданты: 1 – эфирное масло гвоздики, 2 – эфирное масло орегано, 3 – эфирное масло кориандра, 4 – эфирное масло чеснока, 5 – экстракт розмарина Р-126, 6 – экстракт красного перца, 7 – ионол, 8 – аскорбил пальмитат

Из рисунка 2 видно, что эффективность ингибирования автоокисления каротиноидов зависела от концентрации сложным образом. Она снижалась не пропорционально снижению концентрации антиоксидантов с 4 до 2 и до 1 %. Так, для эфирных масел гвоздики и орегано двукратное снижение содержания масла с 4 до 2 % приводило к снижению степени окисления каротиноидов всего лишь на 4-6 %, а дальнейшее снижение с 2 до 1 % – на 8-10 %. Для эфирных масел кориандра и чеснока эти различия были еще меньше и составляли 2-4 %. Аналогичное поведение найдено и для аскорбил пальмитата и ионола. Только экстракт розмарина ингибировал автоокисление пропорционально его концентрации: при 4 % содержании степень ингибирования составляла 67 %, при 2 % – 29 %. Это означает, что компоненты эфирных масел, отвечающие за антиоксидантные свойства, присутствуют в достаточно больших количествах, и возможно продукты их окисления также обладают антиоксидантными свойствами. В экстрактах розмарина компоненты с антиоксидантными свойствами при взаимодействии с кислородными радикалами давали не активные продукты.

Пряности и продукты их переработки – эфирные масла и экстракты широко используют в пищевой промышленности в виде смесей для придания аромата продуктам, одновременно они способствуют снижению в них окислительных процессов и улучшению микробиологического статуса. Важным и малоизученным вопросом является взаимное влияние масел и экстрактов на их суммарную антиоксидантную активность. Мы приготовили несколько смесей эфирных масел и экстрактов и сравнили их свойства с индивидуальными составляющими этих смесей (табл. 2). В состав всех смесей входило эфирное масло гвоздики, которое при концентрации 2 % ингибировало окисление каротиноидов на 70 %, а при 1 % – на 60%. Добавление к этому маслу эфирного масла орегано не увеличивало суммарную активность смеси. Таким же образом вели себя смеси эфирных масел гвоздики и кориандра, гвоздики, орегано и кориандра. В смеси эфирных масел гвоздики, кориандра, чеснока и экстракта красного перца суммарная активность была на 8% меньше, чем активность одной гвоздики (табл. 2). Однако все эти различия были незначительны, можно уверенно утверждать, что при снижении концентрации ЭМ гвоздики и добавлении масел орегано, кориандра, чеснока и экстракта красного перца суммарная активность практически не изменялась и смеси сохраняли антиоксидантные свойства системы, близкие к свойствам самого активного компонента смеси – ЭМ гвоздики, при этом становилось возможным получение пищевых продуктов с большим разнообразием органолептических характеристик. Для изученных смесей эфирных масел мы не обнаружили ни аддитивных, ни синергетических эффектов. Аналогичные результаты были получены нами для смесей ЭМ гвоздики и орегано при изучении ингибирования этими маслами автоокисления полиненасыщенных жирных кислот [15, 16].

На рисунке 3 приведены величины степени ингибирования окисления каротиноидов паприки индивидуальными антиоксидантами (2 %, 20 дней) и их смесями с экстрактом розмарина Р-126. Как видно, экстракт розмарина в смеси 1:1 с эфирным маслом гвоздики на 18 % снижал активность масла гвоздики, но практически не изменял активность эфирного масла орегано, аскорбил пальмитата и ионола. Так же, как и для смесей эфирных масел (табл. 2) для смесей экстракта розмарина с другими антиоксидантами ни аддитивные, ни синергетические эффекты не были обнаружены.

Таблица 2. Степень ингибирования окисления каротиноидов паприки индивидуальными эфирными маслами (2 % и 1 %, 20 дней) и их смесями

Эфирное масло	Степень ингибирования при содержании			Смеси эфирных масел и их содержание, % к каротиноидам	Степень ингибирования
	4%	2%	1%		
ЭМ гвоздики	78 ± 5	70 ± 6	60 ± 5	ЭМ гвоздики (2 %) и орегано(2 %)	73 ± 6
ЭМ орегано	54 ± 4	51 ± 2	42 ± 2	ЭМ гвоздики (2 %) и кориандра (2 %)	66 ± 5
ЭМ кориандра	42 ± 3	40 ± 4	38 ± 4	ЭМ гвоздики (1 %), орегано (2 %) и кориандра (1 %)	69 ± 4
ЭМ чеснока	43 ± 5	40 ± 5	36 ± 2	ЭМ гвоздики (1 %), кориандра (1 %), чеснока (1 %) и экстракта красного перца (1 %)	52 ± 4

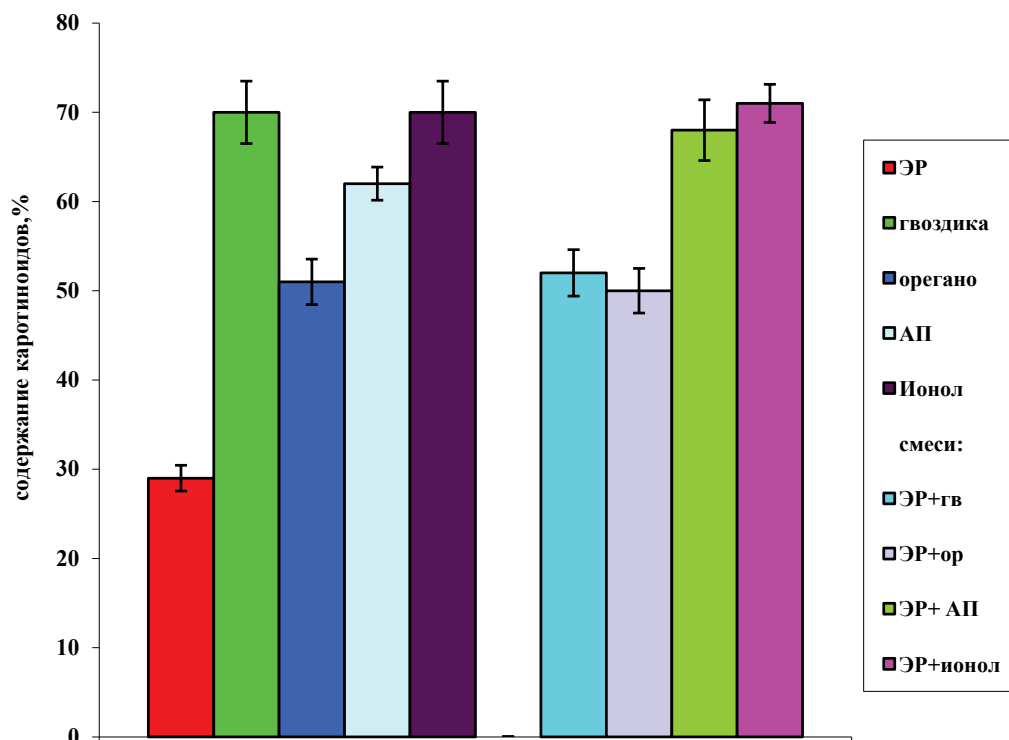


Рисунок 3. Степень ингибирования окисления каротиноидов паприки индивидуальными антиоксидантами (2 %, 20 дней) и их смесями с экстрактом розмарина P-126

Сравнение антиоксидантной активности эфирного масла гвоздики и орегано в методе с каротиноидами паприки с результатами прямого определения ингибирования этими маслами автоокисления полиненасыщенных жирных кислот [15, 16] показало, что результаты, получаемые этими двумя методами, были близки. На рисунке 4 приведены данные по ингибированию окисления самой ненасыщенной кислоты в натуральном рыбьем жире – докозагексаеновой. Как видно, эфирные масла гвоздики и орегано через 3 месяца авто-окисления сохранили 88 % и 74 % этой кислоты, а также 78 % и 54 % каротиноидов, но за 20 дней автоокисления. Однако прямое определение окисления полиненасыщенных жирных кислот проводится дорогим и длительным методом, включающим получение метиловых эфиров кислот, затем периодически, с интервалом в 1 месяц в течение 6 месяцев их анализируют газохроматографически.

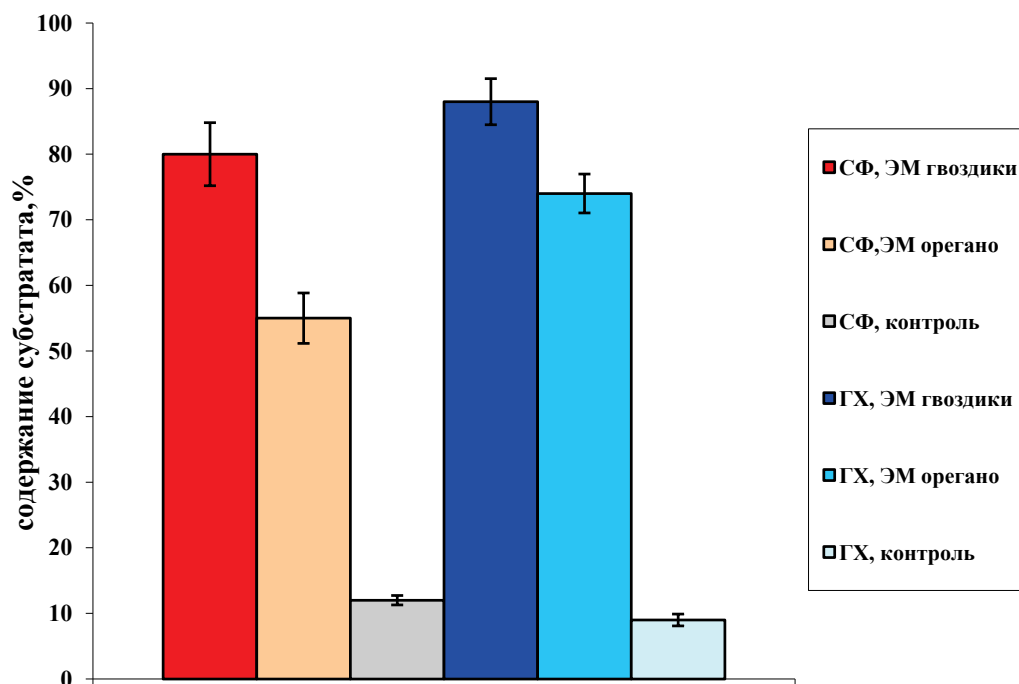


Рисунок 4. Сравнение антиоксидантной активности эфирных масел гвоздики и орегано спектрофотометрическим методом (СФ) с каротиноидами и ингибирования этими маслами автоокисления докозагексаеновой кислоты в рыбьем жире газохроматографическим методом (ГХ)

Каротиноиды окисляются намного быстрее и требуют простого спектрофотометрического анализа и, как видно из приведенных данных, получаемые результаты по ингибированию автоокисления каротиноидов эфирными маслами хорошо совпадают с антиоксидантным действием этих масел на полиненасыщенные жирные кислоты. Аналогичный результат был получен нами для линоленовой кислоты из льняного масла. Степень ингибирования автоокисления этой кислоты эфирными маслами гвоздики, орегано и кориандра в течение 4 месяцев соответствовала ингибированию каротиноидов паприки этими маслами в течение 20 дней [15, 16].

Таким образом, важнейшим преимуществом разработанного метода оценки антиоксидантных свойств природных и синтетических препаратов в системе на основе каротиноидов паприки является то, что каротиноиды практически идентичны ненасыщенным жирным кислотам по способности взаимодействовать с кислородными радикалами окислителями, поэтому полученные результаты хорошо отражают поведение антиоксидантов в реальных липид содержащих модельных системах и пищевых продуктах. За счет того, что каротиноиды (субстрат для окисления) нанесены на пористый нейтральный сорбент, процесс автоокисления проходит быстрее в данном методе исследования, чем в любом другом прямом методе определения ингибирующих свойств антиоксидантов.

Список литературы / References:

1. Shahidi F. Antioxidant in food and food antioxidants. *Nahrung*, 2000, vol. 44, no. 1, pp. 158-163.
2. Prior R.L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, vol. 53, no. 8, pp. 3101-3113.
3. Han R.-M., Chen C.-H., Tian Y.-X., Zhan, J.-P., Skibsted L. H. Fast regeneration of carotenoids from radical cations by isoflavonoid dianions: Importance of the carotenoid ketogroup for electron Transfer. *J. Phys. and Chem. A*, 2009, vol. 114, pp. 126-132.
4. Skibsted L. H. Vitamin and non-vitamin antioxidants and their interaction in food. *J. Food and Drug Analysis*, 2012, vol. 20, pp. 355-358.
5. Miguel M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 2010, vol. 15, pp. 9252-9287.
6. Roginsky V., Lissi E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 2005, vol. 92, pp. 235-254.
7. Mortensen, A., Skibsted, L. H. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Letters*, 1997, vol. 417, pp. 261-266.
8. El-Agamey A., Lowe G. M., McGarvey D. J., Mortensen A., Phillip D. M., Truscott T. G. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, vol. 430, pp. 37-48.
9. Deli J., Toth G. Carotenoid composition of the fruits of *Capsicum annuum* cv. Bovet 4 during ripening. *Zeitschrift. Lebensm. Unters. Forschung*, 1997, vol. 205, no. 5, pp. 388-391.
10. *Chemistry of Spices*. Eds. V.A. Parthasarathy, B. Chempakam, T.J. Zachariah. Oxfordshire: CAB Int., 2008, pp. 260-286.
11. Charles D.J. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. New York: Springer, 2013, 610 p.
12. Frankel E.N., Huang S.W., Aeschbach R., Prior E. Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, vol. 44, no. 1, pp. 131-135.
13. Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1997, vol. 30, pp. 609-615.
14. Hogg J. S., Lohmann D. H., Andrusell K. E. The kinetics of reaction of 2,2-Diphenyl-1 picrylhydrazyl with phenols. *Canadian J. Chem.*, 1961, vol. 39, pp. 1588-1594.
15. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Киселева В.И., Семенова М.Г. Ингибирование автоокисления льняного масла эфирными маслами и экстрактами пряно-ароматических растений. *Прикл. биохимия и микробиология*, 2015, т. 51, № 4, с. 417-423. [Misharina T.A., Alinkina E.S., Terenina M.B., Krikunova N. I., Kiseleva V. I., Semenova M. G. Inhibition of Linseed Oil Autooxidation by Essential Oils and Extracts from Spice Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 455-461. (In Russ.)]
16. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Воробьева А.К., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. Ингибирование окисления метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот эфирными маслами. *Прикл. биохимия и микробиология*, 2016, т. 52, № 3, с. 339-345. [Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorobjeva A.K., Terenina M.B., Krikunova N.I. Inhibition of oxidation of unsaturated fatty acids methyl esters by essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2016, vol. 52, no. 3, pp. 339-345. (In Russ.)]

EFFECT OF PLANT ANTIOXIDANTS ON AUTOOXIDATION OF PAPRICA CAROTENOIDS

Misharina T.A., Kiseleva V.I.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: tmish@rambler.ru

Abstract. A spectrophotometric method for the estimation of antioxidant properties of preparations has been developed on the base of inhibition of paprika carotenoids auto-oxidation. Carotenoids as paprika extract were coated on the porous inert polysaccharide as a support. In such case, the process of auto-oxidation developed faster than in any other method for estimation of antioxidants efficiency. It was shown that developed method was effective for comparison of the antioxidant activity of essential oils and extracts of spices, ionol and ascorbyl palmitate. The most important advantage of the method is that carotenoids are almost identical to polyunsaturated fatty acids in ability to interact with oxygen radicals. Therefore, the results obtained are in good accordance with behavior of antioxidants in real lipid-containing model systems and food products.

Key words: *spectrophotometry, antioxidants, paprika, carotenoids, essential oils and extracts of spices, ionol and ascorbyl palmitate.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ТВЕРДОФАЗНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИЕЙ

Мишарина Т.А.^{1,2}, Теренина М.Б.¹, Крикунова Н.И.¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН,
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

²Российский экономический университет им. Г.В.Плеханова,
Стремянный пер., 36, г. Москва, 117997; e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию: 08.06.2018

Аннотация. Метод твердофазной микроэкстракции в сочетании с капиллярной газожидкостной хроматографией использован для изучения состава биологически активных компонентов смесей эфирных масел, присутствующих в газовой фазе над образцом. Найдено, что эффективность извлечения летучих веществ зависела от состава образца, концентрации эфирных масел, от свойств и структуры летучих соединений, от природы полимерного сорбента, от времени извлечения. При увеличении концентрации исследуемых образцов эфирных масел увеличивалась сорбция более летучих неполярных монотерпенов и уменьшалась сорбция высококипящих ацетатов и сесквитерпенов. Максимальной сорбционной активностью и емкостью обладал полидиметилсилоксан, минимальной – смешанный полимер полидиметилсилоксана с карбоксеном. Найдено, что добавление воды к смеси эфирных масел приводило к увеличению экстракции неполярных соединений и уменьшению сорбции полярных веществ.

Ключевые слова: твердофазная микроэкстракция, капиллярная газожидкостная хроматография, летучие органические соединения, эфирные масла.

Известно, что эфирные масла обладают высокой биологической активностью, которая в значительной степени зависит от их состава [1-3]. Эфирные масла представляют собой сложные смеси, содержащие несколько десятков органических соединений. Для решения ряда экологических проблем таких, как определение состава летучих органических соединений (ЛОС), присутствующих в воздухе и выделяемых различными биологическими объектами, в том числе пищевыми продуктами, микроорганизмами, растениями, весьма актуальной является разработка метода их анализа. Высокочувствительная капиллярная газовая хроматография (ГХ) является одним из основных методов анализа сложных смесей. Наиболее широко используемый способ подготовки пробы для ГХ анализа включал в себя гидродистилляцию, при которой летучие вещества отгоняли с водяным паром в присутствии органического растворителя [4-6]. Затем органический экстракт сушили, концентрировали и анализировали газохроматографически. В последние годы большое распространение получил метод твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) в комбинации с ГХ при определении летучих соединений природных или биологических образцов [7-12]. В этом методе летучие соединения сорбируют и концентрируют с помощью специальных устройств на слое жидкого или твердого полимера (или смеси полимеров), затем их термически десорбируют в инжекторе хроматографа и анализируют. Основные преимущества ТФМЭ по сравнению с традиционными методами – короткое время анализа, отсутствие растворителя, высокая чувствительность и селективность.

Результаты анализа методом ТФМЭ зависят от типа используемого сорбента, температуры и времени экстракции, состава и концентрации исследуемых веществ [8, 13-16]. Биологические объекты содержат большое количество летучих компонентов, принадлежащих к разным классам органических соединений, поэтому особенно важен выбор селективных сорбентов. В качестве сорбентов наиболее часто используют полимерные покрытия: полидиметилсилоксан (ПДМС), полиакрилат (ПА) или комбинированные сорбенты, состоящие из нескольких компонентов. К ПДМС добавляют дивинил- или дифенилбензолы, карбоксен, что приводит к увеличению полярности сорбента, и, следовательно, к увеличению экстракции полярных соединений [13-16].

В работе [17], используя различные количества смеси эфирных масел, было показано, что метод ТФМЭ позволяет с хорошей воспроизводимостью определять состав компонентов в газовой фазе на основе абсолютных значений площадей хроматографических пиков, получаемых капиллярной газовой хроматографией. В случае образцов неизвестного состава или содержащих большое число соединений различной структуры необходимо проводить предварительную оптимизацию условий проведения анализа, включая выбор наиболее эффективного и селективного полимерного сорбента по отношению к компонентам исследуемой смеси.

Цель работы – изучить влияние состава полимерных сорбентов и состава образца на эффективность определения летучих соединений в газовой фазе методами ТФМЭ и капиллярной газо-жидкостной хроматографии.

Таблица 1. Содержание компонентов исходной смеси эфирных масел

№ пика	Соединение	%	№ пика	Соединение	%
1	α -Туйен	0,29	15	4-Терпинеол	0,47
2	α -Пинен	3,52	16	α -Терпинеол	0,60
3	Камфен	0,84	17	Карвон	9,07
4	Сабинен	2,6	18	Линалилацетат	0,36
5	β -Пинен	3,25	19	Терпенилацетат	7,08
6	β -Мирцен	1,09	20	Нерилацетат	0,60
7	α -Фелландрен	0,37	21	Геранилацетат	0,75
8	3-Карен	3,06	22	β -Элемен	0,33
9	p-Цимен	1,59	23	β -Кариофиллен	6,87
10	Лимонен, цинеол	30,84	24	Куркумен	2,44
11	γ -Терпинен	2,56	25	Зингибирен	5,65
12	α -Терпинолен	0,33	26	β -Бисаболен	0,72
13	Линалоол	8,39	27	β -Селинен	2,00
14	Камфора	0,16	28	Сесквифелландрен	3,02

Модельная смесь летучих соединений приготовлена из эфирных масел (ЭМ) и имела следующий состав: 15,5 % лимона 5-кратного, 20,6 % имбиря, 19,6 % черного перца, 18,5 % кардамона, 10,3 % кориандра и 15,5 % тмина, компоненты смеси и их содержание приведены в таблице 1. Для извлечения и концентрирования летучих веществ из газовой фазы использовали специальное оборудование ("Supelco", США). В держателе шприца установлена подвижная стальная игла, на конце которой прикреплено термостойкое силиконовое микроволокно (фибра), имеющее развитую поверхность. Это волокно покрыто слоем полимерного сорбента (ПС), который по составу близок к неподвижным фазам, применяемым в капиллярных газохроматографических колонках. Использовали 3 вида ПС: полидиметилсилоксан (ПДМС), дивинилбензол (ДВБ) и карбоксен (КАР). Перед каждым анализом ПС выдерживали в инжекторе хроматографа в токе гелия при 250 °C в течение 30 мин.

В колбу на 100 мл наливали 30 мл дистиллированной воды и добавляли 1, 2, 3, 4 или 5 мкл смеси ЭМ, встряхивали, плотно закрывали и выдерживали 40 минут при комнатной температуре для установления равновесия. Для сравнения извлечения ЛС из газовой фазы над безводной смесью эфирных масел и над водным раствором в колбу на 100 мл добавляли 3 мкл смеси ЭМ без растворителя. Затем через специальный затвор из фольги в колбу вводили шприц с ПС, проводили экстракцию при комнатной температуре в течение 20 мин, затем выделенные соединения термически десорбировали в инжекторе газового хроматографа.

Газохроматографический анализ проводили на хроматографе «Кристалл 2000 М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м x 0,32 мм, толщина слоя фазы $d_f = 0,25$ мкм, фирма "Supelco", США) при программировании температуры колонки от 60 до 250 °C со скоростью 4 °C/мин при температуре детектора и инжектора 250 °C.

Идентификацию соединений в смеси эфирных масел проводили на основе индексов удерживания путем их сопоставления с литературными или экспериментальными данными, полученными нами. Для количественного определения содержания каждого компонента использовали абсолютную величину площади его пика в условных единицах (уе), эквивалентных величинам, рассчитанным интегратором как мВ·с. Стандартное отклонение средних величин из 3-х измерений не превышало 5 % (относительных). Математическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 10.

ГХ анализ эфирного раствора смеси ЭМ показал, что в ней присутствовали компоненты, принадлежащие к различным классам органических соединений (табл. 1), включая моно- и сесквитерпеновые углеводороды, спирты и карбонильные соединения. Как видно из таблицы 1, основными компонентами смеси были лимонен и цинеол (около 30 %). Содержание веществ с функциональными группами (линалоол, карвон, терпенилацетат) и сесквитерпеновых углеводородов кариофиллена и зингибирена было меньше и составляло от 6 до 10%.

В табл.2 приведены площади пиков веществ, выделенных из газовой фазы над водным раствором смеси ЭМ четырьмя полимерными сорбентами. Сравнение этих данных с процентным содержанием компонентов в исходной смеси показало, что важным фактором, влияющим на эффективность определения веществ в газовой фазе методом ТФМЭ, является растворимость компонентов смеси ЭМ в воде. Так, содержание линалоола и карвона в смеси ЭМ было 8-9 %, однако их содержание в экстрагированных с сорбентов смесях не превышало 0,7 %, то есть степень их перехода из водного раствора в газовую фазу была меньше 10 %. Эффективность извлечения органических веществ из газовой фазы в значительной степени зависела от состава и способа обработки ПС. Найдено, что одинаковые по составу и толщине полимерные пленки из ПДМС/ДВБ (табл. 2), но отличающиеся по способу обработки, обладали различной сорбционной активностью. Полимерная пленка № 2 стабилизирована специальной обработкой (фирма "Supelco") и может быть использована для экстракции органических соединений из газовой фазы и из водного раствора. Этот сорбент извлекал монотерпены в 2-3 раза, а сесквитерпены в 1,1-1,3 раза больше, чем ПС № 1. В результате, суммарная площадь пиков компонентов смеси, выделенных сорбентом № 2, была в 1,6 раза больше, чем сорбентом № 1. Возможно, сорбент № 2 имел

большее количество сорбирующего полимера, поэтому его сорбционная эффективность была выше, чем полимера № 1, имевшего тот же состав и ту же толщину слоя полимера. Однако сравнение процентного состава двух экстрактов, полученных этими сорбентами, показало, что ПС № 2 изменял соотношение компонентов смеси по сравнению с исходным в большей степени, чем ПС № 1 (табл. 2).

Мы сравнили эффективность сорбции на сорбентах, отличающихся составом и толщиной пленки. Известно, что ПДМС обладает высокой чувствительностью к неполярным соединениям [8-13]. Этот сорбент значительно больше удерживал терпеновые и сесквитерпеновые углеводороды, а полярные соединения лучше сорбировались на смешанных полимерах, содержащих ПДМС с добавками ДВБ или карбоксена (табл. 2). В работе [8] показано, что для анализа летучих соединений кофе, в состав которых входили в основном полярные соединения, наиболее эффективными были сорбенты с ПДМС/ДВБ, а наименее эффективными - с индивидуальным ПДМС [8]. При исследовании продуктов окисления креветок (альдегидов, кетонов, спиртов и пирозинов) найдено, что наибольшая сорбция этих соединений наблюдалась на смешанных полимерах ПДМС/КАР и ПДМС/ДВБ [14]. Изучение состава метоксифенольных компонентов чая методом ТФМЭ показало, что наибольшей эффективностью связывания по отношению к этому классу соединений обладал сорбент ПДМС/КАР, а наименьшей – ПДМС [18]. Вероятно, комбинированный сорбент ПДМС/КАР обладает высокой селективностью к полярным соединениям. Таким образом, при выборе ПС необходимо учитывать состав исследуемой смеси.

Результаты нашей работы показали, что количество сорбированных терпеновых углеводородов на ПДМС было в 23 раза больше чем на ПДМС/ДВБ и ПДМС/КАР. По отношению к сесквитерпеновым углеводородам сорбенты ПДМС и ПДМС/ДВБ проявляли равную сорбционную активность, а активность ПДМС/КАР была в 1,5-2 раза меньше. Добавление карбоксена увеличивало полярность фазы, что приводило к увеличению эффективности сорбции полярных соединений. Функциональные соединения одинаково удерживались ПДМС и ПДМС/ДВБ и меньше ПДМС/КАР. Показано, что наиболее высокой сорбционной эффективностью обладал сорбент № 3, содержащий неполярный полимер ПДМС. В сумме он извлекал в 1.5 раза больше веществ по сравнению с сорбентом № 2 и в 2.3 раза больше, чем ПС № 1. Такая эффективность могла быть обусловлена тем, что ПС №3 имел самую большую толщину пленки (100 мкм). Сравнение суммарных площадей пиков показало, что по сорбционной активности к компонентам эфирных масел, содержащих в основном неполярные соединения, ПС располагаются в следующий ряд: ПДМС > ПДМС/ДВБ > ПДМС /КАР > ПДМС.

Таблица 2. Площади пиков летучих соединений, экстрагированных из газовой фазы над водным раствором смеси эфирных масел различными полимерными сорбентами

№ пика	Соединение	Площади пиков летучих соединений, экстрагированных полимерными сорбентами, условные единицы			
		ПДМС/ДВБ № 1	ПДМС/ДВБ № 2	ПДМС, №3	КАР/ ПДМС, №4
1	α -Туйен	26	37	84	44
2	α -Пинен	271	445	930	420
3	Камфен	70	117	239	106
4	Сабинен	243	473	835	367
5	β -Пинен	339	602	1139	502
6	β -Мирцен	150	320	471	755
7	α -Фелландрен	51	89	166	105
8	3-Карен	436	845	1460	746
9	п-Цимен	226	515	692	518
10	Лимонен + цинеол	4161	8198	13133	8083
11	γ -Терпинен	520	1123	1638	909
12	α -Терпинолен	85	175	245	160
13	Линалоол	79	104	105	54
14	Камфора	2	следы	6	6
15	4-Терпинеол	3	следы	2	3
16	α -Терпинеол	3	следы	1	4
17	Карвон	87	106	110	91
18	Линалилацетат	37	48	56	30
19	Терпенилацетат	998	1371	1363	750
20	Нерилацетат	195	279	304	217
21	Геранилацетат	256	376	396	279
22	β -Элемен	92	134	136	85
23	β -Кариофиллен	1996	2727	2826	1892
24	α -Куркумен	383	499	462	308
25	Зингибирен	800	915	918	446
26	β -Бисаболен	112	122	124	98
27	β -Селинен	267	304	299	152
28	Сесквифелландрен	383	426	421	206
Суммарная площадь пиков		12276	20429	28567	17336

Для определения механизма сорбции летучих веществ на полимерных сорбентах и оценки влияния физико-химического состояния и состава образца на степень извлечения летучих веществ был выбран комбинированный сорбент ПДМС/ДВБ № 2. Исследование концентрационной зависимости показало, что с увеличением концентрации смеси ЭМ в растворе содержание спирта линалоола и кетона карвона увеличивалось практически линейно (рис. 1а). Площади пиков монотерпеновых углеводородов, сорбированных из газовой фазы, имели одинаковые зависимости от концентрации этих веществ в исходном растворе (рис. 1б). Кривые сорбции имели S-образный вид: с увеличением концентрации смеси ЭМ в растворе сорбция монотерпеновых углеводородов увеличивалась не монотонно, кривая имела перегиб при содержании смеси 3 мкл, свидетельствующий о кооперативности этого процесса [19]. При высоком содержании смеси ЭМ кривая сорбции выходила на плато, для некоторых веществ обнаружено снижение сорбции, это свидетельствует об ограниченной ёмкости сорбента и о конкуренции между компонентами ЭМ за места связывания. О наличии таких процессов свидетельствуют зависимости, полученные для сесквитерпеновых углеводородов (рис. 1в). Площади пиков этих веществ незначительно увеличивались при увеличении содержания смеси ЭМ от 1 до 2 мкл, затем они монотонно снижались, при этом площадь пика кариофиллена из раствора с содержанием смеси ЭМ 5 мкл была меньше в 1,4 раза, чем площадь пика из раствора с 1 мкл смеси ЭМ. Для всех других сесквитерпеновых углеводородов эта разница составляла около 60 %. Найдено, что структура ацетатов влияла на характер их сорбции из водных растворов с различным содержанием смеси ЭМ. Снижение сорбции в 1,4 раза из газовой фазы над более концентрированными растворами по сравнению с самым разбавленным найдено для геранилацетата, для нерилацетата обнаружено слабое, в 1,16 раза, снижение площади пика при увеличении его концентрации (рис. 1г). Извлечение терпинилацетата увеличивалось в 2,4 раза при увеличении содержания смеси ЭМ в водном растворе от 1 до 3 мкл, при дальнейшем увеличении оно не изменялось (рис. 1г). Ранее при изучении сорбционных характеристик неполярных полисахаридов также было найдено значительное влияние структуры алифатических, насыщенных, ненасыщенных и циклических одорантов и углеводородов на их связывание этими полисахаридами [15-17]. В любом случае, при определении летучих веществ необходимо иметь в виду, что полимерные сорбенты имеют ограниченную ёмкость и для получения результатов методом ТФМЭ не требуются образцы большого размера.

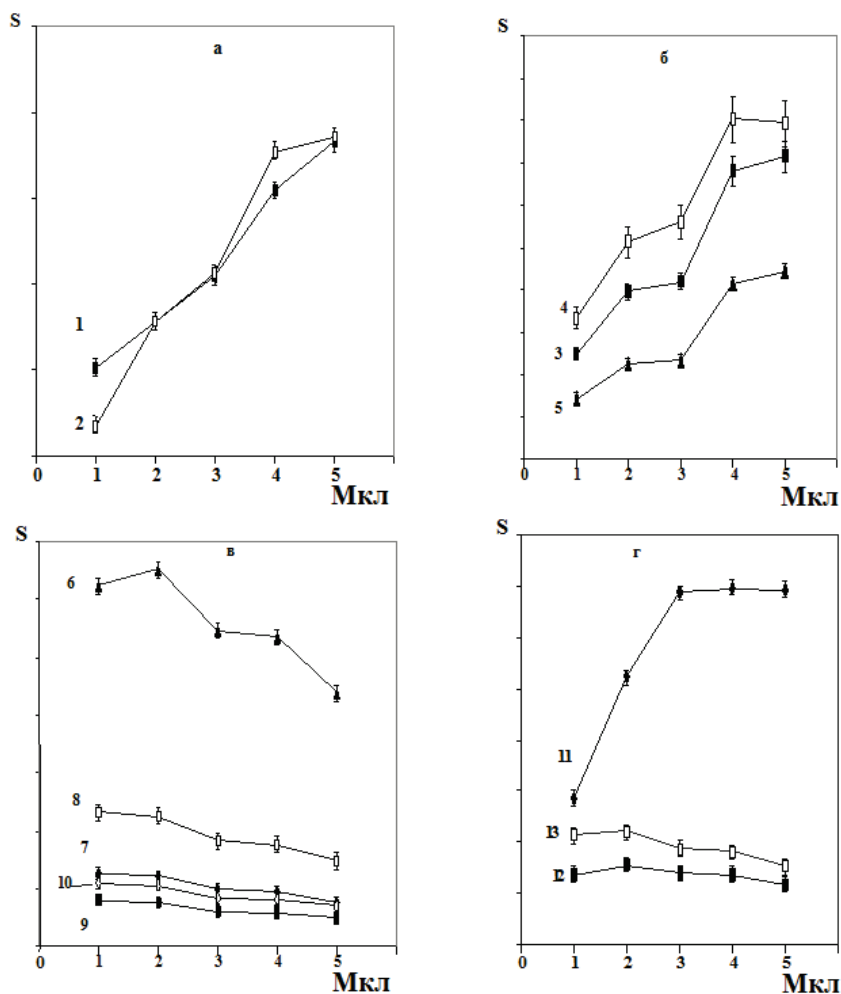


Рисунок 1. Площади пиков (а) линалоола (1), карвона (2) и 3-карена (3), (б) γ -терпинен (4), сабинен (5), β -кариофиллен (6), α -куркумен (7) и зингиберен (8), (в) β -селинен (9) и – сесквифелландрен (10) и (г) терпинилацетат (11), нерилацетат (12) и геранилацетат (13), полученных при газохроматографическом анализе 1, 2, 3, 4 и 5 мкл смеси эфирных масел с применением сорбента ПДМС/ДВБ № 2

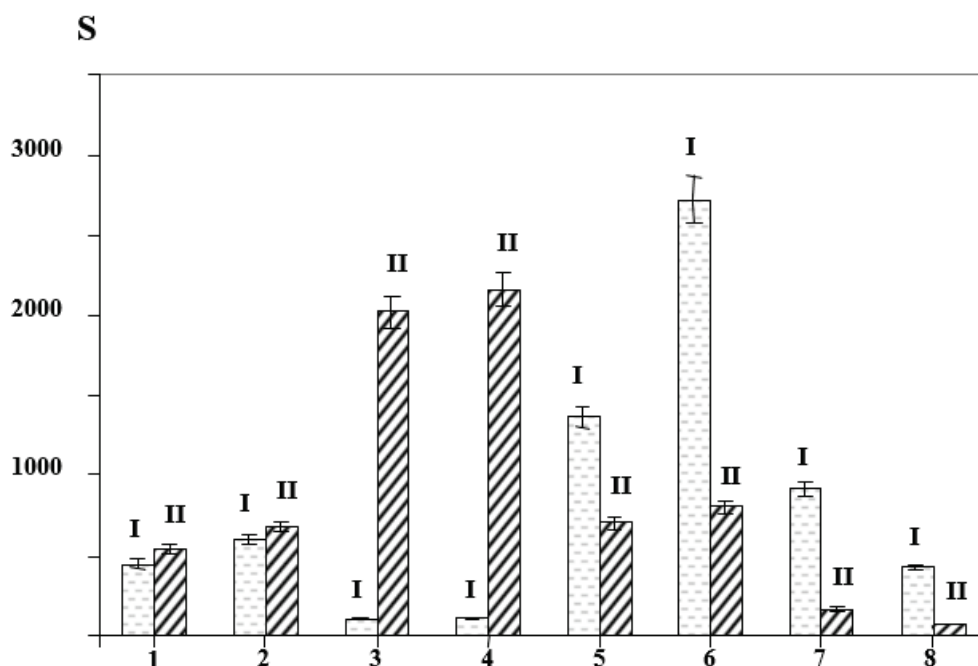


Рисунок 2. Площади пиков α -пинена (1), β -пинена (2), линалоола (3), карвона (4), терпинилацетата (5), β -кариофиллена (6), зингибериена (7) и сесквифелландрена (8), входящих в состав компонентов 3 мкл смеси эфирных масел и полученных сорбцией из газовой фазы над водным раствором (I) или над чистой смесью (II) сорбентом ПДМС/ДВБ № 2

Известно, что летучесть низкомолекулярных органических веществ существенно зависит от состава образца, макрокомпоненты которого влияют на растворимость веществ, особенно в водной или липидной фазе, на их удерживание за счет образования супрамолекулярных структур, комплексов включения с полисахаридными цепями и т.д. [1, 15-17]. Мы сравнили извлечение сорбентом ПДМС/ДВБ № 2 компонентов из 3 мкл чистой смеси ЭМ и из водного раствора (3 мкл смеси масел в 30 мл воды). Полученные различия в величинах площадей пиков обусловлены растворимостью и взаимодействием между собой органических веществ в чистой смеси ЭМ или влиянием воды на летучесть компонентов смеси ЭМ. На рисунке 2 приведены средние величины площадей пиков веществ, принадлежащих к разным классам органических соединений. Найдено, что эффективность извлечения монотерпеновых углеводородов из водного раствора на 20 % меньше, чем из безводной смеси, то есть эти углеводороды незначительно связываются водой. Уменьшение эффективности извлечения α -пинена и лимонена при добавлении воды отмечали в работе [18]. Максимальные различия наблюдались в случае полярных соединений, способных образовывать водородные связи с молекулами воды, за счет этого их содержание в газовой фазе над раствором было намного меньше, чем над смесью масел. Площади пиков линалоола и карвона, полученные для чистого масла, были в 20 раз больше, чем для водного раствора. В работе [13] было найдено, что экстракция терпинеолов и эвгенола уменьшалась в 2-3 раза при добавлении воды. В нашем случае, содержание двух терпинеолов в смеси масел было низким (0,47 и 0,60 %, табл.1), летучесть из воды также низкая и они не были обнаружены в газовой фазе над водным раствором смеси ЭМ. Над чистой смесью масел площади их пиков были такими же, как и для нерилацетата, содержание этих трех веществ в смеси ЭМ было близким (табл. 1). Как видно из рисунка 2, добавление воды увеличивало летучесть ацетатов, площади их пиков были больше в 2-3 раза по сравнению со смесью ЭМ без растворителя. Еще большие различия обнаружены для неполярных сесквитерпеновых углеводородов, их летучесть из водного раствора была в 6 раз выше, чем из смеси масел, то есть сесквитерпены малорастворимы в воде и для их определения в изучаемые образцы можно добавлять воду. В результате исследования найдено, что добавление воды к смеси органических веществ незначительно увеличивало содержание в газовой фазе монотерпеновых углеводородов, существенно увеличивало содержание сложных эфиров и сесквитерпенов, но практически полностью «вычитало» полярные соединения, такие как спирты и кетоны.

Таким образом, проведенное исследование показало, что самая высокая степень извлечения неполярных монотерпенов достигается на неполярном сорбенте полидиметилсилоксане (ПДМС), близкие результаты получены на смешанных сорбентах - стабилизированном полидиметилсилоксане и дивинилбензоле (ПДМС/ДВБ) и полидиметилсилоксане и карбоксене (ПДМС/КАР). Ацетаты и сесквитерпены эффективнее извлекались ПДМС и ПДМС/ДВБ № 2 и менее всего на сорбенте ПДМС/КАР. Степень сорбции ПДМС/ДВБ № 2 сложным образом зависела от увеличения содержания веществ в газовой фазе. Монотерпеновые углеводороды связывались кооперативно, связывание ацетатов и сесквитерпенов снижалось с увеличением их концентрации в газовой фазе. Этот метод очень удобен и информативен для изучения состава композиций летучих веществ, определяющих аромат различных образцов, в первую очередь пищевых продуктов. При этом следует иметь в виду, что реальный состав этих же веществ в самом продукте будет значительно отличаться от

состава в газовой фазе. Так, спирты и кетоны, а также другие полярные соединения, хорошо растворимые в воде, не переходили в газовую фазу и поэтому не обнаруживались всеми полимерными сорбентами. Более того, они не извлекались и из водного раствора, для таких образцов необходимо использовать другие методы. Также метод ТФМЭ можно использовать для оценки влияния состава и свойств систем, содержащих различные полимеры, липиды, воду и другие ингредиенты, на связывание и удерживание неполярных летучих веществ. Результаты работы показали, что методом ТФМЭ можно успешно решать различные аналитические задачи, но необходимо иметь предварительные сведения о составе образца. В этом случае можно наилучшим образом выбрать тип микроволокна, размеры образца, способ его предварительной подготовки, время и условия извлечения летучих веществ.

Список литературы / References:

1. *Chemistry of spices*. Oxfordshire: CAB Int., ed. V.A. Parthasarathy, B. Chempakam, T.J. Zachariaah, 2008, pp. 260-268
2. Charles D.J. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. *New York: Springer*, 2013, 610 p.
3. *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer Verlag, ed. R.G. Berger, 2007, pp. 43-116.
4. Ettore L.S. *Headspace Analysis of Food and Flavours: Theory and Practice*. New York: Academic Plenum Publishers, 2001, pp. 347.
5. Мишарина Т. А. Определение летучих органических веществ в газовой фазе с применением пористых адсорбентов. *Ж. Аналит. Химии*, 2010, т. 26, № 2, с.132-139. [Misharina T.A. Determination of volatile organics in gaseous phase using porous adsorbents. *J. Analyt. Chem*, 2010, vol. 65, no. 2, pp.127-139. (In Russ.)]
6. Ayayi E.O., Sadimenko A.P., Afolayan A.J. GC-MS evaluation of Cymbopogon citrates (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. *Food Chem.*, 2016, vol. 209, no. 1, pp. 262-266.
7. Arthur C.L., Pawliszyn J. Solid-phase microextraction method with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62, no. 7, pp. 1843-1852.
8. Roberts D.D., Polien P., Milo C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavour compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, vol. 48, no. 6, pp. 2430-2437.
9. Wardenky W., Michulec M., Curylo J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analyses. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, vol. 39, pp. 703-717.
10. Ouyang G., Vuckovic D., Pawliszyn. Nondestructive sampling of living systems using *in vivo* solid-phase microextraction. *J. Chem. Rev.*, 2011, vol. 111, no. 4, pp. 2784-2815.
11. Зайцев В.Н., Зуй М.Ф. Твердофазное микроэкстракционное концентрирование. *Ж. Аналит. Химии*, 2014, т. 69, № 8, с. 787-801. [Zaitsev V.N., Zui M.F. Preconcentration by solid-phase microextraction. *J. of Analyt. Chem.*, 2014, vol. 68, no. 8, pp. 715-727. (In Russ.)]
12. Савельева Е.И., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. Применение твердофазной микроэкстракции в сочетании с газовой хромато-масс-спектрометрией для исследования летучих продуктов биосинтеза, выделяемых растениями и микроорганизмами. *Ж. Аналит. Химии*, 2014, т. 69, № 7, с. 675-682. [Savelieva E.I., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. Using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the study of the volatile products of biosynthesis released by plants and microorganisms. *J. Analyt. Chem.*, 2014, vol. 69, no. 7, pp.609-615. (In Russ.)]
13. Bajer T., Ligor M., Ligor T., Buszewski D. Design of the extraction process for terpenes and other volatiles from allspice by solid-phase microextraction and hydrodistillation. *J. Separation Sci.*, 2016, vol. 39, no. 4, pp. 769-774.
14. Souza H. A.L., Bragagnolo N. New method for the extraction of volatile lipid oxidation products from shrimp by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and evaluation of the effect of salting and drying. *J. Agric. Food Chem.*, 2014, vol. 62, no. 3, pp. 590-599.
15. Du L., Wang Ch., Li J., Xiao D., Li Ch., Xu Y. Optimization of headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for detecting methoxyphenolic compounds in pu-erh tea. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, vol. 61, no. 2, pp. 561-568.
16. Moradi M., Kaykhali M., Ghiasvand A.R., Shadabi S., Salehinia A. Comparison of headspace solid-phase microextraction, headspace single-drop microextraction and hydrodistillation for chemical screening of volatiles in *Myrtus Communis L.* *Phytochem. Anal.*, 2012, vol. 23, pp. 379-386.
17. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. Определение летучих органических веществ методом твердофазной микроэкстракции. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2017, т. 53, № 5, с.534-543. [Misharina T.A., Terenina M.B., Krikunova N.I. Determination of volatile organic compounds by solid-phase microextraction. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol. 53, no. 5, pp. 534-543. (In Russ.)]
18. Bajer T., Ligor M., Ligor T., Buszewski D. Design of the extraction process for terpenes and other volatiles from allspice by solid-phase microextraction and hydrodistillation. *J. Separation Sci.*, 2015, vol. 39, no. 4, pp. 769-774.
19. Misharina T.A., Terenina M.B., Krikunova N.I., Kalinchenko M.A. Sorption of components from of odorants by polysaccharides of starch, chitosan and carrageenan. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42, no. 1, pp. 111-115.

**DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS
BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION****Misharina T.A.^{1,2}, Terenina M.B.¹, Krikunova N.I.¹**¹Emmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
*Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia*²Plekhanov Russian Economic University,
Stremyanin str., 36, Moscow, 117997, Russia; e-mail: tmish@rambler.ru

Abstract. The solid-phase microextraction method in combination with capillary gas-liquid chromatography was used to study the composition of the biologically active components of a mixture of essential oils present in the gas phase above the sample. It was found that the extraction efficiency of volatile substances depended on the composition of the sample, the concentration of essential oils, the properties and structure of volatile compounds, the nature of the polymer sorbent, and the extraction time. The increase in concentration of essential oils in test samples resulted in the increase of sorption of more volatile nonpolar monoterpenes and decrease of sorption of high-boiling acetates and sesquiterpenes. It was found that polydimethylsiloxane had the highest sorption activity and capacity, a mixed polymer of polydimethylsiloxane with carboxene showed the minimal values. The addition of water to a mixture of essential oils led to an increase in the extraction of nonpolar compounds and a decrease in the sorption of polar substances.

Key words: *solid-phase microextraction, capillary gas-liquid chromatography, volatile organic compounds, essential oils.*

КАТИОННЫЕ МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫЕ ТИАКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В КАЧЕСТВЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ДНК

Пронкин П.Г., Шведова Л.А., Татиколов А.С.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, д. 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: pronkinp@gmail.com

Поступила в редакцию: 13.06.18

Аннотация. Изучены спектрально-флуоресцентные свойства новых катионных тиакарбоцианиновых красителей – 3,3'-диметил-9-фенилтиакарбоцианин-иодида (ДФТЦ) и его аналога 3,3'-диэтил-9-(2-гидрокси-4-метоксифенил)тиакарбоцианин-иодида (ДМФТЦ). Несмотря на наличие объёмных заместителей в *мезо*-положении полиметиновой цепи эти красители в растворах находятся в формах *транс*-изомеров независимо от полярности растворителя. В растворе фосфатного буфера красители образуют нековалентные комплексы с ДНК. Взаимодействие с ДНК протекает с образованием комплексов красителей как в мономерной, так и в агрегированной форме и сопровождается изменениями спектрально-флуоресцентных свойств красителей. Взаимодействие мономерных молекул ДФТЦ и ДМФТЦ с ДНК не приводит к сдвигу изомерного равновесия в сторону *цис*-изомера и протекает преимущественно через *транс*-изомер. Методом импульсного фотолиза изучено триплетное состояние молекул красителей, связанных в комплекс с ДНК. Повышение температуры плавления ДНК свидетельствуют в пользу образования красителями ДФТЦ и ДМФТЦ комплексов интеркаляции.

Ключевые слова: тиакарбоцианиновые красители, ДНК, нековалентный комплекс, спектрально-флуоресцентные зонды, импульсный фотолиз, интеркаляция.

Цианиновые красители обладают интересными спектрально-флуоресцентными свойствами [1, 2], наличие гибкой полиметиновой цепи определяет быструю безызлучательную дезактивацию энергии возбужденного электронного состояния, эффективно конкурирующую с процессами флуоресценции и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние ($S_1 \rightarrow T$) [2]. За счет вращения фрагментов молекул красителей вокруг связей полиметиновой цепи возможна *цис-транс*-изомеризация [1, 2]. Для карбоцианиновых красителей, имеющих заместители в *мезо*-положении полиметиновой цепи, в растворах наблюдается равновесие между их полностью *транс*- и *цис*-изомерами [1-3].

Цианиновые красители способны образовывать нековалентные комплексы с белками и нуклеиновыми кислотами, при этом свойства красителей резко изменяются [1, 2, 4, 5]. Комплексообразование приводит к росту квантовых выходов флуоресценции (и триплетного состояния) связанных молекул красителей, что делает возможным их использование в качестве спектрально-флуоресцентных и фотохимических зондов [2, 5-8]. В этом качестве перспективны *мезо*-замещенные тиакарбоцианиновые красители, поскольку спектрально-флуоресцентные свойства *транс*- и *цис*-изомеров красителей существенно различаются [1, 2, 4, 6-8].

Таким образом, для разработки новых зондов на биомакромолекулы актуальным является изучение взаимодействия *мезо*-замещенных тиакарбоцианинов с биомолекулами и исследование их фотофизических свойств. В настоящей работе спектрально-флуоресцентными методами изучалось взаимодействие с ДНК *in vitro* двух *мезо*-замещенных тиакарбоцианиновых красителей (рис. 1): 3,3'-диметил-9-фенилтиакарбоцианин-иодида (ДФТЦ) и его аналога 3,3'-диэтил-9-(2-гидрокси-4-метоксифенил)тиакарбоцианин-иодида (ДМФТЦ).

Методика эксперимента. В работе использовали красители, любезно предоставленные научным центром НИИХИМФОТОПРОЕКТ и Институтом органической химии РАН. Использовалась коммерческая ДНК цыпленка (Реанал, Венгрия). Концентрация ДНК определялась спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции пары оснований $\epsilon = 13200 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\lambda = 260 \text{ нм}$ [9]. В качестве растворителей использовали водный раствор фосфатного буфера (рН 7, 20 ммоль л^{-1}), этанол, ацетонитрил, диметилсульфоксид, 1,4-диоксан (ч.д.а.). Измерения спектров поглощения красителей проводились на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), флуоресцентные измерения – на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия). Квантовые выходы флуоресценции красителей (ϕ_f) определялись путем сравнения со стандартом (3,3'-диэтилтиакарбоцианин-иодид, ДТЦ, $\phi_{f, \text{ДТЦ}} = 5\%$ в этаноле [10]).

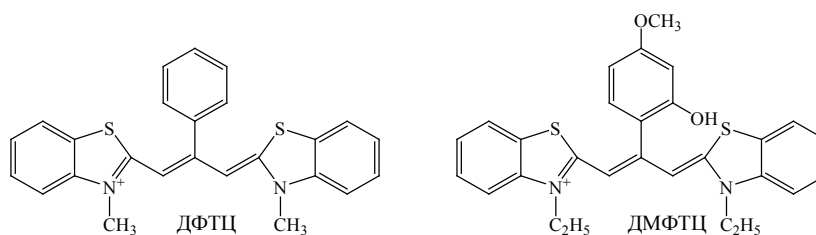


Рисунок 1. Структурные формулы исследованных красителей

Для изучения триплетного состояния красителей в присутствии ДНК ($c_{\text{ДНК}} \sim 4,0 \times 10^{-4}$ моль л⁻¹) использовали установку импульсного фотолиза с возбуждением ксеноновой лампой (энергия 50 Дж, $\tau_{1/2} = 10$ мкс) [7], растворы обескислороживали на вакуумной установке. В экспериментах по тушению триплетных состояний кислородом для определения давления воздуха в рабочей кювете использовалась манометрическая установка.

Эксперименты по температурной денатурации ДНК на спектрофотометре с регистрацией при $\lambda = 260$ нм при концентрациях, обеспечивающих насыщение ДНК красителем во всем температурном диапазоне ($c_{\text{ДНК}} = 5,02 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹, $c_{\text{кр}} \sim 1,0 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹). Температуру измеряли путем введения термпары (медь-константан) в кювету.

Наблюдаемые константы комплексообразования красителей с ДНК (K_a , л/моль) определялись по данным спектров флуоресценции с использованием зависимости Скотчарда [11]: $r/c = nK_a - rK_a$, где r – отношение концентрации связанного лиганда (красителя) к концентрации доступных лиганду сайтов связывания ДНК; c – концентрация свободного лиганда, и n – число сайтов связывания в расчете на молекулу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрально-флуоресцентные свойства красителей в растворах. Спектры ДФТЦ и ДМФТЦ были изучены в растворителях различной полярности и в водном растворе фосфатного буфера [12]. Спектры поглощения ДФТЦ и ДМФТЦ представляют собой одиночные полосы с близкими максимумами (в этаноле $\lambda_{\text{max}} = 562$ и 565 нм соответственно) и электронно-колебательным плечом (в этаноле $\lambda_{\text{max}} \sim 525$ нм), при переходе к менее полярным системам (от ацетонитрила и диметилсульфоксида к 1,4-диоксану) наблюдается bathochromный сдвиг максимумов поглощения (~ 12 -15 нм). Для ДФТЦ и ДМФТЦ в растворах наблюдается флуоресценция (в этаноле $\phi_f = 0,8\%$ и 4 %, соответственно). Можно сделать вывод, что красители в растворах присутствуют в форме *транс*-изомеров, т.к. *цис*-изомеры *мезо*-замещенных тиакарбоцианинов практически не флуоресцируют [3]. В спектрах флуоресценции ДФТЦ и ДМФТЦ независимо от полярности среды наблюдается только одна полоса, положения максимумов спектров возбуждения флуоресценции красителей ДФТЦ и ДМФТЦ с разницей в пределах 1 нм соответствуют спектрам поглощения независимо от полярности растворителя.

Поскольку спектры поглощения ДФТЦ и ДМФТЦ близки к спектрам не имеющего *мезо*-заместителя тиакарбоцианинового красителя ДТЦ, который независимо от растворителя находится в *транс*-форме [2, 3], то можно заключить, что исследуемые красители также находятся в растворах в виде *транс*-изомеров.

Влияние ДНК на спектрально-флуоресцентные свойства красителей. Спектры поглощения и флуоресценции красителей ДФТЦ и ДМФТЦ в присутствии ДНК были изучены в растворах фосфатного буфера при различных концентрациях биополимера ($c_{\text{ДНК}} = 0$ -7,5 $\times 10^{-4}$ моль л⁻¹). При низком соотношении $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} < 50$ в спектрах наблюдается существенное падение интенсивности полос поглощения красителей, сопровождающееся увеличением ширины спектров (достигает 130-140 %). Взаимодействие с ДНК также сопровождается длинноволновым сдвигом максимумов полос в спектрах. Эти эффекты проявляются вплоть до $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} < 100$: в случае ДФТЦ (при $c_{\text{ДНК}} = 7,46 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹; $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} = 66,1$) максимум его спектра поглощения сдвигается в длинноволновую область почти на 10 нм по сравнению с исходным спектром ($c_{\text{ДНК}} = 0$ моль л⁻¹), оптическая плотность в максимуме красителя ДФТЦ уменьшается почти в 2 раза [12]. Краситель ДМФТЦ демонстрирует аналогичную картину спектральных изменений в этом диапазоне концентраций ДНК (рис. 2а). Увеличение концентрации ДНК (при $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} > 100$ и выше) приводит к росту наблюдаемого коэффициента экстинкции красителей, ширина полос в спектрах ДФТЦ и ДМФТЦ уменьшается, в случае ДМФТЦ при $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} \sim 200$ достигает исходных значений. При $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} > 100$ положения максимумов полос поглощения ДФТЦ и ДМФТЦ остаются практически постоянными ($\lambda_{\text{max}} = 565$ и 568 нм, соответственно), т.е. увеличение концентрации ДНК не сопровождается дополнительным длинноволновым сдвигом максимумов спектров красителей.

Падение наблюдаемых коэффициентов экстинкции красителей и отсутствие изобестических точек в спектрах поглощения в присутствии ДНК, свидетельствует о том, что комплексообразование не сводится к простому одностадийному равновесию [12]. Взаимодействие красителей с ДНК может, помимо комплексов мономерных молекул красителей [2], приводить к образованию агрегатов красителей на ДНК [4].

В присутствии ДНК наблюдается рост квантового выхода флуоресценции красителей ДФТЦ и ДМФТЦ (при $c_{\text{ДНК}} = 5,0 \times 10^{-4}$ моль л⁻¹ в 10,8 и в 9,3 раз соответственно). При $c_{\text{ДНК}}/c_{\text{кр}} < 50$ наблюдается длинноволновый сдвиг максимумов спектров флуоресценции и спектров возбуждения флуоресценции красителей (достигает 5-7 нм). Поскольку спектры возбуждения флуоресценции ДФТЦ и ДМФТЦ удовлетворительно совпадают со спектрами поглощения красителей, можно сделать вывод, что в присутствии ДНК не происходит сдвигов *цис-транс*-изомерного равновесия (в отличие от других *мезо*-замещенных карбоцианинов [8]) и образуются флуоресцирующие комплексы ДНК и *транс*-изомеров красителей. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции красителей остаются узкими и соответствуют флуоресценции связанных с ДНК мономерных молекул красителей (агрегированные формы не вносят заметный вклад в флуоресценцию [1, 2, 12]).

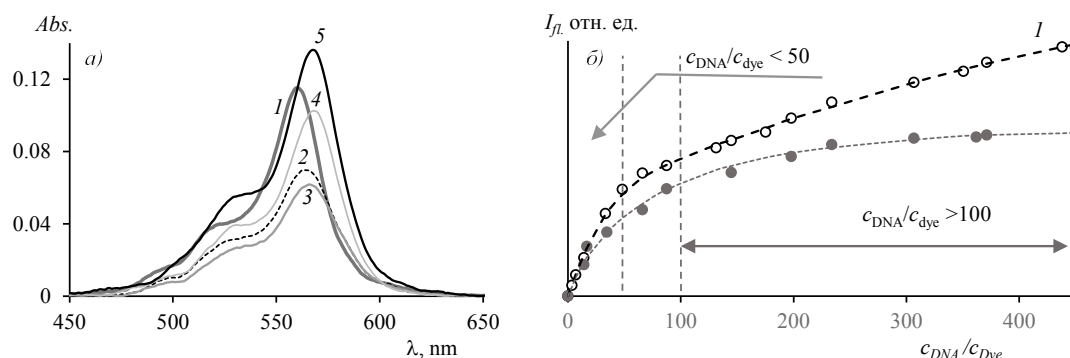


Рисунок 2. (а) Спектры поглощения ДМФТЦ ($c_{\text{ДМФТЦ}} = 1,10 \times 10^{-6}$ моль л^{-1}), полученные в растворе фосфатного буфера при различных концентрациях ДНК: $c_{\text{ДНК}} = 0$ (1), $1,95 \times 10^{-5}$ (2), $3,85 \times 10^{-5}$ (3), $2,70 \times 10^{-4}$ (4), $4,28 \times 10^{-4}$ моль л^{-1} (5); (б) – зависимость относительной интенсивности флуоресценции красителей ДМТЦ (1, $c_{\text{ДМТЦ}} = 1,03 \times 10^{-6}$ моль л^{-1}) и ДМФТЦ (2, $c_{\text{ДМФТЦ}} = 1,10 \times 10^{-6}$ моль л^{-1}) от концентрации ДНК

Оценка величин эффективных констант связывания красителей с ДНК. Из данных спектров флуоресценции по уравнению Скотчарда [11] получены значения эффективных констант комплексообразования (K_{ef}) красителей. Для ДФТЦ $K_{\text{ef1}} = 1,34 \times 10^5$ л моль $^{-1}$, при этом в комплексе на одну молекулу красителя приходится ~ 8 пар оснований ДНК, $K_{\text{ef2}} = 4,84 \times 10^4$ л моль $^{-1}$, при этом на одну молекулу красителя приходится ~ 13 пар оснований ДНК. Для красителя ДМФТЦ $K_{\text{ef1}} = 1,19 \times 10^5$ л моль $^{-1}$ (при соотношении 7-8 пар оснований на одну молекулу лиганда), $K_{\text{ef2}} = 6,57 \times 10^4$ л моль $^{-1}$ (при соотношении ~ 11 пар оснований на одну молекулу лиганда).

Отметим, что мономерные комплексы молекул карбоцианиновых красителей с ДНК также могут относиться к различным типам: комплексы интеркаляции между парами оснований ДНК, и комплексы, в которых связывание происходит в малом желобе двойной спирали ДНК [2, 4]. Согласно литературным данным [13], эффективные константы комплексообразования с ДНК красителей-интеркаляторов не превышают 10^7 л моль $^{-1}$, тогда как константы комплексообразования, полученные при связывании красителей в бороздке двойной спирали ДНК, оказываются выше ($K_{\text{ef}} > 10^8$ л моль $^{-1}$). Невысокие K_{ef} ДФТЦ и ДМФТЦ могут быть обусловлены взаимодействием красителей с ДНК по типу интеркаляции [12].

Свойства триплетного состояния. Взаимодействие с ДНК приводит к возрастанию квантового выхода триплетного состояния красителей. Кинетики гибели Т-состояния красителей в комплексах с ДНК являются двухэкспоненциальными. Константы скорости гибели триплетного состояния (k_1 и k_2) отличаются на порядок (например, для ДФТЦ $k_1 \sim 1,2 \times 10^4$ с $^{-1}$, $k_2 \sim 1,2 \times 10^3$ с $^{-1}$). В комплексах краситель–ДНК различных типов Т-состояние молекул красителя будет, вероятно, обладать различными характеристиками, что будет отражаться в двухэкспоненциальном характере их кинетик [7].

Изучено влияние растворенного кислорода на кинетику гибели Т-состояния ДФТЦ и ДМФТЦ в присутствии ДНК. Аналогично [7], константы скорости тушения (k_{qO_2}) триплетного состояния оказались существенно ниже величин, характерных для диффузионно-контролируемых реакций ($k_{\text{qO}_2} = 1/9$, $k_{\text{dif}} \sim 3,0 \times 10^9$ моль $^{-1}$ л с $^{-1}$ с учетом спин-статистического фактора): для ДФТЦ $k_{\text{qO}_2} = 4,3 \times 10^8$ моль $^{-1}$ л с $^{-1}$, а для ДМФТЦ $k_{\text{qO}_2} = 6,0 \times 10^8$ моль $^{-1}$ л с $^{-1}$. Взаимодействие с ДНК приводит к частичному экранированию молекул красителей, что затрудняет доступ молекул тушителя (O_2) к возбужденному Т-состоянию красителя, что выражается понижением константы скорости тушения.

Термическая диссоциация ДНК. Для подтверждения возможности образования комплексов интеркаляции проведены эксперименты по термической диссоциации ДНК в присутствии красителей. Кривые плавления ДНК позволяют точно определить точку плавления (T_m), т.е. температуру, при которой 50 % ДНК денатурировано. Эксперименты демонстрируют увеличение температур плавления T_m ДНК в образцах с красителями ДФТЦ и ДМФТЦ. Так, в случае ДФТЦ $T_m(\text{ДФТЦ}) = 79,1$ °С, что дает рост на 14,1 °С по сравнению с образцом ДНК, не содержащим красителя. Для ДМФТЦ увеличение T_m составляет 11,7 °С ($T_m(\text{ДМФТЦ}) = 76,7$ °С). Взаимодействие лигандов-интеркаляторов с ближайшими парами оснований ДНК приводит к заметному повышению T_m (за счет стабилизации биополимера).

ВЫВОДЫ

Показано, что в отличие от многих мезо-замещенных карбоцианинов, ДФТЦ и ДМФТЦ в растворах находятся в *транс*-форме (независимо от полярности растворителя). В качестве объяснения разницы изомерных конфигураций красителей предполагается различное влияние мезо-заместителей: для ДФТЦ и ДМФТЦ возможен поворот фенильного кольца заместителя, выводящий заместитель из плоскости молекул и уменьшающий его стерическое влияние на конфигурацию *транс*-изомеров.

Красители образуют с ДНК нековалентные комплексы, что сопровождается изменениями спектров поглощения и ростом флуоресценции красителей (комплекс *транс*-изомера). Анализ спектрально-

флуоресцентных свойств указывают на то, что ДФТЦ и ДМФТЦ способны образовывать с ДНК комплексы как в мономерной форме, так и в форме агрегатов. В комплексе с ДНК в отсутствие кислорода кинетики гибели триплетного состояния красителей являются двухэкспоненциальными, что может объясняться образованием нескольких типов комплекса красителей с ДНК. Эксперименты по термической денатурации ДНК свидетельствуют в пользу образования комплексов интеркаляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), проекты № 16-03-00735, № 16-03-00275.

Список литературы / References:

1. Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B., Cyanines during the 1990s: a review. *Chem. Rev.*, 2000, vol. 100, pp. 1973-2011.
2. Levitus M., Ranjit S., Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2011, vol. 44, pp. 123-151.
3. Khimenko V., Chibisov A.K., Gorner H., Effects of alkyl substituents in the polymethine chain on the photoprocesses in thiacyanine dyes. *J. Phys. Chem. A*, 1997, vol. 101, pp. 7304-7310.
4. Armitage B.A. Cyanine Dye-DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation. *DNA Binders and Related Subjects, Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 55-76.
5. Бычкова А.В., Пронкин П.Г., Сорокина О.Н., и др. Исследование сшитых по свободнорадикальному механизму белковых покрытий на магнитных наночастицах методом спектрально-флуоресцентных зондов. *Коллоидный журнал*, 2014, т. 76, с. 420-428. [Bychkova, A.V., Pronkin, P.G., Sorokina, O.N. et al. Study of protein coatings cross-linked via the free-radical mechanism on magnetic nanoparticles by the method of spectral and fluorescent probes. *Colloid Journal*, 2014, vol. 76 pp. 420-428. (In Russ.)]
6. Tatikolov A.S., Akimkin T.M., Pronkin P.G., Yarmoluk S.M. Enhancement of photoisomerization of polymethine dyes in complexes with biomacromolecules. *Chem. Phys. Lett.*, 2012, vol. 556, pp. 287-291
7. Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А. Фотохимические свойства мезо-замещенных тиакрбоцианиновых красителей в растворах и в комплексах с ДНК. *Химия высоких энергий*, 2006, т. 40, № 4, с. 295-302. [Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Sklyarenko V.I., Kuz'min V.A., Photochemical properties of meso-substituted thiacyanine dyes in solutions and in complexes with DNA. *High Energy Chemistry*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 252-258. (In Russ.)]
8. Аниковский М.Ю., Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Левин П.П., Скляренко В.И., Кузьмин В.А. Влияние ДНК на цис-транс равновесие и флуоресцентные свойства 3,3'-диэтил-9-тиометилтиакрбоцианиниодида в водном растворе, *Химия высоких энергий*, 2003, т. 37, № 6, с. 445-451. [Anikovsky M.Yu., Tatikolov A.S., Pronkin, P.G., Levin, P.P., Sklyarenko, V.I., Kuzmin, V.A. DNA effect on cis-trans equilibrium and fluorescent properties of 3,3'-diethyl-9-thiomethylthiacyanine iodide in aqueous solution. *High Energy Chemistry*, 2003, vol. 37, pp. 398-404. (In Russ.)]
9. Baguley B.C., Falkenhang E.-M. The interaction of ethidium with synthetic double-stranded polynucleotides at low ionic strength. *Nucl. Acids Res.*, 1978, vol. 5, pp. 161-171.
10. Ищенко А.А. *Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей*. Киев: Наукова думка, 1994, 231 с. [Ishchenko A.A. *Structure and Spectral-Fluorescent Properties of Polymethine Dyes*. Kiev: Naukova Dumka, 1994, 231 p. (In Russ.)]
11. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949. vol. 51, pp. 660-672.
12. Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Influence of the interaction with DNA on the spectral-fluorescent and photochemical properties of some meso-substituted polymethine dyes. *Spectrochim. Acta A*, 2018, vol. 202, pp. 269-275.
13. Kurutos A., Ryzhova O., Trusova V., Tarabara U., Gorbenko G., Gadjev N., Deligeorgiev T. Novel asymmetric monomethine cyanine dyes derived from sulfobetaine benzothiazolium moiety as potential fluorescent dyes for non-covalent labeling of DNA. *Dyes and Pigments*, 2016, vol. 130, pp. 122-128.

**CATIONIC MESO-SUBSTITUTED THIACARBOCYANINE DYES
AS SPECTRAL-FLUORESCENT PROBES FOR DNA**

Pronkin P.G., Shvedova L.A., Tatikolov A.S.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics,
Russian Academy of Sciences (IBCP PAS)

Kosygin str. 4, Moscow, 119334 Russia; e-mail: pronkinp@gmail.com

Abstract. Spectral-fluorescent properties of new cationic thiacyanocyanine dyes – 3,3'-dimethyl-9-phenylthiacyanocyanine iodide (DPTC) and its analogue, 3,3'-diethyl-9-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)thiacyanocyanine iodide (DMPTC), have been studied. Despite the presence of bulky substituents in the *meso*-position of the polymethine chain, these dyes in solutions are in the forms of *trans*-isomers regardless of the solvent polarity. In a phosphate buffer solution, these dyes form noncovalent complexes with DNA. The interaction with DNA proceeds with the formation of dye complexes in both monomeric and aggregated forms and is accompanied by changes in the spectral-fluorescent properties of the dyes. The interaction of monomeric molecules of DPTC and DMPTC with DNA does not lead to a shift of the isomeric equilibrium toward the *cis*-isomer and proceeds mainly through the *trans*-isomer. The triplet state of dye molecules bound in a complex with DNA has been studied by flash photolysis. An increase in the melting temperature of DNA indicates the formation of intercalation complexes by the dyes.

Key words: thiacyanocyanine dyes, DNA, noncovalent complex, spectral-fluorescent probes, flash photolysis, intercalation.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ И АНИОННЫХ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С СОЛЯМИ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ (ХОЛАТАМИ)

Татиколов А.С., Шведова Л.А., Пронкин П.Г.

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

Поступила в редакцию: 13.06.2018

Аннотация. Изучены спектрально-флуоресцентные и фотохимические свойства полиметиновых красителей анионного 3,3'-ди(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина (ДЭЦ) и катионных 3,3',9-триметилтиакарбоцианина (Суап 2), 3,3'-ди(β -гидроксид)-9-метилтиакарбоцианина, 3,3'-ди(β -гидроксид)-5,5'-диметокси-9-этилтиакарбоцианина в присутствии биологически важных поверхностно-активных веществ (ПАВ) – солей желчных кислот (холатов) холата натрия (NaC), дезоксихолата натрия (NaDC) и таурохолата натрия (NaTC), а также, для сравнения, додецилсульфата натрия (SDS). При введении ПАВ в раствор ДЭЦ наблюдаются спектральные изменения, обусловленные распадом димеров красителя на *цис*-мономеров и *цис-транс*-изомеризацией образующихся мономеров. В то время как в присутствии SDS оба процесса протекают параллельно, обусловлены взаимодействием мономеров красителя с мицеллами и происходят главным образом вблизи критической концентрации мицеллообразования (ККМ), при введении возрастающих концентраций холатов распад димеров на мономеры начинается при гораздо меньших концентрациях, чем *цис-транс*-конверсия. При этом первый процесс завершается при концентрациях близких к ККМ вторичных мицелл холатов (ККМ2), в то время как второй происходит даже при концентрациях холатов $\gg$ ККМ2. Сделан вывод, что ДЭЦ может служить зондом, позволяющим оценить величину ККМ2; спектральные изменения ДЭЦ свидетельствуют о перестройке вторичных мицелл с ростом концентрации холатов. Наблюдается также агрегация ДЭЦ и Суап 2 на холатах. Поскольку она происходит в области концентраций $<$ ККМ2, матрицами для агрегации могут служить как мономерные молекулы, так и малые ассоциаты и первичные мицеллы холатов. Распад же образовавшихся агрегатов начинается при концентрациях холатов выше ККМ2 и продолжает происходить при дальнейшем росте их концентрации. При импульсном фотолизе растворов ДЭЦ и Суап 2 в присутствии холатов наблюдаются процессы фотоизомеризации и образования триплетного состояния красителей.

Ключевые слова: полиметиновые красители, димеры, агрегаты, соли желчных кислот (холаты), мицеллы.

Полиметиновые красители (ПК) широко используются в различных областях науки и техники. Важным применением ПК является их использование в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для биомакромолекул [1], мицелл и везикул [2]. В ряде работ изучалась фотоника ПК при их взаимодействии с синтетическими поверхностно-активными веществами (ПАВ): анионными (додецилсульфат натрия SDS), катионными (цетилтриметиламмоний-бромид СТАВ), нейтральными (Тритон X-100), а также образующими обратные мицеллы (АОТ, Тритон X-100) [3-6]. Однако, помимо синтетических, имеется большой класс биологически важных ПАВ – соли желчных кислот (СЖК), структура молекул которых существенно отличается от структуры синтетических ПАВ: их молекула имеет стероидный скелет, вогнутая сторона которого гидрофильна благодаря присутствию ОН-групп, а выпуклая сторона с угловыми метильными группами – гидрофобна. При повышении концентрации СЖК выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) начинают образовываться мицеллы: вначале первичные (за счет гидрофобных взаимодействий между выпуклыми областями молекул) с числом агрегации 2-10, затем вторичные (за счет водородных связей между первичными мицеллярными ассоциатами) с числом агрегации 10-100 [7]. Соответственно этому, для СЖК часто выделяют две области ККМ (ККМ1 и ККМ2) [8-11]. Некоторые авторы считают, что понятие ККМ вообще неприменимо к СЖК [12, 13]. Это определяет своеобразие поведения молекул красителей в таких системах [14-16]. В то же время, свойства ПК в системах, включающих СЖК, практически не изучались. В настоящей работе изучены спектрально-флуоресцентные свойства анионного 3,3'-ди(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина (ДЭЦ) и катионных (3,3',9-триметилтиакарбоцианина (Суап 2), 3,3'-ди(β -гидроксид)-9-метилтиакарбоцианина и 3,3'-ди(β -гидроксид)-5,5'-диметокси-9-этилтиакарбоцианина) ПК в водных растворах в присутствии СЖК: холата натрия (NaC), дезоксихолата натрия (NaDC) и таурохолата натрия (NaTC) в широком интервале концентраций ПАВ. Для сравнения был взят также синтетический анионный ПАВ – SDS, поскольку СЖК являются анионными.

Таблица 1. Свойства мицелл изучаемых ПАВ: первая и вторая критические концентрации мицеллообразования (ККМ1 и ККМ2 соответственно) и число молекул в мицелле (n)

	NaDC	NaC	NaTC	SDS
ККМ, мМ	2,4 и 6,5 [9]	6,2 и 12,8 [9]	3-5 и 15 [18]	8 [17]
n	3,1 [9]	2,7 [9]	6 [11]	50-60 [17]

Краситель ДЭЦ в водном растворе при концентрациях порядка 1-2 мкМ присутствует главным образом в виде димеров с максимумом спектра поглощения $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 535$ нм, находящихся в равновесии с мономерами (в виде *цис*-изомера), проявляющимися в спектре поглощения в виде плеча с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \sim 575$ нм) [4]. Флуоресценция красителя очень слаба и обусловлена присутствием следов *транс*-изомера (спектр возбуждения флуоресценции с $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} \sim 595$ нм), поскольку *цис*-изомер и димер ДЭЦ не флуоресцируют [4]. При введении в раствор возрастающих концентраций SDS, при [SDS] до ~ 4 мМ изменения в спектрах поглощения и флуоресценции красителя невелики. Это обусловлено сравнительно слабым взаимодействием одноименно заряженных молекул SDS и ДЭЦ, недостаточным для существенного сдвига вправо равновесия димер–*цис*-мономер. В области концентраций SDS близких к ККМ (8 мМ [17]), когда в растворе появляются мицеллы SDS, наблюдается рост полосы поглощения *цис*-мономеров красителя, связанных с мицеллами ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \sim 580$ нм) вследствие сдвига равновесия димер–*цис*-мономер вправо (полоса димеров падает) за счет гидрофобного взаимодействия *цис*-мономеров с мицеллами. Одновременно резко возрастает интенсивность флуоресценции в результате *цис*–*транс*-конверсии. При дальнейшем росте концентрации SDS (> 10 мМ) изменения в спектрах поглощения и флуоресценции красителя опять невелики. Это обусловлено достаточно полным связыванием красителя с мицеллами, на которое уже слабо влияет дальнейшее повышение концентрации ПАВ. Поскольку с ростом [SDS] рост полосы поглощения *цис*-мономеров и рост флуоресценции происходят симбатно, процессы распада димеров на *цис*-мономер и *цис*–*транс*-конверсия протекают параллельно при взаимодействии (связывании) с мицеллами. После распада димеров на мономер и их связывания с мицеллами соотношение *цис*- и *транс*-изомеров красителя практически не меняется. Об этом свидетельствует и то, что спектр возбуждения флуоресценции остается более узким и длинноволновым, чем спектр поглощения, и форма обоих спектров приблизительно сохраняется даже при высоких концентрациях SDS (> 30 мМ).

При введении в раствор ДЭЦ возрастающих концентраций NaDC, NaC или NaTC резкие изменения в спектрах поглощения вследствие распада димеров красителя на *цис*-мономер ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \sim 580$ нм) начинаются еще до достижения первой ККМ (ККМ1) СЖК и продолжаются до второй ККМ (ККМ2) (табл. 1).

Это, вероятно, обусловлено более сильным, чем в случае SDS, гидрофобным взаимодействием *цис*-мономеров красителя с ПАВ, достаточным для сдвига равновесия в сторону распада димеров красителя. При этом также возрастает интенсивность флуоресценции, но основной рост флуоресценции начинается в области концентраций ПАВ выше первой ККМ. При [NaDC] ~ 8 мМ в спектре поглощения ДЭЦ с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \sim 590$ нм, принадлежащим к *цис*-мономеру красителя, связанному с мицеллами NaDC, появляется длинноволновое плечо, которое затем перерастает в самостоятельный максимум при [NaDC] ~ 15 мМ, становящийся основным ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 610$ нм) при больших концентрациях NaDC. Поскольку этот максимум примерно соответствует максимуму спектра возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 612$ нм), то он принадлежит полосе поглощения флуоресцирующей формы красителя – *транс*-мономеру, связанному с мицеллами СЖК. В случае NaC длинноволновое плечо *транс*-мономера появляется при большей концентрации NaC (20-40 мМ), которое перерастает в самостоятельный максимум при [NaC] ~ 100 мМ, а в случае NaTC вклад *транс*-мономера в спектр поглощения остается сравнительно слабым плечом даже при [NaTC] = 140 мМ. Степень *цис*–*транс*-конверсии красителя под действием СЖК возрастает в ряду NaTC < NaC < NaDC, что соответствует росту гидрофобности молекул СЖК. В области концентраций выше ККМ2 рост полосы *цис*-мономера (с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 575$ -590 нм) замедляется, хотя флуоресценция и длинноволновая полоса поглощения с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 610$ нм продолжают возрастать. Следовательно, распад димеров красителя на *цис*-мономер происходит главным образом в области концентраций СЖК от малых (< ККМ1) до ККМ2, а конверсия *цис*-мономеров в *транс*-мономер – от ККМ1 до очень больших ($>>$ ККМ2). Степень осуществления последнего процесса, вероятно, определяется степенью гидрофобности окружения молекулы красителя в мицеллах СЖК.

Оказалось, что СЖК, как и SDS, стимулируют J-агрегацию ДЭЦ (при [ДЭЦ] = 7-10 мкМ) при концентрациях СЖК ниже или близкой к ККМ1. В частности, при [NaTC] = 3,1 мМ (вблизи ККМ1, табл. 1) в спектре поглощения ДЭЦ, наряду с небольшим ростом полосы *цис*-мономеров (с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 580$ -585 нм), наблюдается появление и рост во времени полосы поглощения J-агрегатов (с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 658$ -659 нм) за счет расщепления димеров (падения полосы поглощения димеров с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 535$ -540 нм). Повышение концентрации NaTC (до 8,1 мМ), наряду с дальнейшим ростом полосы мономеров, приводит к дальнейшему росту полосы J-агрегатов (как сразу после введения NaTC, так и во времени), и лишь при [NaTC] = 13 мМ, близкой ККМ2, наблюдается некоторое падение интенсивности полосы J-агрегатов (при росте полосы мономеров), которое резко ускоряется при дальнейшем росте концентрации NaTC ([NaTC] = 25,5 мМ), приводя к полному распаду J-агрегатов при соответствующем росте полосы мономеров. В случае NaC рост во времени полосы J-агрегатов наблюдается уже при [NaC] = 1,5 мМ, который усиливается при дальнейшем повышении концентрации NaC (вплоть до [NaC] = 6,0 мМ, то есть выше ККМ1), и лишь при [NaC] = 15,6 мМ, что немного выше ККМ2,

начинается падение полосы J-агрегатов, которое усиливается при $[\text{NaC}] = 38,6$ мМ. В случае NaDC рост полосы J-агрегатов наблюдался при $[\text{NaDC}] = 5,0$ мМ (между ККМ1 и ККМ2), а падение – при $[\text{NaDC}] = 12,4$ мМ. При концентрациях СЖК < 1 мМ стимулирования J-агрегации ДЭЦ не наблюдается. В случае NaDC стимулирования J-агрегации не происходило не только при $[\text{NaDC}] = 0,71$ мМ, но даже при $[\text{NaDC}] = 3,2$ мМ, при которой уже наблюдается рост полосы мономеров в результате распада димеров красителя. Следует отметить, что в присутствии SDS наблюдается стимулирование J-агрегации ДЭЦ ($[\text{ДЭЦ}] = 10$ мкМ) уже при $[\text{SDS}] = 1,65$ мМ, то есть при концентрации гораздо ниже ККМ (8 мМ), когда SDS находится главным образом в мономолекулярной форме, а начало распада образовавшихся J-агрегатов – при $[\text{SDS}] \sim 4$ мМ, то есть при появлении мицелл. Следовательно, матрицей для образования J-агрегатов в данном случае, вероятно, могут служить мономерные молекулы SDS, но не мицеллы SDS, взаимодействие с которыми вызывает распад J-агрегатов. В то же время для СЖК рост J-агрегатов наблюдается при концентрациях ПАВ в области ККМ1 и выше, что указывает на то, что матрицами для образования J-агрегатов могут служить малые ассоциаты (включая первичные мицеллы) СЖК. Распад же J-агрегатов наблюдается при концентрациях свыше ККМ2, то есть при взаимодействии с вторичными мицеллами СЖК.

Суан 2 в водном растворе имеет полосу поглощения с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 535$ нм с колебательным плечом при ~ 500 нм и слабую флуоресценцию ($\lambda_{\text{f}}^{\text{max}} \sim 565$ нм), спектр возбуждения которой сдвинут в длинноволновую сторону по отношению к спектру поглощения и имеет $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 547$ нм. Это обусловлено тем, что Суан 2 в водных растворах находится главным образом в виде нефлуоресцирующего коротковолнового *цис*-изомера (мономера), а содержание более длинноволнового флуоресцирующего *транс*-изомера (с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \sim 547$ нм) мало [19]. Поскольку заряды Суан 2 и изучаемых ПАВ разноименные, существенную роль при их взаимодействии, наряду с гидрофобными, должны играть электростатические силы. При введении в водный раствор Суан 2 (1–2 мкМ) возрастающих концентраций NaDC, в области малых концентраций ПАВ (~ 1 мМ) наблюдается падение и уширение исходной полосы поглощения красителя с появлением коротковолнового плеча, обусловленного образованием агрегатов красителя на молекулах ПАВ. Данные агрегаты обладают флуоресценцией с широким спектром, максимум которой лежит в длинноволновой области ($\lambda_{\text{f}}^{\text{max}} \sim 660$ нм), а спектр возбуждения – в коротковолновой ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 490$ нм) по отношению к полосам флуоресценции и поглощения мономерного красителя соответственно. Следовательно, их можно отнести к H-агрегатам красителя, обладающим большим Стоксовым сдвигом. С ростом концентрации ПАВ эти агрегаты вначале перестраиваются (среди них появляется компонент с $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 515$ нм и $\lambda_{\text{f}}^{\text{max}} \sim 605$ нм), а затем (при $[\text{NaDC}] > 6$ мМ) начинают распадаться на мономеры, связанные с ПАВ, что проявляется в росте полосы поглощения ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 545\text{--}550$ нм) и росте флуоресценции ($\lambda_{\text{f}}^{\text{max}} = 576$ нм) мономерного красителя, связанного с ПАВ. При этом спектр поглощения остается более широким, чем спектр возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 564$ нм), что указывает на одновременное связывание с ПАВ *транс*- (флуоресцирующего) и *цис*- (нефлуоресцирующего) изомеров красителя. При взаимодействии Суан 2 с SDS также наблюдается образование флуоресцирующих H-агрегатов красителя, причем краситель практически полностью переходит в H-агрегаты уже при $[\text{SDS}] \sim 0,2$ мМ. Они имеют полосу поглощения с $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 435\text{--}440$ нм и флуоресценции с $\lambda_{\text{f}}^{\text{max}} \sim 690$ нм и начинают распадаться при приближении концентрации SDS к ККМ (≥ 5 мМ). При $[\text{SDS}] \geq \text{ККМ}$ агрегаты полностью распадаются на мономеры (связанные с ПАВ), что сопровождается резким ростом флуоресценции. Как и в случае NaDC, спектр поглощения мономеров красителя ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 545\text{--}547$ нм) остается более широким, чем спектр возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 558$ нм), что указывает на одновременное связывание с ПАВ обоих изомеров красителя. В отличие от NaDC и SDS, взаимодействие Суан 2 с NaC и NaTC не приводит к образованию флуоресцирующих агрегатов. С ростом концентрации СЖК вначале наблюдается падение интенсивности исходной полосы поглощения красителя (небольшое в случае NaC) без появления новых полос, вероятно, за счет образования неупорядоченных агрегатов, не обладающих флуоресценцией и существенным поглощением в области поглощения красителя, затем рост слегка сдвинутой в длинноволновую область ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 543\text{--}545$ нм) полосы поглощения красителя, связанного с ПАВ (небольшой в случае NaTC и гораздо больший в случае NaC, с резким ростом флуоресценции), аналогично наблюдавшемуся при взаимодействии Суан 2 с ДНК [19]. Как и в случае NaDC и SDS, спектр поглощения красителя остается более широким, чем спектр возбуждения флуоресценции, что указывает на одновременное связывание с ПАВ обоих изомеров красителя. Аналогично происходит взаимодействие с СЖК катионных красителей 3,3'-ди(β-гидроксид-9-метилтиакарбоцианина и 3,3'-ди(β-гидроксид)-5,5'-диметокси-9-этилтиакарбоцианина.

При импульсном фотолизе растворов ДЭЦ и Суан 2 в водных растворах в отсутствие ПАВ не наблюдается фотоизомеризации красителей (поскольку *цис*-изомеры данных красителей не фотоизомеризуются), однако в присутствии избытка СЖК наблюдается образование фотоизомеров, а в отсутствие кислорода – также триплетного состояния красителей. Это является следствием образования фотоизомеризующихся *транс*-изомеров при взаимодействии красителей с СЖК.

Таким образом, исследование показало, что структурные перестройки в растворах СЖК происходят в широком интервале их концентраций, а не только вблизи ККМ. При этом краситель ДЭЦ может служить спектрально-флуоресцентным зондом при изучении таких перестроек. Поведение красителей с ростом концентрации СЖК (рост полосы поглощения *цис*-мономера ДЭЦ, распад агрегатов красителей, образовавшихся на ПАВ) во многом определяется величиной ККМ2. В частности, факт замедления роста полосы *цис*-мономера ДЭЦ в области концентраций свыше ККМ2 позволяет оценить ее величину. В то же

время не было заметно резких изменений в поведении красителей в области ККМ1, что, вероятно, обусловлено постепенным образованием первичных мицелл с ростом концентрации СЖК вследствие малого числа составляющих их молекул. Образование фотоизомеров при импульсном фотолизе является следствием *цис-транс*-конверсии при взаимодействии красителей с СЖК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-03-00735).

Список литературы / References:

1. Tatikolov A.S. Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *J. Photochem. Photobiol. C*, 2012, vol. 13, pp. 55-90.
2. Viseu M.I., Tatikolov A.S., Correia R.F., Costa S.M.B. Time evolution of monomers and aggregates of a polymethine dye probe the dynamics of model vesicles and micelles. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2014, vol. 280, pp. 54-62.
3. Chibisov A.K., Prokhorenko V.I., Görner H. Effects of surfactants on the aggregation behaviour of thiocarbocyanine dyes. *Chem. Phys.*, 1999, vol. 250, pp. 47-60.
4. Tatikolov A.S., Costa S.M.B. Effects of normal and reverse molecular environment on the spectral properties, isomerization and aggregation of a hydrophilic cyanine dye. *Chem. Phys. Lett.*, 2001, vol. 346, pp. 233-240.
5. Tatikolov A.S., Costa S.M.B. Photophysics and photochemistry of hydrophilic cyanine dyes in normal and reverse micelles. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, vol. 1, pp. 211-218.
6. Sidorowicz A., Mora C., Jablonka S., Poła A., Modrzycka T., Mosiadz D., Michalak K. Spectral properties of two betaine-type cyanine dyes in surfactant micelles and in the presence of phospholipids. *J. Mol. Struct.*, 2005, vol. 744-747, pp. 711-716.
7. Mukhopadhyay S., Maitra U. Chemistry and biology of bile acids. *Curr. Sci.*, 2004, vol. 87, pp. 1666-1683.
8. Li G., McGown L.B. Model for bile salt micellization and solubilization from studies of a "polydisperse" array of fluorescent probes and molecular modeling. *J. Phys. Chem.*, 1994, vol. 98, pp. 13711-13719.
9. Matsuoka K., Moroi Y. Micelle formation of sodium deoxycholate and sodium ursodeoxycholate (Part 1). *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1580, pp. 189-199.
10. Ninomiya R., Matsuoka K., Moroi Y. Micelle formation of sodium chenodeoxycholate and solubilization into the micelles: comparison with other unconjugated bile salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1634, pp. 116-125.
11. Matsuoka K., Suzuki M., Honda C., Endo K., Moroi Y. Micellization of conjugated chenodeoxy- and ursodeoxycholates and solubilization of cholesterol into their micelles: comparison with other four conjugated bile salts species. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2006, vol. 139, pp. 1-10.
12. Djavanbakht A., Kale K.M., Zana R. Ultrasonic absorption and density studies of the aggregation in aqueous solutions of bile acid salts. *J. Coll. Interf. Sci.*, 1977, vol. 59, pp. 139-148.
13. Lindman B., Kamenka N., Fabre H., Ulmuis J., Wieloch T. Aggregation, Aggregate Composition, and Dynamics in Aqueous Sodium Cholate Solutions. *J. Coll. Interf. Sci.*, 1980, vol. 73, pp. 556-565.
14. Carey M.C., Small D.M. Micellar properties of dihydroxy and trihydroxy bile salts: effects of counterion and temperature. *J. Coll. Interf. Sci.*, 1969, vol. 31, pp. 382-396.
15. Mishra S.S., Subuddhi U. Spectroscopic investigation of interaction of Nile Blue A, a potent photosensitizer, with bile salts in aqueous medium. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014, vol. 141, pp. 67-75.
16. Mukerjee P., Moroi Y., Murata M., Yang A.Y.S. Bile salts as atypical surfactants and solubilizers. *Hepatology*, 1984, vol. 4, pp. 61S-65S.
17. Anachkov S.E., Danov K.D., Basheva E.S., Kralchevsky P.A., Ananthapadmanabhan K.P. Determination of the aggregation number and charge of ionic surfactant micelles from the stepwise thinning of foam films. *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 2012, vol. 183-184, pp. 55-67.
18. Matsuoka K., Maeda M., Moroi Y. Micelle formation of sodium glyco- and taurocholates and sodium glyco- and taurodeoxycholates and solubilization of cholesterol into their micelles. *Colloids and Surfaces B*, 2003, vol. 32, pp. 87-95.
19. Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Ярмолук С.М. Спектрально-флуоресцентное изучение взаимодействия цианиновых красителей Суан 2 и Суан 45 с ДНК. *Химия высоких энергий*, 2011, т. 45, с. 252-259. [Akimkin T.M., Tatikolov A.S., Yarmoluk S.M. Spectral and fluorescent study of the interaction of cyanine dyes Cyan 2 and Cyan 45 with DNA. *High Energy Chem.*, 2011, vol. 45, pp. 222-228. (In Russ.)]

STUDY OF THE INTERACTION OF CATIONIC AND ANIONIC POLYMETHINE DYES WITH BILE SALTS (CHOLATES)

Tatikolov A.S., Shvedova L.A., Pronkin P.G.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences (IBCP RAS)

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: tatikolov@mail.ru

Abstract. Spectral-fluorescent and photochemical properties of polymethine dyes anionic 3,3'-di(γ -sulfopropyl)-4,5,4',5'-dibenzo-9-ethylthiacarbocyanine-betaine (DEC) and cationic 3,3',9-trimethylthiacarbocyanine (Cyan 2), 3,3'-di(β -hydroxy)-9-methylthiacarbocyanine, 3,3'-di(β -hydroxy)-5,5'-dimethoxy-9-ethylthiacarbocyanine in the presence of biological surfactants (bile salts, cholates) sodium cholate (NaC), sodium deoxycholate (NaDC), sodium taurocholate (NaTC) and, for comparison, sodium dodecyl sulfate (SDS), were studied. Upon introduction of surfactants into DEC solution, changes of dye properties are observed due to decomposition of dye dimers into *cis*-monomers and *cis-trans* conversion of the resulting monomers. In the presence of SDS, both processes occur in parallel due to noncovalent interaction of dye monomers with micelles, and mainly occur near the critical micelle concentration (CMC). In contrast, upon introduction of cholates, decomposition of dye dimers into monomers begins at much lower concentrations than *cis-trans* conversion. The former process is completed at cholate concentrations close to CMC of secondary micelles (CMC2), while the latter occurs even at concentrations $\gg$ CMC2. It is concluded that DEC can serve as a probe for estimating CMC2; spectral changes of DEC indicate reorganization of secondary micelles with increasing cholate concentration. Aggregation of DEC and Cyan 2 on cholates is also observed. Since it occurs at concentrations $<$ CMC2, monomeric molecules of cholates, their small associates, and primary micelles serve as matrices for aggregation. Decomposition of the aggregates begins at cholate concentrations $>$ CMC2 and continues at higher cholate concentrations. Upon flash photolysis of solutions of DEC and Cyan 2 in the presence of cholates, photoisomerization and triplet state formation are observed.

Key words: polymethine dyes, dimers, aggregates, bile salts (cholates), micelles.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОСТУПНОСТИ T2/T3 ЦЕНТРА ДВУХДОМЕННОЙ ЛАККАЗЫ ИЗ *STREPTOMYCES GRISEOFLOVUS* AC-993

Тищенко С.В.¹, Костарева О.С.¹, Михайлина А.М.¹, Лисов А.А.², Коляденко И.А.¹,
Габдулхаков А.Г.¹

¹Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пушкино, 142290, РФ; e-mail: sveta@vega.protres.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

проспект Науки, 5, г. Пушкино, 142290, РФ

Поступила в редакцию: 13.06.2018

Аннотация. Лакказы (ЕС 1.10.3.2) – широко распространённые в природе «голубые» медьсодержащие оксидоредуктазы, являются перспективным объектом для биотехнологической индустрии. Субстратами этих ферментов являются различные фенольные соединения, лакказы обнаружены в высших растениях, некоторых насекомых, грибах и бактериях. Лакказы содержат четыре атома меди, организованные в 3 сайта: T1, T2 и T3. В бактериях, наряду с трёхдоменными лакказами, имеются двухдоменные лакказы (2DLac), которые имеют ряд функциональных преимуществ. 2DLac активны в нейтральных и щелочных значениях pH, обладают повышенной термостабильностью и устойчивы к действию различных ингибиторов. Каталитический механизм двухдоменных лакказ интенсивно изучается, однако, принципы субстрат/продуктного транспорта до сих пор не вполне понятны. В данной работе представлен сравнительный анализ каталитической активности и кристаллических структур рекомбинантной 2DLac из *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 и её мутантных форм с заменами His165 на Phe и Ala. Консервативный для 2DLac His165 принадлежит второй координационной сфере и располагается близко к поверхности белка. Мы предполагаем, что движение имидазольного кольца His165 может «открывать» или «закрывать» один из субстрат-продуктных каналов, ведущих к T2/T3 центру лакказы *S. griseoflavus*.

Ключевые слова: двухдоменные лакказы, *Streptomyces griseoflavus*, кристаллические структуры, T2/T3 центр, субстратные каналы.

ВВЕДЕНИЕ

Лакказы катализируют окисление различных соединений молекулярным кислородом. В результате происходит восстановление кислорода до воды. Ферменты используются при трансформации ксенобиотиков, делигнификации и окислении субстратов, имеющих промышленное значение (например, краски для текстиля), в косметике и медицине.

Активный центр лакказ имеет 4 иона меди: T1 центр, содержащий один ион меди (Cu1) и медьсодержащий T2/T3 кластер, который состоит из T2 центра (Cu2) и двух ионов меди T3 центра (Cu3_α и Cu3_β) [1]. T1 центр принимает электроны от субстрата, а T2/T3 центр связывает молекулу кислорода и восстанавливает её до воды [2]. Трёхдоменные лакказы представляют собой мономер, состоящий из 3 доменов. 2DLac состоят из двух доменов и образуют функциональный тример, причём, T2/T3 центр локализован в интерфейсе между мономерами [3].

Ранее мы определили кристаллические структуры двух рекомбинантных 2DLac рода *Streptomyces* – лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 [4] и из *S. griseoflavus* Ac-993 [5]. Сравнительный структурный анализ окружения, а T2/T3 центра большинства 2DLac и трёхдоменных лакказ показал отличия в сети каналов, соединяющих этот центр с поверхностью белка. В структуре трёхдоменных лакказ явно видны широкие каналы, обеспечивающие доступ кислорода к каталитическому центру, в 2DLac возможные каналы явно неопределены.

Целью наших исследований является поиск каналов, соединяющих T2/T3 центр 2DLac с поверхностью белка. Мы предположили, что гистидин 165, принадлежащий второй координационной сфере T2/T3 центра лакказы *S. griseoflavus* (SgfSL) может играть роль «ворот» одного из каналов для транспорта кислорода к каталитическому центру. Согласно нашим предположениям, замена гистидина на аланин должна открыть «ворота», а замена на гидрофобный фенилаланин – закрыть.

Анализ структур SgfSL и двух мутантных форм (His165Phe SgfSL и His165Ala SgfSL) показал, что изменения наблюдаются только в местах замен аминокислотных остатков. Каталитическая активность His165Ala SgfSL повысилась по сравнению с активностью белка дикого типа, а активность His165Phe SgfSL значительно снизилась.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение SgfSL и мутантных форм.

Генетические конструкции His165Phe SgfSL и His165Ala SgfSL получены методом сайт-направленного мутагенеза по протоколу Quick Change. В качестве матрицы для ПЦР использована плаزمида pQE-993nS, в которой последовательность гена SgfSL не содержала последовательности сигнального пептида [13].

Использованы следующие олигонуклеотиды: для His165Ala SgfSL: прямой – 5'-TCGGCACGGAAGCGGGCACGGGCGGCAT-3' и обратный – 5'-ATGCCGCCCCGTGCCCCGCTCCGTGCCGA-3'; для His165Phe SgfSL: прямой – 5'-TCGGCACCGAAATTTGGCACCGGCGGCATTCGCAACGG-3' и обратный – 5'-GCCGCCCCGTGCCAAATTCCGTGCCGACGACGTGGTC-3', курсивом с подчёркиванием показаны заменённые основания. ПЦР продукты были обработаны DpnI эндонуклеазой и затем трансформированы в компетентные клетки XL1-Blue. Нуклеотидная последовательность новых генетических конструкций подтверждалась секвенированием.

Компетентные клетки *Escherichia coli* M15 (pRep4) (Qiagen) трансформированы соответствующими плазмидами и выращены до оптической плотности $A_{600} = 0,5$ о.е при 37 °C с перемешиванием 150 об/мин. Суперпродукция лакказ индуцировалась добавлением 0,1 мМ ИПТГ (ИзоПропил β -D-1-ТеоГалактопиранозид). Одновременно с ИПТГ добавляли CuSO_4 до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали клетки при температуре 18 °C с перемешиванием 50 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при 5000 g в течение 15 минут, суспендировали в буфере А (20 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, 0,5 М NaCl и 20 мМ имидазола) с 1 мМ ФМСФ (ФенилМетилСульфонил Фторид) и разрушали на гомогенизаторе высокого давления EmulsiFlex-C3 (Avestin). Обломки клеточных мембран удаляли центрифугированием (15000g 30 мин.). Поскольку рекомбинантные белки содержали в N-концевой части шесть остатков гистидина, мы использовали металл-аффинную хроматографию. Клеточный экстракт наносили на колонку HisTrap (V = 5 мл) (GE Healthcare), уравновешенную буфером А. Несвязавшиеся со смолой белки удаляли промывом смолы 20 мл буфера А. Элюцию лакказ проводили буфером А со 150 мМ имидазола. Фракции, содержащие ферменты, были собраны и диализованы против буфера 50 мМ H_3BO_3 -NaOH, pH 9,0, 100 мМ NaCl.

Анализ каталитической активности.

Определение pH-оптимумов активности лакказ проводили в 50 мМ буфера Бриттона-Робинсона (борная кислота/ортофосфорная кислота/уксусная кислота) в области pH от 3,0 до 9,8. В качестве субстратов были использованы АБТС ($\lambda_{\text{макс}} = 420$ нм, $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 2,6-ДМФ ($\lambda_{\text{макс}} = 469$ нм, $\epsilon_{469} = 49600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Реакции проводили при комнатной температуре при оптимальных для ферментов значениях pH. Полученные данные о кинетике окисления субстратов аппроксимированы с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен, а также посредством линеаризации методом Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах $1/V$ и $1/[S]$, где V – скорость катализируемой реакции, выраженная в единицах удельной активности, и S – концентрация субстрата.

Кристаллизация и кристаллография.

Все эксперименты по кристаллизации проводились, как описано в [5] с небольшими модификациями.

Перед замораживанием кристаллы вымачивали в криорастворе (условия № 17 набора Crystal Screen Cryo, “Hampton Research”, США). Сбор дифракционных данных проводили на линии BL14.1 синхротрона BESSY (Берлин, Германия). Данные обрабатывали в программе XDS [6]. Фазовая проблема решена методом молекулярного замещения в программе Phaser [7], в качестве стартовой модели использовали структуру SgSL дикого типа [9]. Пространственную модель уточняли в программном комплексе Refmac [8], занятость ионов меди в T1-, T2- и T3-центрах определяли в программе Phenix [9]. Ручную правку структуры проводили в программе Coot [10]. Каналы доступа к T2/T3- центру рассчитывали в программе Caver [11], координационную ошибку структур оценивали в программе Scheck [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный структурный анализ каналов, ведущих к T2/T3-центру лакказ

Каналы 2DLac отличаются от каналов трёхдоменных лакказ длиной и шириной [13]. Предположительная роль Cu_2 и Cu_3 ионов состоит в фиксации молекулы кислорода в T2/T3 центре и временное связывание OH- групп перед поступлением протонов и освобождением воды [2]. Канал, ведущий к Cu_2 (T2 канал), может быть ответственным за транспорт протонов к активному центру [14] и удалению молекул воды [3]. В нем же располагается вероятный донор электронов 2DLac - тирозин 109. В структурах трёхдоменных лакказ на месте OH- группы этого аминокислотного остатка находится молекула воды.

Роль канала, ведущего к T3 центру (T3 канал), по-видимому, заключается в транспорте молекулярного кислорода [15, 16]. Таких T3 каналов может быть несколько. Мы предположили существование T3 канала, ведущего через межсубъединичное пространство от His165 по направлению к Cu_3 . Этот путь является кратчайшим для доступа кислорода с поверхности белка к T2/T3 центру (рис.1). Гистидин 165 занимает положение, соответствующее Glu498 в структуре трёхдоменной лакказы CotA *Bacillus subtilis*. Боковая цепь глутамина направлена внутрь T3 канала CotA. По этому каналу, предположительно, осуществляется доступ кислорода к каталитическому центру. Известно, что замены Glu498 на Asp, Thr и Leu приводили к резкому падению активности мутантных белков.

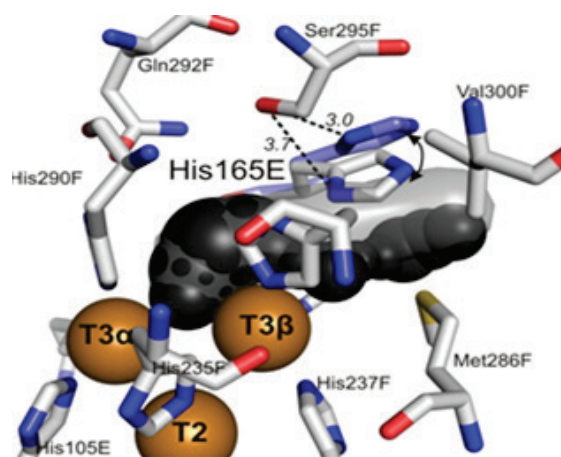


Рисунок 1. Предположительный Т3-канал, His 165 в «закрытом» и «открытом» положении. Буквами Е и F отмечены аминокислотные остатки, принадлежащие к разным молекулам тримера лакказы. Цифрами показано расстояние между имидазольным кольцом гистидина и сериновым остатком соседнего мономера в «закрытом» (3,7 Å) и «открытом» (3,0 Å) состоянии

Несмотря на то, что укорочение длины боковой цепи в случае замен на аспартат и треонин расширяет канал и повышает доступность Т2/Т3 центра, данные мутации значительно снижали активность фермента, что, вероятно, свидетельствовало о том, что Glu498 в трёхдоменных лакказах является переносчиком протонов, а не «воротами» данного канала. Видимо, роль аминокислотных остатков, расположенных в каналах, ведущих к Т2/Т3 центру, отличается у трёхдоменных и двухдоменных лакказ. Мы предполагаем, что роль переносчика протонов у 2DLac может выполнять глутамин (Gln291 у SgSL).

В структурах 2DLac SgfSL (PDB ID 5LHL) и лакказы *S. viridochromogenes* (PDB ID 4N8U) гистидин165 находится только в «закрытом» положении и минимальный радиус канала составляет всего $0,71 \pm 0,09$ Å. Расчёт стерически разрешённых состояний боковой цепи His165 показал, что имидазольное кольцо может смещаться и формировать водородную связь с серином 295 соседнего мономера (рис. 1), что расширяет канал до минимального радиуса в 1,28 Å. Этой ширины канала может быть достаточно для прохождения молекулы кислорода. Таким образом, расчёты свидетельствуют о возможности движения имидазольного кольца гистидина 165 в SgfSL, что позволяет рассматривать этот аминокислотный остаток как «ворота» Т3-канала лакказы.

Влияние замен гистидина 165 на активность SgfSL.

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу о наличии Т3-канала, «открытие» или «закрытие» которого обеспечивается мобильностью имидазольного кольца His165, были созданы мутантные формы His165Phe SgfSL и His165Ala SgfSL. Белки выделены, очищены, закристаллизованы, их структуры определены с высоким разрешением 1,95 Å и 2,3 Å, соответственно. Структуры депонированы в банк данных белковых структур: His165Phe SgfSL – PDB код 6FC7, His165Ala SgfSL – PDB код 6FDJ.

Анализ каталитической активности SgfSL и её мутантных форм при использовании в качестве субстрата АБТС (оптимум pH = 4,0 для SgfSL и мутантных форм) показал, что замена His165Phe в SgfSL приводит к резкому (более чем на 2 порядка) снижению значения K_{cat}/K_m , а замена His165Ala в 1,4 раза повышает активность SgfSL (табл. 1). His165Phe SgfSL не окисляет 2,6-ДМФ, активность His165Ala SgfSL относительно 2,6-ДМФ (оптимум pH белков = 8,5) практически не меняется (табл. 1).

Таблица 1. Каталитическая активность SgfSL и её мутантных форм. * - активность не наблюдается

		K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
АБТС	SgfSL	0,1±0,008	6,6±0,12	66,28
	SgfSL-H165A	0,12±0,01	10,8±0,21	90
	SgfSL-H165F	0,45±0,03	0,12±0,009	0,26
2,6-ДМФ	SgfSL	5,2	0,8	0,15
	SgfSL-H165A	6,1±0,34	1,1±0,065	0,18
	SgfSL-H165F	*	*	*

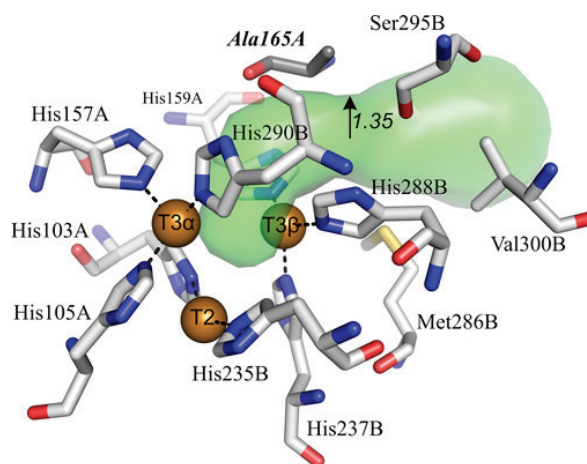


Рисунок 2. Фрагмент структуры His165Ala SgfSL. Указан радиус канала (Å). Пунктиром показаны связи ионов меди T2/T3 центра с гистидинами первой координационной сферы

Изменения в структурах наблюдались лишь в точках мутаций. Боковая группа фенилаланина находится в том же положении, что и имидазольное кольцо гистидина и перекрывает T3 канал, однако, Phe не может быть «воротами» канала, поскольку из-за своих гидрофобных свойств, практически не меняет свое положение. Это приводит к постоянному закрытию канала и, соответственно, существенному снижению каталитической активности. При замене His165 на аланин радиус канала увеличивается до 1,35 Å (рис. 2), T3 всегда находится в «открытом» состоянии, что, по всей видимости, и приводит к некоторому повышению активности фермента. Показано, что заполненность медью функциональных центров лакказы дикого типа и её мутантных форм примерно одинакова, тем самым, отсутствие меди в активных центрах не может быть причиной изменений в функциональной активности мутантных форм SgfSL.

По результатам наших исследований можно сделать вывод о наличии одного из каналов SgfSL, ведущих с поверхности белка к T2/T3 центру, а именно, к T3_β иону меди от His 165.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-04-00270-а) и Программы Президиума “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии” РАН.

Список литературы / References:

1. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.*, 1996, vol. 96, pp. 2563-2606.
2. Bento I., Martins L.O., Gato Lopes G., Arménia Carrondo M., Lindley P.F. Dioxygen reduction by multicopper oxidases; a structural perspective. *Dalt. Trans.*, 2005 vol. 4, p. 3507, DOI:10.1039/b504806k.
3. Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L.H., Østergaard P.R., Kolenko P., Dušková J., et al. The Structure of the Small Laccase from *Streptomyces coelicolor* Reveals a Link between Laccases and Nitrite Reductases. *J. Mol. Biol.*, 2009, vol. 385, pp. 165-1178, DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.024.
4. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G., Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie*, 2015, vol. 112, pp. 151-159, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.03.005.
5. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Trubitsina L., Lisov A., Zakharova M., Leontievsky A. Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus*. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.*, 2015, vol. 71, pp. 1200-1204, DOI: 10.1107/S2053230X15014375.
6. Kabsch W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, pp. 133-144, DOI: 10.1107/S0907444909047374.
7. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, vol. 40, pp. 658-674, DOI: 10.1107/S0021889807021206.
8. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., et al., REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2011, vol. 67, pp. 355-367, DOI:10.1107/S0907444911001314.
9. Adams P.D., Afonine P.V., Bunkóczi G., Chen V.B., Davis I.W., Echols N., et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, pp. 213-221, DOI: 10.1107/S0907444909052925.
10. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, pp. 486-501, DOI: 10.1107/S0907444910007493.
11. Pavelka A., Sebestova E., Kozlikova B., Brezovsky J., Sochor J., Damborsky J. CAVER: Algorithms for Analyzing Dynamics of Tunnels in Macromolecules, *IEEE. ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma*, 2016, vol. 13, pp. 505-517, DOI: 10.1109/TCBB.2015.2459680.

12. Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J., et al. *SFCHECK*: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 1999, vol. 55, pp. 191-205, DOI:10.1107/S0907444998006684.
13. Gabdulkhakov A.G., Kostareva O.S., Kolyadenko I.A., Mikhaylina A.O., Trubitsina L.I., Tishchenko S.V. Incorporation of Copper Ions into T2/T3 Centers of Two-Domain Laccases. *Mol. Biol.*, 2018, vol. 52, DOI:10.1134/S0026893318010041.
14. Jones S.M., Solomon E.I. Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. *Cell Mol Life Sci.*, 2015, vol. 72, pp. 869-883, DOI:10.1007/s00018-014-1826-6. Electron.
15. Komori H., Kataoka K., Tanaka S., Matsuda N., Higuchi Y., Sakurai T. Exogenous acetate ion reaches the type II copper centre in CueO through the water-excretion channel and potentially affects the enzymatic activity. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.*, 2016, vol. 72, pp. 558-563, DOI: 10.1107/S2053230X16009237.
16. K.M. Polyakov, S. Gavryushov, S. Ivanova, T. V. Fedorova, O.A. Glazunova, A.N. Popov, et al., Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, 2017, vol. 73, pp. 388-401, DOI: 10.1107/S2059798317003667.

INVESTIGATIONS OF ACCESSIBILITY OF T2/T3 COPPER CENTRE OF TWO-DOMAIN LACCASE FROM *STREPTOMYCES GRISEOFLOVUS* AC-993

Tishchenko S.V.¹, Kostareva O.S.¹, Mikhaylina A.O.¹, Lisov A.V.², Kolyadenko I.A.¹, Gabdulkhakov A.G.¹

¹Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: sveta@vega.protres.ru

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences

Nauki dis., 5, Pushchino, 142290, Russia

Abstract. Laccases (EC 1.10.3.2) are "blue" copper-containing oxidoreductases widely distributed and highly important for biotechnology. The substrates of these enzymes are various phenolic compounds. Laccases are found in higher plants, some insects, fungi and bacteria. Laccases contain four copper atoms organized in 3 sites: T1, T2 и T3. In bacteria, along with three-domain laccases, there are two-domain laccases (2DLac), which have a number of functional advantages. 2DLac are active at neutral and alkaline pH values, have increased thermostability and are resistant to the action of various inhibitors. The catalytic mechanism of the two-domain laccase is intensively studied; however, the principles of substrate/product transport are still not fully understood.

This paper presents a comparative analysis of the catalytic activity and crystal structures of recombinant 2DLac from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 and its mutant forms with His165 substitutions on Phe and Ala. His165 is conservative for 2DLac, it belongs to the second coordination sphere and is located near the surface of the protein. We assume that the movement of the imidazole ring His165 can "open" or "close" one of the substrate-product channels leading to the T2 /T3 center of laccase from *S. griseoflavus*.

Key words: two-domain laccases, *Streptomyces griseoflavus*, crystal structures, T2 / T3 center, substrates channels.

МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫЕ ТИА- И ОКСАКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ В КАЧЕСТВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ НА АЛЬБУМИН В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Шведова Л.А.¹, Татиколов А.С.¹, Пронкин П.Г.¹, Панова И.Г.²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, д. 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: shvedova@sky.chph.ras.ru

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

ул. Вавилова, д. 26, г. Москва, 119334, РФ

Поступила в редакцию: 13.06.2018

Аннотация. Спектрально-флуоресцентными методами было изучено нековалентное взаимодействие ряда анионных мезо-замещенных карбоцианиновых красителей – 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-метилтиакарбоцианин-бетаина (ДМЦ), 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этил-тиакарбоцианин-бетаина (ДЭЦ), 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбо-цианин-бетаина (ОКЦ) с сывороточным альбумином человека (САЧ). Существенные изменения в спектрах поглощения и флуоресценции красителей в присутствии САЧ указывают на образование стабильных нековалентных комплексов. Взаимодействие с САЧ приводит к значительному росту флуоресценции красителей. Показано, что взаимодействие мезо-замещенных красителей с САЧ приводит к сдвигу *цис-транс*-изомерного равновесия. Красители предложены для использования в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для оценки структурно-функциональных свойств САЧ и для анализа внеклеточного матрикса с целью определения альбумина, динамика изменения которого может характеризовать изучаемую ткань при ее развитии, стадии взросления и старения.

Ключевые слова: тиакарбоцианиновые красители, оксакарбоцианиновые красители, сывороточный альбумин, нековалентный комплекс, спектрально-флуоресцентные зонды.

В организме сывороточный альбумин выполняет функции транспорта биологических метаболитов, в основе которых лежит способность альбумина образовывать межмолекулярные комплексы с различными соединениями [1, 2]. На этой же способности сывороточных альбуминов основано применение спектрально-флуоресцентных зондов для обнаружения этих белков в биологических образцах и искусственных системах [3]. Полиметиновые (цианиновые) красители успешно применяются в качестве чувствительных к альбуминам молекулярных зондов [4]. Поскольку фотофизические и фотохимические свойства полиметиновых красителей значительно изменяются при нековалентном взаимодействии с биополимерами, эти соединения, нековалентно связываясь с молекулой альбумина, демонстрируют изменение спектрально-флуоресцентных свойств, что позволяет детектировать малые концентрации белка [4].

В настоящей работе приведены результаты взаимодействия ряда мезо-замещенных цианиновых красителей – 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-метилтиакарбоцианин-бетаина (ДМЦ), 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина (ДЭЦ), 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианин-бетаина (ОКЦ) с сывороточным альбумином человека (САЧ). Исследовано влияние комплексообразования с белком на спектрально-флуоресцентные свойства красителей, в работе ставилась задача раскрыть потенциал ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ как красителей-зондов для определения САЧ *in vitro* в модельных и реальных биологических системах.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали красители, любезно предоставленные научным центром НИИХИМФОТОПРОЕКТ. Сывороточный альбумин человека был коммерческий («Sigma-Aldrich», США). В качестве растворителей использовались 1,4-диоксан, ацетон, этанол, изопропанол, диметилсульфоксид (ДМСО) (ч.д.а), дистиллированная вода. Для денатурации САЧ использовалась кристаллическая мочеви́на (х.ч., «Химмед», Россия). Растворы красителя готовили непосредственно перед проведением измерений.

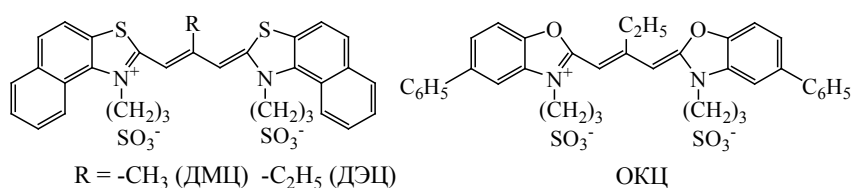


Рисунок 1. Структурные формулы исследованных красителей

Измерения спектров поглощения красителей проводились на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), флуоресцентные измерения – на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия). Все измерения проводились при комнатной температуре (20 ± 3 °C).

Наблюдаемые константы комплексообразования красителей с САЧ определялись по данным спектров флуоресценции с использованием зависимости Хилла (K_H , л моль⁻¹) [5]: $I_f = I_{f,max} \cdot [САЧ] / (K_d^m + [САЧ]^m)$, где $[САЧ]$ – концентрация альбумина (моль л⁻¹); I_f – интенсивность сигнала флуоресценции красителя при этой концентрации альбумина; $I_{f,max}$ – интенсивность сигнала флуоресценции при 100 % связывании красителя; K_d – эффективная константа диссоциации комплекса (моль л⁻¹; $K_H = 1/K_d$); m – коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность связывания ($m > 1$ – кооперативное связывание, $m < 1$ – антикооперативное) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрально-флуоресцентные свойства анионных мезо-замещенных красителей ДЭЦ, ОКЦ в различных растворителях были изучены ранее [6, 7]. Краситель ДМЦ характеризуется довольно узкими и интенсивными полосами поглощения в видимой области спектра. Благодаря полному π -электронному сопряжению в полиметиновой цепи цианиновые красители имеют, как правило, высокие коэффициенты экстинкции. При понижении полярности наблюдается bathochromный сдвиг максимумов спектров поглощения красителей (для ДМЦ в этаноле ~ 575 нм, в диметилсульфоксиде ~ 580 нм).

Тиа- и оксакарбоцианиновые красители способны образовывать *цис*- (EEZE) и *транс*-(EEEE) изомеры за счет вращения концевых фрагментов молекул вокруг связей полиметиновой цепи. Известно, что красители, не имеющие заместителей в полиметиновой цепи, находятся в растворах в форме *транс*-изомеров, т.е. при отсутствии стерических затруднений планарная *транс*-конфигурация тиакарбоцианиновых красителей является энергетически более стабильной [8]. В спектрах поглощения мезо-замещенных карбоцианиновых красителей обнаружено равновесие *цис*- и *транс*-изомеров, сдвигающееся в полярных средах в сторону *цис*-форм (коротковолновая полоса), а в малополярных растворителях в сторону *транс*-изомеров (длинноволновая полоса) [9, 10].

Для ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ характерна слабая флуоресценция в полярных растворителях. В частности, для ОКЦ квантовый выход флуоресценции $\phi_f = 7$ % в растворе изопропанола и 4 % в растворе ацетона [7]. В полярных растворителях спектры возбуждения флуоресценции красителей сдвинуты в длинноволновую область по сравнению со спектрами поглощения, максимумы в спектрах возбуждения флуоресценции для ДМЦ в этаноле ~ 583 нм, в диметилсульфоксиде ~ 598 нм. Это свидетельствует о присутствии в полярных растворителях значительных количеств *цис*- и *транс*-изомеров красителей, которые имеют различные спектрально-флуоресцентные свойства. Так, у *цис*-изомеров мезо-замещенных карбоцианиновых красителей практически отсутствует флуоресценция [11].

В неполярных растворителях происходит стабилизация флуоресцирующих *транс*-изомеров мезо-замещенных карбоцианиновых красителей за счет образования ионных пар анионов красителей с противоионами. В случае растворов ДЭЦ и ОКЦ в неполярном 1,4-диоксане положения максимумов красителей в спектрах поглощения и спектрах возбуждения флуоресценции удовлетворительно совпадают. Образование ионных пар в неполярном растворителе к значительному увеличению «жесткости» молекул флуорофоров, что сопровождается резким ростом флуоресценции ДЭЦ, ОКЦ (для ОКЦ $\phi_f = 42$ % в растворе 1,4-диоксана). В то же время спектр поглощения ДМЦ в растворе 1,4-диоксана уширен и сдвинут в длинноволновую область за счет образования агрегатов (642 нм).

В водных растворах красители ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ проявляют тенденцию к агрегации (способны образовывать димеры, Н- и J-агрегаты даже при малых концентрациях). Тип и строение агрегатов полиметиновых красителей зависят как от особенностей их молекулярной структуры, так и от молекулярного окружения. В спектре поглощения ДМЦ наблюдается интенсивная полоса Н-димеров (~ 534 нм), полоса мономерного красителя (М-полоса) представляет собой плечо ~ 578 нм, в спектрах может присутствовать незначительный вклад J-агрегатов (~ 690 нм). Для Н-димеров ДМЦ характерна длинноволновая флуоресценция (686 нм), флуоресценция М-полосы крайне слабая (максимум ~ 650 нм). Спектр поглощения ДЭЦ представляет собой полосу с максимумом 535 нм и плечом при ~ 570 нм, обусловленную поглощением соответственно димеров и *цис*-мономеров красителя, находящихся в равновесии (отметим, что ни димеры, ни *цис*-мономеры ДЭЦ не флуоресцируют) [6]. Отметим, что тиакарбоцианиновые красители ДМЦ, ДЭЦ более склонны к агрегации, нежели оксакарбоцианиновый краситель ОКЦ. В водном растворе ОКЦ, наряду с мономером (максимум поглощения мономера 499 нм), образует флуоресцирующие Н-димеры (поглощение димеров в виде коротковолнового плеча ~ 470 нм), а также образует J-агрегаты (характерное слабое поглощение 560 нм).

Спектры поглощения и флуоресценции ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ в присутствии САЧ были изучены в водном растворе при различных концентрациях биополимера ($c_{САЧ} = 0.3, 4 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹). При введении САЧ в растворы тиакарбоцианиновых красителей ДМЦ, ДЭЦ спектры поглощения красителей резко изменяются, происходит распад агрегатов красителя, в спектрах поглощения появляются длинноволновые максимумы мономеров, связанных с САЧ (ДМЦ – 604 нм, ДЭЦ – 610 нм). В присутствии САЧ спектры возбуждения флуоресценции ДМЦ, ДЭЦ удовлетворительно соответствуют спектру поглощения связанных форм красителей (т.е. спектру поглощения, регистрируемому при большой концентрации САЧ), а спектры флуоресценции –

спектрам флуоресценции связанных красителей (ДМЦ – 617 нм, ДЭЦ – 622 нм), что указывает на образование красителями флуоресцирующих комплексов только одного типа. На образование *транс*-мономерной формы ДЭЦ в комплексе с САЧ указывает также то, что спектр поглощения связанного красителя близок по форме и положению к спектру *транс*-изомера ДЭЦ, зарегистрированного ранее в 1,4-диоксане. Таким образом, при взаимодействии с альбумином красители ДМЦ, ДЭЦ переходят из агрегатов и *цис*-мономеров в комплексы *транс*-мономеров, для которых характерна сильная флуоресценция.

В случае ОКЦ в области низких и умеренных концентраций САЧ ($c_{\text{САЧ}} \sim 5 \times 10^{-6}$ моль л⁻¹) спектры поглощения красителя уширяются, интенсивность полос падает. Увеличение концентрации САЧ приводит к росту наблюдаемого коэффициента экстинкции полосы поглощения ОКЦ, максимум спектра поглощения сдвигается в длинноволновую область (~ 12 нм; $c_{\text{САЧ}} = 2.1 \times 10^{-5}$ моль л⁻¹). Эти эволюции спектров объясняются образованием и распадом агрегатов красителя, связанного с САЧ. В спектрах флуоресценции ОКЦ в присутствии САЧ наблюдается длинноволновый сдвиг полосы красителя. В спектрах возбуждения флуоресценции максимумы не соответствуют спектрам поглощения красителя и сдвинуты в длинноволновую область (~ 11 нм). Несовпадение положений максимумов полос в спектрах поглощения и возбуждения флуоресценции для красителя, связанного с САЧ, изменения ширины и структурированности полос в спектрах свидетельствуют о том, что взаимодействие с белком приводит к сдвигу *цис-транс*-изомерного равновесия ОКЦ в сторону образования длинноволнового *транс*-изомера красителя, связанного с САЧ. Отметим, что аналогичные эффекты наблюдаются при связывании ОКЦ с бычьим сывороточным альбумином [13], тогда как в системе, содержащей ДЭЦ и САЧ, краситель проявляет высокую специфичность по отношению к САЧ [6, 13], что, вероятно, объясняется высокой эффективностью (энергией) связывания *транс*-мономера ДЭЦ с САЧ.

Образование комплекса с САЧ приводит к сдвигу изомерного равновесия и росту флуоресценции красителей ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ. При образовании комплексов с САЧ может увеличиваться «жесткость» молекул красителей, что, в свою очередь, способно приводить к падению констант скорости внутренней конверсии и увеличению квантовых выходов флуоресценции красителей как конкурирующего процесса.

Сложное равновесие краситель – САЧ с участием стадий образования и распада агрегатов красителей позволяет говорить лишь об определении эффективных значений констант комплексообразования (K_{ef}) из спектральных данных. Из уравнения Хилла [5] получены константы ассоциации красителей (K_{H}): $K_{\text{H}}(\text{ДМЦ}) = 2,9 \times 10^6$ л моль⁻¹ (коэффициент Хилла $m = 1,4$), $K_{\text{H}}(\text{ДЭЦ}) = 7,7 \times 10^5$ л моль⁻¹ ($m = 1,05$), оксакарбоданиновый краситель ОКЦ демонстрирует меньшее на порядок значение константы комплексообразования $K_{\text{H}}(\text{ОКЦ}) = 1,3 \times 10^5$ л моль⁻¹ ($m = 1,1$).

Исследовано влияние денатурации САЧ (денатурирующий агент мочевины) на спектрально-флуоресцентные свойства красителей ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ в комплексах. В процессе денатурации нарушение конформационной структуры альбумина приводит к распаду сильно-флуоресцирующих комплексов краситель-САЧ, что сопровождается изменениями спектров и падением флуоресценции. Поскольку наиболее сильное падение интенсивности флуоресценции ДМЦ имеет место в присутствии $\sim 4\text{--}4,5$ моль л⁻¹ можно сделать вывод, что краситель образует комплекс с САЧ, в основном связываясь с белком в области субдомена IIIa, который подвергается денатурации в этих условиях [14]. В случае ОКЦ, обнаружено сильное влияние происходящих при денатурации структурных изменений альбумина на агрегацию красителя [15]. Денатурация комплекса ОКЦ-САЧ сопровождается появлением в спектрах поглощения полос J-агрегатов двух различных типов: при $0,37\text{--}2,5$ моль л⁻¹ мочевины образуются J¹-агрегаты (максимум поглощения 576 нм), увеличение концентрации мочевины (до $7,2$ моль л⁻¹) приводит к нарастанию коротковолновой полосы J²-агрегатов (545 нм). Спектральные характеристики J-агрегатов, образующихся в присутствии белка, отличаются от свойств агрегатов, образующихся в растворах, что является дополнительным способом контроля типа и состояния биополимера [15].

Таким образом, значительные изменения спектрально-флуоресцентных свойств (происходящие в результате сдвигов *цис-транс*-изомерного равновесия красителей в сторону образования комплексов *транс*-изомеров), высокие эффективные константы связывания (порядка 10^6 л моль⁻¹ для ДМЦ, ДЭЦ), высокие квантовые выходы флуоресценции связанных с белком красителей ($\phi_{\text{п}} = 0,57$ для ДЭЦ и $0,36$ для ОКЦ) позволяют предложить красители ДМЦ, ДЭЦ, ОКЦ в качестве эффективных спектрально-флуоресцентных зондов при изучении САЧ [6, 7, 12, 13, 15–18]. В работе [16] комплексом методов, в том числе с применением красителя-зонда ОКЦ, исследовано изменение химической и пространственной структуры САЧ при его окислении озоном, количество озона в реакторе варьировали в диапазоне $2,0\text{--}9,7 \times 10^{-7}$ моль ($0,5\text{--}2$ усл. ед.). Показано, что в образцах с озонированным САЧ наблюдается меньший рост флуоресценции по сравнению с исходным: при обработке раствора белка 1 и 2 ед. озона интенсивность флуоресценции ОКЦ составляет $\sim 74 \pm 6$ % и 41 ± 6 % от контрольного значения. При озонировании имеет место нарушение связывания красителя и белка, являющееся косвенным признаком химической и структурной модификации белка в области связывания ОКЦ (субдомен IIIa) [16].

В [17] было показано, что зонд ДЭЦ может применяться для определения САЧ во внеклеточных средах организма. В частности, он был применен в качестве спектрально-флуоресцентного зонда для определения альбумина в образцах стекловидного тела глаза в пренатальном развитии человека и была показана возрастная динамика концентрации САЧ с 16-й по 31-ю неделю беременности [18].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), проект № 16-03-00735.

Список литературы / References:

1. Peters T., Jr. *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. San-Diego: Academic Press, 1996, 432 p.
2. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.*, 1981, vol. 33, pp. 17-53.
3. Cheng Er.J., Vendrell M., Tang M.K., Zhai D., Chang Y.-T. Fluorescent Dye Cocktail for Multiplex Drug-Site Mapping on Human Serum Albumin. *ACS Comb. Sci.*, 2013, vol. 15, pp. 452-457.
4. Tatikolov A.S. Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Reviews*, 2012, vol. 13, pp. 55-90.
5. Hill A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*, 1910, vol. 40, pp. 4-7.
6. Татикилов А.С., Панова И.Г. Спектрально-флуоресцентное изучение нековалентного взаимодействия мезо-замещенного цианинового красителя с сывороточными альбуминами. *Химия высоких энергий*, 2014, т. 48, № 2, с. 116-122. [Tatikolov A.S., Panova I.G. Spectral and fluorescent study of the noncovalent interaction of a meso-substituted cyanine dye with serum albumins. *High Energy Chemistry*, 2014, vol. 48, no. 2, pp 116-122. (In Russ.)]
7. Пронкин П.Г., Татикилов А.С. Спектрально-флуоресцентные свойства анионного оксакарбоцианинового красителя в комплексах с сывороточным альбумином человека. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2015, т. 82, № 3, с. 429-435. [Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Spectral fluorescence properties of an anionic oxacarbocyanine dye in complexes with human serum albumin. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2015, vol. 82, pp. 429-435. (In Russ.)]
8. Колесников А.М., Михайленко Ф.А. Конформации полиметиновых красителей. *Успехи химии*, 1987, т. 56, № 3, с. 466-488. [Kolesnikov A.M., Mikhailenko F.A. The conformations of polymethine dyes. *Russ. Chem. Rev.*, 1987, vol. 56, no. 3, pp. 275-287. (In Russ.)]
9. West W., Pearce S. The Dimeric State of Cyanine Dyes. *J. Phys. Chem.*, 1965, vol. 69, pp. 1894-1903.
10. Noukakis D., Van der Auweraer M., Toppet S., De Schryver F. Photophysics of a thiacarbo-cyanine dye in organic solvents. *J. Phys. Chem.*, 1995, vol. 99, pp. 11860-11866.
11. Khimenko V., Chibisov A.K., Gorner H., Effects of alkyl substituents in the polymethine chain on the photoprocesses in thiacarbo-cyanine dyes. *J. Phys. Chem. A*, 1997, vol. 101, pp. 7304-7310.
12. Пронкин П.Г., Татикилов А.С. Изучение взаимодействия анионного оксакарбоцианинового красителя с бычьим сывороточным альбумином спектрально-флуоресцентными методами. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2016, т. 83, № 6, с. 884-890. [Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Spectral and fluorescent studies of the interaction of an anionic oxacarbocyanine dye with bovine serum albumin. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2017, vol. 83, no. 6, pp. 938-944. (In Russ.)]
13. Tatikolov A.S., Costa S.M.B. Complexation of polymethine dyes with human serum albumin: a spectroscopic study. *Biophys. Chem.*, 2004, vol. 107, pp. 33-49.
14. Leggio C., Galantini L., Konarev P.V., Pavel N.V. Urea-induced denaturation process on defatted human serum albumin and in the presence of palmitic acid. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 12590-12602.
15. Пронкин П.Г., Татикилов А.С. Изучение образования J-агрегатов анионного оксакарбоцианинового красителя при взаимодействии с белками и полиэлектролитами. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2017, т. 84, № 2, с. 192-200. [Pronkin P.G., Tatikolov A.S. Formation of J-aggregates of an anionic oxacarbocyanine dye upon interaction with proteins and polyelectrolytes. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2017, vol. 84, no. 2, pp. 217-224. (In Russ.)]
16. Горобец М.Г., Вассерман Л.А., Васильева А.Д., Бычкова А.В., Пронкин П.Г., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Шилкина Н.Г., Константинова М.Л., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А. Модификация человеческого сывороточного альбумина при его индуцированном окислении. *Доклады Академии наук*, 2017, т. 474, № 6, с. 751-755. [Gorobets M.G., Wasserman L.A., Vasilyeva A.D., Bychkova A.V., Pronkin P.G., et. al. Modification of human serum albumin under induced oxidation. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2017, vol. 474, no. 1, pp. 231-235. (In Russ.)]
17. Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T., Tatikolov A.S. Use of a cyanine dye as a probe for albumin and collagen in the extracellular matrix. *Analytical Biochemistry*, 2007, vol. 361 pp. 183-189.
18. Панова И.Г., Татикилов А.С., Сухих Г.Т. Корреляция между содержанием альбумина и каротиноидов в стекловидном теле глаза человека в пренатальном развитии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2007, т. 144, № 11, с. 522-525. [Panova I.G., Tatikolov A.S., Sukhikh G.T. Correlation between the content of albumin and carotenoids in human vitreous body during prenatal development. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2007, vol. 144, no. 5, pp. 681-683. (In Russ.)]

MESO-SUBSTITUTED THIA- AND OXACARBOCYANINE DYES AS MOLECULAR PROBES FOR ALBUMIN IN BIOLOGICAL SYSTEMS**Shvedova L.A.¹, Tatikolov A.S.¹, Pronkin PG.¹, Panova I.G.²**¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS*Kosygin str. 4, Moscow, 119334 Russia; e-mail: shvedova@sky.chph.ras.ru*²Kol'tsov Institute of Developmental Biology, RAS*Vavilova str., 26, Moscow, 119334, Russia*

Annotation. The noncovalent interaction of a number of anionic meso-substituted carbocyanine dyes – 3,3'-di-(γ -sulfopropyl)-4,5,4',5'-dibenzo-9-methylthiacarbocyanine betaine (DMC), 3,3'-di-(γ -sulfopropyl)-4,5,4',5'-dibenzo-9-ethylthiacarbocyanine betaine (DEC), 3,3'-di-(γ -sulfopropyl)-5,5'-diphenyl-9-ethyloxacarbon-cyanine betaine (OEC) with human serum albumin (HSA) was studied by spectral-fluorescent methods. Substantial changes in the absorption and fluorescence spectra of the dyes in the presence of HSA indicate the formation of stable noncovalent complexes. Interaction with HSA leads to a significant increase in fluorescence of the dyes. It is shown that the interaction of meso-substituted dyes with HSA leads to a shift of cis-trans-isomeric equilibrium of the dyes. The dyes were proposed for use as spectral-fluorescent probes for evaluating the structural and functional properties of HSA and for analyzing the extracellular matrix in order to determine albumin whose dynamics of change can characterize the tissue under study during its development, the stage of growing up and aging.

Key words: *thiacarbocyanine dyes, oxacarbocyanine dyes, serum albumin, noncovalent complex, spectral-fluorescent probes.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОНАНОАЭРОЗОЛЕЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Морозов В.Н.

Институт Теоретической и Экспериментальной биофизики РАН
Ул. Институтская, 3, г. Пушкино, 142290 РФ; e-mail: tammorozova@rambler.ru
Поступила в редакцию: 16.06.2018

Аннотация. Представлено новое направление биотехнологии, основанное на использовании наноаэрозолей для лечения и диагностики легочных заболеваний. В обзоре описаны методы генерации бионаноаэрозолей (БНА), которые сохраняют структуру и биологическую активность молекул. Разработанный автором метод генерации использует электрогидродинамическое распыление растворов лекарств с последующей нейтрализацией заряженных нанокластеров в газовой фазе. Он позволяет превращать в БНА практически любое вещество, растворимое в воде или в спирте (включая пептиды, белки, ДНК) без изменения его функциональных свойств. Представлены методы дозиметрии наноаэрозольных лекарств, приведены примеры использования БНА антибиотиков и других лекарств для лечения инфекционных и системных заболеваний лабораторных животных. Описаны особенности лекарственных БНА, их преимущества по сравнению с другими способами введения лекарства и возможные побочные эффекты. Показано, что наноаэрозольные частицы, образующиеся в выдыхаемом воздухе при высыхании микрокапель легочной жидкости, могут быть использованы для неинвазивной диагностики легочных заболеваний. Разработаны специальные фильтры и одноразовые приспособления для сбора таких микрокапель из выдыхаемого воздуха. Продемонстрирована принципиальная возможность неинвазивной диагностики туберкулеза легких по выдыхаемым антителам, специфичным к секретируемым антигенам микобактерии. Аналогичные устройства, успешно примененные для анализа нозокомиальных инфекций в клинике, можно использовать для обеспечения безопасности на транспорте, в промышленных и жилых помещениях.

Ключевые слова: бионаноаэрозоли, генератор, лечение бионаноаэрозолями, выдыхаемый воздух, неинвазивная диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

В данном сообщении представлена новая область исследований в биотехнологии, связанная с изучением и использованием наноаэрозолей биологических и биологически-активных веществ в терапевтических целях и для диагностики легочных заболеваний. Термином «наноаэрозоли» мы будем далее обозначать взвешенные в воздухе частицы с размерами от нескольких нанометров до 200-300 нм. Наноаэрозольные частицы такого размера, состоящие из органического материала, мы будем далее называть бионаноаэрозолями (БНА). БНА поступают в атмосферу в ряде природных процессов. Например, большое количество БНА образуется над лесными массивами при фотоокислении летучих органических веществ, выделяемых растениями [1]. Конденсация водяных паров на таких наночастицах в значительной степени определяет осадки и климат и влияет на здоровье населения [2]. БНА могут нести токсины или патогены. Так, наноаэрозоли, содержащие вирусные частицы, могут попадать в воздушную среду при смыве туалета [3].

БНА представляют собой сравнительно новую область исследования, направленную на изучение токсичности вдыхаемых наноаэрозолей, на создание новых лекарственных форм и новых способов введения лекарственных веществ в организм, на разработку новых методов бесконтактной неинвазивной диагностики легочных заболеваний, основанных на сборе и анализе наноклапель и наночастиц в выдыхаемом воздухе. Эта область исследования возникла как результат разработки технических средств для генерации БНА, методов дозиметрии и определения регионального осаждения БНА. При вдыхании БНА он проникает в альвеолярные структуры легкого, где непосредственно вступает в контакт с клеточными мембранами легочного эпителия и альвеолярных макрофагов. Поэтому, для понимания биологических эффектов БНА требуется фундаментальное исследование эффектов взаимодействия БНА с поверхностью клетки в зависимости от состава наночастиц, их формы и заряда поверхности. Также как при других способах доставки можно существенно увеличить эффективность лекарства в БНА, упаковав его в специальные наноконтейнеры, которые защитят лекарство от разрушения, обеспечат длительное его выделение в легочную жидкость или доставку в специальные клетки (в макрофаги или в клетки опухоли). Таким образом, разработка наноаэрозольных лекарств предполагает решение целого ряда технологических проблем.

Природные наноаэрозоли, в частности БНА, образующиеся при высыхании микрокапель легочной жидкости в выдыхаемом воздухе, также представляют большой практический интерес, так как их анализ позволит получать сведения о биохимических процессах в глубине легкого. С учетом неинвазивного характера сбора проб такой метод обещает стать хорошим подспорьем рентгеновским методам в скрининге легочных заболеваний и в мониторинге их лечения.

Наноаэрозольные лекарства. В первой части обзора мы кратко рассмотрим современное состояние проблемы наноаэрозольных лекарств: методов генерации БНА лекарственных веществ, способов измерения дозы лекарства, полученного при вдыхании БНА, и особенности терапевтического действия наноаэрозольных лекарств, отличающие их от аэрозолей микронного размера, генерируемых стандартными небулайзерами и ингаляторами. Мы также кратко обсудим наиболее интересные опубликованные данные по терапии лекарственными БНА.

Методы генерации бионаноаэрозолей. Одной из проблем в исследовании биологических эффектов БНА являлось отсутствие надежных коммерческих приборов для их генерации. Из известных методов генерации наноаэрозолей, таких как горение, дуговой и искровой разряды, лазерная абляция, конденсация паров и высушивание микрокапель раствора (см. отличный обзор методов [4]), только два последних могут быть применены для генерации БНА. Так, сравнительно простые органические молекулы можно испарять или сублимировать при нагревании в атмосфере инертного газа (чтобы избежать окисления при высоких температурах), как схематически показано на рис. 1А. При охлаждении пара образуются частицы наноаэрозоля, размер которых определяется концентрацией пара и скоростью его охлаждения [5]. Данный принцип реализован в серии конденсационных генераторов БНА, два из которых изображены на рисунке 1В. Конденсационные генераторы отличаются простотой конструкции, дешевизной и возможностью миниатюризации [6]. Однако их применимость ограничена, только органические соединения небольшой молекулярной массы, способные испаряться при нагревании без разрушения, можно превратить в БНА. БНА сложных лекарств с большой молекулярной массой, таких как пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды (не говоря о лекарствах, запакованных в наноконтейнеры) получить таким методом невозможно.

БНА сложных биологически активных веществ можно получить, распыляя раствор с помощью небулайзера и высушивая образовавшиеся микрокапли. Однако, значительные повторяющиеся сдвиговые нагрузки в компрессорном и в ультразвуковом небулайзерах приводят к повреждению биомолекул, например, к разрыву молекул ДНК [7]. В этом смысле наиболее щадящим является мембранный распылитель [8]. Все небулайзеры имеют еще один недостаток при их использовании для генерации БНА. Для того, чтобы превратить 5-микронную каплю раствора в наночастицу с диаметром 50 нм потребуется, чтобы объемная доля сухого вещества в растворе составляла 1 мкг/мл. Для полного высыхания таких микрокапель при относительной влажности 20% на 1 мкг сухой массы БНА потребуется не менее 200 литров сухого воздуха, т.е., максимальная массовая концентрация БНА составит всего 5 мкг/м³. При средней скорости вдыхания 8 л/мин за один час человек получит около 1 мкг лекарства (учтено, что только половина таких БНА осядет в легких [10]). Чтобы увеличить скорость поступления лекарства дозу требуется увеличить концентрацию распыляемого раствора и разбить его на значительно более мелкие микрокапли, чем это позволяют небулайзер. Такую возможность дает технология электрораспыления.

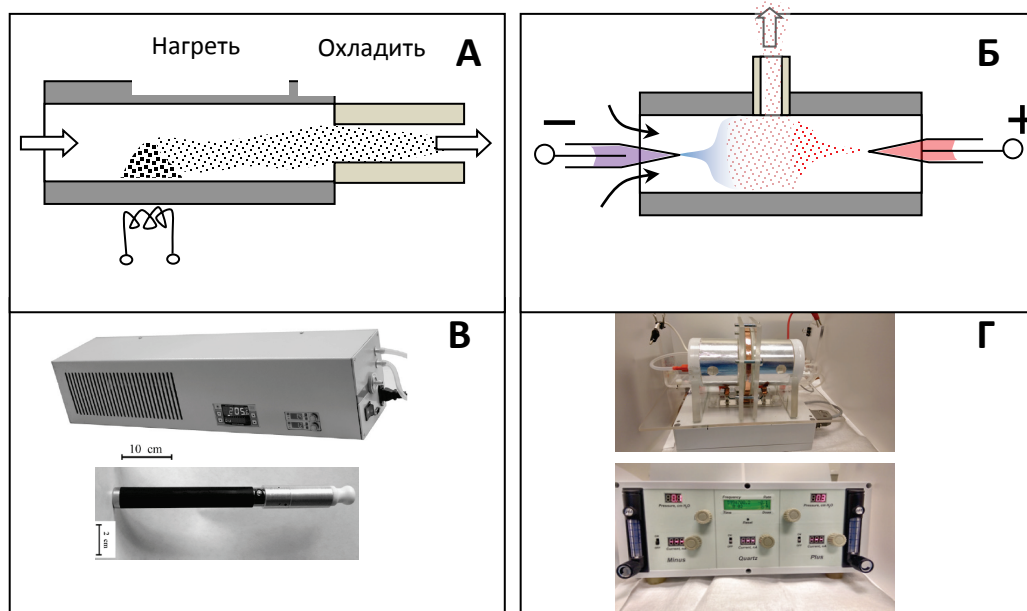


Рисунок 1. Схематическое изображение двух основных методов генерации БНА и изображения реальных генераторов БНА. А. Схема конденсационного генератора, в котором органическое вещество сублимируется при повышенной температуре, а затем охлаждается с образованием наноаэрозольных частиц. Б. Схематическое изображения генерации БНА методом электрораспыления с нейтрализацией продуктов электрораспыления противоположными в газовой фазе. В. Реальные конструкции конденсационного наногенератора [6]. Г. Конструкция генератора БНА, основанного на электрораспылении растворов лекарств [9]

В методе электрогидродинамического распыления диспергирование раствора идет не за счет механического воздействия на раствор, как в небулайзерах, а вследствие действия электрических зарядов, разрывающих заряженные микрокапли на нанокაпли [11]. Технически процесс электрораспыления происходит при приложении высокого напряжения к раствору, помещенному в тонкий капилляр. Высокая напряженность электрического поля на конце капилляра приводит к инъекции струи микрокапель микронного размера, как в небулайзере, но сильно заряженных. По мере испарения растворителя, заряженные микрокапли достигают предела Рэлея, после чего испытывают дополнительные распады, в каждом из которых испускается серия дочерних нанокაпель с размерами, примерно на порядок меньшими, чем материнская капля. В результате таких распадов каждая капля микронных размеров превращается в сотни нанокაпель, которые высыхают и превращаются в сильно заряженные нанокластеры сухих остатков вещества. Так как размер нанокაпель при электрораспылении примерно на порядок меньше размера микрокапель, получаемых в небулайзере, для получения БНА с диаметром 50 нм можно распылять раствор с объемной долей сухого вещества 1 мг/мл, что позволит в 1000 раз увеличить концентрацию БНА и скорость поступления вещества БНА в организм по сравнению с небулайзером в примере, представленном выше.

Получаемые в процессе электрораспыления нанокластеры сильно заряжены. Облако таких наночастиц быстро расширяется за счет пространственного заряда и наночастицы осаждаются на стенках генератора, в трубках и в носоглотке. В следствие этого сильно заряженный наноаэрозоль не может проникнуть в бронхи и альвеолы. Было предложено несколько способов нейтрализовать избыточные заряды на нанокластерах: пропускать их через разреженную плазму, создаваемую радиоактивными изотопами [12] или через облако ионных продуктов коронного тлеющего разряда [13]. Однако, в этих методах возможно повреждение биомолекул ионами и радикалами. Чтобы избежать этих повреждений автором было предложено использовать электрораспыление для генерации противоионов [14,15]. В конструкции на рисунке 1Б схематически показано, как облако нанокластеров, полученное при распылении раствора лекарства из положительно заряженного капилляра, нейтрализуется облаком отрицательно заряженных противоионов, получаемых, например, при распылении спиртового водного раствора из отрицательно заряженного капилляра. На рисунке 1В представлен протип такого прибора для генерации БНА в опытах с животными. Детали конструкции прибора, его основные технические характеристики, а также примеры генерации БНА из белков и других веществ представлены в серии работ автора с сотр. [14,15]. Было показано, что практически любое вещество, растворимое в воде или в этаноле, может быть превращено в БНА с эффективностью до 40%, с полным сохранением структуры и функциональных свойства молекул (антибиотиков, пептидов, белков, ДНК) и их сложных комплексов (нанолипосом, заполненных антибиотиком [16]). Генератор создает БНА с размерами 20-300 нм в концентрации до 10^{13} м^{-3} , и с выходом аэрозоля до 20 л/мин. При этом генератор может работать до 6 часов непрерывно. Отличительной чертой генератора является сохранение нескольких элементарных зарядов на БНА, что приводит примерно к двукратному увеличению вероятности осаждения БНА в легких по сравнению с нейтральными частицами такого же размера [17].] Преимуществом генератора по сравнению с небулайзерами является его значительно более высокая экономичность. Так, введение одинаковой дозы антибиотика в легкие мыши с помощью данного генератора потребовало в 20 раз меньшего количества антибиотика по сравнению с компрессорным небулайзером [16].

Измерение дозы наноаэрозольного лекарства, осажденного в легких. Дозиметрия БНА представляет определенные сложности как в измерении, так и в интерпретации. Во-первых, прямые методы ее измерения, основанные на использовании конденсационных счетчиков, сложнее и дороже лазерных счетчиков микронных аэрозольных частиц. Во-вторых, пока не ясно, в каких терминах описывать дозу БНА: как массовую, в мг вещества на кг массы тела, или как число частиц, отнесенное на площадь поверхности легкого. В первом случае предполагается, что лекарство поступает в кровоток, разбавляется там и распределяется по всем тканям. Во втором учитывается локальное действие в легком: терапевтическое, раздражающее, токсичное. По-видимому, тип дозы нужно будет подбирать для каждого лекарства в БНА форме, учитывая механизм его действия.

Технически дозиметрию БНА в опытах с животными осуществляют двумя способами. В наиболее распространенном способе БНА собирают после пропускания через клетку или устройство для носового дыхания в течении всего опыта, а затем смывают, измеряют в смыве количество лекарства и рассчитывают концентрацию БНА в воздухе. Далее, по известным данным об объеме воздуха, потребляемом животным, и о вероятности осаждения частиц данного размера в легких рассчитывают массовую дозу [18]. В более сложном методе используют размеры частиц и их концентрации, измеренные специальными конденсационными спектрометрами [15,19]. Этот метод позволяет вычислить не только общую массу лекарства, доставленного в легкие, но и определить локальную дозу, т.е., число частиц и массу лекарства, попавшего в разные отделы легкого.

Применение бионаноаэрозолей в терапии легочных и системных заболеваний. В настоящее время исследования в области наноаэрозольной терапии только начинаются. Известны немногочисленные публикации, описывающие эксперименты на животных моделях [6, 17, 19, 20-23]. Исследования в этой области сдерживаются отсутствием коммерчески доступных приборов для генерации и дозиметрии наноаэрозольных лекарств. Поэтому работа, как правило, делается на приборах, изготовленных самостоятельно.

Группа исследователей из Сибирского Отделения РАН изучила терапевтический эффект вдыхания БНА противовоспалительных и обезболивающих соединений (индометацина и ибупрофена) мышами. БНА создавали с помощью разработанного ими генератора конденсационного типа (рис. 1А, В) и показала, что

терапевтический эффект БНА данных веществ, а также диклофенака и бутадиона отмечается при массовой дозе (в мг/кг) в десятки и сотни тысяч меньших, чем при пероральном введении [19, 20]. Гипотензивное действие БНА нисолдипина на артериальное давление у крыс отмечалось при массовой дозе в сто раз меньшей пероральной [6]. В наших исследованиях эффективности наноаэрозолей левофлоксацина при лечении легочной формы туляремии также было обнаружено примерно стократное уменьшение массовой эффективной дозы антибиотика по сравнению с дозой при пероральном введении [16].

Был выявлен ряд интересных особенностей наноаэрозольных лекарств. Во-первых, отмеченное выше уменьшение рабочей дозы БНА на несколько порядков по сравнению с пероральной было обнаружено только для противовоспалительных и болеутоляющих веществ, что может свидетельствовать о действии особых механизмов, возможно, не зависящих от концентрации препарата в крови. Мы уже высказывали гипотезу [9], что противовоспалительное действие таких БНА в сверхмалых дозах может быть объяснено раздражением рецепторов блуждающего нерва, многочисленных в легких [24], которое по механизму холинэргического противовоспалительного рефлекса [25] приводит к системному подавлению воспалительной реакции в результате выброса противовоспалительных интермедиатов (адреналина и норадренолина) во всех тканях.

Интересно отметить еще одну особенность, отмеченную в работе [20]: при вдыхании БНА ибупрофена проницаемость легких для проникновения лекарства в кровь, постепенно уменьшалась в течение 1,5 часов, достигая $\sim 1/1000$ от исходной, причем, восстановление проницаемости после окончания вдыхания занимало несколько часов. В настоящее время, это явление не имеет объяснения, но указывает на необходимость исследования таких необычных эффектов БНА.

В наших исследованиях было показано [16], что действие БНА левофлоксацина существенно зависит от того в какой форме этот антибиотик вводится в организм мыши. В то время как БНА чистого левофлоксацина только слегка отдалая гибель мышей, инфицированных легочной туляремией, та же массовая доза того же антибиотика, заключенного в нанолипосомы, 170 нм диаметром, приводила к практически полному выздоровлению мышей. Такой эффект упаковки лекарства в нанолипосомы можно объяснить способностью альвеолярных макрофагов фагоцитировать нанолипосомы. Так как тулярийный паразит (*Francisella tularensis*) развивается в макрофагах, такое фагоцитирование приводит к значительно большей концентрации антибиотика в этих клетках и к большему подавлению патогена по сравнению с БНА чистого антибиотика, растворенного во всем объеме легочной жидкости.

Еще один пример необычного действия наноаэрозольных лекарств представляет исследование влияния вдыхания БНА блеомицина, антибиотика используемого при лечении ряда форм рака [26]. Его широкому применению препятствует наличие частого побочного эффекта – развития фиброза легких после введения лекарства перорально или любым другим путем [27]. Указанная особенность блеомицина используется для создания экспериментальной животной модели фиброза [28]. Мы ожидали, что фиброз у мышей разовьется быстрее и в более яркой форме при вдыхании наноаэрозоля блеомицина. Оказалось, однако, что длительное вдыхание БНА блеомицина в массовой дозе, достаточной для развития фиброза при однократном ингаляционном введении, не вызывало никаких признаков фиброза, только макрофагию и другие обратимые признаки воспаления [21]. Этот и другие примеры хорошо иллюстрируют трудности в прогнозировании эффектов наноаэрозольных лекарств, исходя из известного действия этих лекарств при других способах введения в организм.

Особенности и преимущества наноаэрозольных лекарств. Говоря об особенностях наноаэрозольных лекарств следует отметить как общие, свойственные всем ингаляционным лекарствам, так и специальные, присущие только наноаэрозолям. Во-первых, введение лекарства в легкие в виде БНА или аэрозоля микронных размеров предотвращает разрушение лекарства в ЖКТ и в печени при первом прохождении. Ферментов, способных разрушить лекарство в легочной жидкости значительно меньше, чем в ЖКТ [29]. Первое существенное различие между ингаляционными аэрозолями микронного размера и наноаэрозолями состоит в осаждении в разных структурах легкого. Если первые частицы оседают в верхних дыхательных путях, то наноаэрозольные частицы проникают глубоко в легкие, в альвеолярные структуры. Для ряда лекарств такое различие в осаждении будет существенно определять «время жизни»: частицы слабо растворимого лекарства будут выноситься из бронхов и трахеи мукоциллиарным аппаратом, в то время как наночастицы из того же лекарства, осевшие в альвеолах, будут существовать дольше и удаляться после фагоцитирования макрофагами.

Еще одним качественным различием между микро- и наноаэрозолями является соотношение между числом частиц лекарства и числом клеток. Так, при средней плотности вещества 1.5 г/см^3 , диспергирование 1 мг лекарства приведет к образованию $\sim 10^8$ частиц с диаметром 5 микрон и $\sim 10^{13}$ частиц с диаметром 100 нм, соответственно. С учетом того, что легкие человека состоят из $\sim 2 \times 10^{10}$ эпителиальных клеток 1-го типа [30], при вдыхании такого аэрозоля только одна частица упадет на каждую двухсотую эпителиальную клетку. В случае наноаэрозоля на каждую клетку эпителия упадет 500 наночастиц лекарства. Этот чисто иллюстративный пример показывает качественное различие между аэрозольными лекарствами микронного и наноразмеров: наноаэрозоль будет равномерно нанесен на все клетки, в то время как микроаэрозольные частицы «достанутся» очень небольшой фракции клеток. Кроме того, большая часть наноаэрозоля осядет в альвеолах, которые мало доступны для микронных частиц.

Наноаэрозольные лекарства вводятся в организм сравнительно медленно. Эта особенность обусловлена физическим ограничением на концентрацию частиц. С ростом концентрации начинается быстрая агрегация частиц. Например, если наноаэрозоль вдыхается в течение 10 секунд после генерации, его концентрация не

может превышать 10^8 частиц/см³ [15]. Легко оценить, что для частиц с диаметром 30 и 100 нм при средней скорости потребления воздуха 8 л/мин лекарство будет вводиться со скоростью 0.9 мг и 14 мг в час, соответственно [15]. Разумеется, это создаст некоторые неудобства для приема такой лекарственной формы. С другой стороны, в ряде случаев такое медленное введение лекарства будет иметь преимущества, обеспечивая поддержание высокого уровня лекарства в легких, наподобии капельного внутривенного введения. В отличие от последнего нанозерозоль можно вводить неинвазивно без соблюдения специальных стерильных условий.

Другие перспективные применения нанозерозольных лекарств. В настоящее время интенсивно разрабатываются многочисленные подходы к лечению заболеваний, основанные на использовании наночастиц (см. обзоры [31, 32]). Одним из перспективных направлений является доставка лекарства в мозг, основанная на способности наночастиц проникать при определенных условиях через гематоэнцефалический барьер [33]. Было показано, что нанозерозольные частицы могут проникать в мозг, будучи нанесены на обонятельный эпителий животного [34]. Совершенно очевидно, что нанозерозоли могут быть использованы для такого нанесения. Более того, придание нанозерозольным частицам заряда позволит направленно осаждать такие частицы на обонятельный эпителий, предотвращая потерю лекарства за счет осаждения в носовой полости и в легких. Такого сорта устройства описаны в литературе [35]. Возможно использование подобных устройств в комбинации с эндоскопом для локальной обработки отдельных участков пищевода, желудка и других внутренних органов. Однако применение таких технологий потребует более углубленного изучения взаимодействия наночастиц с клетками.

Локальные эффекты нанозерозольных частиц. Выше при обсуждении известных применений нанозерозольных лекарств были представлены некоторые их «странные» эффекты: терапевтическое действие чрезвычайно малых концентраций противовоспалительных лекарств [19, 20], отсутствие фиброза при введении БНА блеомицина [21]. При объяснении таких эффектов следует учитывать качественное отличие микро- и нанозерозолей. Как отмечалось выше, уменьшение размера частицы в 10 раз при той же массовой дозе увеличивает общее число частиц в 1000 раз, так что на каждую клетку легкого падает множество частиц. При толщине слоя легочной жидкости в альвеолах, оцениваемой как 50-80 нм [36], падение частицы с размером 100 нм приведет к прямому контакту с клеточной стенкой самой частицы или концентрированного раствора лекарственного вещества, из которого частица состоит. Никто и никогда не исследовал, как насыщенные растворы антибиотиков или других лекарств влияют на клеточную мембрану животной клетки. Концентрированный раствор вещества может вызвать раздражение клетки, изменив проницаемость клеточной мембраны, или вызвать гибель клетки. Мы называем такое воздействие «локальным эффектом» БНА. В настоящее время мало что известно о таких локальных эффектах и разработка методов лечения, основанных на БНА требует детального их изучения.

Бионанозерозоли в диагностике. В этой части показано, как БНА природного происхождения могут быть использованы в диагностике. Человек и животное производит очень большое число аэрозольных частиц. Так, в спокойном состоянии с человека падает до $5 \cdot 10^6$ частиц в течении часа, а при движении – до $5 \cdot 10^7$ частиц с общей массой до 5 мкг [37]. Это частицы кожи, волосяного покрова, высохшие остатки микрокапель слюны, образованных при разговоре и при кашле. Такая «человеческая пыль» может быть использована в диагностике. Мы показали, что, собирая на фильтре аэрозольные частицы в воздухе палат туберкулезной клиники и анализируя собранный материал на присутствие ДНК маркеров микобактерии, можно обнаружить биомаркеры патогена даже в том случае, когда всего 2-3 бактерии в среднем находятся в кубометре воздуха [38]. Таким же образом можно решать другие проблемы биобезопасности, обнаруживая аэрозольные патогены в воздухе клиник, в публичных зданиях и на транспорте.

Особый интерес для диагностики имеют наночастицы, возникающие при высыхании микрокапель легочной жидкости (МЛЖ). МЛЖ выносятся потоком выдыхаемого воздуха из бронхиол и альвеолярных структур. Их сбор позволяет неинвазивно получать пробы легочной жидкости из глубоких отделов легкого. Стандартным способом получения образцов легочной жидкости является «бронхоальвеолярный лаваж», при котором под местным наркозом в устье сегментарного бронха вводится эндоскоп и производится смыв легочной жидкости физиологическим раствором. Такая процедура является травмирующей, непригодной для мониторинга лечения легочных заболеваний и для скрининга заболеваний у больших групп населения. Кроме того, смыв происходит из верхних отделов легкого, не затрагивая альвеолярных структур. Возможность получить микроколичества легочной жидкости неинвазивно, просто собирая МЛЖ в выдыхаемом воздухе привлекает внимание исследователей уже давно, и мы далее рассмотрим различные методы сбора таких микрокапель и их сухих остатков для диагностики легочных заболеваний.

Механизмы генерации микрокапель в выдыхаемом воздухе. Хотя в настоящее время предложено несколько альтернативных механизмов образования МЛЖ [39-41], ряд хорошо установленных фактов, таких как увеличение концентрации микрокапель с увеличением объема и скорости вдоха [39], указывают на разрыв пленки легочной жидкости как на основной механизм их образования. Такой разрыв происходит при открывании альвеолярных мешков [42] или при выдувании жидких пробок из бронхов и бронхиол. Следует иметь в виду, что МЛЖ из разных отделов легкого могут отличаться как по размерам, так и по составу биомаркеров. Холмгрен с сотр. [43] показали, измеряя распределение размеров выдыхаемых микрокапель как функцию глубины дыхания, что концентрация небольших капель (менее 100 нм) не зависит от глубины дыхания, в то время как микрокапли с размером более 500 нм показывали 100-кратное увеличение концентрации с увеличением глубины дыхания. Естественно, МЛЖ, образовавшиеся в разных отделах легкого,

будут отличаться и по составу липидов, белков и других биомаркеров. Следует также иметь в виду, что количество выдыхаемой с микрокаплями легочной жидкости сильно варьирует у разных людей, и даже у одного человека в течении дня, а также меняется при вдыхании воздуха с аэрозолем соли [44], в зависимости от глубины дыхания и под влиянием других факторов.

Методы сбора нелетучих биомаркеров в выдыхаемом воздухе. Далее мы ограничимся только сбором и анализом нелетучих биомаркеров. Летучие маркеры также представляют большой интерес для диагностики легочных заболеваний, однако, выходят за рамки тематики данной статьи. В составе выдыхаемого воздуха они находятся в виде молекул, их сбор и детекция существенно отличаются от таковых для БНА. Известны четыре основных метода сбора нелетучих биомаркеров в выдыхаемом воздухе.

Метод, основанный на сборе конденсата выдыхаемого воздуха, относится к самым распространенным, ввиду его простоты. Описаны многочисленные самодельные и ряд коммерческих приборов [45]. В этом методе МЛЖ сильно укрупняются за счет конденсации на них воды при охлаждении выдыхаемого влажного воздуха и оседают на охлажденную поверхность. За 10 минут собирают около 1-2 мЛ конденсата, в котором легочная жидкость разведена примерно в 20 тысяч раз [46]. Такое сильное разведение делает недоступным определение биомаркеров в конденсате стандартными методами. Поэтому пробы часто концентрируют, объединяя пробы, собранные у нескольких добровольцев [47].

Чтобы избежать сильного разведения легочной жидкости в пробах, МЛЖ можно собрать на фильтрах [48-50]. Это простой и дешевый способ. Имеются коммерческие приборы для такого сбора [51], однако рекомендуемые объемы смыва (7 мЛ) не дают никаких преимуществ таким устройствам по сравнению с устройствами для сбора конденсата. Автором этой статьи с коллегами удалось разработать специальные аналитические нанофильтры, которые позволяют экстрагировать собранный материал в минимальном объеме (0.01-0.1 мЛ) жидкости [38, 50, 52], а в ряде случаев полностью исключить проблему смыва собранных биомаркеров, изготовив нанофильтр из материала, который после сбора растворяется в 5-20 мкЛ водного раствора, полностью освобождая все биомаркеры [52]. Последние фильтры были успешно использованы для выявления аэрозольных ДНК маркеров микобактерии в палатах туберкулезной клиники [38].

Технология изготовления наших нанофильтров основана на электропрядении полимерных растворов, как в случае изготовления фильтров Петрянова [53]. Однако, в отличие от технологии Петрянова, пленка из нановолокон формируется не на проводящей поверхности, а на отверстии в непроводящем экране, где нановолокна нейтрализуются облаком противоионов [54]. Такие пленки полностью свободны от дефектов (прогаров), обладают практически калиброванными порами (отверстиями между волокнами) и по качеству (задерживающая способность, отнесенная к сопротивлению потоку воздуха) превосходят все коммерческие и опубликованные фильтрующие материалы такого типа [50]. Для аналитического применения очень важно отметить, что фильтры, задерживающие 99 % частиц диаметром более 200 нм, сделаны из очень небольшого количества полимера (примерно 10 мг/м²). Это позволяет экстрагировать такой материал малым объемом жидкости, в результате чего получается концентрированная проба для анализа. Далее мы приведем пример использования таких фильтров в устройствах для сбора биомаркеров туберкулеза в выдыхаемом воздухе.

Микрокапли можно также собирать импактором. При сборе в импакторе микрокапли разгоняются до высоких скоростей (100-300 м/сек) в струе воздуха, направленной на подложку [55]. При резком повороте направления потока микрокапли не успевают за потоком воздуха и по инерции продолжают движение до столкновения с поверхностью. Такой метод был использован в ряде исследований, выдыхаемых микрокапель [56, 57]. К недостаткам метода следует отнести его техническую сложность, связанную с использованием мощного насоса и ограничение на минимальный размер собираемых микрокапель, который обычно не превышает 300 нм. К достоинствам метода относится большая скорость сбора и возможность сохранения на поверхности отдельных капель для анализа биомаркеров в каждой капле.

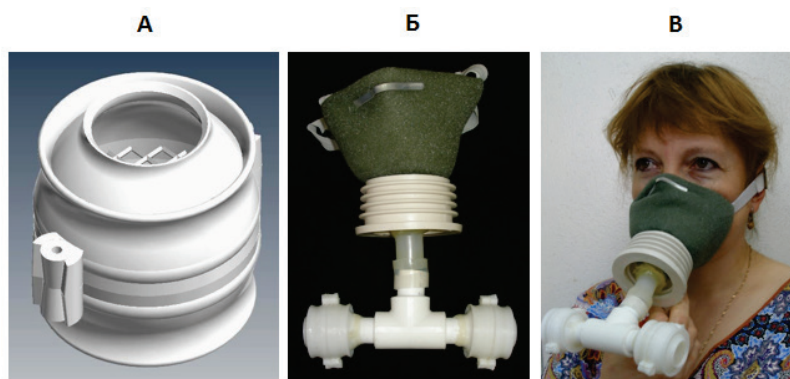


Рисунок 2. Одноразовое устройство, использованное для сбора биомаркеров туберкулеза легких в выдыхаемом воздухе. А. Конструкция держателя нанофильтра, изготовленная на 3-мерном принтере. Б. Общий вид устройства, собранного на основе коммерческого респиратора УК-2 и двух держателей нанофильтров. В. Фото добровольца, собирающего выдыхаемый воздух[50]

Электростатический преципитатор был разработан для визуализации наноаэрозольных частиц методом электронной микроскопии [58] и для исследования сухих остатков микрокапель методом атомно-силовой микроскопии [59]. В этом методе микрокапли или сухие их остатки заряжаются продуктами тлеющего коронного разряда и после зарядки осаждаются в электрическом поле на подходящую проводящую подложку. Преимуществом преципитатора по сравнению с импактором является отсутствие нижнего предела для размеров собираемых частиц. В то же время, преципитатор имеет два существенных недостатка. Во-первых, сбор осуществляется при малых скоростях потока воздуха (около 0.1 л/мин [59]). Во-вторых, при контакте микрокапель и БНА с радикалами и другими химически активными продуктами коронного разряда возможна фрагментация и химическая модификация биомолекул. Однако, несмотря на эти недостатки такой метод сбора хорошо дополняет возможности импактора. В частности, он позволил нам установить связь между количеством липидов в микрокаплях и их размерами. Было показано, что независимо от размеров, все капли в выдыхаемом воздухе покрыты слоем липида примерно одинаковой толщины [59].

В то время как в образцах, полученных методом конденсации и фильтрованием, все микрокапли объединяются в одну жидкую пробу, импактор и преципитатор позволяют собирать отдельные микрокапли и сухие остатки на поверхности в том месте, где они коснулись поверхности. Это открывает интересную возможность анализа биомаркеров в каждой отдельной микрокапле [60]. Учитывая, что микрокапли возникают в разных отделах легкого, следует ожидать, что состав легочной жидкости в них будет варьировать и по наличию определенных маркеров можно будет установить в каком отделе легкого микрокапля возникла. Например, по наличию муцина можно выделить микрокапли, образовавшиеся в бронхах и бронхиолах. Можно также ожидать, что микрокапли из зоны инфекции будут нести большее количество биомаркеров инфекции и определение биомаркеров в таких «горячих» микрокаплях позволит диагностировать инфекцию с большей надежностью, чем в сильно разбавленных пробах, полученных методом конденсации и на фильтрах. Однако, определение биомаркеров в отдельных микрокаплях требует решения ряда технологических задач, таких как подготовка специальных поверхностей, способных ковалентно связывать белки, разработка методов детекции единичных белковых маркеров (например, с помощью магнитных частиц или квантовых точек).

Бесконтактная диагностика туберкулеза легких по выдыхаемому воздуху. Разработанные нами фильтры [61] были использованы в одноразовых устройствах для сбора биомаркеров из воздуха, выдыхаемого пациентами туберкулезной клиники [50]. Их конструкцию и процедуру сбора иллюстрируют рисунки 2А, Б и В. После 10-минутного сбора выдыхаемого воздуха капроновые нанофильтры смывали буферным раствором и анализировали смывы на присутствие живых микобактерий (посев), ДНК микобактерий, двух секретируемых антигенов микобактерии (ESAT-6 и PstS-1) а также на общее содержание иммуноглобулинов (IgA и IgG) и на наличие антител, специфичных к указанным антигенам. Иммунохимический анализ антигенов и антител выполняли разработанным нами сверхчувствительным методом, основанным на электрофоретическом концентрировании аналита на микрочипе и детектировании отдельных связанных молекул аналита с помощью магнитных микросфер, покрытых вторичными антителами [62,63]. Метод имеет предел обнаружения в миллион раз меньший чем у стандартного ИФА и позволяет детектировать около тысячи молекул иммуноглобулина. Результаты анализа проб у пациентов с легочной формой туберкулеза и у здоровых добровольцев недавно опубликованы [50] и кратко представлены в таблице 1. Из анализа проб, собранных у 42 пациентов и 13 здоровых добровольцев, был сделан вывод о том, что по наличию в пробах иммуноглобулина IgA, специфичного хотя бы к одному из секретируемых антигенов микобактерии можно диагностировать легочный туберкулез с чувствительностью и специфичностью 72 % и 58 %, соответственно. Есть все основания полагать, что специфичность такого анализа можно существенно повысить, включив в анализ интерлейкины, свидетельствующие о наличии воспалительного процесса в легких.

Таблица 1. Результаты анализа биомаркеров туберкулеза легкого после сбора на нанофильтрах из капрона в течении 10 минут [50].

Биомаркер	Предел обнаружения	Здоровые добровольцы ^а	Туберкулез легкого ^а
Посев (Бактек)	1 клетка	-	0/42
ДНК микобактерии	10 колоний	-	0/42
ESAT-6	10 фг	0/13	0/42
PstS-1	10 фг	0/13	0/42
Общий IgA	1 фг	12/13 (495; 80-1200)	38/42 (200; 10-1000)
ESAT-6-специфичный IgA	0,1-1 фг	3/13 (51; 40-60)	14/42 (6,5; 0,2-55)
PstS-1 –специфичный IgA	0,1-1 фг	5/13 (40; 3-170)	23/42 (8,5; 0,7-90)
Общий IgG	1 фг	0/5	0/10

^аЧисло образцов, содержащих данный биомаркер/общее число проанализированных образцов; в скобках – содержание биомаркеров в образцах в фг (медиана; 5 % квантиль – 95 % квантиль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование биологических наноаэрозолей представляет большой практический интерес в связи с решением трех важных проблем. Одна из них связана с обеспечением биобезопасности (анализ инфекций, передаваемых аэрозольным путем, мониторинг токсичных выбросов на производствах). Наночистоты, импакторы и электростатические преципитаторы, кратко представленные выше, могут решить проблему сбора наноаэрозольных патогенов и токсинов. Эти же средства могут быть использованы для целей бесконтактной диагностики легочных и системных заболеваний по биомаркерам, покидающим легкие в виде микрокапель и бионаноаэрозолей с выдыхаемым воздухом. Наконец, превращение известных лекарств в бионаноаэрозоли обеспечивает новый путь для их введения в организм с принципиально иной фармакодинамикой и уменьшенными дозами, способствующими снижению побочных эффектов. Все это делает исследования бионаноаэрозолей крайне интересными и актуальными.

Автор признателен Российскому Научному Фонду за финансирование разработки неинвазивной диагностики туберкулеза легких (грант № 15-15-00086), Российскому Фонду Фундаментальных Исследований (грант НК 15-29-01180\15) и Агентству по Защите от Рисков США (Defense Threat Reduction Agency, DTRA, грант HDTRA1 – 11 – 1 – 0054, суб-контракт E2024051) за финансирование разработок наноаэрозольных лекарств. Автор также благодарит Т.Я. Морозову за ценные замечания при подготовке рукописи.

Список литературы / References:

1. Ehn M., Thornton J. A., Kleist E. et al. A large source of low-volatility secondary organic aerosol. *Nature*, 2014, vol. 506, pp. 476-479.
2. Julin J., Murphy B. N., Patoulias D., Fountoukis C., Olenius T., Pandis S. N., Riipinen I. Impacts of future european emission reductions on aerosol particle number concentrations accounting for effects of ammonia, amines, and organic species. *Environ. Sci. Technol.*, 2018, vol. 52, pp. 692-700.
3. Lin K., Marr L. C. Aerosolization of Ebola virus surrogates in wastewater systems. *Environ. Sci. Technol.*, 2017, vol. 51, pp. 2669-2675.
4. Biskos G., Vons V., Yurteri C.U., Schmidt-Ott A. Generation and sizing of particles for aerosol-based nanotechnology. *KONA Powder and Particle Journal*, 2008, vol. 26, pp. 13-35.
5. Samodurova A.V., Vosel' S.V., Baklanov A.M., Onishchuk A.A., Karasev V.V. A study of homogeneous nucleation of ibuprofen in a flow chamber. Determination of the surface tension of critical nuclei. *Colloid J.*, 2013, vol. 75, pp. 397-408.
6. Onishchuk A.A., Tolstikova T.G., Baklanov A.M., Khvostov M.V., Sorokina I.V., Zhukova N.A., An'kov S.V., Borovkova O.V., Dultseva G.G., Boldyrev V.V., Fomin V.M., Steven Huang G. Generation, inhalation delivery and anti-hypertensive effect of nisoldipine nanoaerosol. *J. Aerosol Sci.*, 2014, vol. 78, pp. 41-54.
7. Rajapaksa A.E., Ho J.J., Qi A., Bischof R., Nguyen T.H., Tate M., Piedrafita D., McIntosh M. P., Yeo L.Y., Meeusen E., Coppel R. L., Friend J. R. Effective pulmonary delivery of an aerosolized plasmid DNA vaccine via surface acoustic wave nebulization. *Respiratory Research*, 2014, vol. 15, pp. 1-12.
8. Lee S.H., Heng D., Nga W.K., Chan H.K., Tan R.B.H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int. J. Pharmaceutics*, 2011, vol. 403, pp. 192-200.
9. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Y.M., Nwabueze A.O., Propst C. N., van Hoek M. L. Biological nanoaerosols: from delivering drugs to collecting lung liquid in exhaled air. *New Approaches combating Cancer & Aging*, 2016, vol. 3, pp. 11-14.
10. International Commission on Radiological Protection. Human respiratory model for radiological protection. *Ann ICRP*, 1994, vol. 24, pp. 1-3.
11. Kebarle P., Verkerk U.H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, vol. 28, pp. 898-917.
12. Fu H., Patel A.C., Holtzman M.J., Chen D.R. A new electrospray aerosol generator with high particle transmission efficiency. *Aerosol Sci. Technol.*, 2011, vol. 45, pp. 1176-1183.
13. Ijsebaert J. C., Geerse K.B., Marijnissen J.C.M., Lammers J.W.J., Zanen P. Electro-hydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes. *J. Appl. Physiol.*, 2001, vol. 91, pp. 2735-2741.
14. Morozov V.N. Generation of biologically active nano-aerosol by an electrospray-neutralization method. *J. Aerosol Sci.*, 2011, vol. 42, pp. 341-354.
15. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Y.M., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Nwabueze A.O., van Hoek M.L. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances. *J. Aerosol Sci.*, 2014, vol. 69, pp. 48-61.
16. Propst C.N., Nwabueze A.O., Kanev I.L., Pepin R.E., Gutting B.W., Morozov V.N., van Hoek M.L. Nanoaerosols reduce required effective dose of liposomal levofloxacin against pulmonary murine *Francisella tularensis* subsp. novicida infection. *J. Nanobiotechnology*, 2016, vol. 14, pp. 1-10.
17. Morozov V.N., Kanev I.L. Dry lung as a physical model in studies of aerosol deposition. *Lung*, 2015, vol. 193, pp. 799-804.
18. Kim C. S. Methods of calculating lung delivery and deposition of aerosol particles. *Respiratory care*, 2000, vol. 45, pp. 695-671.

19. Onischuk A.A., Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Zhukova N.A., Baklanov A.M., Karasev V.V., Borovkova O.V., Dultseva G.G., Boldyrev V.V., Fomin V.M. Analgesic effect from ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Delivery*, 2009, vol. 22, pp. 1-8.
20. Onischuk A.A., Tolstikova T.G., An'kov S.V., Baklanov A.M., Valiulin S.V., Khvostov M.V., Sorokina I.V., Dultseva G.G., Zhukova N.A. Ibuprofen, indomethacin and diclofenac sodium nanoaerosol: Generation, inhalation delivery and biological effects in mice and rats. *J. Aerosol Sci.*, 2016, vol. 100, pp. 164-177.
21. Shlyapnikova E.A., Kanev I.L., Novikova N.N., Litvinova E.G., Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. Inhalation of bleomycin nanoaerosol does not induce fibrosis in mice. *European J. Nanomedicine*, 2016, vol. 8, pp. 213-224.
22. Garbuzenko O.B., Mainelis G., Taratula O., Minko T. Inhalation treatment of lung cancer: the influence of composition, size and shape of nanocarriers on their lung accumulation and retention. *Cancer Biol. Med.*, 2014, vol. 11, pp. 44-55.
23. Kuzmov A., Minko T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. *Journal of Controlled Release*, 2015, vol. 219, pp. 500-518.
24. Yang X., Zhao C., Gao Z., Su X. A novel regulator of lung inflammation and immunity: pulmonary parasympathetic inflammatory reflex. *Q. J. Med.*, 2014, vol. 107, pp. 789-792.
25. Tracey K.J. The inflammatory reflex. *Nature*, 2002, vol. 420, pp. 853-859.
26. *Bleomycin Chemotherapy*. Academic Press, ed. I. Banimir, M. Sikic, S. Rozenzweig, K. Carter, 1985, 335 p.
27. Sheykh Z.V., Krutskevich A.O., Drebushevskiy N.S., Shvayko S.N., Dunaev A.P., Alekseev V.G. Pulmonary cytotoxicity induced by bleomycin and methotrexate. *Vestnik Rentgenologii i Radiologii*, 2015, vol. 3, pp. 46-51. (In Russ.)
28. Mouratis M.A., Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2011, vol. 17, pp. 355-361.
29. Wall D.A., Lanutti A. T. High levels of exopeptidase activity are present in rat and canine bronchoalveolar lavage fluid. *Int. J. Pharmaceutics*, 1993, vol. 97, pp. 171-181.
30. Stone K.C., Mercer R.R., Gehr, P., Stockstill B., Crapo J.D. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1992, vol. 6, pp. 235-243.
31. Coty J.B., Vauthie C. Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success. *Journal of Controlled Release*, 2018, vol. 275, pp. 254-268.
32. Pelaz B., Alexiou C., Alvarez-Puebla R. A. et al. Diverse applications of nanomedicine. *ACS Nano*, 2017, vol. 11, pp. 2313-2381.
33. Zhou Y., Peng Z., Seven E. S., Leblanc R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J. Controlled Release*, 2018, vol. 270, pp. 290-303.
34. Kozlovskaya L., Abou-Kaoud M., Stepensky D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *J. Controlled Release*, 2014, vol. 189, pp. 133-140.
35. Xi J., Zhang Z., Si X. A. Improving intranasal delivery of neurological nanomedicine to the olfactory region using magnetophoretic guidance of microsphere carriers. *Int. J. Nanomedicine*, 2015, vol. 10, pp. 1211-1222.
36. Dasa S. C., Stewart P. J. The influence of lung surfactant liquid crystalline nanostructures on respiratory drug delivery. *Int. J. Pharmaceutics*, 2016, vol. 514, pp. 465-474.
37. Austin P.R., Timmerman S.W. *Design and operation of clean rooms*. Business News Publishing Co, Detroit (USA), 1965, pp. 235-251.
38. Vladimirov M.A., Shipina L.K., Makeeva E.S., Alyapkina Y.S., Mikheev A.Y., Morozov V.N. Application of water-soluble nanofilters for collection of airborne *M. tuberculosis* DNA in hospital wards. *J. Hospital Infect.*, 2016, vol. 93, pp. 100-104.
39. Johnson G.R., Morawska L. The mechanism of breath aerosol formation. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, 2009, vol. 22, pp. 229-237.
40. Haslbeck K., Schwarz K., Hohlfield J.M., Seume J.R., Koch W. Submicron droplet formation in the human lung. *J. Aerosol Sci.*, 2010, vol. 41, pp. 429-438.
41. Bondesson E., Jonsson L.T., Bengtsson T., Wollmer P. Exhaled breath condensate – site and mechanism of formation. *J. Breath Res.*, 2009, vol. 3, p. 016005.
42. Namati E., Thiesse J., de Ryk J., McLennan G. Alveolar dynamics during respiration. Are pores of Kohn a pathway to recruitment? *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2008, vol. 38, pp. 572-578.
43. Holmgren E., Gerth E., Ljungstrom A.C., Almstrand P., Larsson B., Bake A.C., Olin A.C. Effects of breath holding at low and high lung volumes on amount of exhaled particles. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2013, vol. 185, pp. 228-234.
44. Edwards D.A., Man J.C., Brand P., Katstra J.P., Sommerer K., Stone H.A., Nardell E., Scheuch G. Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, vol. 101, pp. 17383-17388.
45. Kubán P., Foret F. Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, vol. 805, pp. 1-18.
46. Effros R. M., Biller J., Foss B., Hoagland K., Dunning M. B., Castillo D., Bosbous M., Sun F., Shaker R. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, vol. 168, pp. 1500-1505.

47. Muccillia V., Saletta R., Cunsolo V., Hob J., Gilic E., Contec E., Sichilic S., Foti V. C. S. Protein profile of exhaled breath condensate determined by high resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, vol. 105, pp. 134-49.
48. Tinglev S., Ullah G., Ljungkvist E., Viklund A.C., Olin O., Beck O. Characterization of exhaled breath particles collected by an electret filter technique. *J. Breath Res.*, 2016, p. 026001.
49. Ullah S., Sandqvist S., Beck O. Measurement of lung phosphatidylcholines in exhaled breath particles by a convenient collection procedure. *Anal. Chem.*, 2015, vol. 87, pp. 11553-11560.
50. Morozov V.N., Nikolaev A.A., Shlyapnikov Y.M., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Bagdasaryan T.R., Burmistrova I.A., Smirnova T.G., Andrievskaya I.Y., Larionova E.E., Lyadova I. V. Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using exhaled air. *J. Breath Res.*, 2018, vol. 12, p. 036010.
51. Beck O., Stephanson N., Sandqvist S., Frank J. Detection of drugs of abuse in exhaled breath using a device for rapid collection: comparison with plasma, urine and self-reporting in 47 drug users. *J. Breath Res.*, 2013, vol. 7, p. 026006.
52. Mikheev A.Y., Kanev I.L., Morozova T.Y., Morozov V.N. Water-soluble filters from ultra-thin polyvinylpyrrolidone nanofibers. *J. Membr. Sci.*, 2013, vol. 448, pp. 151-159.
53. Basmanov P.I., Kirichenko V.N., Filatov Y.N., Yurov Y.L. *Highly Efficient Cleaning of Gases from Aerosols with Petryanov's Filters*, Moscow, 2002, 193 p. (In Russ.)
54. Morozov V.N., Vsevolodov N.N. Electrospray-neutralization method for manufacturing free and supported nanomats. *Adv. Materials*, 2007, vol. 19, pp. 4381-4386.
55. Marple V.A., Liu B.Y.H. Characteristics of laminar jet impactors. *Environ. Sci. Technol.*, 1974, vol. 8, pp. 648-654.
56. Papineni R.S., Rosenthal F.S. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J. Aerosol. Med.*, 1997, vol. 10, pp. 105-116.
57. Almstrand A.C., Ljungström E., Lausmaa J., Bake B., Sjövall P., Olin A. C. Airway monitoring by collection and mass spectrometric analysis of exhaled particles. *Anal. Chem.*, 2009, vol. 81, pp. 662-668.
58. Miller A., Frey G., King G., Sunderman C. A handheld electrostatic precipitator for sampling airborne particles and nanoparticles. *Aerosol Sci. Technol.*, 2010, vol. 44, pp. 417-427.
59. Morozov V.N., Mikheev A.Y. A collection system for dry solid residues from exhaled breath for analysis via atomic force microscopy. *J. Breath Res.*, 2017, vol. 11, p. 016006.
60. Morozov V.N., Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Nikolaev A.A., Lyadova I.V. Non-invasive lung disease diagnostics. Perspectives and technical challenges. *J. Breath Res.*, 2018, vol. 12, p. 017103.
61. Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V. N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6. *European Polymer Journal*, 2016, vol. 75, pp. 317-328.
62. Morozov V.N., Groves, S., Turell M. J., Bailey C., Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic beads detection. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 12628-12629.
63. Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels. *Anal. Chim. Acta*, 2017, vol. 966, pp. 47-53.

USE OF BIONANOAERSOLS IN TREATMENT AND DIAGNOSTICS OF LUNG DISEASES

Morozov V.N.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: tammorozova@rambler.ru

Abstract. The report outlines a new field of biotechnology, which employs nanoaerosols for treatment, and diagnostics of lung diseases. It presents a brief review of known methods for generation of nanoaerosolized drugs without damaging their functional activity. The author's method is based on electrohydrodynamic atomization of drug solutions followed by gas-phase neutralization of charged nanoclusters with counter-ions. This method turns any water- or ethanol-soluble substance (including peptides, proteins and DNA) into bionanoaerosol (BNA) with their structure and functional properties retained. Methods for measurement of inhaled BNA doses are briefly outlined and a few examples of successful application of BNA from antibiotics and other drugs for treatment of diseases in animals are presented. Some peculiarities of BNA, advantages of drug introduction via BNA inhalation over the other administration routes, as well as potential side effects of BNA are discussed. It is demonstrated that nanoaerosol particles formed upon drying of microdroplets of lung fluid (MLFs) can be used in non-invasive diagnostics of lung diseases. Special filtering material was developed and disposable filtering devices were designed to collect such nanoaerosols and MLFs from exhaled air of patients with pulmonary tuberculosis. Tuberculosis biomarkers (antibodies specific to secreted mycobacterium antigens) were detected in most probes collected from the patients, illustrating feasibility of non-invasive diagnostics. Similar filtering devices were successfully employed in analysis of nosocomial infections in clinics. These devices may also be used to control biosafety in transport, in private houses and in industrial buildings.

Key words: bionanoaerosols, generation, treatment with bionanoaerosols, exhaled air, non-invasive diagnostics.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НАНОАЛМАЗОВ В БИОМАТЕРИАЛАХ И ИЗУЧЕНИЯ ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Инжеваткин Е.В.^{1,2}, Барон А.В.^{1,3}, Максимов Н.Г.^{1,4}, Волкова М.Б.^{1,3}, Пузырь А.П.^{1,2}, Ронжин Н.О.¹, Бондарь В.С.¹

¹Институт биофизики Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук”

Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: inscience@mail.ru, bondvs@mail.ru

²Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук”

Академгородок, 50, г. Красноярск, 660036, РФ

³Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

⁴Институт химии и химической технологии Федерального исследовательского центра

“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук”

Академгородок, 50/24, г. Красноярск, 660036, РФ

Поступила в редакцию: 25.06.2018

Аннотация. В модельных экспериментах *in vitro* установлена применимость метода ЭПР-спектроскопии для выявления модифицированных нанодiamondов (МНА) взрывного синтеза в образцах биоматериалов (кровь и гомогенаты органов мышей). В содержащих МНА биопробах регистрируется характерный ЭПР сигнал ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс), интенсивность которого линейно возрастает при концентрации наночастиц в диапазоне 1,6-200 мкг МНА на 1 мл образца. В экспериментах *in vivo* методом ЭПР установлено, что через 2.5 часа после внутривенной инъекции мышам МНА аккумулируются преимущественно в легких и печени животных – около 25 % и 20 %, соответственно, от дозы введенных наночастиц. В сердце и почках животных было обнаружено значительно меньшее (на 1-1,5 порядка) количество МНА. В крови, селезенке, головном мозге и мышцах бедра мышей наличие МНА не было выявлено в пределах чувствительности метода ЭПР. Через 10 суток после инъекции регистрируется перераспределение МНА в организме животных: количество наночастиц в легких уменьшается в 3,5 раза и увеличивается в печени практически в 3 раза, наблюдается накопление МНА в селезенке. В это время не наблюдалось изменений в содержании МНА в сердце и почках мышей. В целом, полученные данные открывают перспективы использования ЭПР-спектроскопии для изучения динамики межорганного распределения, накопления и элиминации МНА при их внутривенном введении в организм экспериментальных животных.

Ключевые слова: нанодiamondы, ЭПР-спектроскопия, биологические образцы, кровь, гомогенаты органов, динамика распределения.

Развитие нанотехнологии открывает значительные возможности для новых решений обширного спектра биомедицинских задач [1-11]. Прогнозируется, что применение наноматериалов разной физико-химической природы в биологии, медицине, экологии, фармакологии, токсикологии, и т.д. позволит расширить арсенал и повысить эффективность используемых в них методов, и будет способствовать их выходу на новый качественный уровень. В частности, одно из активно развивающихся направлений в этой области связано с изучением применимости наночастиц в создании систем избирательного (направленного) транспорта биологически активных веществ, включая лекарственные [12-14]. При этом следует сказать, что исследователи, изучающие применимость наноматериалов в биологических и медицинских приложениях, проявляют большой интерес к использованию для этих целей разных форм нанодiamondа (фуллерены, нанотрубки, графен) [6, 7, 9, 15-18]. Многообещающим материалом этой группы являются нанодiamondы, получаемые методом взрывного синтеза, который был впервые разработан российскими учеными [19]. Совокупность физико-химических свойств этих наночастиц (прежде всего, химически полиморфная, активная поверхность и возможности ее химической модификации, малая токсичность и высокая биосовместимость) позволяют прогнозировать их применимость в биотехнологических и биомедицинских целях [20-26]. Например, ученые многих стран изучают применимость нанодiamondов в качестве носителей для конструирования систем адресной доставки лекарственных препаратов [27-31]. Предполагается, что создание средств избирательного транспорта лекарств к очагам патологии позволит снизить дозы вводимых лечебных препаратов, повысит их эффективность и минимизирует риски возникновения побочных эффектов.

Использование наноматериалов в создании новых средств медицинского назначения (например, при конструировании систем адресной доставки лекарств на основе наночастиц) предполагает возможность их введения в организм пациента. Однако в этом случае возникает ряд вопросов, имеющих принципиальное значение и требующих всестороннего изучения. Одним из ключевых аспектов является четкое представление о

характере распределения в организме введенных наночастиц (носителя), их биодеструкции или элиминации из организма после выполнения адресной наносистемой терапевтической функции. Особенно это важно при использовании в качестве носителя создаваемой системы избирательной доставки наночастиц, которые не подвергаются биодеструкции. Поскольку детонационные наноалмазы относятся к таким нанообъектам, возникает необходимость в изучении их межорганный распределения, накопления и путей элиминации после введения в организм. Важность этих исследований определяется возможностью возникновения нежелательных последствий при накоплении наночастиц в органах и тканях. При проведении таких исследований могут применяться разные способы маркировки наноалмазов, например, флуоресцентными или радиоактивными метками посредством ковалентной иммобилизации на наночастицы предварительно маркированных этими метками органических молекул пептидной и не пептидной природы [32-34]. В то же время, детекция непосредственно наноалмазных частиц представляется наиболее корректной. Это позволяет получать более объективную информацию о межорганный распределении наноалмазов и избежать возможных ошибок при трактовке результатов их детекции, поскольку существует вероятность десорбции иммобилизованной метки с поверхности наночастиц в условиях биологической среды организма. Для детекции наноалмазов может быть использован метод ЭПР-спектроскопии, который позволяет выявлять наночастицы, имеющие парамагнитные центры. Известно, что наноалмазы взрывного синтеза содержат парамагнитные центры [35, 36].

В настоящей работе в экспериментах *in vitro* и *in vivo* мы оценивали применимость метода ЭПР-спектроскопии для выявления наноалмазов в биоматериалах и исследовали этим методом динамику распределения внутривенно введенных наночастиц в организме животных.

Исследования были выполнены с использованием модифицированных наноалмазов (МНА) со средним размером кластеров наночастиц в гидрозолях – $d_{50} = 70.6$ нм (Zetasizer Nano ZS, «Malvern Instruments Ltd.», UK), которые были получены из взрывных наноалмазов российского производства (ООО «Реал-Дзержинск») разработанным ранее способом [37, 38]. МНА обладают высокой коллоидной стабильностью в дисперсионных средах (вода, органические растворители, масла) и применимы для медико-биологических исследований [37, 39]. Для экспериментов исходный гидрозоль с концентрацией МНА 1 мг/мл получали добавлением деионизованной воды (Milli-Q system, «Millipore», US) к навеске порошка наночастиц. После этого из исходного гидрозоля последовательными разведениями деионизованной водой готовили гидрозоли МНА с концентрацией наночастиц 200, 40 и 8 мкг/мл.

В экспериментах использовали мышей ICR (самцы, масса 26-28 грамм), при работе с животными соблюдали принципы эвтаназии. При исследованиях *in vitro* для получения биообразцов мышей усыпляли эфирным наркозом и брали кровь из подчелюстной артерии. После этого животных умерщвляли цервикальной дислокацией и извлекали органы – для экспериментов брали печень, селезенку, почки, сердце, головной мозг, мышцы бедра и легкие. Извлеченные органы помещали на лед, удаляли примеси соединительной и жировой тканей и разрушали в дистиллированной воде с помощью ручного гомогенизатора (система стекло-стекло). В полученные образцы крови и гомогенатов добавляли гидрозоли МНА с разной концентрацией наночастиц в соотношении 1:4 (объем гидрозоля: объем образца) – финальная концентрация МНА в биоматериалах составляла 200, 40, 8 и 1,6 мкг/мл, соответственно. В контрольные образцы крови и гомогенатов вместо суспензии МНА добавляли дистиллированную воду. Все приготовленные биопробы перемешивали, помещали в пластиковые контейнеры и замораживали в жидком азоте. Замороженные образцы извлекали из контейнеров и при температуре жидкого азота помещали в специальный держатель, который устанавливали в резонатор ЭПР спектрометра Elexsys E580 («Bruker Corp.», US). Регистрацию ЭПР спектров проводили при температуре 85-90 К. В экспериментах *in vivo* гидрозоль МНА вводили в хвостовую вену мышей в дозе 40 мг наночастиц на 1 кг веса. Через 2,5 часа и 10 суток после инъекции животных использовали для исследований. Получение и подготовку биообразцов, а также их анализ методом ЭПР-спектроскопии проводил аналогичным образом, как и в исследованиях *in vitro*.

На начальном этапе исследований было показано (рис. 1А), что в ЭПР спектрах образцов замороженных гидрозолей МНА наблюдается характерный сигнал ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс). Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований, в которых было показано, что в образцах МНА с разными размерами кластеров детектируется симметричный ЭПР сигнал при $g = 2,003$, связанный с наличием в наночастицах парамагнитных центров [35]. Было установлено, что величина ЭПР сигнала, регистрируемого в гидрозолях МНА, практически линейно зависит от концентрации наночастиц в диапазоне 1,6-200 мкг/мл (рис. 1Б). Полученные результаты явились основанием для оценки применимости метода ЭПР-спектроскопии для выявления и количественной оценки МНА в биоматериалах.

В предварительных экспериментах было установлено, что важным условием эффективного применения метода ЭПР для детекции МНА в образцах биоматериалов (кровь и гомогенаты органов) является их глубокое замораживание при низких температурах и увеличение объема образца.

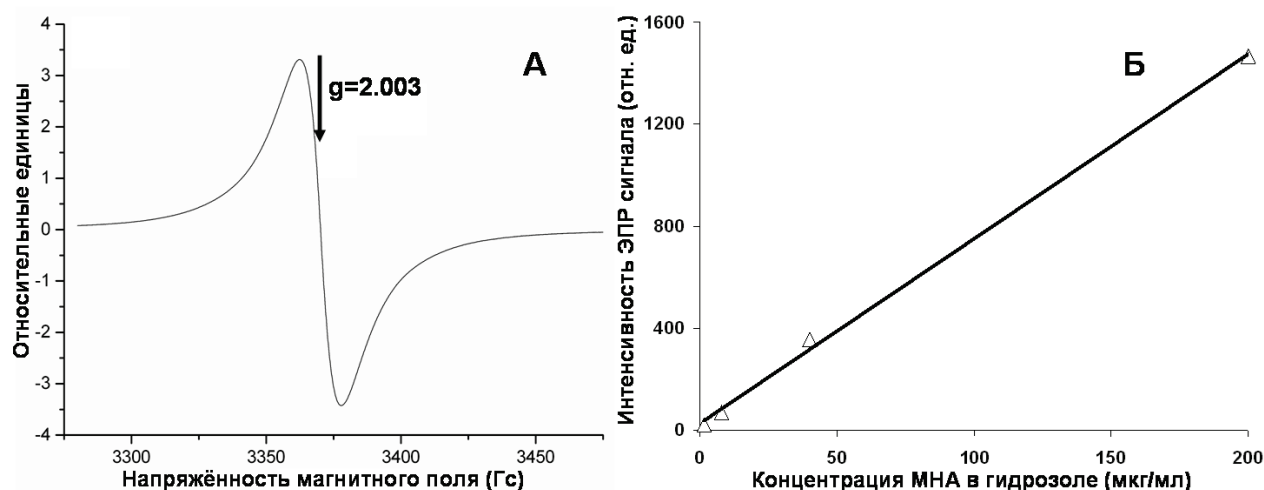


Рисунок 1. Типичный ЭПР сигнал, регистрируемый в образцах замороженных гидрозолей МНА (А), интенсивность ЭПР сигнала в зависимости от концентрации МНА в гидрозоле (Б)

Благодаря этим исследованиям, были разработаны оригинальные контейнеры, обеспечивающие замораживание образцов в жидком азоте, и специальный держатель, позволяющий переносить замороженные образцы из контейнеров при температуре жидкого азота. В свою очередь, применение созданного держателя позволило использовать безампульный способ фиксации образца в резонаторе ЭПР спектрометра и увеличить объем изучаемых проб биоматериалов.

В исследованиях *in vitro* было установлено, что в замороженных образцах всех изучаемых биоматериалов, содержащих МНА (кровь и гомогенаты органов животных), также регистрируется симметричный ЭПР сигнал ($g = 2,003$, $\Delta H \approx 10$ Гс). При этом было показано, что интенсивность детектируемых в образцах ЭПР сигналов прямо пропорционально зависит от концентрации МНА. В качестве примера приведены ЭПР сигналы, регистрируемые в образцах крови с разной концентрацией МНА (рис. 2А, Б). Следует сказать, что ЭПР исследования не содержащих МНА контрольных образцов всех биоматериалов выявили в них наличие собственных парамагнитных центров (радикалы, гем-содержащие белки и др.), сигналы от которых накладываются на сигналы от МНА. Однако было установлено, что при использованных в экспериментах объемах биообразцов величины ЭПР сигналов, регистрируемых от их собственных парамагнитных центров, как правило, невелики (рис. 2В). Тем не менее, для большей корректности тестирования мы вычитали из ЭПР сигнала опытного образца ЭПР сигнал контрольного образца – это позволило определять наночастицы в биоматериалах с большей точностью. Как и при исследовании гидрозолей МНА (см. выше), в экспериментах *in vitro* было установлено, что в содержащих МНА биоматериалах интенсивность регистрируемых ЭПР сигналов линейно возрастает при увеличении концентрации МНА от 1,6 до 40 мкг и более (до 200 мкг) на 1 мл образца (рис. 3). Полученные зависимости могут быть использованы в качестве калибровочных кривых для количественной оценки наноалмазов в биологических материалах с помощью ЭПР анализа. В целом, результаты проведенных экспериментов демонстрируют перспективность использования метода ЭПР-спектрометрии в исследованиях *in vivo* для выявления детонационных наноалмазов в органах и тканях экспериментальных животных после внутривенного введения наночастиц.

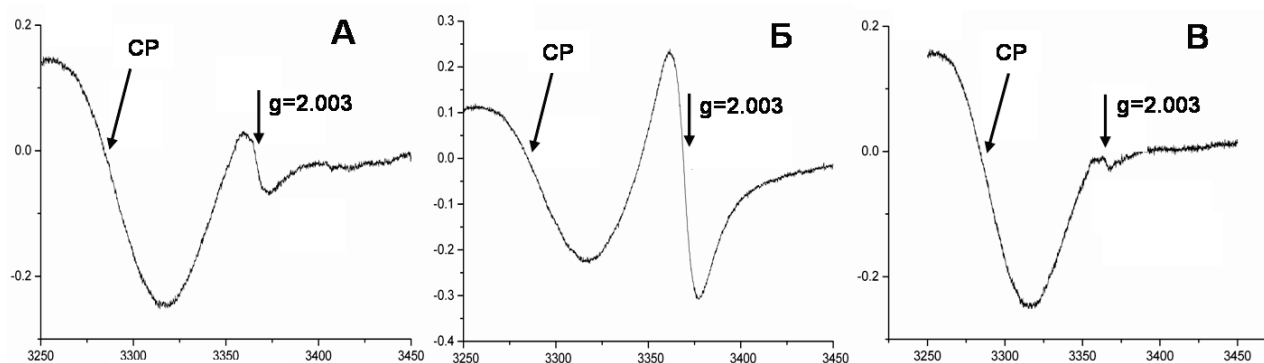


Рисунок 2. ЭПР спектры образцов крови мышей: А и Б – опытные образцы с концентрацией МНА 10 и 80 мкг/мл, соответственно; В – контрольный образец (без МНА): обозначения осей на графиках такие же, как на рисунке 1А; CP – часть спектра церулоплазмينا

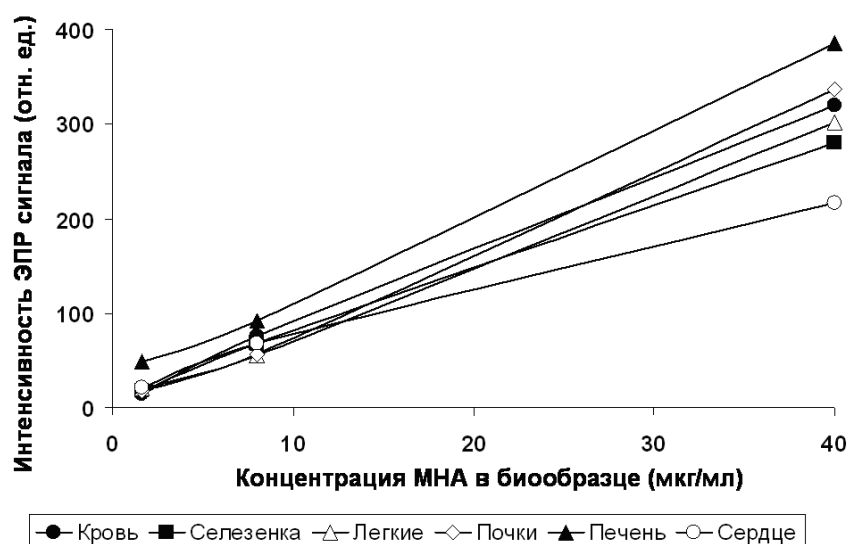


Рисунок 3. Интенсивность ЭПР сигналов в зависимости от концентрации МНА в образцах биоматериалов

В экспериментах *in vivo* методом ЭПР-спектроскопии нами было установлено, что через 2,5 часа после внутривенной инъекции МНА аккумулируются преимущественно в легких и печени животных. Как показали расчеты с использованием полученных в экспериментах *in vitro* калибровочных зависимостей величины ЭПР сигнала от концентрации МНА в биоматериалах (рис. 3), в тканях легких и печени через этот период времени аккумулируется около 25 % и 20 % МНА, соответственно, от дозы введенных наночастиц. При этом расчеты удельного содержания наночастиц на единицу массы органа (рис. 4), проведенные на основании данных ЭПР анализа образцов биоматериалов, свидетельствуют о гораздо большей (практически на порядок) эффективности накопления МНА в легочной ткани, по сравнению с тканью печени. На этом сроке исследований в сердце и почках животных методом ЭПР было зарегистрировано значительно меньшее (на 1-1,5 порядка) количество МНА, по сравнению с легкими и печенью. Через 2,5 часа после инъекции в образцах крови, селезенки, головного мозга и мышц бедра наличие МНА не было выявлено в пределах чувствительности использованного метода.

Как показали дальнейшие исследования *in vivo*, метод ЭПР-спектроскопии позволил зарегистрировать перераспределение МНА в организме животных через 10 суток после инъекции наночастиц. Из данных по удельному содержанию МНА в органах мышей видно (рис. 4), что этот показатель в легких снижается более чем в 3 раза, увеличивается в печени более чем в 2 раза, отмечается аккумуляция МНА в селезенке. При этом не было выявлено значимых изменений общего содержания МНА в сердце и почках мышей, по сравнению с этим показателем для данных органов через 2,5 часа после инъекции. Следует сказать, что на данном сроке исследований МНА вновь не были зарегистрированы методом ЭПР в образцах крови, головного мозга и мышц бедра животных.

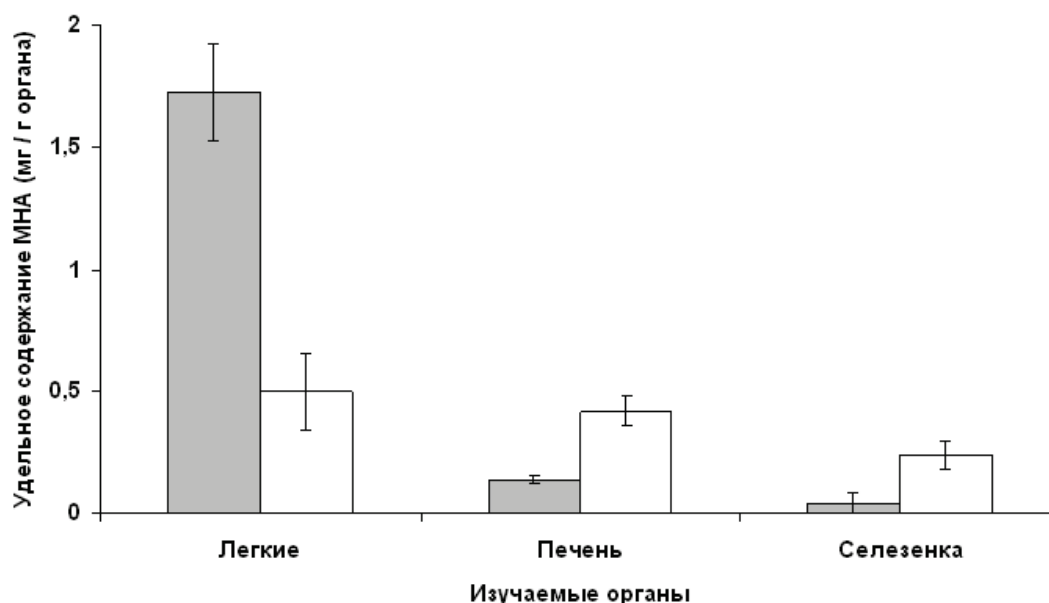


Рисунок 4. Распределение МНА в организме мышей через 2,5 часа (темные столбцы) и 10 суток (светлые столбцы) после внутривенной инъекции — приведено удельное содержание наночастиц в органах животных: данные представлены в виде $M \pm m$, $n = 4$ для каждого определения

Таким образом, результаты проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* демонстрируют применимость ЭПР-спектроскопии для выявления нанодiamondов взрывного синтеза в биоматериалах и открывают перспективы использования данного метода для изучения динамики межорганный распределения, накопления и элиминации нанодiamondов при их внутривенном введении в организм экспериментальных животных.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-00999).

Список литературы / References:

1. Vo-Dinh Tuan *Nanotechnology in Biology and Medicine: methods, devices, and applications*. Taylor & Francis Group, LLC: New York, 2006, 762 p.
2. Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Adithan C. Novel applications of nanotechnology in medicine. *Ind. J. Med. Res.*, 2009, vol. 130, pp. 689-701.
3. Tran P.A., Zhang L., Webster T.J. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, vol. 61, pp. 1097-1114.
4. Thanh N.T.K., Green L.A.W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 2010, vol. 5, pp. 213-230.
5. Zamborini F.P., Bao L., Dasari R. Nanoparticles in measurement science. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 84, pp. 541-576.
6. Monaco A.M., Giugliano M. Carbon-based smart nanomaterials in biomedicine and neuroengineering. *Beilstein J. Nanotech.*, 2014, vol. 5, pp. 1849-1863.
7. *Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications*. Springer, ed. M. Zhang, R.R. Naik, L. Dai, 2015, 587 p.
8. Yin M., Zhao L., Wei Q., Li H. Rapid colorimetric detection of melamine by H₂O₂-Au nanoparticles. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 32897-32901.
9. Kumar A. Fullerenes for biomedical applications. *J. Environ. Appl. Biores.*, 2015, vol. 3, pp. 175-191.
10. Wang Y., Hu S. Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants. *J. Nanosci. Nanotech.*, 2016, vol. 16, pp. 7852-7872.
11. Ding X., Liu J., Li J., Wang F., Wang Y., Song S., Zhang H. Polydopamine coated manganese oxide nanoparticles with ultrahigh relaxivity as nanotheranostic agents for magnetic resonance imaging guided synergetic chemo-/photothermal therapy. *Chem. Sci.*, 2016, vol. 7, pp. 6695-6700.
12. Jin-Wook Y., Nishit D., Samir M. Adaptive micro and nanoparticles: temporal control over carrier properties of facilitate drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, vol. 63, pp. 1247-1256.
13. Plank C., Zelphati O., Mykhalik O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, vol. 63, pp. 1300-1331.
14. Morachis J.M., Mahmoud E.A., Almutairi A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacol. Rev.*, 2012, vol. 64, pp. 505-519.
15. Lamanna G., Battigelli A., Menard-Moyon C., Bianco A. Multifunctionalized carbon nanotubes as advanced multimodal nanomaterials for biomedical applications. *Nanotech. Rev.*, 2012, vol. 1, pp. 17-29.
16. Mendes R.G., Bachmatiuk A., Buchner B. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms. *J. Mater. Chem. B.*, 2013, vol. 1, pp. 401-428.
17. Kozak O., Sudolska M., Pramanik G., Cigler P., Otyepka M., Zboril R. Photoluminescent carbon nanostructures. *Chem. Mater.*, 2016, vol. 28, pp. 4085-4128.
18. Maas M. Carbon nanomaterials as antibacterial colloids. *Materials*, 2016, vol. 9, pp. 617-636.
19. Danilenko V.V. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Phys. Solid State*, 2004, vol. 46, pp. 595-599.
20. Krueger A. New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials. *Chem. Eur. J.*, 2008, vol. 14, pp. 1382-1390.
21. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications. *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, 2009, vol. 34, pp. 18-74.
22. Kharisov B.I., Kharissova O.V., Chavez-Guerrero L. Synthesis techniques, properties, and applications of nanodiamonds. *Synth. React. Inorg., Metal-Org., Nano-Metal Chem.*, 2010, vol. 40, pp. 84-101.
23. Sung J.C., Lin J. *Diamond Nanotechnology: syntheses and applications*. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: Singapore, 2010, 258 p.
24. Say J.M., van Vreden C., Reilly D.J., Brown L.J., Rabeau J.R., King N.J.C. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications. *Biophys. Rev.*, 2011, vol. 3, pp. 171-184.
25. Mochalin V.N., Shenderova O., Ho D., Gogotsi Y. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat. Nanotech.*, 2011, vol. 7, pp. 11-23.
26. Shugalei I.V., Voznyakovskii A.P., Garabadzhiu A.V., Tselinskii I.V., Sudarikov A.M., Ilyushin M.A. Biological activity of detonation nanodiamond and prospects in its medical and biological applications. *Rus. J. Gen. Chem.*, 2013, vol. 83, pp. 851-883.
27. Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Puzyr A.P., Bondar V.S. Nanodiamonds as a carriers for address delivery of biologically active substances. *Nanoscale Res. Lett.*, 2010, vol. 5, pp. 631-636.
28. El-Say Kh.M. Nanodiamond as a drug delivery system: applications and prospective. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2011, vol. 1, pp. 29-39.

29. Zhu Y., Li J., Zhang Y., Yang X., Chen N., Sun Y., Zhao Y., Fan C., Huang Q. The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems. *Teranostics*, 2012, vol. 2, pp. 302-312.
30. Zhang X., Wang A.Q., Liu M., Hui J., Yang B., Tao L., Wei Y. Surfactant-dispersed nanodiamond: biocompatibility evaluation and drug delivery applications. *Toxicol. Res.*, 2013, vol. 2, pp. 335-342.
31. Kaur P., Badea I. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging. *Int. J. Nanomed.*, 2013, vol. 8, pp. 203-220.
32. Chang I.P., Hwang K.C., Chiang C.S. Preparation of fluorescent magnetic nanodiamonds and cellular imaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, vol. 130, pp. 15476-15481.
33. Salaam A.D., Hwang P., McIntosh R., Green H.N., Jun H.-W., Dean D. Nanodiamond-DGEA peptide conjugates for enhanced delivery of doxorubicin to prostate cancer. *Beilstein J. Nanotech.*, 2014, vol. 5, pp. 937-945.
34. Purtov K., Petunin A., Inzhevatin E., Burov A., Ronzhin N., Puzyr A., Bondar V. Biodistribution of different sized nanodiamonds in mice. *J. Nanosci. Nanotech.*, 2015, vol. 15, pp. 1070-1075.
35. Puzyr A.P., Bondar V.S., Bukayemsky A.A., Selyutin G.E., Kargin V.F. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds. *NATO Sci. Ser. II. Math. Phys. Chem.*, 2005, vol. 192, pp. 261-270.
36. Solmatova A.A., Il'in I.V., Shakhov F.M., Kidalov S.V., Vul' A.Ya., Yavkin B.V., Mamin G.V., Orlinskii S.B., Baranov P.G. Electron paramagnetic resonance detection of the giant concentration of nitrogen vacancy defects in sintered detonation nanodiamonds. *JETP Lett.*, 2010, vol. 92, pp. 102-106.
37. Bondar V.S., Puzyr A.P. Nanodiamonds for biological investigations. *Phys. Solid State*, 2004, vol. 46, pp. 716-719.
38. Puzyr A.P., Bondar V.S. *Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability*. RU Patent No. 2252192, 2005, bull. no. 14.
39. Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. Nanodiamonds with novel properties: a biological study. *Diam. Relat. Mater.*, 2007, vol. 16, pp. 2124-2128.

BIOMATERIALS AND TO STUDY THEIR DISTRIBUTION IN THE BODY OF ANIMALS AFTER INTRAVENOUS INJECTION

Inzhevatin E.V.^{1,2}, Baron A.V.^{1,3}, Maksimov N.G.^{1,4}, Volkova M.B.^{1,3}, Puzyr A.P.^{1,2}, Ronzhin N.O.¹, Bondar V.S.¹

¹Institute of Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: inscience@mail.ru, bondvs@mail.ru

²International Scientific Center for Studies of Extreme States of Organism, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

Akademgorodok, 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³Siberian Federal University

Svobodny Av., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

⁴Institute of Chemistry and Chemical Technology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Abstract. In the model experiments *in vitro*, the applicability of EPR spectrometry for the detection of the modified detonation nanodiamonds (MNDs) in biomaterial samples (blood and homogenates of mouse organs) was established. The intensity of a characteristic EPR signal ($g = 2.003$, $\Delta H \approx 10$ G) registered in the samples increases linearly at MNDs concentrations in the range of 1.6-200 $\mu\text{g/ml}$. It was established in experiments *in vivo* that 2.5 hours after an intravenous injection to mice MNDs were mainly accumulated in the lungs and liver of animals – about 25 % and 20 % of the injected dose, respectively. A much smaller amount of MNDs (by 1-1.5 orders of magnitude) was found in the heart and kidneys. The presence of MNDs in the blood, spleen, brain and hip muscles was not detected within the sensitivity of the EPR method. Ten days after injection, the redistribution of MNDs was recorded: the amount of nanoparticles in the lungs decreases 3.5 fold and increases practically 3 fold in the liver. There was also registered the accumulation of MNDs in the spleen. At the same time, no change in the content of MNDs in the heart and kidneys was observed. In general, the obtained results open up the prospects for using EPR spectrometry to study the dynamics of inter-organs distribution, accumulation and elimination of MNDs after intravenous injection to the body of experimental animals.

Key words: nanodiamonds, EPR spectrometry, biological samples, blood, organs homogenates, distribution dynamics.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ УМЕРЕННЫМИ ДОЗАМИ НИТРИТОМ НАТРИЯ В ОПЫТАХ *in vitro*

Гусейнова С.Я., Гусейнов Т.М., Дадашов М.З.

Институт Биофизики, НАН Азербайджана

ул. З. Халилова, 117, г. Баку, AZ 1141, Азербайджан; e-mail: thuseynov@physics.ab.az

Поступила в редакцию: 25.06.2018

Аннотация. В работе изучены влияния умеренно-хронических доз нитрита натрия на окислительной модификации Hb и эритроцитов, изменения активности каталазы, глутатионпероксидазы (ГП) и интенсивность перекисное окисления липидов (ПОЛ). Анализ спектральных линий раман спектроскопии показывает, что способность Hb связывать кислород I1580/I1548 в суспензии эритроцитов, обработанных NaNO₂ существенно выше, чем в контроле и этот эффект прямо зависит от концентрации NaNO₂ и значителен уже при минимальных концентрациях NaNO₂ (0,07 мМ), а относительная способность Hb отдавать лиганды I1375/I1580 также зависит от дозы, но в противоположную сторону. Проявления симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец Hb (I1375/I1172) с увеличением дозы нитрита повышается на ~ 14 %, что указывает о наличие конформационных изменений пиррольных колец, связанных с окислительной модификацией Hb. Накопление metHb также зависит от дозы и достигает своего максимума на 30-40 минутах, это сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ и увеличением доли мембрансвязанного Hb. Характерно, что развитие окислительного процесса сопровождается уменьшением активности каталазы, а активность ГП изменяется неоднозначно и при повышенных содержаниях NaNO₂ несколько растет. Констатируя указанных фактов можно сказать, что уже относительно малые концентрации нитрита натрия могут влиять на конформацию Hb, приводящую к изменению его сродства к O₂. Это стимулирует окислительную модификацию Hb, что отражается в росте накопления metHb и потери активности каталазы и ГП, а при больших концентрациях нитрита и к росту активности ГП.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, каталаза, глутатионпероксидаза, ПОЛ, нитрит натрия.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование нитритов-нитратов в сельскохозяйственной промышленности, пищевой промышленности и огромное количество промышленных выхлопных газов, содержащих окислы азота, представляет токсикологическую угрозу здоровью человека [1]. Длительное нитритное интоксикация сопровождается нарушением прооксиданто-антиоксидантного равновесия, т.е. развитием в той или иной мере окислительного стресса. Здесь одним из главных аспектов является изменения состояния компонент системы антиокислительной (АО) защиты, в том числе и важных АО энзимов супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), каталазы и др. и окислительная модификация гемоглобина (Hb) и эритроцитов в целом [2, 3, 4]. Кроме того, Hb и его дериваты как гемопротеиды обладают пероксидазной активностью и поэтому могут существенно влиять на развития окислительных процессов [5].

Разнообразие и тяжесть возникающих нарушений в организме человека при нитритных интоксикациях, особенно малыми - «хроническими» дозами, диктуют необходимость детального исследования компонентов крови, в том числе изменений структуры, конформации, O₂-связывающих свойств Hb, состояние антиперекисных энзимов от окислительных эффектов малотоксичных доз нитритов. Т.е. тех доз, которые не приводит к явным структурно-функциональным нарушениям в Hb и эритроцитах, приводящих к развитию гипоксии в организме. В свете этого, для исследования индуцированных окислительных модификаций эритроцитов и Hb и нарушений функционирования эритроцитов мы поставили цель исследовать воздействия нитритов на эритроциты. Наряду с другими методами мы использовали спектральные данные полученные с помощью Раман спектроскопии (РС). Использование РС позволяет детально изучить основные структурно-функциональные показатели Hb, такие как строение молекулы, колебания метиновых мостиков, сродство к кислороду, способность захватывать или отдавать лиганды и т.д. [6, 7]. Любой эффект, в том числе изменение валентности атомов железа в геме, вызывающий изменения в распределении электронов на π орбиталях порфирина, оказывает влияние на частоту соответствующих полос РС [8]. Соответствие изменений интенсивностей характеристических пиков РС к изменениям соотношений metHb/общего Hb, и наличие линейной корреляции между ними теоретически обеспечили бы возможность количественного исследования нитритной метгемоглобинемии [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах были использованы натрий хлористый, нитрит натрия, натрий фосфат однозамещенный и двухзамещенный, сернокислая железа, молибдат аммония, трихлоруксусная кислота («Реахим», хч, Россия), восстановленный глутатион, 5'-5' дитиобисбензойная кислота, 2-тиобарбитуровая кислота (Sigma, USA).

В опытах *in vitro* была использована кровь доноров, взятая из локтевой вены в пробирки с гепарином (20 ед./мл крови). Основным объектом исследования являлись эритроциты и Hb человека. Путем центрифугирования 800 g в течение 15 мин проводили отделение плазмы крови от эритроцитов. Для получения суспензии эритроцитов осадок эритроцитов трижды отмывали в десятикратном объеме натрий-фосфатном буферном растворе (НФБ) (10 mM НФБ pH 7,4, 0,14 mM NaCl), центрифугировали при 800 g в течение 15 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Гемолиз эритроцитов достигался путем разбавления эритроцитарной массы дистиллированной водой в соотношении 1:9 с последующим замораживанием, оттаиванием и центрифугированием при 10000 g. Нитритное воздействие осуществлялось нитритом натрия, конечная концентрация в инкубационной среде составлял от 0,07 до 0,70 mM время воздействия от 0 до 60 мин. Воздействие на эритроцитарную суспензию в опытах с привлечением РС, осуществлялось использованием NaNO_2 в трех конечных концентрациях - 0,07, 0,15 и 0,35 mM (время инкубации до 60 минут при 25 °C). Эти концентрации были взяты для прослеживания ранних стадий окислительного процесса Hb, вызванного нитритом. РС Hb регистрировали с помощью микроскопической системы 3D-конфокал раманспектрометра Nanofinder 30 (Japan). Для возбуждения раман спектров использовался лазер с длиной волны 532 нм, мощность излучения 10 мВт, объектив 50 х.

Для оценки соотношений окисленных нитритом форм Hb в эритроцитах проведены две серии опытов с сроками инкубирования образцов (30 и 60 мин) при температуре 37 °C. Каждая серия включала в себя один контрольный и опытные образцы. Контрольный образец содержал 2,0 мл суспензии эритроцитов + 0,2 мл забуференный физраствор, а в опытные образцы – по 2,0 мл суспензии эритроцитов и NaNO_2 (0,2 мл) с различными конечными концентрациями. Накопление metHb оценивали по полуэмпирическим формулам, предложенным в [10]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) эритроцитов оценивали по накоплению окрашенных продуктов окисления, реагирующих в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [11]. Определения активности каталазы осуществляли стандартным методом с использованием молибден аммония [12], а активность глутатионпероксидазы определяли по методу Моина [13]. Все измерения выполняли на спектрофотометре СФ-46 (Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия при уровне значимости $p < 0,05$ [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Присоединяя и отдавая лиганды Hb изменяет свою конформацию, что отражается на его физико-химических и функциональных свойствах [15]. Изучение динамики этих конформационных изменений Hb в присутствии различных лигандов является необходимым звеном в понимании механизмов его модификаций, механизмов развития и путей предотвращения его патологических состояний. Как лиганд, O_2 является одним из “аллостерических” эффекторов молекулы Hb [16, 17]. Подобно O_2 NO также принимает участие в “аллостерических” превращениях Hb [16]. NO обладает более высоким сродством к атому железа (Fe^{2+}) порфирина, чем O_2 , и эффективно конкурирует с ним за связывание Hb. Связывание NO с атомом Fe^{2+} Hb, способно изменить конформацию гемопорфирина и как, следствие изменят сродство Hb к O_2 [17, 18]. Наличие полос в Раман-спектре Hb отражает его структурно-функциональное состояние [19, 20].

Анализ спектральных линий, полученных в наших опытах показывает, что способность Hb связывать кислород I1580/I1548 в суспензии эритроцитов, обработанных нитритом существенно выше, чем в контроле (281, 291 и 300%) и прямо зависит от концентрации нитритов, кроме того этот эффект значителен уже при минимальных концентрациях нитрита (0,07 mM). А относительное способность Hb отдавать лиганды I1375/I1580 в зависимости от дозы составляло 94,5, 92,7 и 92,2 % по отношению к контролю. Повышения сродства обеспечивает большое взаимодействие между Hb и O_2 , снижая эффективность отдачи O_2 .

Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец Hb (I1375/I1172) с увеличением дозы нитрита повышается на ~ 14 %, что указывает о наличие конформационных изменений пиррольных колец, связанных с окислительной модификацией Hb.

Процесс индуцированного нитритами окисления гемоглобина представлен на рисунке 2. Из него видно, что уже на 10 мин инкубирования в среде содержащей суспензии эритроцитов гематокрит 5 %, $t = 37$ °C, 10 mM НФБ, pH 7.4) имеет место заметное накопления metHb, которое достигает максимума на 30-40 минуте. Величина этого эффекта коррелирует с конечной концентрацией нитрита (рис. 1).

Окисленное состояние Hb и избыток внутриэритроцитарного metHb способствует встраиванию Hb в эритроцитарную мембрану, увеличивая долю мембранносвязанного Hb, последствием же является нарушение структуры мембран эритроцитов. И на этот счет в литературе имеются сведения о том, что образующиеся под воздействием окислительных факторов агрегаты Hb и его дериватов, содержащих гем в состоянии от Fe (III) до Fe (IV), локализуются в примембранном слое и частично внедряется в мембраны эритроцитов, вызывая окислительную модификацию мембран [21, 22, 23].

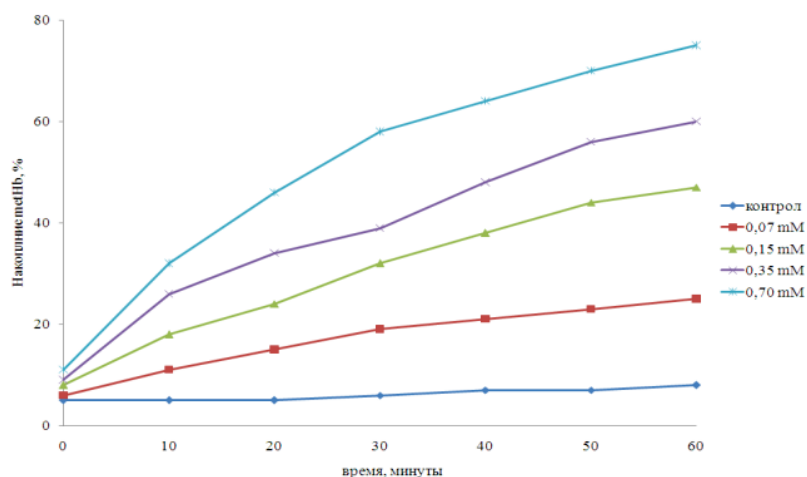


Рисунок 1. Дозозависимое нитрит-индуцированное накопление *metHb* в инкубационной среде, 10 mM НФБ pH 7,4, 0,14 mM, NaCl, $t = 37^\circ\text{C}$, с суспензией эритроцитов в присутствии 0,07-0,7 mM NaNO₂

При этом было показано, что чем выше уровень окисленности гема, то есть доли высоких форм окисленности иона железа, тем выше доля мембраносвязанного Hb, образующие кластеры совместно с полосой 3 AE1 эритроцитарной мембраны [24].

С целью установления связи между развитием окислительной модификации и накоплением мембраносвязанного Hb (мсHb) были поставлены специальные опыты по оценке содержания мсHb в образцах подвергнутых обработке нитритом. В отобранных аликвотных пробах со сроком инкубирования 0, 15, 30, 60 минут определяли суммарное содержание Hb и его дериватов в супернатантах после центрифугирования при 12000 $g \times 10$ мин. При этом изменения качественного состава мсHb оценивали посредством изменения спектральных пиков поглощения при 540, 576 нм (oxiHb) и 630 нм (metHb). По убыви соответствующих экстинкций Hb в образцах до и после центрифугирования оценивали и соотношение oxiHb и metHb конечных и начальных экстинкций, а также суммарного мсHb в них (табл. 1).

Снижение содержания Hb супернатантах свидетельствует о повышении мсHb как в гемолизатах, так и в эритроцитах. Проведенные нами предварительные опыты показали, что при малых конечных концентрациях (0,07 mM и 0,14 mM) нитриты не оказывает заметного влияния на образования мембранного Hb. В связи с этим мы рассматривали влияние нитрита натрия еще и с использованием более высокой дозы (7,0 mM) на состояние содержаний мембранного Hb в суспензии эритроцитов до и после сепарации (центрифугированием 12000 $G \times 30$ мин) мембран эритроцитов (табл.1). Оказалось, что около 2/3 общего мсHb приходится на мембраносвязанный metHb.

После центрифугирования содержание общего Hb в супернатантах эритроцитов уменьшается на $\sim 8\%$, что свидетельствует об их перемещении в примембранное пространство эритроцитов. Из данных таблицы 1 видно, что как увеличение конечной концентрации нитрита в среде инкубирования, так и увеличение ее длительности приводят к увеличению доли мембранного Hb.

Таблица 1. Влияние нитрита натрия на суммарный мембраносвязанный гемоглобин (в %) в изолированных эритроцитах при инкубации Na-фосфатном буфере (pH 7,4, гематокрит $\approx 10\%$, $t = 37^\circ\text{C}$)

Образцы (n=8)	NaNO ₂ (mM)				
	0,07	0,15	0,35	0,70	7,00
Контрольный Hb	0,60 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,12	0,60 $\pm$ 0,12
После 15 минут	0,70 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,15	1,41 $\pm$ 0,31*	2,13 $\pm$ 0,32**	4,17 $\pm$ 0,36**
После 30 минут	0,82 $\pm$ 0,12*	0,90 $\pm$ 0,17*	2,22 $\pm$ 0,26*	3,31 $\pm$ 0,42**	6,78 $\pm$ 0,73
После 60 минут	0,85 $\pm$ 0,20*	0,97 $\pm$ 0,72**	2,97 $\pm$ 0,23**	4,87 $\pm$ 0,36**	8,43 $\pm$ 0,65**

уровень значимости * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Таблица 2. Изменение показаний МДА, активности ГП и каталазы в эритроцитах, инкубированных при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, в среде содержащей NaNO_2 в интервале конечных концентраций от 0 до 7,0 мМ

		МДА нМ/1г Hb			Активность ГП мкМ GSH/мин/1г Hb			Активность каталазы мкМ/мин		
n=8	Время инкуб	15 мин	30 мин	60 мин	15 мин	30 мин	60 мин	15 мин	30 мин	60 мин
	Контроль	$3,75 \pm 0,75$	$3,47 \pm 0,69$	$3,55 \pm 0,71$	220 ± 31	240 ± 48	250 ± 35	$2,6 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,5$
NaNO_2	0,07 мМ	$3,50 \pm 0,70$	$3,05 \pm 0,61$	$2,82 \pm 0,56$	205 ± 29	230 ± 37	240 ± 38	$2,7 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,5$
	0,15 мМ	$3,21 \pm 0,64$	$2,50 \pm 0,50$	$2,25 \pm 0,45$	200 ± 18	217 ± 23	225 ± 27	$2,4 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,3$
	0,35 мМ	$3,42 \pm 0,68$	$3,54 \pm 0,70$	$3,65 \pm 0,52$	210 ± 24	295 ± 25	230 ± 22	$2,3 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,3$
	0,70 мМ	$4,15 \pm 0,83$	$4,72 \pm 0,67$	$4,91 \pm 0,98$	240 ± 26	260 ± 20	225 ± 29	$2,1 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,3$
	7,00 мМ	$5,12 \pm 1,02$	$5,56 \pm 1,11$	$5,85 \pm 1,17$	365 ± 41	335 ± 35	310 ± 24	$1,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$

Уровень значимости * $p < 0,05$

Повышение уровня мембраносвязанного Hb обуславливает нарушение структурно-функционального состояния мембран эритроцитов и создает условия для еще большего заглубления Hb и MetHb в липидный бислой [21-24], а конечном счете вызовет структурную модификацию мембран эритроцитов, определяющая развитие гемолиза и интенсификация ПОЛ. Как видно из таблицы 2 нитриты в зависимости от содержания нитритов по-разному могут действовать на ПОЛ. В частности, малые конечные концентрации 0,07, 0,15 мМ нитритов ингибирует развитие ПОЛ, а 0,35 мМ не оказывает статистически достоверного влияния, выше: 0,70 мМ - ускоряют ПОЛ.

Действительно, согласно имеющимся данным в литературе липидное окисление может быть инициировано ферриловым Hb (Fe IV), образованным при взаимодействии Hb с пероксидами [25]. При этом Hb (Fe IV) вступает в реакцию с NO, фактически ингибирует реакцию Фентона, прекращая генерацию опасных гидроксильных радикалов (OH $\cdot$). В этом случае оказалось, что NO может снижать содержание феррилового гема и тем самым предотвращать окисление липидов мембран. Кроме того, имеются мнения, что образующиеся комплексы metHb-NO обладают определенными АО свойствами, в том числе пероксидазной активностью, ослабляющие генерацию пероксидов [5, 26-28]. В случае больших концентраций нитритов (в нашем случае 0,7 мМ и выше) пероксидазные свойства нитритного гемоглобина недостаточны для предотвращения окислительной модификации Hb, образующийся мембранный Hb [28-30].

Развитие окислительного стресса, в том числе и индуцированного нитритом натрия, неразрывно связано с активностью антиперекисных ферментов, в первую очередь каталазы и ГП. И если об участии каталазы в развитии окислительного процесса в эритроцитах в литературе имеется много сведений и приводятся различные механизмы о участии этого фермента в нитритном отравлении [31, 32], то для случая ГП эти сведения обрывочны и по существу, нет приемлемых гипотез объяснений механизма ее участия в нем [33, 34]. В частности, наиболее часто цитируются работы [Asahi M, 34] проведенные на клетках U937, в которой показано, что азотсодержащие соединения (SNAP) предположительно генерирующие NO, угнетает ГП активность, что приводит к росту ПОЛ [34]. Механизм этого эффекта связывается с окислением Se-цистеина до Se-цистин-цистина

Ранее нами было показано, что нитрит натрия, внесенный в инкубационную среду, содержащую изолированную суспензию эритроцитов человека, в конечной концентрации от 0,5 до 1,0 мМ приводит уже в первые 30 мин к существенному росту метгемоглобина, близкого к максимуму. Было показано, что активность ГП фермента незначительно меняется, а активность каталазы угнетается весьма заметно [35]. В настоящей работе мы провели аналогичное исследование, только здесь конечные концентрации были выбраны в более широком диапазоне от 0,07-0,70 мМ.

Из наших нынешних результатов (табл. 2) видно, что все эти дозы начиная с минимальной 0,07 мМ в той или иной мере приводят к угнетению каталазной активности. Однако, для ГП эти изменения не однозначны и при минимальной концентрации 0,07-0,15 мМ имеет место тенденции к уменьшению активности. Характерным оказалось и то, что активность каталазы при всех использованных конечных концентрациях нитрита однозначно уменьшается, особенно при относительно высоких концентрациях, коррелируя с заметным ростом мембранного Hb и ростом ПОЛ. Однако, активность ГП при повышенных содержаниях NaNO_2 несколько растет. Следует иметь в виду о том, что при увеличении концентрации H_2O_2 , сопровождающееся увеличением содержания metHb происходит ингибирования всех трех основных эритроцитарных пероксидотилизирующих ферментов (каталаза, глутатионпероксидаза и пероксиредоксин-2). Однако, если каталаза не связывается с

эритроцитарными мембранами, и ее действие носит опосредственный характер на ПОЛ, то глутатионпероксидаза и пероксиредоксин-2 тесно взаимодействуют с мембранами [33].

Здесь, интересным оказалось то, что нитриты принимают непосредственное участие в регуляции ПОЛ, при низких и умеренных концентрациях в инкубационной среде подавляют ПОЛ и только при высоких концентрациях 0,7 мМ и выше оно несколько превышает контрольный уровень (~ 30 %), при том, что накопление metHb имеет место при всех концентрациях нитрита и достигает высоких значений до 50 % уже в первый час инкубирования. Резюмируя результаты исследования можно полагать, что нитриты уже в относительно малой концентрации могут влиять на конформацию гемоглобина, приводящую к изменению сродства его к кислороду. Последнее стимулирует окислительную модификацию гемоглобина, что отражается в накоплении метгемоглобина и потери активности каталазы и изменении активности ГП, а при больших концентрациях нитрита и к росту ПОЛ.

Список литературы / References:

1. Mensinga T.T., Gerrit J.A., Speijers J.M. Health Implications of Exposure to Environmental Nitrogenous Compounds. *Toxicological Reviews*, 2003, vol. 22, iss. 1, pp 41-51.
2. Spagnuolo C., Rinelli P., Coletta M., Chiancone E., Ascoli F., Oxidation reaction of human oxyhemoglobin with nitrite: a reexamination. *Biochim Biophys Acta*, 1987, vol. 5, no. 911, iss. 1, pp. 59-65.
3. May J.M., Zhi-Chao Qu, Li Xia, Charles E.C. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2000, v. 279, no. 6, pp 1946-1954
4. Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Rekawiecka K., Zavodnik L.B., Bartosz G., Bryszewska M. Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, vol. 15, no. 1421, iss. 2, pp. 306-16.
5. Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G, Buehler P.W, Schaer D.J. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid Redox Signal*, 2010, vol. 12, no. 2, pp. 185-98.
6. Uskokovich-Markovich S., Jelich-Stankov M., Holclajtner-Antunovich I., Durdevich P. Raman spectroscopy as a new biochemical diagnostic tool. *J. Med. Biochem*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 96-103.
7. Кэри П. *Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии*. М.: Мир, 1985, 272 с. [Cary P. *Application of spectroscopy of the RC and RKC in biochemistry*. Moscow: Mir, 1985, 272 p. (in Russ)]
8. Соловьев К.Н., Гладков Л.Л., Старухин А.С. *Спектроскопия порфиринов: Колебательные состояния*. Минск: Наука и техника, 1985, 415 с. [Soloviev K.N., Gladkov L.L., Starukhin A.S. *Spectroscopy of porphyrins: Oscillatory states*. Minsk: Science and Technology, 1985, 415 p. (in Russ)]
9. Максимов Г.В., Максимова Н.В., Чурие А.А. и др. Исследование изменений конформации порфирина гемоглобина при первичной гипертензии. *Биохимия*, 2001, т. 66, вып. 3, с. 365-370. [Maksimov G.V., Maksimova N.V., Churie A.A. Research of changes in the conformation of porphyrin hemoglobin in primary hypertension. *Biochemistry*, 2001, vol. 66, iss. 3, p. 365-370. (In Russ.)]
10. Winterbourn C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 186, pp. 265-272.
11. Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R. W. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem. J.*, 1984, vol. 220, no. 3, pp. 685-692.
12. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. Дело*, 1986, no. 12, с. 724-727. [Moin V.M. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Lab. Delo*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
13. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, т. 64, № 3, с. 16-17. [Korolyuk M.A. Method for determination of catalase activity. *Lab. Delo*, 1988, т. 64, no. 3, с. 16-17. (In Russ.)]
14. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа, 1990, 352 с. [Lakin G.F. *Biometriya*. Moscow, 1990, 352 p. (in Russ.)]
15. Иржак Л.И. *Hb и их свойства*. М.: Наука, 1975, 239 с. [Irjak L.I. *Hb and their properties*. Moscow: Nauka, 1975, 352 с. (In Russ.)]
16. Duke researchers discover central role of Nitric Oxide in hemoglobin action. *Duke Medicine News and Communication*, 2004, vol. 3.
17. Рубан М.К., Вашанов Г.А., Лавриненко И.А. Структурно-функциональные модификации нитрозилированного Hba, индуцированные оксигенацией. *Вестник ВГУ, Серия: Биология. Фармация*, 2010, № 1, с. 56-61. [Ruban M.K, Vashanov G.A, Lavrinenko I.A. Structural and functional modifications of nitrosylated Hba, induced by oxygenation. *Digest VSU, Series: Biology. Pharmacia*, 2010, no. 1, p. 56-61. (In Russ.)]
18. Hobbs A.I., Gladwin M.T., Patel R.P., Williams D.L.H., Butler A.R. Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or NO of the above. *TRENDS in Pharmacological Science*, 2002, vol. 23, p. 406-411.
19. Ramser K, Logg K, Goksör M, Enger J, Käll M, Hanstorp D. Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes. *J Biomed Opt.*, 2004, vol. 9, no. 3, pp. 593-600.
20. Podstawka E, Rajani C, Kincaid JR, Proniewicz LM. Resonance Raman studies of heme structural differences in subunits of deoxyhemoglobin. *Biopolymers*, 2000, vol. 57, no. 4, pp. 201-207.
21. Tsuneshige A, Imai K, Tyuma I. The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity. *J Biochem.*, 1987, vol. 101, no. 3, pp. 695-704.
22. Kirschner-Zilber I, Setter E, Shaklai N. Association of hemoglobin chains with the cell membrane as a cause of red cell distortion in thalassemia. *Biochem Med Metab Biol.*, 1987, vol. 38, no. 1, no. 19-31.

23. Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., Metodiev M.V., Cooper C.E. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 103, pp. 95-106.
24. Осипов А. Н., Борисенко Г. Г., Владимиров Ю. А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов. *Успехи биологической химии*, 2007, т. 47, с. 259-292. [Osipov A.N., Borisenko G.G., Vladimirov Yu. A. Biological role of nitrosyl complexes of hemoproteins. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2007, vol. 47, p. 259-292. (In Russ.)]
25. Giulivi C, Davies K.J. Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells. *Methods Enzymol.*, 1994, vol. 231, pp. 490-6.
26. Ansari F.A., Mahmood R. Sodium nitrite enhances generation of reactive oxygen species that decrease antioxidant power and inhibit plasma membrane redox system of human erythrocytes. *Cell Biol Int.*, 2016, vol. 40, no. 8, pp. 887-894.
27. Montenegro M.F., Pinheiro L.C., Amaral J.H., Marçal D.M., Palei A.C., Costa-Filho A.J., Tanus-Santos J.E. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 2012, vol. 385, no. 5, pp. 509-17.
28. Hogg N., Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.*, 1999, vol. 1411, no. 2-3, pp. 378-384.
29. Violi F., Marino R., Milite M.T., Loffredo L. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev.*, 1999, vol. 15, no. 4, pp. 283-288.
30. Шугалей И.В., Львов С.Н., Целинский И.В., Баев В.И. Влияние интоксикации нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы пероксидации в эритроцитах мыши. *Укр. биохим. журнал*, 1992, т. 64, вып. 2, с. 111-114. [Shugaley I.V., Lvov S.N., Tselinsky I.V., Baev V.I. Influence of sodium nitrite intoxication on the activity of antioxidant defense enzymes and peroxidation processes in mouse erythrocytes. *Ukr. biochem. Journal*, 1992, vol. 64, iss. 2, p. 111-114. (In Russ.)]
31. Титов В.Ю., Петренко М.Ю., *Взаимодействие нитрита с каталазой как важный элемент его токсичности. Биохимия*, 2003, т. 68, вып. 6, с. 769-777. [Titov V.Yu., Petrenko M.Yu., Interaction of nitrite with catalase as an important element of its toxicity. *Biochemistry*, 2003, vol. 68, iss. 6, pp. 769-777. (In Russ.)]
32. Titov V.Yu., Osipov A.N. Nitrite and nitroso compounds can serve as specific catalase inhibitors. *Redox Report*, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 91-97.
33. Rocha S., Gomes D., Lima M., Bronze-da-Rocha E., Santos-Silva A. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H₂O₂-induced oxidative stress. *Free Radic Res.*, 2015, vol. 49, no. 8, pp. 990-1003.
34. Asahi M., Fujii J., Suzuki K., Seo H.G., Kuzuya T., Hori M., Tada M., Fujii S., Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem.*, 1995, vol. 270, no. 36, pp. 21035-21039.
35. Гусейнова С.Я., Гулиева Р.Т., Дадашов М.З., Джафаров А.И., Яхьяева Ф.Р., Гусейнов Т.М. Окислительная модификация гемоглобина изолированных эритроцитов в инкубационной среде, содержащей нитрит натрия и селенит натрия. *Вестник Новосибирского государственного педагогического университета*, 2016, т. 5, № 33, с. 207-217. [Huseynova S.Ya., Guliyeva R.T., Dadashov M.Z., Jafarov A.I., Yakhyayeva F.R., Huseynov T.M. Oxidative modification of hemoglobin of isolated erythrocytes in incubation medium containing sodium nitrite and sodium selenite. *Bulletin of the Novosibirsk State Pedagogical University*, 2016, vol. 5, no. 33, pp. 207-217. (In Russ.)]

OXIDATIVE MODIFICATION OF ERYTHROCYTES MODERATELY DOSES OF SODIUM NITRITE *in vitro* TESTS**Huseynova S.Ya., Huseynov T.M., Dadashov M.Z.**

Institute of Biophysics, NAS of Azerbaijan

Z. Khalilov str., 117, Baku, AZ 1141, Azerbaijan; e-mail: thuseynov@physics.ab.az

Abstract. The work explored the influence of moderately chronic doses of NaNO₂ on the oxidative modification of Hb and RBC, changes the activity of catalase, glutathione peroxidase (GP) and the intensity of peroxide oxidation of lipids (LPO). Analysis of the spectral lines of Raman Spectroscopy shows that the ability of the Hb to bind O₂ I1580/I1548 in a suspension of erythrocytes treated with NaNO₂ is significantly higher than control and this effect directly depends on the concentration of NaNO₂ and significant even at the minimum concentrations of NaNO₂ (0,07 mm), and relative ability of Hb to give ligands I1375/I1580 is also dose dependent but in the opposite direction. Manifestations of symmetrical and asymmetrical vibrations of the pyrrole rings of Hb (I1375/I1172) increase with an increasing nitrite dose by ~ 14 %, which indicates the presence of conformational changes in the pyrrole rings associated with the oxidative modification of Hb. MetHb accumulation also dose-depend and reaches its maximum at 30-40 minutes, this is accompanied by the intensification of processes of LPO and the increasing share of membrane bound Hb. It is characteristic that the development of oxidative process is accompanied by a decrease in catalase activity and the activity of GP changes ambiguously and multiple grows with increased NaNO₂ contents. Noting these facts, we can say that the already relatively small concentrations of nitrite of sodium can affect the conformation of Hb, resulting in a change in his affinity for O₂. This stimulates oxidative modification of Hb, which is reflected in the increasing accumulation of methHb and loss of activities of catalase and GP, and at high concentrations of nitrite to increase the activity of GP.

Key words: erythrocytes, hemoglobin, catalase, glutathionperoxidase, LPO, sodium nitrite.

АМИНАЗИН МОДУЛИРУЕТ ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию: 26.06.2018

Аннотация. С использованием метода фиксации потенциала исследовали участие сигма-1 рецепторов в регуляции глютоксिमом транспорта Na^+ в коже лягушки. Показано, что обработка кожи лягушки антагонистом рецепторов сигма-1 аминазином подавляет стимулирующее влияние глютоксима на транспорт Na^+ . Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции глютоксिमом транспорта Na^+ в коже лягушки.

Ключевые слова: кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na^+ , глютоксим, аминазин.

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки [1]. Трансэпителиальный транспорт Na^+ представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса [2, 3].

Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется различными окисляющими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и препарат глютоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла; «ФАРМА – ВАРМ», Санкт-Петербург), приложенными к апикальной или базолатеральной поверхности кожи [4]. Обнаружено, что добавление этих окислителей со стороны апикальной поверхности кожи ингибирует транспорт Na^+ . В то же время, при добавлении агентов со стороны базолатеральной поверхности кожи, только цистин и цистамин сохраняли своё ингибирующее действие, тогда как GSSG и глютоксим имитировали действие инсулина и стимулировали трансэпителиальный транспорт Na^+ . В дальнейшем, с использованием широкого спектра фармакологических агентов, нами было впервые показано, что в регуляции глютоксिमом транспорта Na^+ в коже лягушки принимают участие различные структурные элементы клетки и компоненты многих сигнальных систем [5-10]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия глютоксима на транспорт Na^+ , во многом еще не ясны.

Ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). ENaC являются представителями обширного суперсемейства дегенерины/эпителиальные Na^+ -каналы (Deg/ENaC), объединяющего лиганд-управляемые Na^+ -проводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом. Deg/ENaC универсальны для всех многоклеточных организмов; экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях и участвуют в таких разнообразных процессах, как болевая чувствительность, механочувствительность и направленный перенос Na^+ [11, 12]. Несмотря на то, что представители суперсемейства Deg/ENaC функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией.

Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные как в плазматической мембране, так и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [13, 14]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [15]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [16]. Ранее нами было показано, что антагонисты рецепторов сигма-1 – нейролептики галоперидол и хлорпромазин (аминазин) подавляют транспорт Na^+ в коже лягушки [17]. В то же время известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейролептиков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глютоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 – нейролептик фенотиазинового ряда аминазин [18].

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга («World Precision Instruments, Inc.», Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в mM): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22-23 °C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик. Для измерения вольт-амперных

характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T .

Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} . В связи с этим, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ - каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ). Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 23,18 \pm 3,95$ мкА, $V_{OC} = -83,42 \pm 12,05$ мВ, $g_T = 0,30 \pm 0,13$ мСм. Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину, стимулирует транспорт Na^+ (рис.1, кривая 1). В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения глутоксима, I_{SC} возрос на $38,44 \pm 6,35$ %; V_{OC} – на $47,12 \pm 6,38$ %; величина g_T не изменилась.

Показано, что предварительная обработка кожи лягушки аминазином (100 мкг/мл) в течение 30 мин перед добавлением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл глутоксима, приводила к снижению стимулирующего влияния глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что степень ингибирующего действия аминазина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1). Так, изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл аминазина (по данным 10 экспериментов), было следующим: I_{SC} увеличился на $3,31 \pm 1,5$ или на $20,14 \pm 5,03$ %, V_{OC} увеличился на $5,31 \pm 1,23$ или на $18,34 \pm 3,13$ %, а g_T уменьшилась на $7,13 \pm 2,04$ или увеличилась на $4,85 \pm 1,76$ %, при преинкубации с аминазином с апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

(1) – I_{SC} после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл аминазина со стороны апикальной поверхности кожи; (3) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл аминазина со стороны базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). На рисунке представлены результаты типичных экспериментов.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, в последнее время появляются данные о том, что рецепторы сигма-1 модулируют активность ионных каналов различных типов, в том числе протон-активируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC. Обнаружено, что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs, с образованием комплекса со стехиометрией 1 сигма-1 рецептор/1 субъединица ASIC [19], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов сигма-1 рецепторов на ASICs, при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как гетеротримерные G- белки и комплекс кальцинеина с адаптерным белком AKAP150 [20]. Полученные нами данные о том, что ингибирующий эффект аминазина значительно более выражен при добавлении его со стороны апикальной поверхности кожи, позволяют предположить, что основные мишени для действия антагонистов рецепторов сигма-1 локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки.

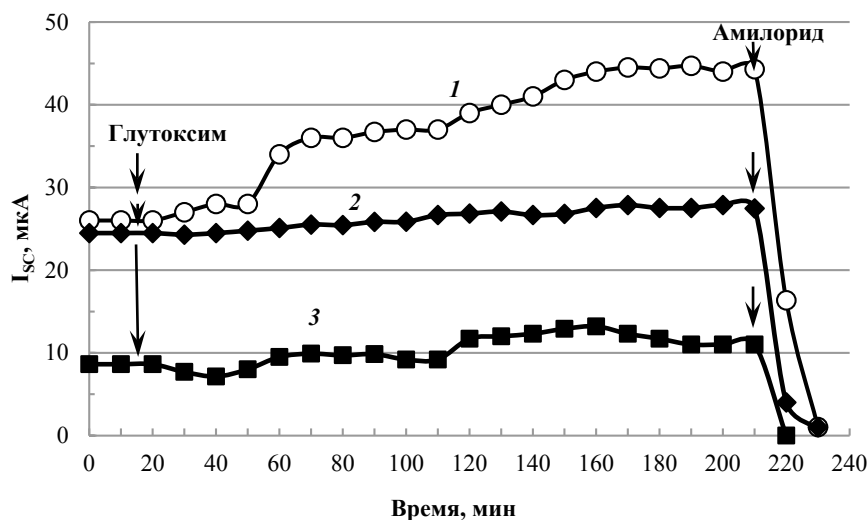


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и антагониста рецепторов сигма-1 аминазина

Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [2, 3]. Однако добавление в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ), вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1). Это свидетельствует о том, что влияние глутоксима на транспорт Na^+ обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами показано модулирующее влияние антагониста рецепторов сигма-1 аминазина на эффект глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Полученные данные свидетельствуют об участии рецепторов данного типа в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксимом в эпителии кожи лягушки, и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ . Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата глутоксим и нейролептика аминазина.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin, Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*. Leningrad: Nauka, 1982. 184 p.]
2. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
3. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
4. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide containing compounds on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Akad. Nauk*, 2008, vol. 421, no. 5, pp. 709-712.
5. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., Butov S.N. Involvement of tyrosine and phosphatidylinositol kinases in oxidized glutathione and glutoxim regulation of Na^+ transport in frog skin. *Cell and Tissue Biology*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279.
6. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin: the role of cytoskeleton. *Cell and Tissue Biology*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 248-253.
7. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Inhibitors of the cyclooxygenase oxidation pathway of arachidonic acid suppress the stimulating effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, vol. 451, no. 1, pp. 193-195.
8. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The inhibitors of Arp2/3 complex and WASP proteins modulate the effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2016, vol. 467, pp. 102-104.
9. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Lipoxigenases modulate the effect of glutoxim on Na^+ transport in the frog skin epithelium. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 474, pp. 193-195.
10. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Epoxigenase inhibitors attenuate the stimulatory effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2018, vol. 480, pp. 1-3.
11. Benos D.J., Stanton B.A. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol.*, 1999, vol. 520, pp. 631-644.
12. Kellenberger S., Schild L. Epithelial sodium channel/Degenerin family of ion channels: a variety of function for a shared structure. *Physiol. Rev.*, 2002, vol. 82, pp. 735-767.
13. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ R]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal. Trans.*, 2016, vol. 36, pp. 327-388.
14. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., Orringer J., Williams W., Bowen W.D. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 268, pp. 9-18.
15. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.
16. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, pp. 344-366.
17. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние нейролептиков на транспорт Na^+ в коже лягушки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2017*, Севастополь, 2017, т.1, с. 272-275. [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of neuroleptics on Na^+ transport in frog skin. *Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2017*, Sevastopol, 2017, vol. 1, pp. 272-275 (In Russ.)]
18. Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H. Binding of umespirone to the sigma receptor: evidence for multiple affinity states. *Neuropharmacol.*, 1990, vol. 29, pp. 181-184.
19. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., Jackson M.B., Edwardson J.M. Demonstration of a direct interaction between σ -1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys. J.*, 2010, vol.98, pp. 1182-1191.
20. Herrera Y., Katnik C., Rodriguez J.D., Hall A.A., Willing A., Pennypacker K.R., Cuevas J. Sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel a (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca^{2+} influx in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, vol. 327, pp. 491-502.

AMINAZINE MODULATES THE EFFECT OF IMMUNOMODULATOR GLUTOXIM
ON Na⁺ TRANSPORT IN FROG SKIN

Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G.

Saint-Petersburg State University,

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

Abstract. Using voltage-clamp technique, the involvement of sigma-1 receptors in the effect of glutoxim on Na⁺ transport in frog skin was investigated. We have shown that preincubation of the frog skin with sigma-1 receptor antagonist – aminazine – attenuates the stimulatory effect of glutoxim on Na⁺ transport. The results suggest the possible involvement of the sigma-1 receptors in glutoxim effect on Na⁺ transport in frog skin epithelium.

Key words: frog skin, transepithelial Na⁺ transport, glutoxim, aminazine.

2-АМИНОЭТОКСИДИФЕНИЛ БОРАТ МОДУЛИРУЕТ ДЕПО-ЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И.,
Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 26.06.2018

Аннотация. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что 2-аминоэтоксидифенил борат оказывает дозо-зависимое модулирующее влияние на депо-зависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. В концентрации 25 мкМ 2-аминоэтоксидифенил борат вызывает потенциацию входа Ca^{2+} , в то время как в концентрациях 50 и 100 мкМ эффективно подавляет вход Ca^{2+} в макрофаги.

Ключевые слова: 2-аминоэтоксидифенил борат, депо-зависимый вход Ca^{2+} , макрофаги.

Универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот является депо-зависимый, или “емкостной”, вход Ca^{2+} [1,2]. В соответствии с моделью “емкостного” входа Ca^{2+} , этот процесс регулируется степенью заполнения Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} [1, 2].

Функциональной единицей депо-зависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс (store-operated calcium influx complex, SOCIC), компоненты которого обладают высокой мобильностью, и взаимодействия между ними жестко регулируются [2, 3]. Основными компонентами комплекса, необходимыми и достаточными для активации депо-зависимого входа Ca^{2+} , являются Ca^{2+} -каналы Orai1 в плазмалемме и Ca^{2+} -сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+} -депо [2, 3]. При опустошении Ca^{2+} -депо, STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депо-зависимый вход Ca^{2+} [2, 3].

После обнаружения важной роли депо-зависимых Ca^{2+} -каналов в патогенезе тяжелых заболеваний человека, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит (severe combined immunodeficiency, SCID), назальный полипоз, ревматоидный артрит, эктодермальная дисплазия, тромбоз, острый панкреатит, аутоиммунные и аллергические заболевания [4], возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов, депо-зависимых Ca^{2+} -каналов.

Из различных фармакологических модуляторов депо-зависимых Ca^{2+} -каналов лучше других исследован 2-аминоэтоксидифенил борат (2-APB). 2-APB широко использовался в качестве инструмента исследования механизмов функционирования депо-зависимых Ca^{2+} -каналов [5, 6]. Показано, что 2-APB модулирует депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетках разных типов: в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [7], Т-клетках линии Jurkat человека, В-клетках цыпленка (линия DT40) и лейкоцитарных базофилах крысы (RBL-2H3) [8].

Учитывая важную роль депо-зависимых Ca^{2+} -каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние 2-APB на депо-зависимый вход Ca^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22 °С через 1-2 сут. после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны ранее [9]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [10]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [11].

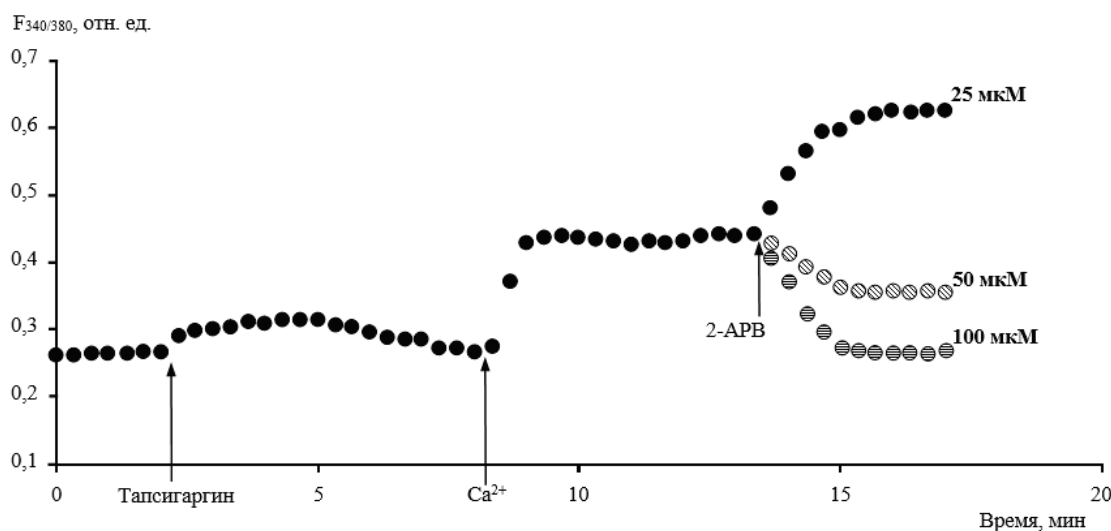


Рисунок 1. Влияние 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB) на вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином в макрофагах

В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0,5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 30 ± 8 нМ. При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депо-зависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 112 ± 21 нМ. Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ циклопязониковой кислоты (рис. 2). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой циклопязониковой кислотой, составило 31 ± 9 нМ, а во время входа Ca^{2+} - 99 ± 21 нМ (рис. 2).

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 2-APB на фоне развившегося депо-зависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, эффект 2-APB зависит от его концентрации. В концентрации 25 мкМ 2-APB вызывал значительную потенциацию входа Ca^{2+} (по данным 7 экспериментов на $105,2 \pm 25,3$ %). В то же время, добавление 2-APB в концентрации 50 или 100 мкМ приводило к подавлению депо-зависимого входа Ca^{2+} . По данным 7 экспериментов для каждой из концентраций 2-APB, подавление входа Ca^{2+} при действии 50 мкМ 2-APB составило $51,4 \pm 14,7$ %, а в концентрации 100 мкМ - $96 \pm 3,9$ %.

Аналогичные результаты мы получили при добавлении 2-APB на развившийся вход Ca^{2+} , индуцированный циклопязониковой кислотой. При воздействии 25 мкМ 2-APB наблюдалась потенциация входа Ca^{2+} на $116,3 \pm 23,7$ %. При приложении 50 мкМ 2-APB происходило подавление входа Ca^{2+} на $56,5 \pm 15,3$ %, а при действии 100 мкМ 2-APB - на $97,1 \pm 2,8$ %.

Здесь и на рисунке 2. по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время.

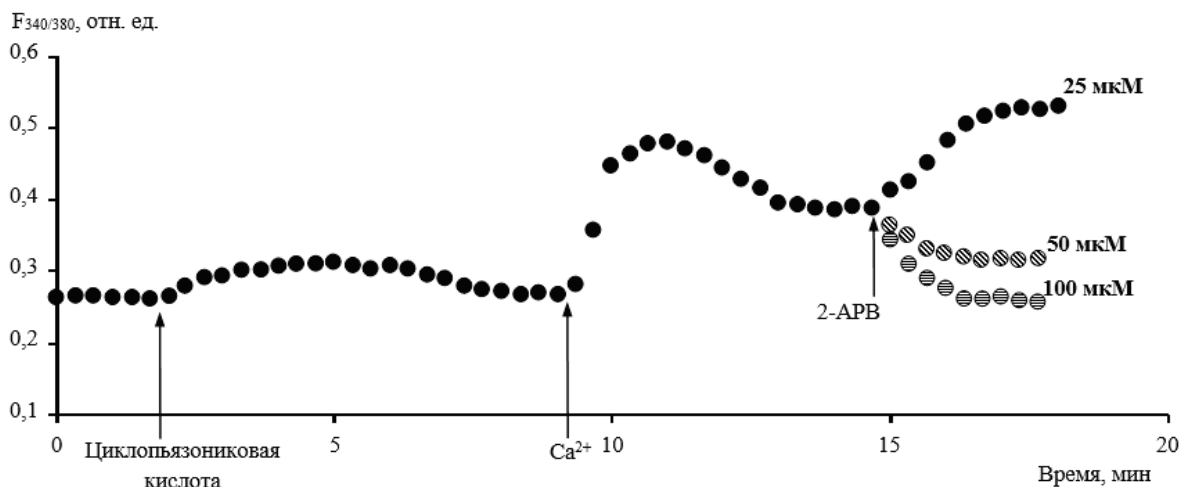


Рисунок 2. Влияние 2-аминоэтоксидифенил бората (2-APB) на вход Ca^{2+} , индуцируемый циклопязониковой кислотой в макрофагах

Макрофаги стимулировали 0,5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 25, 50 или 100 мкМ 2-аминоэтоксидифенил бората (2-АРВ).

Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов.

Макрофаги стимулировали 10 мкМ циклопязоникой кислоты в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 25, 50 или 100 мкМ 2-аминоэтоксидифенил бората (2-АРВ).

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, на макрофагах из костного мозга мыши обнаружено, что 50 мкМ 2-АРВ практически полностью подавляет депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином [12]. Дозо-зависимое модулирующее влияние 2-АРВ на депо-зависимый вход Ca^{2+} показано также на клетках различных типов: клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [7], Т-клетках линии Jurkat человека, В-клетках цыпленка (линия DT40) и лейкоэмических базофилах крысы (RBL-2H3) [8]. В низких концентрациях (<30 мкМ) 2-АРВ потенцирует, в то время как в более высоких концентрациях практически полностью подавляет депо-зависимый вход Ca^{2+} . Полагают, что в низких концентрациях 2-АРВ потенцирует депо-зависимый вход Ca^{2+} путем прямого расширения (dilating) поры открытых Orai1 каналов [13, 14]. При этом диаметр поры Orai1 каналов увеличивается с 3,8 до 4,6 Å. Ингибирование входа Ca^{2+} при действии высоких концентраций 2-АРВ можно объяснить нарушением взаимодействия между STIM1 и Orai1 [15].

Таким образом, нами впервые на перитонеальных макрофагах крысы показано, что 2-АРВ дозо-зависимо активирует и ингибирует депо-зависимый вход Ca^{2+} . Это комплексное действие 2-АРВ на депо-зависимый вход Ca^{2+} может быть связано с его влиянием на оба компонента мультибелкового комплекса депо-зависимого входа Ca^{2+} , на белки STIM1 и Orai1. Полученные данные свидетельствуют также о том, что 2-АРВ является удобным фармакологическим инструментом для изучения депо-зависимого входа Ca^{2+} .

Список литературы / References:

1. Putney J. W. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990. vol. 11, pp. 611-624.
2. Prakriya M., Lewis R.S. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2015, vol. 95, pp. 1383-1436.
3. Vaca L. SOCIC: the store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium*, 2010, vol. 47, pp. 199-209.
4. Lacruz R.S., Feske S. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2015, vol. 1356, pp. 45-79.
5. Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Roderick H.L., Berridge M.J., Peppiatt C.M. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release. *FASEB J.*, 2002, vol. 16, pp. 1145-1150.
6. Putney J.W. Pharmacology of store-operated calcium channels. *Mol. Interventions*, 2010, vol. 10, pp. 209-218.
7. De Haven W.I., Smyth J.T., Boyles R.R., Bird G.S., Putney J.W. Complex actions of 2-aminoethoxydiphenyl borate on store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, pp. 19265-19273.
8. Prakriya M., Lewis R.S. Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP_3 receptors. *J. Physiol.*, 2001, vol. 536. 1, pp. 3-19.
9. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Антонов В.Г. Arp 2/3-комплекс участвует в действии глутоксида и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. *Биофизика*, 2014, т. 59, вып. 5, с. 907-912. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. Arp2/3-complex is involved in the effect of glutoxim and molixan on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. *Biophysica*, 2014, vol. 59, pp. 907-912. (In Russ.)]
10. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
11. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566.
12. Vaeth M., Zee I., Concepcion A.R., Maus M., Shaw P., Portal-Celhay C., Zahra A., Kozhaya L., Weidinger C., Philips J., Unutmaz D., Feske S. Ca^{2+} -signaling but not store-operated Ca^{2+} entry is required for the function of macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.*, 201, vol. 195, pp. 1202-1217.
13. Xu X., Ali Sh., Li Y., Yu H., Zhang M., Lu J., Xu T. 2-aminoethoxydiphenyl borate potentiates CRAC current by directly dilating the pore of open Orai 1. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, p. 29304.
14. Ali Sh., Xu T., Xu X. CRAC channel gating and its modulation by STIM 1 and 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J. Physiol.*, 2017, vol. 595, no. 10, pp. 3085-3095.
15. Peinelt C., Lis A., Beck A., Fleig A., Penner R. 2-aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM 1-dependent gating of CRAC channels. *J. Physiol.*, 2008, vol. 586, pp. 3061-3073.

2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE MODULATES STORE-DEPENDENT Ca^{2+} ENTRY IN MACROPHAGES

**Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I.,
Antonov V.G.**

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: cozy@mail.ru

Abstract. Using Fura-2AM microfluorimetry, it was shown for that 2-aminoethoxydiphenyl borate modulates store-dependent Ca^{2+} entry in dose-dependent manner. At concentration of 25 μM 2-aminoethoxydiphenyl borate potentiates Ca^{2+} entry, while at concentrations of 50 and 100 μM it effectively inhibits store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages.

Key words: 2-aminoethoxydiphenyl borate, store-dependent Ca^{2+} entry, macrophages.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ АЛЮМИНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЛИЗОЦИМА

Скоробогатова А.С., Венская Е.И., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»
ул. Академическая, 27, г. Минск, 20072, РБ; e-mail: sas.alesya@gmail.com
Поступила в редакцию: 26.06.2018

Аннотация. Изучено влияние ионов алюминия в концентрации 100 мкМ на рост амилоидных структур из лизоцима. При использовании флуоресцентного зонда тиофлавина было обнаружено, что добавление ионов алюминия в среду роста амилоидных фибрилл из лизоцима вызывает увеличение интенсивности флуоресценции используемого зонда, что говорит о более высокой скорости образования амилоидных фибрилл при добавлении ионов металла. При этом использование другого флуоресцентного зонда – 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС) не позволило обнаружить структурных различий амилоидных фибрилл с и без хлорида алюминия в среде инкубации. Также нами была изучена собственная тирозиновая и триптофановая флуоресценция амилоидных фибрилл на основе лизоцима и их комплекса с ионами алюминия. Показано, что добавление в среду роста амилоидных фибрилл 100 мМ хлорида алюминия приводит к снижению интенсивности собственной флуоресценции по сравнению с амилоидными фибриллами, полученными только на основе лизоцима.

Ключевые слова: амилоидные структуры, лизоцим, хлорид алюминия, флуоресцентные зонды.

Амилоиды – это неразветвленные белковые нити, структура которых состоит из β -складчатых тяжей неопределенной длины. Таким образом, амилоиды состоят из расположенных в определенном порядке большого количества копий (обычно тысячей) пептида или белка. Амилоидные структуры легко идентифицируются с помощью электронной микроскопии как длинные неразветвленные нити диаметром 6-12 нм. Повторяющиеся поперечные β -сшивки обеспечивают характерный рисунок при двумерной рентгеновской дифракции. Предполагается, что способность формировать высокоорганизованные структуры такого типа характерна не только для пептидов, связанных с развитием различных заболеваний, но является генетически обусловленным качеством всех полипептидных цепей. На сегодняшний день уже не вызывает сомнений медицинская значимость амилоидных структур как патогенов, некоторые из которых также обладают инфекционными свойствами. Однако несмотря на то, что изучение амилоидных белков первоначально связано с исследованием патологий человека, в 2000-х гг. было доказано, что организм продуцирует некоторые амилоиды в норме и они определяют некоторые физиологические функции в различных организмах. Сейчас известно, что более 30 амилоидов человека ассоциированы с различными патологиями. Показано, что отложение амилоидных фибрилл является характерной чертой развития ряда заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА) [1].

В экспериментах на животных было установлено, что введение наноалюминия стимулирует синтез β -амилоидных белков, повышая активность генов предшественника амилоидного белка (APP), а также β -секретазы BACE1. Алюминий – хорошо известный нейротоксин, во многих исследованиях обсуждается его возможная связь с развитием нейродегенеративных патологий. Точные этиологические факторы возникновения этой патологии не известны, но гипотезы о ее развитии включают совокупное действие генетических факторов, травм головы, окислительного стресса, инфекционных агентов и факторов окружающей среды [2].

Известно, что собственные физико-химические характеристики (гидрофобность и заряд) влияют на способность пептидов образовывать как амилоидные фибриллы, так и потенциально более токсичные олигомерные комплексы. Более того было показано, что существует значительная корреляция между способностью белка образовывать агрегаты, и цитотоксичностью полученных структур. Амилоиды, образованные из различных белков, имеют ряд общих свойств. Так обнаружено, что в префибриллярных агрегатах различных полипептидов содержатся эпитопы, характеризующиеся общим строением, что говорит о возможности существования общих черт в механизмах агрегации различных белковых последовательностей [3]. Это дает возможность предположить, что, несмотря на отличие белков-предшественников, полученные из различных белков амилоидные фибриллы, являются сходными по структуре и физико-химическим показателям, что позволяет использовать один из амилоидогенных белков для получения модельных амилоидных фибрилл при изучении их свойств и механизмов действия. Часто в качестве модельного предшественника амилоидов используют лизоцим, который *in vitro* образует амилоидные фибриллы при определенных условиях.

Гидроксид и карбонат алюминия широко используется для связывания фосфатов у больных с хронической почечной недостаточностью, находящихся на длительном диализе, чтобы избежать гиперфосфатемии. Однако введение больших доз хелаторов фосфатов, содержащих алюминий, в течение долгого периода приводит к накоплению в организме алюминия и проявлению его токсических эффектов [4]. Показано, что у 25-30 % больных почечной недостаточностью, находящихся на длительном диализе, возникают анемии, остеопороз и

патологии, сходные по симптомам с БА. Удаление алюминия из диализных растворов или использование хелаторов алюминия приводило к реверсии симптомов, что указывает на него как причину развития патологического состояния.

Принято считать, что гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является препятствием для проникновения металлов в мозг. Однако, вероятнее всего, алюминий проникает в мозг напрямую через ГЭБ с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза через белок-переносчик железа или его поврежденные структуры и накапливается в глиальных и нейрональных клетках [5]. Известно, что ГЭБ обладает системой защиты мозга от накопления ионов алюминия, которая реализуется в активном выведении катионов посредством монокарбоксилатных транспортеров [6], но эта система не срабатывает при накоплении алюминия в крови свыше 2 нг/г [7].

Обнаружено, что в результате накопления алюминия в тканях головного мозга может развиваться энцефалопатия [8]. Период полувыведения алюминия из клеток мозга человека составляет 7 лет, что приводит к нарушению аксонального транспорта и функций нейрофиламентов. Некоторые авторы полагают, что именно это играет ключевую роль в образовании нейрофибрильных сплетений подобных тем, которые образуются при развитии БА [9]. Кроме того, благодаря своим проокислительным свойствам алюминий способен нарушать физические параметры мембраны нейронов, воздействуя на работу потенциал-активируемых ионных каналов или секрецию трансммиттера [10]. Было обнаружено, что ионы алюминия способны влиять на процесс связывания кальция с кальмодулином в клетках мозга, что приводит к повышению уровня свободного кальция в цитозоле [11].

Так как транспорт амилоидных структур и ионов алюминия в организме человека осуществляется кровью, то существует вероятность образования комплексов амилоидные фибриллы-ионы алюминия. При этом, несмотря на то, что в последнее время достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов развития болезни Альцгеймера, до сих пор остается не выясненной роль взаимосвязи амилоидных фибрилл и ионов алюминия в патогенезе этого заболевания.

Целью нашей работы было изучить влияние ионов алюминия на основные спектрально-флуоресцентные характеристики амилоидов на основе лизоцима в процессе их образования.

Амилоидные структуры получали из лизоцима куриного яйца. Для получения комплекса амилоидных структур и ионов алюминия использовали хлорид алюминия в конечной концентрации 100 мкМ. Образование амилоидов двух видов проходило в одинаковых условиях: использовали 0,1 М раствор HCl pH 2,0, лизоцим куриного яйца в концентрации 5 мг/мл. Фибрилляцию белковых олигомеров стимулировали воздействием температуры (60 °C) при постоянном перемешивании в течение 6 суток. Контроль за процессом образования амилоидов из лизоцима осуществляли ежедневно флуоресцентным методом с использованием зонда 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС) и тиафлавина Т (ThT), которые широко используются в качестве маркеров образования амилоидных β -слоев [12].

Флуоресцентные исследования проводились на спектрофлуориметре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь). Спектр флуоресценции тирозина в амилоидах оценивали в диапазоне 290-380 нм с длиной волны возбуждения 270 нм; спектр флуоресценции триптофана в амилоидах оценивали в диапазоне 310-400 нм с длиной волны возбуждения 290 нм [13].

Кинетика образования фибрилл может быть описана как процесс нуклеации, состоящий из трех главных шагов: нуклеация, рост фибрилл и фаза покоя. Нуклеация происходит при связывании нескольких белковых мономеров в организованные структуры – ядра, выступающие в роли предшественника для образования фибрилл. Лаг-фаза кинетики фибрилляции связана с необходимостью времени для формирования ядер. Последовательное добавление мономеров к ядру удлиняет их до состояния фибрилл. Добавление уже готовых ядер уменьшает длительность лаг-фазы [14]. Известно, что амилоидные фибриллы принимают характерную трехмерную структуру в зависимости от их индивидуальной аминокислотной последовательности, но общим признаком упаковки всех белков является то, что гидрофобные остатки находятся внутри тела упакованной молекулы.

Процесс образования амилоидных агрегатов оценивали по изменению интенсивности флуоресценции зонда тиафлавина Т. Как упоминалось выше, данный флуоресцентный зонд используется для оценки формирования поперечно складчатого β -слоя в амилоидных фибриллах. Предполагается, что образование амилоидных фибрилл начинается с образования в растворе белковых олигомерных ядер, которые затем формируют комплексы в виде длинных нитей.

Изучение формирования амилоидных фибрилл, состоящих только из лизоцима, показало, что образование белковых агрегатов проходило постепенно, с ростом интенсивности уже на 2 сутки инкубации, общее время роста составило около 6 суток, что видно по выходу интенсивности флуоресценции тиафлавина Т на плато к 6 суткам инкубации (рис. 1А).

Добавление 100 мкМ хлорида алюминия в среду инкубации амилоидных фибрилл на основе лизоцима привело к пролонгированию лаг-фазы, т.е. рост интенсивности флуоресценции зонда наблюдался на 3 сутки.

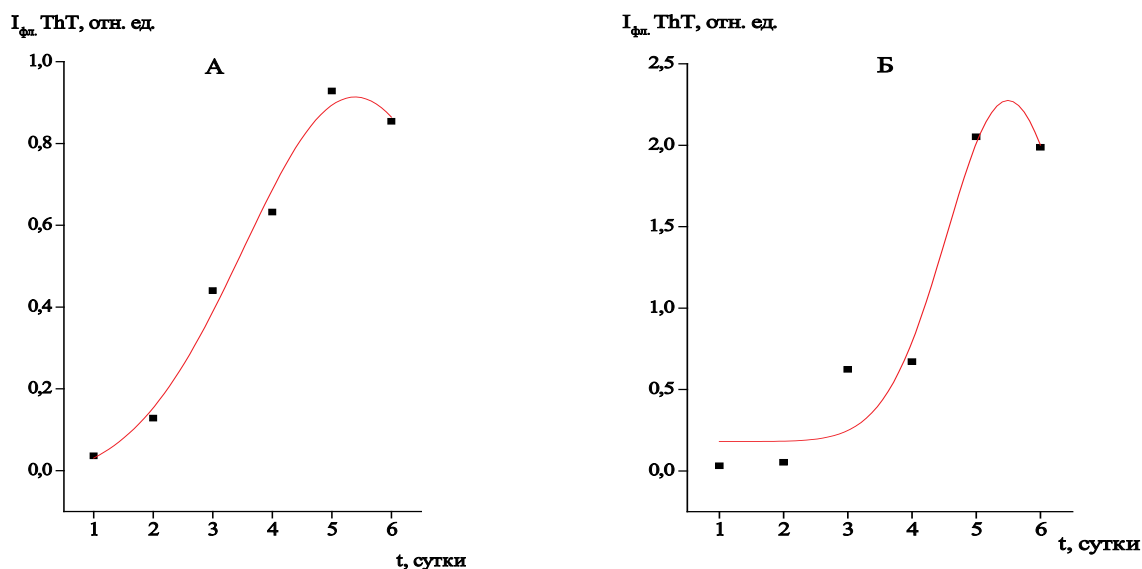


Рисунок 1. Изменение интенсивности флуоресценции тιοфлавина Т (ThT) в зависимости от времени инкубации раствора лизоцима (А) и раствора лизоцима с хлоридом алюминия в концентрации 100 μМ (Б)

При этом общее время образования амилоидных фибрилл осталось неизменным, так как максимальный рост интенсивности флуоресценции используемого зонда также наблюдался на 6-е сутки инкубации. Однако стоит отметить, что конечное значение интенсивности флуоресценции тιοфлавина Т было значительно выше (примерно в 2 раза) в растворе амилоидных фибрилл, содержащих 100 мкМ ионов алюминия (рис. 1Б). Полученные нами данные согласуются с результатами, полученными при изучении воздействия ионов алюминия на рост амилоидных фибрилл на основе пептида Аβ40 [13]. Авторы считают, что эффект ингибирования лаг-фазы роста амилоидов может быть связан с низким значением рН.

Воздействие ионов алюминия на структуру амилоидных фибрилл нами было изучено с помощью флуоресцентного зонда АНС и по изменению собственной флуоресценции остатков тирозина и триптофана в лизоциме. Известно, что квантовый выход флуоресценции АНС зависит от полярности его окружения и увеличивается при связывании в гидрофобных средах [12].

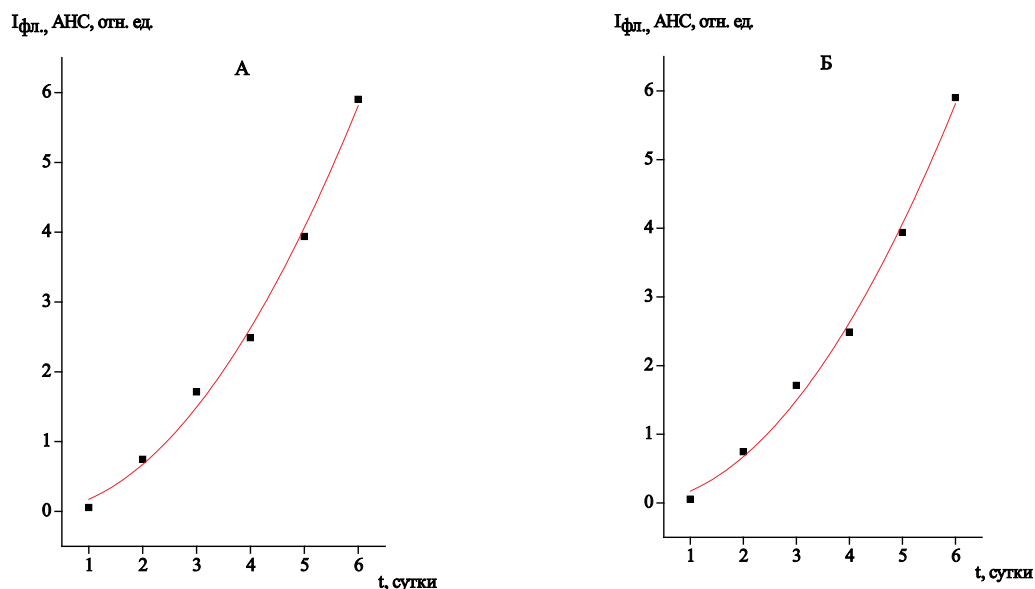


Рисунок 2. Изменение интенсивности флуоресценции АНС в зависимости от времени инкубации раствора лизоцима (А) и раствора лизоцима с хлоридом алюминия в концентрации 100 мкМ (Б)

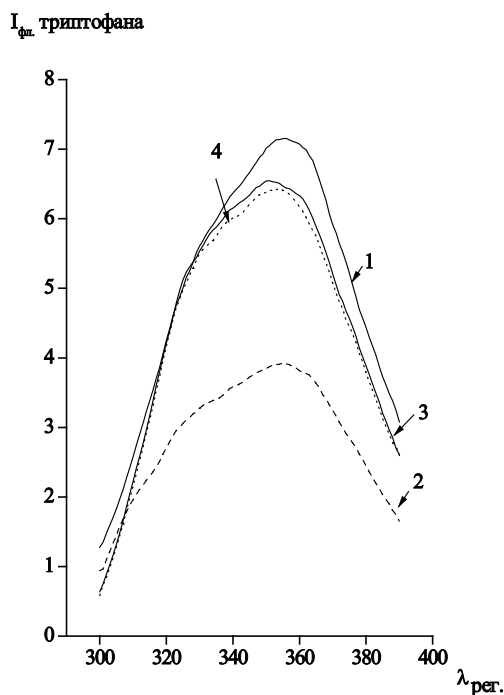


Рисунок 3. Спектры триптофановой флуоресценции в зависимости от состава амилоидных фибрилл.

1 – амилоидные фибриллы на основе лизоцима куриного яйца

2 – амилоидные фибриллы на основе лизоцима куриного яйца, образованные в присутствии 100 μM AlCl_3

3 – раствор лизоцима

4 – раствор лизоцима + 100 μM AlCl_3

В наших экспериментах наблюдался рост интенсивности флуоресценции АНС в растворе лизоцима в зависимости от времени инкубации (рис. 2). Сравнение результатов, полученных при инкубации лизоцима в присутствии ионов алюминия и в их отсутствии не выявило значительных отличий в интенсивности флуоресценции используемого зонда. Полученные данные демонстрируют, что добавление ионов алюминия в среду роста амилоидных структур не вызывает значимых изменений структуры получаемых фибрилл по сравнению с амилоидами, полученными только из лизоцима.

При изучении собственной флуоресценции амилоидов нами было установлено, что добавление ионов алюминия в конечной концентрации 100 μM в среду инкубации амилоидных фибрилл на основе лизоцима приводит к снижению интенсивности как триптофановой, так и тирозиновой флуоресценции по сравнению с амилоидными фибриллами, полученными только из раствора лизоцима, а также по сравнению с контрольным раствором лизоцима (рис. 3).

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что ионы алюминия стимулируют фибрилляцию белковых нитей лизоцима, а также приводят к появлению локальных изменений структуры белковой молекулы.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ), грант Б17М-098.

Список литературы / References:

1. Woodard D., Bell D., Tipton D., Durrance S., Cole L., Li B., Xu S. Gel formation in protein amyloid aggregation: A physical mechanism for cytotoxicity. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 4, pp. 1-8.
2. Zawilla N.H., Taha F.M., Kishk N.A., Farahat S.A., Farghaly M., Hussein M. Occupational exposure to aluminum and its amyloidogenic link with cognitive functions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, no. 139, pp. 57-64.
3. Kaye R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003, vol. 300, pp. 486-489.
4. Hosokawa S., Nishitani H., Nishio T., Imai T., Tomita Y., Tomoyoshi T., Sawanishi K., Yoshida O. Aluminum transport and Dialysance during Haemodialysis. *International Urology and Nephrology*, 1988, vol. 20, no. 1, pp. 89-100.
5. Aremu D.A., Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Res.*, 2005, vol. 1031, pp. 284-296.
6. Yokel R.A., Rhineheimer S.S., Sharma P., Elmore D., McNamara P.J. Entry, half-life and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single (26) Al exposure. *Toxicol. Sci.*, 2001, vol. 64, pp. 77-82.

7. Andr  si E., P  li N., Moln  r Z., K  sel S. Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *J. Alzheimers Dis.*, 2005, vol. 7, pp. 273-284.
8. Yokel A.R., Golub M.S. *Research issues in aluminum toxicity*. Washington, DC: Taylor and Francis, 1997, 116 p.
9. Sanei H., Goodarzi F., Flier-Keller E.V. Historical variation of elements with respect to different geochemical fractions in recent sediments from Pigeon Lake, Alberta, Canada. *J. Environ. Monit.*, 2001, vol. 3, pp. 27-36.
10. L  vesque L., Mizzen C.A., McLachlan D.R., Fraser P.E. Ligand specific effects on aluminum incorporation and toxicity in neurons and astrocytes. *Brain Res.*, 2000, vol. 877, pp. 191-202.
11. Zaf  r T.A., Uppal A. Aluminum intake and it's toxic effects on health. *International J. of Agriculture and Biology*, 1999, vol. 1-3, pp. 188-191.
12. Bolognsi B., Kumita J.R., Barros T.P., Esbj  rner E.K., Luheshi L.M., Crowther D.C., Wilson M.R., Dobson C.D., Favrin G., Yerbury J.J. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chemical biology*, 2010, vol. 5, no 8, pp. 735-740.
13. Chen W-T., Liao Y-H., Yu H-M., Cheng I.H., Chen Y.R. Distinct effects of Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ and Al³⁺ on amyloid-   stability, oligomerization and aggregation: Amyloid-   destabilization promotes annular protofibril formation. *The journal of biological chemistry*, 2011, vol. 286, pp. 9646-9656.
14. Morozova-Roche L.A., Zurdo J., Spencer A., Noppe W., Receveur V., Archer D.B., Joniau M., Dobson C.M. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. *Journal of Structural Biology*, 2000, no. 130, pp. 339-351.

ALUMINUM IONS INFLUENCE ON CHANGES OF SPECTRAL AND FLUORESCENT PROPERTIES OF AMYLOID FIBRILLS FROM LYSOZYME

Skarabaha  ta A.S., Venskaya E.I., Zubritskaya G.P., Lukyanenko L.M., Slobozhanina E.I.

Institute biophysics and cell engineering of NAS of Belarus,
Akademicheskaya str., 27, Minsk, Belarus; e-mail: sas.alesya@gmail.com

Abstract. Influence of 100   M aluminum ions on amyloids fibril growth from lysozyme was studied. Using fluorescent probe thioflavin T it was shown that addition aluminum ions to growth medium of amyloid fibrils from lysozyme leads to increasing fluorescent intensity of applied probe. This suggests that aluminum ions stimulate formation of amyloid fibrils. However, applying another fluorescent probe - 1-anilinonaphthalene 8-sulfonate (ANS) we couldn't find structural differences between amyloid fibril with and without aluminum chloride in the environment. Also we studied own fluorescent of tyrosine and tryptophan of amyloid fibrils from lysozyme and their complexes with aluminum ions. It was shown that 100   M aluminum ions lead to decreasing intrinsic fluorescence in compare with amyloid fibrils only from lysozyme.

Key words: amyloid structures, lysozyme, aluminum chloride, fluorescent probes.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАЗОМЕДИАТОРАМИ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Петрова И.В.¹, Бирулина Ю.Г.¹, Трубачева О.А.², Шефер Е.А.¹, Розенбаум Ю.А.¹,
Тесля Е.С.¹, Овчинникова А.С.¹

¹Сибирский государственный медицинский университет
Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: ivpetrova57@yandex.ru

²НИИ кардиологии Томского НИМЦ
ул. Киевская, 111А, г. Томск, 634012, РФ
Поступила в редакцию: 27.06.2018

Аннотация. Мы установили, что монооксид азота (NO) и сероводород (H₂S) оказывают модулирующее действие на Ca²⁺-зависимые калиевые каналы мембраны эритроцитов. Это приводит к изменению амплитуды гиперполяризации мембраны, вызванной кальциевым ионофором или редокс-агентами. Эффекты NO и H₂S зависят от способа активации исследуемых каналов. Влияние NO и H₂S на исследуемые каналы может быть опосредовано модификацией SH-групп белков ионного канала или белков, регулирующих его проводимость, в частности, входящих в состав электронно-транспортной цепи мембраны эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, кальций-зависимые калиевые каналы, газовые посредники.

NO, H₂S и CO образуют новую группу внутри- и межклеточных посредников, выполняющих разнообразные регуляторные функции. Некоторые исследователи относят их к особой группе газомедиаторов [1]. Все газы имеют собственные ферменты синтеза, экспрессирующиеся тканеспецифично; синтез газов регулируется как кратковременно в ответ на увеличение концентрации кальция в клетке, так и на уровне экспрессии ферментов. Несмотря на сходство их свойств, газы имеют специфические физиологические эффекты и собственные мишени действия в различных тканях. Влияние газов может опосредоваться как непосредственным взаимодействием и модификацией белковых субъединиц ионтранспортных систем, так и изменением активности систем внутриклеточных мессенджеров. Преимуществом газов перед другими посредниками является малое время жизни и высокая скорость диффузии, что позволяет им инициировать быстрые и кратковременные эффекты. Кроме того, липофильность позволяет молекулам газам проникать в мембраны, где они могут, воздействуя на структуру мембраносвязанных белков, в частности, ионных каналов или обменников, изменять их функции.

Эритроциты не являются исключением среди клеток, функции которых контролируются газовыми посредниками. Так, показано, что оксид азота оказывает воздействие на деформируемость эритроцитов [2], а также препятствует программированной гибели красных клеток крови [3].

Установлено, что ион-транспортной системой, участвующей в регуляции деформируемости эритроцитов [4], а также обеспечивающей эриптоз [5], являются кальций-зависимые калиевые каналы (K(Ca)каналы) промежуточной проводимости, обнаруженные в мембране красных клеток крови несколько десятилетий назад. Открывание K(Ca)каналов обеспечивает выходящий поток ионов калия и приводит к гиперполяризации мембраны эритроцитов, что рассматривается как начальный этап программируемой гибели красных клеток крови [5]. Стимуляция K(Ca)каналов может осуществляться двояким образом: либо при увеличении входящего потока ионов кальция, либо при активизации электронно-транспортной цепи, некоторые фрагменты которой находятся в мембране эритроцитов [6].

Несмотря на интенсивные исследования физиологических эффектов газообразных посредников, молекулярные механизмы действия газов в клетках изучены недостаточно, это, в частности, касается роли газомедиаторов в регуляции ион-транспортной функции мембраны эритроцитов.

Целью настоящей работы является изучение влияния доноров оксида азота и сероводорода на Ca²⁺-зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовалась венозная кровь 25 здоровых добровольцев в возрасте 20-27 лет. Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови).

Процедура получения упакованных эритроцитов: после центрифугирования (1000 g, 5 мин, 4 °C) плазму и клетки белой крови удаляли, а осадок эритроцитов дважды промывали тремя частями изотонического раствора NaCl (150 mM), содержащего 5 mM Na-фосфатного буфера (pH 7,4), при тех же условиях центрифугирования. Последний раз осадок эритроцитов промывали средой, содержащей 150 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM глюкозы, при тех же условиях центрифугирования. После этого упакованные эритроциты переносили на лед и хранили не более 12 ч.

Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в присутствии Ca²⁺ ионофора (A23187) или искусственной электронно-донорной системы аскорбат – феназинметосульфат (ФМС) использовался метод [7], основанный на том, что при наличии протонофора (карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон) (CI-CCP) в

среде инкубации распределение протонов зависит от мембранного потенциала E_m , как $E_m = RT/F \cdot (pH_i - pH_o)$, где pH_i и pH_o – значения pH цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации (в наших условиях она примерно в 100 раз меньше буферной емкости цитоплазмы) изменениями pH_i можно было пренебречь, а его квазистационарный уровень определялся при гемолизе клеток в присутствии детергента.

Эксперименты проводились по следующему плану. Для получения A23187-зависимого гиперполяризационного ответа (ГО) к 4,75 мл среды инкубации (150 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM глюкозы), добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °C и перемешивании добавляли 20 мкМ протонофора Cl-CCP, еще через 2 мин добавляли 0,5 мкМ Ca²⁺-ионофора A23187.

Для получения редокс-зависимого ГО к 4,75 мл среды инкубации того же состава, но содержащей 10 mM аскорбата натрия добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37 °C и перемешивании добавляли 20 мкМ протонофора Cl-CCP, через 2 мин добавляли 0,1 mM ФМС.

Для исследования влияния монооксида азота, сероводорода на амплитуду A23187- или редокс-зависимого гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов в среду инкубации добавляли донор NO - нитропруссид натрия (НН) или донор сероводорода гидросульфид натрия (NaHS) в различных концентрациях (указаны в соответствующих сериях экспериментов).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS Statistics 17.0.1 for Windows. Достоверность различий определяли непараметрическими критериями: U-критерий Манна-Уитни (U test Mann-Whitney) для независимых и Т-критерий Вилкоксона (Wilcoxon Signed Ranks Test) для зависимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стимуляция K(Ca)-каналов эритроцитов в условиях эксперимента может осуществляться в присутствии либо Ca²⁺-ионофора A23187, либо экзогенных доноров электронов (например, системы аскорбат – феназинметосульфат) [7,6]. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ благодаря кальциевому ионофору A23187, как и добавление электронно-донорной системы аскорбат – ФМС приводит к сходным изменениям мембранного потенциала эритроцитов, что находит свое отражение в формировании так называемого гиперполяризационного ответа (ГО). Амплитуда ГО является интегральной характеристикой, отражающей активность K(Ca)-каналов эритроцитов.

Для изучения влияния оксида азота в экспериментальной практике широко используются нитросоединения – доноры NO. В первой серии экспериментов изучалось влияние донора NO нитропруссида натрия на амплитуду A23187- и редокс-стимулированного ГО эритроцитов. Для этого к среде инкубации эритроцитов добавляли 5, 10, 50, 100, 500 или 1000 нМ нитропруссида натрия.

Добавление нитропруссида натрия в избранных концентрациях приводило к значительному снижению амплитуды A23187-стимулированного ГО. При этом максимальное снижение амплитуды ГО мембраны эритроцитов наблюдалось уже при низких концентрациях нитропруссида натрия в среде инкубации, и дальнейший рост концентрации этого агента не приводил к изменению исследуемого параметра (табл. 1).

Характер изменения амплитуды редокс-стимулированного ГО при использованных концентрациях носил другой характер. Так, присутствие 5 нМ и 10 нМ нитропруссида натрия в среде инкубации эритроцитов вызывало достоверное увеличение амплитуды редокс-стимулированного ГО эритроцитов (табл. 1). При дальнейшем увеличении концентрации НН (50 - 500 нМ) амплитуда ГО приближалась к контрольным значениям, и лишь при максимальной среди использованных нами концентраций нитропруссида натрия амплитуда ГО снижалась (табл. 1).

Таким образом, эффекты нитропруссида натрия оказались неодинаковыми при разных способах стимуляции K(Ca)каналов.

Следует отметить, что в литературе не существует единой точки зрения относительно донорной способности НН. Согласно [8], НН спонтанно освобождает оксид азота, который, легко проникая внутрь клеток, оказывает свое регуляторное действие. Но существует и другая точка зрения, согласно которой НН подвергается изменениям благодаря мембранносвязанной НАДН-дегидрогеназе [9], присутствующей в мембране эритроцитов [10]. Кроме того, нельзя исключить, что НН освобождает не только NO, но и ионы ферроцианида и феррицианида, которые могут модулировать процесс переноса электронов посредством фрагментов электронно-транспортной цепи (НАДН-дегидрогеназа, цитохром c), присутствующие в мембране эритроцитов [10]. В работе [11] показано, что компоненты этой цепи вмешиваются в регуляцию Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости эритроцитов.

Таблица 1. Влияние нитропруссида натрия (НН) на амплитуду A23187- и редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа эритроцитов

Концентрация НН, нМ	5	10	50	100	500	1000
Способ получения ГО						
A23187	93,15 ± 2,67*	92,26 ± 4,06*	92,11 ± 3,32*	88,18 ± 2,89*	89,39 ± 4,02*	86,95 ± 149*
Редокс-система	107,8 ± 8,5*	104,22 ± 7,23*	97,43 ± 4,54	97,92 ± 4,29	96,83 ± 5,87	91,42 ± 3,69*

Примечание: За 100 % приняты значения параметров в отсутствие нитропруссида натрия.

* – амплитуда ГО достоверно отличается от полученного в отсутствие нитропруссида натрия (n = 8, p < 0,05).

Возможно, обнаруженные эффекты НН на К(Са)каналы эритроцитов обусловлены не только влиянием NO, но и другими продуктами его диссоциации. Кроме того, важно отметить, что полученные нами результаты снижения активности К(Са)каналов эритроцитов в присутствии НН согласуются с данными о предотвращении NO программируемой гибели эритроцитов (эритрозо), поскольку начальным этапом этого процесса является увеличение Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов [3].

Во второй серии экспериментов исследовали влияние донора сероводорода NaHS на амплитуду ГО мембраны эритроцитов. Известно, что гидросульфид натрия (NaHS) в водном растворе подвергается гидролизу, образуя ионы Na^+ и HS^- , которые, в свою очередь, взаимодействуют с H^+ с формированием H_2S [12].

Стимуляцию К(Са)каналов также, как и в первой серии экспериментов, проводили двумя способами.

Инкубация эритроцитов с различными концентрациями NaHS (0,005-0,2 мМ) приводила к неодинаковым изменениям амплитуды A23187-стимулированного ГО. Так, в присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда ГО достоверно возрастала. Внесение более высоких концентраций NaHS (от 0,01 мМ до 0,2 мМ) приводило к постепенному снижению амплитуды ГО. При повышении концентрации NaHS в среде инкубации до 0,2 мМ наблюдалось снижение изучаемой величины в 7,6 раз (рис. 1А). При концентрациях NaHS, превышающих 0,2 мМ, получить ГО эритроцитов не удалось.

Другим способом активации К(Са)-каналов, как отмечалось выше, является внесение в среду инкубации эритроцитов искусственной электронно-донорной системы аскорбат – ФМС. Добавление в среду инкубации клеток возрастающих концентраций NaHS приводило к достоверному снижению амплитуды редокс-зависимого ГО (рис. 1В).

Оказалось, что, как и в серии с НН, динамика A23187- и редокс-стимулированного ГО была неодинаковой. Так, в присутствии 0,005 мМ NaHS амплитуда A23187-стимулированного ГО увеличивалась, а редокс-стимулированного ответа снижалась. Кроме того, было выявлено, что снижение амплитуды редокс-зависимого ГО в присутствии NaHS менее выражено по сравнению с A23187-зависимым ГО. Так, в присутствии 0,1 мМ NaHS амплитуда редокс-зависимого ГО снижалась в среднем на 10 %, а A23187-зависимого – на 60 %. Практически полного подавления редокс-зависимого ГО удалось достичь при инкубации эритроцитов в присутствии 1,6 мМ NaHS, тогда как A23187-зависимый ГО практически не развивался при добавлении 0,2 мМ NaHS.

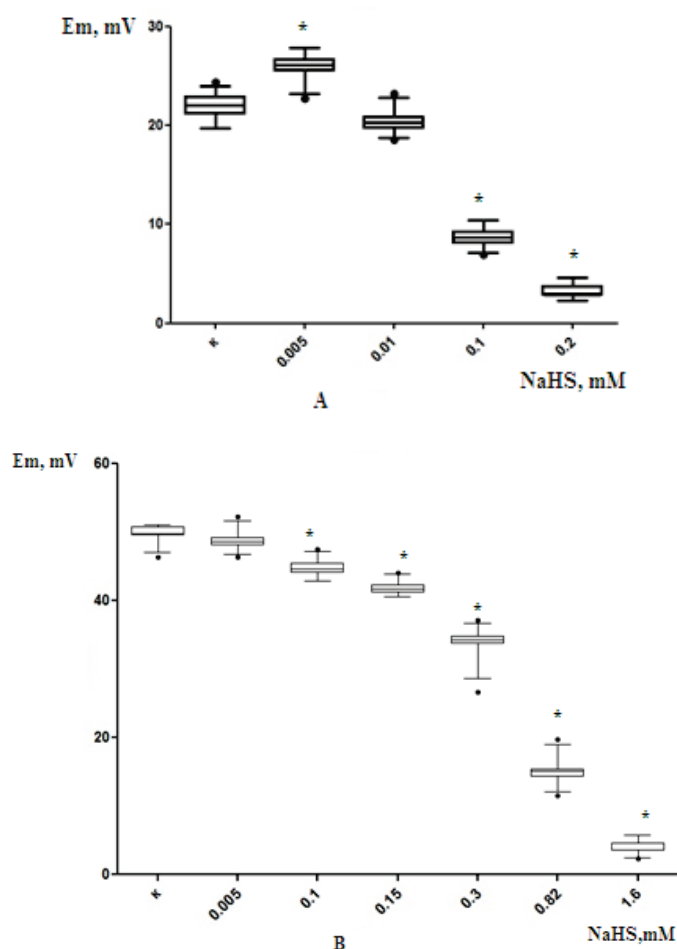


Рисунок 1. Влияние NaHS на амплитуду (А) A23187- и (В) редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа эритроцитов человека.

*- Отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных ($n = 25$, $p < 0,05$)

Таким образом, оказалось, что в присутствии доноров NO и H₂S изменение амплитуды A23187-зависимого и редокс-стимулированного ГО имеет разнонаправленный характер. Это свидетельствует о том, что проводимость K(Ca)каналов эритроцитов, активированные различным способом, меняется неодинаковым способом.

Регуляция K(Ca)-каналов эритроцитов осуществляется несколькими путями. Один из них связан с компонентами электронно-транспортной цепи, некоторые компоненты которой присутствуют на мембране эритроцитов (НАДН-дегидрогеназа, цитохром c) [10, 11] и могут включаться в регуляцию K(Ca)-каналов эритроцитов [11].

Система аскорбат – ФМС приводит к образованию редокс-агентов, которые, возможно оказывают свое влияние на Ca²⁺-зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов опосредованно через SH-группы белков канала или его регуляторных белков. Окисление и восстановление SH-групп играет определенную роль в редокс-зависимой калиевой проводимости мембраны эритроцитов человека. Возможно, что сульфгидрильные группы белка калиевого канала являются конечным или промежуточным акцептором в электронном транспорте на мембране эритроцитов. Тогда модуляция SH-групп может оказаться пусковым конформационным сигналом для запуска работы K(Ca)-канала.

В проведенном исследовании установлено, что доноры NO и H₂S регулируют K(Ca)каналы эритроцитов, что находит свое отражение в изменении амплитуды ГО, вызванного кальциевым ионофором или редокс-агентами. Оказалось, что зависимость амплитуды ГО от концентрации NH или NaHS определяется способом стимуляции Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов. Влияние монооксида азота и сероводорода на исследуемые каналы может быть опосредовано модификацией SH-групп белков ионного канала или белков, регулирующих его проводимость, в частности, входящих в состав электронно-транспортной цепи мембраны эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенном исследовании установлено, что монооксид азота и сероводород оказывает модулирующее действие на K(Ca)-каналы мембраны эритроцитов. Эффекты NO и H₂S зависели от способа активации исследуемых каналов. A23187-зависимый ГО оказался более чувствителен к NO и H₂S по сравнению с редокс-индуцированной гиперполяризацией мембраны эритроцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-015-00395/18.

Список литературы / References:

1. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.*, 2002, vol. 16, no. 13. pp. 1792-1798.
2. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H. J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, vol. 284, pp. H1577-H1584.
3. Nicolay J.P., Liebig G., Niemoeller O.M., Koka S., Ghashghaieina M., Wieder T., Haendeler J, Busse R., Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 2008, vol. 456, no. 2, pp. 293-305.
4. Трубачева О.А., Шахристова Е.В., Галич А.И., Петрова И.В. Влияние повышенной Ca²⁺-зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов. *Вестник ТГПУ*, 2011, вып. 5, № 107, с. 69-72. [Trubacheva O.A., Shahristova E.V., Galich A.I., Petrova I.V. The effect of increased Ca²⁺-dependent potassium permeability on erythrocyte deformability. *Digest TGPU*, 2011, iss. 5, no. 107, pp. 69-72. (In Russ.)]
5. Lang F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal.*, 2006, vol. 8, no. 8, pp. 1183-1192.
6. Гюльханданян А.В., Геокчакян Г.М. Ca²⁺-зависимый выход K⁺ из эритроцитов, индуцированный окислительными процессами. *Биофизика*, 1991, т. 36, № 1, с. 169-171. [Gyulhandanyan A.V., Geokchakyan G.M. Ca²⁺-dependent K⁺ output of the red blood cells induced by oxidative processes. *Biofizika*, 1991, vol. 36, no. 1, pp. 169-171 (In Russ.)]
7. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И., Баскаков М.Б., Медведев М.А. Ca²⁺-активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca²⁺-индуцированных изменений мембранного потенциала. *Биологические мембраны*, 1992, т. 9, № 9, с. 885-903. [Orlov S.N., Petrova I.V., Pokudin N.I., Baskakov M.B., Medvedev M.A. Ca²⁺-activated potassium channels of erythrocytes, studied by the method of recording the Ca²⁺-induced changes in the membrane potential. *Biologicheskie membrany*, 1992, vol. 9, no. 9, pp. 885-903. (In Russ.)]
8. Ignarro L., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2002, vol. 34, no. 6, pp. 879-886.
9. Mohazzab K.M., Kaminski P.M., Agarwal R., Wolin M.S. Potential role of a membrane-bound NADH oxidoreductase in nitric oxide release and arterial relaxation to nitroprusside. *Circ Res.*, 1999, no. 84, iss. 2, pp. 220-228.

10. Kennett E.C., Kuchell P.W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane. *IUBMB Life*, 2003, vol. 55, no. 7, pp. 375-385.
11. Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, no. 17, pp. 11789-11793.
12. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, 1996, vol. 16, no. 3, pp. 1066-1071.

REGULATION MECHANISMS OF ERITROCYTE MEMBRANE IONIC PENETRATION BY GASOMEDIATORS

Petrova I.V.¹, Birulina Y.G.¹, Trubachova O.A.², Shefer E.A.¹, Rozenbaum Y.A.¹,
Teslya E.S.¹, Ovchinnikova A.S.¹

¹Siberian state medical university

Moscow road, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: ivpetrova57@yandex.ru

²SRI of cardiology of Tomsk SRMC

Kievskaya str., 111A, Tomsk, 634012, Russia

Abstract. We have established that nitrogen monoxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S) have a modulating effect on the Ca^{2+} -dependent potassium channels of the erythrocyte membrane. This leads to a change in the hyperpolarization amplitude of the membrane caused by the calcium ionophore or redox agents. The effects of NO and H₂S depend on the way the channels are activated. The effect of NO and H₂S on the channels under investigation can be mediated by the modification of SH-groups of ion channel proteins or proteins regulating its conductivity, in particular, which are part of the electron transport chain of the erythrocyte membrane.

Key words: erythrocytes, calcium-dependent potassium channels, gas intermediaries.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ НЕМОДИФИЦИРОВАННОГО ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА *IN VITRO*

Даллакян Г.А., Мошарова И.В., Михеев И.В., Волков Д.С., Проскурнин М.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: ivmpost@mail.ru, honaris@bk.ru

Поступила в редакцию: 22.06.2018

Аннотация. Проведено исследование влияния водных дисперсий немодифицированного фуллерена C₆₀ (ВДФ) на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде. Показано стимулирующее влияние ВДФ на численность бактериопланктона в концентрационном диапазоне от 0,5 до 50 мг/л. Наиболее выраженный стимулирующий эффект фуллерена на численность бактерий зафиксирован в варианте с концентрацией 50 мг/л. Во всех случаях при концентрациях C₆₀ (0,5, 5 и 50 мг/л) наблюдали увеличение численности бактериальных клеток.

Ключевые слова: бактериопланктон, водные дисперсии фуллерена C₆₀, токсичность.

Фуллерены – это молекулярные соединения, принадлежащие к классу аллотропных модификаций углерода. Специфическая молекулярная структура фуллеренов в виде замкнутых каркасных углеродных структур обуславливает их уникальные физико-химические свойства. С момента открытия фуллеренов в 1985 г. [1] и по настоящее время эти соединения широко используются в научных и технологических целях. Наиболее успешно фуллерен содержащие продукты применяются в производстве полупроводников, сенсоров и солнечных батарей [2]. Фуллерен C₆₀ – мощный нейтрализатор активных форм кислорода и свободных радикалов. Эти свойства делают фуллерены привлекательными для изготовления лекарственных препаратов [3]. Каркасная структура молекул фуллеренов позволяет им инкапсулировать молекулы других веществ, образуя при этом новый класс фуллеренов, в частности, эндометаллофуллеренов. Наиболее перспективное применение которых возможно в области создания на их основе МРТ-контрастных агентов на основе гадолиний содержащих фуллеренов [4].

Биомедицинское применение фуллеренов требует получение стабильных, высококонцентрированных водных дисперсий фуллеренов (ВДФ) причем с отсутствием функционализированной поверхности. Водные дисперсии нефункционализированных фуллеренов представляют собой стабильные в течение продолжительного времени (5 и более лет) коллоидные растворы с размером частиц до 200 нм, обладающие высоким значением электрокинетического потенциала от -25 до -40 мВ, что характеризует их как стабильные коллоидные системы [5].

С момента начала массового промышленного производства фуллеренов в 1990 г. прошло уже более 20 лет, и в настоящее время остро стоят проблемы определения, аккумуляции и утилизации фуллеренов в окружающей среде, особенно в водных экосистемах [6]. Известно, что гетеротрофный бактериопланктон является основным звеном, осуществляющим деструкцию различных, в т.ч. и антропогенного происхождения, органических соединений, от активного функционирования планктонного микробоценоза во многом зависит благополучие всего водоема [7].

Первые работы по исследованию токсичности ВДФ появились уже в 1995-96 гг. [8, 9]. В [10] проведено обобщение данных о токсичности наночастиц различной природы. В [3, 11] показано, что ВДФ C₆₀ не оказывают острого или подострого воздействия на различные эукариотные организмы. Для ВДФ C₆₀ проведен анализ токсичности на нескольких экологически значимых видах: *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes*. Последние два вида использовали для оценки сублетальных эффектов воздействия фуллеренов, также оценивая экспрессию мРНК и белка в печени. Исследуемые максимальные концентрации C₆₀ 35 мг/л для пресной воды и 22,5 мг/л для морской воды [12].

Однако подобные работы по изучению влияния различных концентраций ВДФ на бактериопланктон не проводились ранее. Кроме того, вопрос о токсичности ВДФ C₆₀ по отношению к прокариотам остается дискуссионным. Например, ранее были обнаружены антимикробные свойства ВДФ C₆₀, особенно по отношению к отдельным культурам грамм-отрицательных бактерий. В [13] показано, что ВДФ C₆₀ может ингибировать рост *Pseudomonas putida*. В [13] показали, что фуллерены ингибируют рост *Escherichia coli*. Однако в других работах установили, что внесение ВДФ C₆₀ не влияло на рост *E. coli* [15, 16]. Одно из объяснений обнаруженных несоответствий, по-видимому, заключается в том, что штаммы *E. coli*, используемые в работах [14] и [15, 16] различались и, таким образом получены противоречивые результаты. В [17] показано, что ВДФ C₆₀ в концентрациях от 3 до 7 мг/л оказывал стимулирующее влияние на увеличение численности и биомассы *Bacillus cereus* и вызывал изменения структуры микробного сообщества в аэробных условиях при pH 6,5. Кроме того, в присутствии 5 мг/л фуллерена скорость потребления нитратов *B. cereus* увеличилась до 55 % по сравнению с контрольными вариантами.

В связи с вышесказанным, а также с возрастанием производства фуллеренов в современное время, изучение воздействия ВДФ на бактериопланктон является очень актуальным направлением для экологии водных экосистем.

Цель исследования оценить влияние различных концентраций водных дисперсий немодифицированного фуллера C₆₀ на численность гетеротрофного бактериопланктона в условиях краткосрочного эксперимента *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение водных дисперсий фуллеренов и их характеристики.

ВДФ C₆₀ получена по методике ультразвуковой замены растворителя из толуола [18]. Для этого навеска коммерчески доступного C₆₀ 0,1004 г (степень чистоты 99,5+ %) помещали в мерную колбу объемом 50 мл, затем добавляли 40 мл толуола. После этого раствор подвергали ультразвуковой обработке (УЗ) в течение 1 часа до образования насыщенного ярко-фиолетового раствора и полного растворения навески исходного C₆₀. Раствор охлаждали до комнатной температуры, затем доводили до метки раствором толуола. Полученный раствор переносили в коническую колбу на 500 мл и добавляли 250 мл деионизованной воды. Полученный двухфазный раствор (соотношение объемов органической-водной фаз составило 1:5) подвергали УЗ-обработке (900 Вт) в течение 5-ти дней по 6 часов ежедневно до полного испарения верхнего органического слоя толуола. Светло-коричневые ВДФ C₆₀ в воде переносили в мерные стаканы и кипятили до испарения остатков толуола в течение 15 минут с одновременной продувкой аргоном со скоростью 0,1 л/мин. Содержание толуола и летучих органических компонентов в дисперсиях контролировали с помощью статического парового газохроматографического анализа (ПФА-ГХ-МС), значения не превышали 0,1 мкг/л. После этого ВДФ C₆₀ переносили в мерные колбы на 250 мл, после их остывания до комнатной температуры доводили до метки деионизованной водой.

Дополнительно проведено изучение коллоидных характеристик с помощью динамического рассеяния света. Средний диаметр кластеров фуллеренов в ВДФ C₆₀ составил 130 ± 5 нм, с величиной электрокинетического потенциала $-33,2 \pm 0,5$ мВ. Также с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой установили, что содержание токсичных элементов As не превышает 5 мкг/л для Pb, Cd, Zn, Cu содержание не превышает 1 мкг/л.

Численность гетеротрофных бактерий.

Эксперимент по изучению влияния различных концентраций ВДФ C₆₀ на численность гетеротрофного бактериопланктона проводился в период с 4.04. по 09.04.2018 г. В стерильные стеклянные конические колбы объемом 250 мл вносили по 100 мл воды из функционирующего аквариума (модель природного водоема), после чего в колбы добавляли предварительно простерилизованные в автоклаве ВДФ C₆₀ в концентрациях 0,5 мг/л, 5 мг/л и 50 мг/л. Каждый вариант эксперимента (0,5, 5 и 50 мг/л и контрольный опыт – аквариумная вода без ВДФ C₆₀) выполняли в двух повторностях при комнатной температуре 22 °C.

Численность гетеротрофных бактерий определяли сначала в аквариумной воде до внесения ВДФ C₆₀, а затем на первые, вторые и пятые сутки после внесения в экспериментальные колбы ВДФ, для чего из каждой экспериментальной колбы стерильной пипеткой отбирали аликвоты воды объемом 1 мл. Для определения численности гетеротрофных бактерий (ЧБ) использовался метод эпифлуоресцентной микроскопии с окраской бактериальных клеток водным раствором флуорохрома акридинового оранжевого [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее значение численности бактерий в воде, взятой перед началом эксперимента из аквариума и помещенной в экспериментальные колбы (04.04.2018 г.), составляло $0,51 \pm 0,01$ млн кл./мл. Через сутки после начала эксперимента (05.04.2018 г.) величина ЧБ в контрольных колбах (аквариумная вода без добавления ВДФ C₆₀) снизилась по сравнению со стартовой величиной и составляла $0,33 \pm 0,02$ млн кл./мл. Однако во всех вариантах с ВДФ C₆₀ численность бактериопланктона резко возросла. Наиболее высокая ЧБ при сравнении трех вариантов опыта с фуллереном наблюдали в колбах с концентрацией ВДФ C₆₀ 50 мг/л – $1,82 \pm 0,01$ млн кл./мл, а наименьшая – в колбах с содержанием фуллера 0,5 мг/л – $0,51 \pm 0,01$ млн кл./мл (рис. 1)

На второй день эксперимента численность бактерий в контрольных колбах увеличилась, но незначительно до $0,47 \pm 0,02$ млн кл./мл. Во всех трех вариантах опыта с ВДФ ЧБ оказалась значительно выше, чем в контрольном варианте, причем наиболее высокая численность микроорганизмов ($2,17 \pm 0,01$ млн кл./мл) установлена в колбах с содержанием ВДФ 5 мг/л. Значительно возросла ЧБ в колбах с минимальным содержанием ВДФ 0,5 мг/л. В то же время численность бактерий в варианте с содержанием ВДФ 50 мг/л немного снизилась по сравнению с ЧБ, определенной на первые сутки после начала эксперимента до $1,51 \pm 0,01$ млн кл./мл. На пятые сутки эксперимента ЧБ в контрольных колбах снова снизилась до $0,21 \pm 0,02$ млн кл./мл. В вариантах же с фуллереном численность бактерий хотя и снизилась по сравнению с ЧБ, определенной на вторые сутки эксперимента, но оставалась значительно выше, чем в контрольном варианте. В конце эксперимента наиболее высокой оказалась численность бактерий в варианте с содержанием ВДФ 50 мг/л. Таким образом, проведенные нами эксперименты по изучению влияния различных концентраций (рис. 1) ВДФ C₆₀ на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде показали не только отсутствие токсического эффекта C₆₀ на бактериопланктон, но наоборот - его стимулирующего влияние на численность гетеротрофных бактерий.

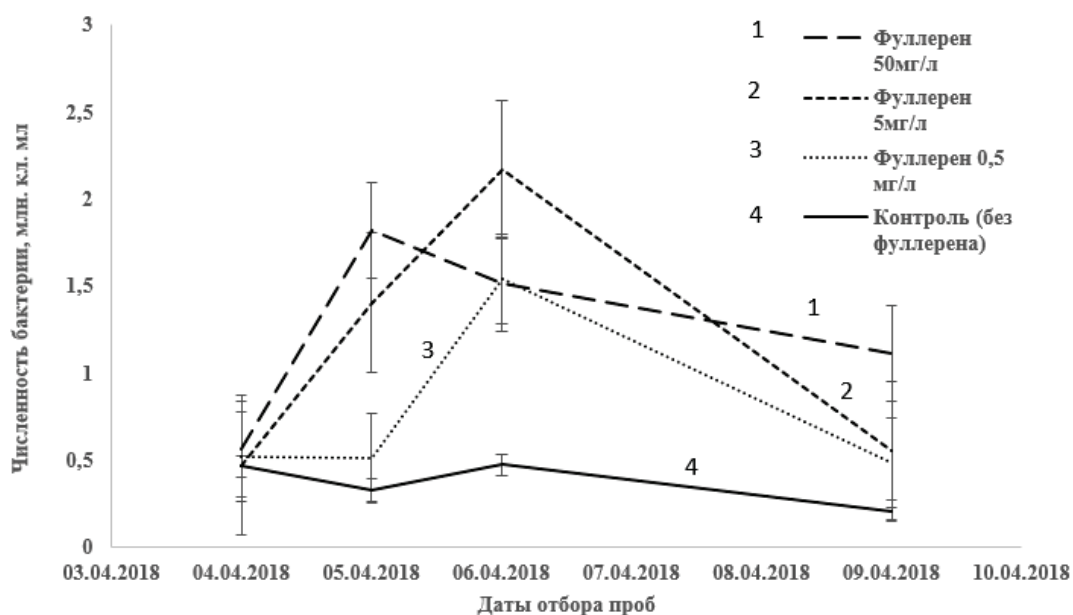


Рисунок 1. Влияние водной дисперсии фуллерена C₆₀ в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мг/л на численность гетеротрофного бактериопланктона в аквариумной воде во время эксперимента *in situ*

Мы наблюдали стимулирующее влияние ВДФ C₆₀ в концентрационном диапазоне от 0,5 до 50 мг/л на численность бактериальных клеток в аквариумной воде. Наиболее выраженный стимулирующий биологический эффект зафиксирован для варианта с ВДФ в концентрации 50 мг/л. Кроме того, все изученные нами концентрации ВДФ вызвали увеличение объема бактериальных клеток во время эксперимента.

Получаемые различными авторами противоречивые результаты исследований влияния ВДФ C₆₀ на бактериальные клетки [12-16] связывают с различными причинами. Вероятно, что влияние ВДФ C₆₀ на бактериальные культуры зависит от особенностей строения бактериальной клеточной стенки – например, было показано, что минимальная ингибирующая концентрация C₆₀ для грамположительных бактерий может быть значительно выше, чем для грамотрицательных бактерий [20]. Помимо особенностей строения клеточной стенки бактерий, результаты воздействия ВДФ на микроорганизмы могут зависеть от способа получения дисперсии, коллоидного состояния и концентрации, а также от факторов окружающей среды - например, низкий уровень кислотности среды и высокие концентрации фуллерена C₆₀ могут способствовать образованию более крупных агрегатов [20] с последующим ослаблением токсичности фуллерена [17].

Обнаруженное нами стимулирующее влияние ВДФ C₆₀ в концентрационном диапазоне от 0,5 до 50 мг/л на численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде перекликается с результатами исследования [21], в котором показано, что активность и численность бактериальных клеток снижалась при концентрациях Ag-наночастиц < 0,1 мг/л, однако воздействие их более высоких концентраций увеличивало бактериальную продукцию, хотя механизм этого увеличения не ясен [21].

Таким образом, судя по нашим результатам, а также данным предшествующих исследований, особенности взаимодействия ВДФ с бактериальными клетками чрезвычайно сложны и требуют дальнейшего глубокого изучения. Согласно полученным результатам, воздействие ВДФ C₆₀ в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мг/л во время краткосрочных экспериментов не оказывало токсического эффекта на бактериальные клетки, и, соответственно, ВДФ C₆₀ не могут рассматриваться в качестве соединений, вызывающих ингибирование численности бактериопланктона, т.е. в качестве бактериостатических соединений. Однако, по результатам лабораторных экспериментов практически невозможно судить об эффектах воздействия ВДФ C₆₀ на бактериопланктон в природных водоемах, поэтому для более корректных выводов необходимы дополнительные исследования. Тем не менее, проведенная нами работа весьма важна для понимания разнообразия результатов воздействия ВДФ C₆₀ на микроорганизмы.

Список литературы/References:

1. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature*, 1985, vol. 318, p. 162.
2. Sherigara Bailure S., Kutner Wlodzimierz, D'Souza Francis. Electrocatalytic Properties and Sensor Applications of Fullerenes and Carbon Nanotubes. *Electroanalysis*, 2003, vol. 15, no. 9, p. 753.
3. Shershakova N.N., Baraboshkina E.N., Andreev S.M., Shabanova D.D., Smirnov V.V., Kamishnikov Y.O., Khaitov M.R. Fullerene C₆₀ aqueous solution does not show acute toxicity. *Immunologiya*, 2016, vol. 37, no. 6, p. 325.

4. Li J., Cui R., Chang Y., Guo X., Gu W., Huang H., Chen K., Lin G., Dong J., Xing G., Sun B. Adaption of the structure of carbon nanohybrids toward high-relaxivity for a new MRI contrast agent. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no. 63, p. 58028.
5. Duncan L.K., Jinschek J.R., Vikesland P.J. C60 Colloid Formation in Aqueous Systems: Effects of Preparation Method on Size, Structure, and Surface Charge. *Environmental Science & Technology*, 2008, vol. 42, no. 1, p. 173.
6. Dhawan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K., Shan W., Miller S.M., Hashsham S.A., Tarabara V.V. Stable Colloidal Dispersions of C60 Fullerenes in Water: Evidence for Genotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 2006, vol. 40, no. 23, p. 7394.
7. Song M., Yuan S., Yin J., Wang X., Meng Z., Wang H., Jiang G. Size-Dependent Toxicity of Nano-C₆₀ Aggregates: More Sensitive Indication by Apoptosis-Related Bax Translocation in Cultured Human Cells. *Environmental Science & Technology*, 2012, vol. 46, no. 6, p. 3457.
8. Moussa F., Chretien P., Dubois P., Chuniaud L., Dessante M., Trivin F., Sizaret P.-Y., Agafonov V., Céolin R., Szwarc H., Greugny V., Fabre C., Rassat A. The Influence of C60 Powders On Cultured Human Leukocytes. *Fullerene Science and Technology*, 1995, vol. 3, no. 3, p. 333.
9. Moussa F., Trivin F., Céolin R., Hadchouel M., Sizaret P.Y., Greugny V., Fabre C., Rassat A., Szwarc H. Early effects of C60 Administration in Swiss Mice: A Preliminary Account for In Vivo C60 Toxicity. *Fullerene Science and Technology*, 1996, vol. 4, no.1, p. 21.
10. James J., Saxena P., Rajendran N. Nanotoxicity of materials on marine and aquatic organisms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2014, vol. 27, no. 2, p. 117.
11. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, vol. 12, p. 1281.
12. Oberdörster E., Zhu S., Blickley T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. *Carbon*, 2006, vol. 44, no. 6, p. 1112.
13. Fang J., Lyon D.Y., Wiesner M.R., Dong J., Alvarez Effect of a Fullerene Water Suspension on Bacterial Phospholipids and Membrane Phase Behavior. *Environmental Science & Technology*, 2007, vol. 41, no. 7, p. 2636.
14. Chae S.R., Wang S.Y., Hendren Z.D., Wiesner M.R., Watanabe Y., Gunsch C.K. Effects of fullerene nanoparticles on Escherichia coli K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control. *Journal of Membrane Science*, 2009, vol. 329, no. 1-2, p. 68.
15. Dai J., Wang C., Shang C., Graham N., Chen G.-H. Comparison of the cytotoxic responses of Escherichia coli (E. coli) AMC 198 to different fullerene suspensions (nC60). *Chemosphere*, 2012, vol. 87, no. 4, p. 362.
16. Hadduck A.N., Hindagolla V., Contreras A.E., Li Q.L., Bakalinsky A.T. Does Aqueous Fullerene Inhibit the Growth of Saccharomyces cerevisiae or Escherichia coli? *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, vol. 76, no. 24, p. 8239.
17. Huang F., Ge L., Zhang B., Wang Y., Tian H., Zhao L., He Y., Zhang X. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria. *Chemosphere*, 2014, vol. 108, p. 411.
18. Mikheev I.V., Khimich E.S., Rebrikova A.T., Volkov D.S., Proskurnin M.A., Korobov M.V. Quasi-equilibrium distribution of pristine fullerenes C₆₀ and C₇₀ in a water-toluene system. *Carbon*, 2017, vol. 111, p. 191.
19. Sherr B., Sherr E., del Giorgio P. *Enumeration of total and highly active bacteria. Methods in microbiology*. Elsevier, 2001, 129 p.
20. Fortner J.D., Lyon D.Y., Sayes C.M., Boyd A.M., Falkner J.C., Hotze E.M., Alemany L.B., Tao Y.J., Guo W., Ausman K.D., Colvin V.L., Hughes J.B. C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol*, 2005, vol. 39, no. 11, p. 4307.
21. Blakelock Graham C., Xenopoulos Marguerite A., Norman Beth C., Vincent Jennifer L., Frost Paul C. Effects of silver nanoparticles on bacterioplankton in a boreal lake. *Freshwater Biology*, 2016, vol. 61, no. 12, p. 2211.

**A STUDY OF AQUEOUS UNMODIFIED FULLERENE DISPERSIONS C_{60} INFLUENCE
ON THE TOTAL NUMBER OF BACTERIOPLANKTON *IN VITRO***

Dallakyan G.A., Mosharova I.V., Mikheev I.V.,

Volkov D.S., Proskurnin M.A.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ivmpost@mail.ru, honaris@bk.ru

Abstract. The influence of aqueous unmodified fullerene C_{60} dispersions (AFD) on the total number of heterotrophic bacteria in aquarium water has been investigated. The stimulating effect of AFD on the number of bacterioplankton in the concentration range from 0,5 to 50 ppm was shown. The most pronounced stimulating effect of C_{60} on the number of bacteria was observed in case of fullerene concentration – 50 ppm. In all cases at concentrations C_{60} in a range of 0,5, 5, and 50 ppm were the observed increases of the bacterial cells quantity.

Key words: *bacterioplankton, aqueous fullerene C_{60} dispersions, toxicity*

БИОКОНВЕРСИЯ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПОЛЕЗНЫЕ ПРОДУКТЫ – ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ЦЕЛЛЮЛАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА

Синицын А.П.^{1,2}, Шашков И.А.², Гусаков А.В.^{1,2}, Синицына О.А.^{1,2}, Рожкова А.М.^{1,2}, Зоров И.Н.^{1,2}, Кондратьева Е.Г.², Короткова О.Г.², Рубцова Е.А.², Семёнова М.В.², Сатрутдинов А.Д.², Осипов Д.О.², Волков П.В.², Баширова А.В.², Доценко А.С.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

ул. Ленинские Горы, 1, г. Москва, 119991, РФ

²ФИЦ Биотехнологии РАН

Ленинский пр., 33, г. Москва, 119071, РФ

Поступила в редакцию: 25.06.2018

Аннотация. Растительная биомасса является основным видом органической материи на Земле. Целлюлоза растительной биомассы может быть конвертирована ферментативным путем в глюкозу, из которой, далее, можно получать разные виды топлива (этанол, бутанол и др.), этилен, органические и аминокислоты, полимеры, кормовой белок и многие другие полезные продукты. Для биоконверсии целлюлозосодержащего сырья в глюкозу требуются гидролитические ферменты трех типов: эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы, а также оксидоредуктазы (полисахаридмонооксигеназы). В данной работе изучены возможности улучшения гидролитической способности секреторного ферментного комплекса *Penicillium verruculosum* с помощью добавления к нему методами генетической инженерии гомологичных и гетерологичных целлюлаз в различных комбинациях и соотношениях: полисахаридмонооксигеназы (эндоглюканазы IV) *Trichoderma reesei*, эндоглюканазы II и целлобиогидролазы I *P. verruculosum*, а также β -глюкозидазы *Aspergillus niger*. Определено оптимальное соотношение компонентов целлюлазного комплекса для увеличения эффективности ферментативной деструкции целлюлозы, достигнуто (до двух раз) увеличение каталитической активности ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов-продуцентов, по сравнению с базовым ферментным комплексом исходного штамма *P. verruculosum*.

Ключевые слова: целлюлазы, возобновляемая растительная биомасса, ферментативная конверсия целлюлозы, генетическая инженерия, *Penicillium verruculosum*.

ВВЕДЕНИЕ

Растительная биомасса является основным видом органической материи на Земле. Общие запасы растительной биомассы составляют примерно 1 трлн т, а ежегодный прирост биомассы в мире составляет до 5 млрд т [1]. Целлюлоза растительной биомассы может быть конвертирована ферментативным путем в глюкозу. В свою очередь глюкоза является незаменимым сырьем для микробиологических процессов получения топлива (этанола, бутанола и др.), этилена, органических и аминокислот, полимеров, кормового белка и многих других полезных продуктов. Таким образом реализуется так называемая концепция «биофабрики» (biorefinery), сутью которой является превращение альтернативного возобновляемого растительного сырья в продукты, которые традиционно получают из невозобновляемого ископаемого углеводородного сырья [2]. Подобные биотехнологии были апробированы в пилотном масштабе. Начиная с 2005 г., в разных странах были построены демонстрационные фабрики по производству биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов (биотоплива второго поколения), а в 2012 г. в Крешентино (Италия) начал работать первый крупномасштабный завод мощностью около 80 млн. л спирта в год [3]. К настоящему времени в США и Бразилии уже функционируют несколько подобных предприятий.

Ключевой стадией переработки растительного целлюлозосодержащего сырья является его каталитическое превращение с помощью ферментов в глюкозу. Для эффективной конверсии целлюлозы используются ферментные комплексы целлюлаз, полученные с использованием различных грибных штаммов-продуцентов (микроскопические грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola* и др.). В состав таких ферментных комплексов входят в различном соотношении ключевые ферменты, участвующие в гидролизе целлюлозы, – эндоглюканазы (ЭГ), осуществляющие деструкцию целлюлозы до фрагментов небольшого размера, целлобиогидролазы (ЦБГ), превращающие целлюлозу и продукты действия эндоглюканаз в целлобиозу, и β -глюкозидазы (БГ), гидролизующие целлобиозу до глюкозы [3]. Помимо гидролитических ферментов для конверсии целлюлозы необходимы т.н. синергитические белки [3,4], наиболее важным из которых являются белки оксидоредуктазы (полисахаридмонооксигеназы), относящиеся к 9 семье ферментов с вспомогательной активностью (семья AA9), которые ранее квалифицировали как гликозил-гидролазы 61 семьи (GH61). Присутствие относительно небольшого количества ферментов этого типа в карбогидразном целлюлазном комплексе повышает общую степень конверсии целлюлозы [5] поскольку ферменты AA9 (GH61) расщепляя целлюлозную цепь в произвольной позиции, разрыхляют кристаллические участки целлюлозы и

формируют дополнительные свободные концевые группы для действия основных гидролитических ферментов – целлобиогидролаз.

Как правило, секретируемый микроорганизмами-продуцентами природный ферментный комплекс целлюлаз недостаточно эффективен для полноценной конверсии целлюлозы и требуется либо введение в его состав новых компонентов, либо изменение соотношения уже секретируемых компонентов комплекса, что может осуществляться с помощью методов и подходов генетической инженерии. Поиск новых, более активных целлюлаз и их продуцентов, улучшение свойств уже известных ферментов и усовершенствование микробных штаммов-продуцентов с помощью современных методов белковой и генетической инженерии приобретают в настоящее время важное значение [3].

Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* является перспективным продуцентом гидролитического комплекса ферментов карбогидраз и секретирует высокоактивный целлюлазный комплекс [6, 7]. Поэтому использование гриба *P. verruculosum* как базового штамма для полечения ферментных препаратов, гидролизующих целлюлозу с повышенной эффективностью, является актуальной задачей.

В данной работе мы описываем возможности улучшения гидролитической способности секреторного ферментного комплекса *P. verruculosum* с помощью добавления к нему с использованием методов генетической инженерии гомологичных и гетерологичных целлюлаз в различных комбинациях и соотношениях – эндоглюканазы 4 (ЭГ4) *Trichoderma reesei*, эндоглюканазы 2 (ЭГ2) и целлобиогидролазы 1 (ЦБГ1) *P. verruculosum*, а также β -глюкозилазы *Aspergillus niger*. Отметим что полисахаридмонооксигеназа *T. reesei*, которая относится к семье AA9 (GH61), ранее из-за структурной схожести с эндоглюканазами была квалифицирована как ЭГ4 *T. reesei* и её до недавнего времени считали малоактивной эндоглюканазой [4], поэтому мы сохранили традиционное название этого фермента (ЭГ4).

Материалы и методы. Методы клонирования целевых генов, а также методы определения качественного и количественного состава препаратов описаны нами в работах [8,9]. Ферментные препараты были получены лиофильным высушиванием культуральных жидкостей исходного штамма *P. verruculosum* B1-537 и рекомбинантных штаммов, выращенных в 3-л ферментерах. Ферментные препараты получены в ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина (Пушино).

Эксперименты по определению гидролитической способности ферментных препаратов проводили в термостатируемой при 50 °С ячейке, помещенной на качалку INNOVA 40 Thermo Shaker (США). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л (в пересчете на сухое вещество), реакцию проводили в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0 при перемешивании 250 об./мин. Ферментные препараты в реакционную смесь добавляли в пересчете на белок (5 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мл. Гидролиз проводили в течение 24 часов.

Реакционная ячейка представляла собой пластиковый сосуд объемом 50 мл с крышкой, для обеспечения дополнительного перемешивания реакционной смеси в ячейку помещали металлический цилиндр ($d = 7$ мм, $h = 10$ мм) из нержавеющей стали. Через определенные промежутки времени (3, 12 и 24 часа) из реакционной смеси отбирали пробы (0,5 мл), центрифугировали 3 мин при 10 000 об/мин и измеряли в супернатанте концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди–Нельсона [9].

За критерий гидролитической способности принимали концентрацию ВС в реакционной смеси, образовавшихся за 24 часа. В качестве субстратов были использованы измельченные микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) и осиновая древесина (размер частиц после помола составлял 5-10 мкм), измельчение проводили в ОАО ГосНИИ биосинтеза белковых веществ на планетарной мельнице-активаторе типа АГО-2С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация исходного ферментного комплекса *P. verruculosum* была осуществлена с помощью добавления в его состав гомологичных и гетерологичных ферментов в результате клонирования кодирующих их генов в исходный (реципиентный) штамм *P. verruculosum* B1-537 под управлением индуцибельного промотора гена *cbh1*, кодирующего целлобиогидролазу 1 (ЦБГ1). *Cbh1* промотор является «сильным промотором», обеспечивающим высокий уровень экспрессии управляемого им гена [8]. С помощью *cbh1* промотора были клонированы гены ЭГ4 (*egl4*) *T. reesei*, ЭГ2 (*egl2*) и ЦБГ1 (*cbh1*) *P. verruculosum*, а также БГ (*bglA*) *A. niger*.

На основе штамма-реципиента *P. verruculosum* B1-537 с помощью использования *cbh1* промотора было получено 5 различных новых рекомбинантных штаммов *P. verruculosum*, продуцирующих модифицированные ферментные комплексы, включающие в различных сочетаниях и соотношениях ферменты как исходного (базового) ферментного комплекса *P. verruculosum*, так и ферменты, гены которых были клонированы. Были получены рекомбинантные штаммы с клонированными индивидуальными генами ЭГ4 (ферментный препарат № 2) или БГ (препарат № 3), с клонированными одновременно генами ЭГ4 и БГ (препарат №4), ЦБГ1, ЭГ2 и БГ (препарат № 5), и ЭГ4, ЦБГ1, ЭГ2 и БГ (препарат № 6). В качестве контроля использовали препарат № 1, полученный на основе штамма-реципиента.

Для ферментных препаратов, полученных с помощью новых рекомбинантных штаммов, были определены компонентный состав (по методике, описанной нами в работах [9, 10]), а также гидролитическая способность по отношению к измельченным МКЦ и осиновой древесине, которую оценивали по выходу ВС через 24 часа гидролиза.

Таблица 1. Компонентный состав ферментных препаратов (ФП), полученных на основе *P. verruculosum* (в % от общего содержания белка). Содержание не-целлюлазных ферментов не приведено

№ ФП	Клонированные гены	Содержание ферментов							
		ЦБГ1	ЦБГ2	ЭГ1	ЭГ2	ЭГ3	БГ	БГ <i>A. niger</i>	ЭГ4 <i>T. reesei</i>
1	Штамм-реципиент B1-537	35	21	5	3	2	3	-	-
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью целлобиогидролазного промотора <i>cbh1</i>									
2	ЭГ4	23	15	2	2	3	3	-	24
3	БГ	40	17	4	4	4	3	11	-
4	БГ + ЭГ4	27	20	5	3	5	3	18	1
5	ЦБГ1+ЭГ2+БГ	30	14	6	30	2	3	8	-
6	ЦБГ1+ЭГ2+БГ+ЭГ4	27	12	5	35	2	3	10	1
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью гистонового промотора <i>h4.1</i>									
7	ЦБГ1+БГ	37	20	7	5	6	3	5	-

Контрольный препарат № 1 содержал базовый комплекс собственных целлюлолитических ферментов штамма-реципиента *P. verruculosum* B1-537, который имел следующий состав (здесь и далее – в % от общего содержания белка в ферментном препарате, таблица 1): ЦБГ1 – 35 %, ЦБГ2 – 21 % (суммарное содержание целлобиогидролаз – 56 %), суммарное содержание эндоглюканаз (ЭГ1, ЭГ2, ЭГ3) – 10 %, БГ – 3 %.

Ферментный препарат № 2, полученный с помощью рекомбинантного штамма с клонированным геном гетерологичной ЭГ4 *T. reesei*, содержал существенное её количество – 24 %, при этом собственный целлюлазный комплекс *P. verruculosum* оказался несколько редуцирован, наиболее заметно уменьшилось содержание ЦБГ1 (с 35 до 23 %, табл. 1). Гидролитическая способность полученного ферментного препарата по отношению к МКЦ и измельченной осиновой древесине несколько превосходила таковую для контрольного препарата №1 (выход ВС после 24 часов гидролиза МКЦ и осиновой древесины составлял 18 и 30 г/л для рекомбинантного ферментного препарата № 2 по сравнению с 16 и 28 г/л для контрольного препарата № 1, соответственно, табл. 2).

Как отмечалось выше, бета-глюкозидаза является ферментом, гидролизующим до глюкозы целлобиозу. Это является важным не только для получения глюкозы, как целевого продукта, но и для общего увеличения эффективности процесса ферментативной конверсии целлюлозосодержащего сырья эндоглюканазами и целлобиогидролазами, поскольку целлобиоза ингибирует эти ферменты (глюкоза обладает значительно меньшим ингибирующим эффектом, чем целлобиоза) [3]. Таким образом, обеспечение достаточно высокого содержания β-глюкозидазы является необходимым условием высокой гидролитической способности целлюлолитического ферментного комплекса.

Ферментный препарат № 3 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированным геном гетерологичной БГ *A. niger* и содержал в дополнение к собственной гомологичной БГ (3 % от общего содержания белка) БГ *A. niger* (11 %, табл. 1). Отметим при этом, что препарат № 3 характеризовался практически полным сохранением состава собственного целлюлазного комплекса *P. verruculosum* по сравнению с контрольным препаратом № 1: ЦБГ1 – 40 %, ЦБГ2 – 17 % (суммарное содержание целлобиогидролаз – 57 %), суммарное содержание эндоглюканаз – 12 %.

Ферментный препарат № 4 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированными генами гетерологичных БГ *A. niger* и ЭГ4 *T. reesei* (18 и 1 % от общего содержания белка, соответственно, табл. 1). Этот препарат характеризовался некоторым уменьшением содержания собственной ЦБГ1 (27 %), при этом содержание ЦБГ2 (20 %) и суммарное содержание эндоглюканаз (13 %) практически не изменилось по сравнению с базовым целлюлазным комплексом *P. verruculosum*.

Гидролитическая способность препаратов № 3 и 4 по отношению к МКЦ превышала контрольные значения почти в 2 раза (выход ВС составил 32-33 г/л, табл. 2). Выход ВС при гидролизе измельченной осиновой древесины препаратами № 3 и 4 составил около 35-36 г/л, что превышало выход ВС при гидролизе этого субстрата контрольным ферментным препаратом №1 в 1,3 раза.

Препарат № 5 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированными генами гомологичных ЦБГ1 и ЭГ2, а также с клонированным геном гетерологичной БГ *A. niger* – этот препарат имел близкое с контрольным содержание ЦБГ1 (30 %) и заметно увеличенное содержание ЭГ2 (30 %); содержание гетерологичной БГ *A. niger* составило 8 %. Препарат характеризовался заметным пониженным по сравнению с контрольным содержания собственной ЦБГ2 (14%, табл. 1).

Препарат № 6 был получен с помощью рекомбинантного штамма *P. verruculosum* с клонированными гомологичными генами ЦБГ1 и ЭГ2, а также клонированными гетерологичными генами БГ *A. niger* и ЭГ4 *T. reesei* – он содержал 27 % ЦБГ1 35 % ЭГ2, 12% ЦБГ2, 10% БГ *A. niger* и 1% ЭГ4 (табл. 1).

Гидролитическая способность препаратов № 5 и 6 по отношению к МКЦ (выход ВС 25 и 31 г/л, соответственно) была выше, чем у контрольного ферментного препарата №1 (выход ВС – 16 г/л); гидролитическая способность этих препаратов по отношению к измельченной осиновой древесине также превосходила таковую для контрольного препарата (выходы ВС составили 30 и 32 г/л против 28 г/л у контрольного препарата № 1, табл. 2). Однако, в целом, гидролитическая способность препаратов № 5 и 6 несколько уступала таковой для препаратов № 3 и 4. Причиной этого может быть уменьшение общего содержания ферментов целлюбиогидролизного блока у препаратов №5 и 6 (суммарное содержание целлюбиогидролаз у этих ФП уменьшилось до 44 и 39 % по сравнению с 56 % у контрольного препарата № 1). Уменьшение содержания целлюбиогидролаз у препаратов №5 и 6 происходит за счёт заметного увеличения содержания ЭГ2 – до 30-35 % в рекомбинантных препаратах по сравнению с 9% у контрольного препарата № 1.

Обобщая результаты исследований, связанных с клонированием генов эндоглюканаз ЭГ4 *T. reesei* и ЭГ2 *P. verruculosum*, целлюбиогидролазы ЦБГ1 *P. verruculosum*, а также БГ *A. niger* с использованием *cbh1* промотора, следует заключить, что дополнительное введение гомологичных и гетерологичных целлюлаз и монооксигеназ в состав исходного целлюлазного комплекса *P. verruculosum* несомненно позволило увеличить его гидролитическую способность. Особенно заметно гидролитическая способность увеличивалась в случае клонирования индивидуального гена БГ *A. niger* (препарат № 3, содержание БГ *A. niger* составило 11 %), а также совместного клонирования генов ЭГ4 *T. reesei* и БГ *T. reesei* (препарат № 4 содержащий 1 % ЭГ4 и 18 % БГ) – очевидно, что увеличение гидролитической способности этих ферментных препаратов по сравнению с контрольным было достигнуто в первую очередь за счёт увеличения содержания БГ без заметного редуцирования содержания других ферментов целлюлазного комплекса *P. verruculosum*, в особенности целлюбиогидролаз, являющихся основными деструкторами целлюлозы.

Одновременное клонирование генов ЭГ2, ЦБГ1 и БГ *A. niger* (препарат № 5), а также генов ЭГ4 *T. reesei*, ЭГ2, ЦБГ1 и БГ *A. niger* (препарат № 6) тоже приводило к увеличению гидролитической способности соответствующих рекомбинантных ферментных препаратов – это происходило за счет увеличения содержания ЦБГ1, ЭГ2 и БГ. По всей вероятности, можно было бы ожидать большего увеличения гидролитической способности препаратов ФП № 5 и 6, если бы содержание в них ЭГ2 было бы меньше, а содержание ЦБГ1, напротив, было бы увеличено.

Таблица 2. Гидролитическая способность ферментных препаратов (ФП), полученных с помощью рекомбинантных штаммов *P. verruculosum* (выход ВС через 24 часа гидролиза), дозировка ФП по белку – 5 мг/г субстрата, концентрация субстрата – 100 г/л (pH 5,0, 50 °C)

№ ФП	Клонированные гены	МКЦ, [ВС], г/л	Измельчённая осиновая древесина [ВС], г/л
1	Штамм-реципиент B1-537 (продуцент контрольного ФП)	16	28
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью целлюбиогидролазного промотора <i>cbh1</i>			
2	ЭГ4	18,0 ± 0,1	30 ± 0,2
3	БГ	33,0 ± 0,2	36 ± 0,3
4	БГ + ЭГ4	32 ± 0,2	35 ± 0,2
5	ЦБГ1+ЭГ2+БГ	25 ± 0,1	30 ± 0,2
6	ЦБГ1+ЭГ2+БГ+ЭГ4	31 ± 0,2	32 ± 0,2
Ферменты, гены которых были клонированы с помощью гистонового промотора <i>h4.1</i>			
7	ЦБГ1+БГ	32 ± 0,2	36 ± 0,3

Клонирование гена индивидуальной ЭГ4 *T. reesei* (препарат № 2 содержащий 24 % ЭГ4) в нашем случае приводило к определённой увеличению гидролитической способности препарата № 2 по сравнению с контролем – вероятно, за счёт существенного увеличения содержания ЭГ4, однако, уровень гидролитической способности препарата № 2 отстаёт от максимально достигнутого, что происходит, очевидно, за счёт редуцирования уровня общего содержания целлюлогидролаз (38 %) и эндоглюканаз (7 %) по сравнению с базовым целлюлазным комплексом *P. verruculosum*, имеющего в своём составе 56 % целлюлогидролаз и 10 % эндоглюканаз, соответственно.

Некоторое уточнение оптимального состава целлюлазного комплекса были осуществлено нами с использованием альтернативной системы экспрессии, основанной на применении менее «сильного», чем *cbh1* конститутивного промотора гена *h4.1* *P. verruculosum*, кодирующего белок гистон H4.1, относящимся к классу ядерных белков, выполняющих две основные функции – участие в упаковке нитей ДНК в ядре и осуществление регуляции таких ядерных процессов, как транскрипция, репликация и репарация. Характерной особенностью такой системы экспрессии является то, что её использование не сильно меняет состав исходного ферментного комплекса и не влияет на продуктивность гриба [8].

В качестве реципиентного был использован штамм *P. verruculosum* Hist4 [8]. С помощью гистонового промотора *h4.1* были одновременно клонированы гены ЦБГ1 *P. verruculosum* и БГ *A. niger*. В результате был получен новый рекомбинантный штамм и, его помощью, новый ферментный препарат № 7, состав которого был следующим: ЦБГ1 – 37 %, ЦБГ2 – 20 %, суммарное содержание эндоглюканаз – 18 %, содержание гетерологичной БГ *A. niger* – 5 %, содержание гомологичной БГ *P. verruculosum* – 3 % (табл. 1). Этот ферментный препарат имел повышенную гидролитическую способность и обеспечивали выход ВС при гидролизе МКЦ до 32 г/л, при гидролизе измельчённой осиновой древесины – до 36 г/л (табл. 2). Отметим, что препарат № 7 характеризовался примерно такой же гидролитической способностью, как и наилучшие с этой точки зрения препараты №3 и 4, полученные с помощью использования *cbh1* промотора.

Таким образом, обобщая полученные данные, можно заключить, что оптимальным составом целлюлазного комплекса для осуществления максимально эффективного процесса биоконверсии целлюлозы может быть следующий: ЦБГ1 – 36-41 %, ЦБГ2 – 16-19 %, суммарное содержание эндоглюканаз – 12-18 %, содержание гетерологичной БГ *A. niger* 5-11 %. Кроме того, в состав ферментного комплекса могут входить полисахаридмонооксигеназы (семья AA9, в нашем случае – ЭГ4 *T. reesei*), содержание которых должно составлять от 1 % и более (но меньше 24 %).

Список литературы / References:

1. Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts. First edition. Wiley and Sons, ed. V.S.Bisaria, A. Kondo, New York, 2014.
2. From the Sugar Platform to biofuels and biochemical. Final report for the European Commission Directorate-General Energy, April 2015, 136 p.
3. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. Depolymerization of natural biopolymers. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Chemistry of biomass: biofuels and bioplastics*, Moscow, 2017, pp. 65-69.
4. Jung K., Hee J.L., In-Geol C., Kyoung Hean K. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17 August, 2014, epub, DOI: 10.1007/s00253-014-6001-3.
5. Harris P. V., Welner D., McFarland, K.C., Re E., Poulsen J.C.N., Brown K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S., Xu F., Cherry J., Larsen S., Leggio L.L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase Family 61: structure and function of large, enzymatic family. *Biochemistry*, 2010, vol. 49, pp. 3305-3316.
6. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunev O.N., Soloveva I.V., Bubnova T.V., Kondratieva E.G., Synitsyn A.P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparation of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2005, vol. 41, pp. 182-184.
7. Martins L.F., Kolling D., Camassola M., Dillon A.J., Ramos L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technol.*, 2008, vol. 99, pp. 1417-1424.
8. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkoba O.G., Sinitsyn A.P. Heterologous β -glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multienzyme cocktail. *Process Biochemistry*, 2015, vol. 50, pp. 1258-1263.
9. Sinitsyn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinitsyna O.A., Kondratieva E.G., Zorov I.N., Okunev O.N., Nemashkalov V.A., Matys V.Yu., Koshelev A.V. Production of highly effective enzyme complexes of cellulases and hemicellulases for the hydrolysis of plant materials based on the strain *Penicillium verruculosum*. *Biotechnologia*, 2013, no. 5, pp. 40-53.
10. Proskurina O.V., Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N., Nemashkalov V.A., Sinitsyna O.A., Sinitsyn A.P. The use of technology "fusion" to create high-performance biocatalysts, based on recombinant strains of the fungus *Penicillium verruculosum* for the conversion of biomass cellulose containing biomass. *Catalysis in Industry*, 2013, no. 5, pp. 65-73.

**BIOCONVERSION OF RENEWABLE PLANT FEEDSTOCKS INTO USEFUL PRODUCTS –
OPTIMIZATION OF CELLULASES ENZYME COMPLEX**

**Sinitsyn A.P.^{1,2}, Shahskov I.A.², Gusakov A.V.^{1,2}, Sinitsyna O.A.^{1,2}, Rozhkova A.M.^{1,2},
Zorov I.N.^{1,2}, Kondratieva E.G.², Korotkova O.G.², Rubtsova E.A.², Semenova M.V.², Satrutdinov A.D.²,
Osipov D.O.², Volkov P. V.², Bashirova A.V.², Dotsenko A.S.²**

¹ M.V.Lomonosov Moscow State University
Leninskie gory str., 1, Moscow, 119991, Russia

² FRC Biotechnology RAS
Leninskiy dis., 33, Moscow, 119071, Russia

Abstract. Plant biomass is the main type of organic matter on Earth. Cellulose of plant biomass can be converted enzymatically into glucose, from which further can be obtained different fuels (ethanol, butanol, etc.), ethylene, organic and amino acids, polymers, feed protein and many other useful products. For bioconversion of cellulose-containing raw materials into glucose, hydrolytic enzymes of three types are required: endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase, as well as oxidoreductase (polysaccharide monooxygenase). In this paper, we studied the possibility of improving the hydrolytic ability of the secretory enzyme complex *Penicillium verruculosum* by adding to it by genetic engineering methods of homologous and heterologous cellulases in various combinations and ratios: polysaccharide monooxygenase (endoglucanase IV) *Trichoderma reesei*, endoglucanase II and cellobiohydrolase I *P. verruculosum*, and β -glucosidase *Aspergillus niger*. The optimal ratio of the components of the cellulase complex to increase the efficiency of the enzymatic destruction of cellulose was determined, an increase in the catalytic activity of enzyme preparations obtained with the help of new recombinant strains-producers was achieved up to two times compared with the basic enzyme preparation of the initial strain of *P. verruculosum*.

Key words: cellulases, renewable plant biomass, cellulose enzymatic conversion, genetic engineering, *Penicillium verruculosum*.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛНОЙ СИСТЕМЫ ПРИРОДНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ

Замятнин А.А.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,
Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН
Ленинский просп., 33, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: aaz@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. Проведен анализ массива данных о структурах и функциях молекул природных пептидов. Рассмотрено понятие олигопептида не только с химической точки зрения, но и с точки зрения математических представлений о малых числах. Описаны общие принципы биогенеза природных олигопептидов из специализированных неспециализированных предшественников. На основании этих представлений сформулировано понятие полной системы молекул данного типа. Показано, какие физические принципы лежат в основе функциональной активности олигопептидов. В качестве примера на основании информации базы данных EROP-Moscow о структурно-функциональных характеристиках олигопептидов, обладающих нейрональной, антимикробной, гормональной и фермент-ингибирующей активностью, рассмотрен ряд математических, химических, физических и биологических особенностей совокупности природных олигопептидов. Показано существенное отличие этих веществ от полипептидных молекул белков по физико-химическим характеристикам. Эти характеристики могут быть ключевыми в понимании молекулярных механизмов действия олигопептидов, приводящих к проявлению физиологических эффектов.

Ключевые слова: олигопептид, белок, фрагмент, структура, функция, регуляция, активность, биогенез, база EROP-Moscow.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что структура и функции представляют собой базовые характеристики молекул живой природы. Их тесная взаимная связь послужила основанием для И.П.Павлова в 1900 г. объединить биохимию и физиологию единым понятием “молекулярная физиология” [1], что в последствии привело к широкому распространению терминов “биологически (или физиологически) активные вещества (или соединения)”.

Среди природных физиологически активных веществ широко распространены как низкомолекулярные соединения (пурины, пиримидины, аминокислоты и многие другие) и их производные, так и высокомолекулярные полимерные соединения, среди которых особое место занимают вещества пептидной природы – олигопептиды и полипептиды (белки). Одни лишь олигопептиды обладают колоссальным структурным и функциональным разнообразием, они присутствуют во всех живых организмах и являются предметом изучения в десятках странах мира тысяч исследователей в области биохимии, биофизики, биоорганической химии, молекулярной биологии, физиологии, медицины и многих других смежных наук. Соответствующие исследования включают в себя их выделение из живого организма, очистку, определение аминокислотного состава и последовательности, выявление функциональной роли и величин активности, локализации в различных органах и тканях, нахождение структурных генов, содержащих сведения о предшественниках, исследование процессинга, искусственный синтез природных структур, дизайн и поиск новых высокоактивных пептидов, выявление механизмов связывания с рецепторными структурами, практическое применение и многие другие задачи. Подобный фронт исследования объединяет множество разных специалистов, но на многие принципиальные вопросы пока еще нет удовлетворительных ответов. Согласно библиографической базе данных PubMed количество публикаций, посвященных веществам пептидной природы превышает 120 000 в год, однако вопрос о специфических структурно-функциональных свойствах этого особого класса биологически активных соединений остается раскрытым неполностью. Так, например, при интенсивном выявлении первичных и пространственных структур, лавинообразном потоке исследований функциональных свойств нельзя считать, что нам уже в достаточной мере известны основные физико-химические принципы взаимодействия пептидных и рецепторных структур и основанные на них механизмы и общие принципы организации физиологических функций.

В связи с этим представляется важным найти способ единого рассмотрения совокупности свойств веществ пептидной природы и на данной основе попытаться выявить их универсальные структурные и функциональные характеристики. В данной работе предпринята попытка рассмотреть полную систему природных пептидов, включающую в себя как выявленные природные структуры олигопептидов, так и возможные олигопептидные фрагменты природных полипептидов – белков. Это рассмотрение основано на использовании данных базы EROP-Moscow (Endogenous Regulatory OligoPeptides, <http://erop.inbi.ras.ru/>), в которой собрана известная к настоящему времени информация о структуре и функциях выявленных олигопептидных регуляторов, образующихся обычно в результате рибосомального синтеза [2-5].

Понятие олигопептида. Для того, чтобы иметь представление о полной системе природных олигопептидов, прежде всего необходимо дать максимально строгое определение тому, что из себя представляют олигопептиды и выяснить, какие из них можно считать природными.

Очевидно, что точного определения олигопептида не существует. Тем не менее, широко используются термины “олигопептид” и “полипептид”, которые предназначены именно для пептидов с небольшим и большим числом аминокислотных остатков соответственно. Вторая из двух составных частей этих слов “пептид” имеет точное химическое определение (вещества, содержащие пептидную связь). Что же касается первых частей, то они, имея греческое происхождение, *оλίγο* (немного) и *πολύ* (много), не дают ясного представления о численном значении, являющемся величиной математической. В то же время для понятия “олигопептид” в различных источниках можно найти вполне определенные толкования. Так, в фундаментальном труде “Peptides: Chemistry and Biology” [6, стр. 7] олигопептидами названы вещества, в которых содержится менее 15 аминокислотных остатков, полипептидами – структуры, содержащие от 15 до 50 остатков, а более крупные молекулы считаются белками. В научной литературе и интернете существуют также доступные определения, в которых утверждается, что олигопептиды содержат не более 10 [7], 20 [8] аминокислотных остатков и некоторые другие величины.

Ввиду того, что в этой проблеме определяющими понятиями являются числа, обратимся к представлениям из математики (теории чисел). Для этого воспользуемся соображениями А.Н.Колмогорова о малых и больших числах [2, 3, 9, 10], представленные им в 1958 г. на семинаре, участником которого был автор данной работы (как позднее выяснилось, Колмогоров данные соображения никогда не публиковал). Им было предложено использовать понятие о величине системы счисления S (например, $S = 10$ в десятичной системе счисления). Следовательно, малыми числами n следует называть те, значение которых близко к величине системы счисления S , т.е. $S \geq n > S$, а большими – те, которые много больше той же величины системы счисления, т.е. $n \gg S$. В нашем случае величиной системы счисления может служить набор так называемых стандартных аминокислотных остатков, число которых равно 20. Тогда число аминокислотных остатков p в олигопептиде должно удовлетворять условиям $p \leq 20$ и $p > 20$, а в полипептиде $p \gg 20$. Поскольку наименьшим пептидом является дипептид (т.е. $p \neq 1$), то в применении к этому случаю первое неравенство может быть преобразовано в конкретный числовой интервал, который следует записать как

$$2 \leq p < 20.$$

Эти математические соображения позволяют определить олигопептиды как молекулы, содержащие от двух до нескольких десятков аминокислотных остатков, т.е. верхняя граница между олигопептидами и полипептидами устанавливается все же лишь приблизительно. Более определенному установлению такой границы может помочь физическое рассмотрение поведения линейных пептидных структур в растворе. Очевидно, что их выступающие наружу боковые и концевые группы ввиду значительной конформационной подвижности всей молекулы [11] хорошо доступны окружению (например, рецепторам). При отсутствии сильных химических S–S связей и ввиду наличия большого числа степеней свободы малая пептидная молекула может принимать практически любую конформацию. Однако с увеличением длины из-за тенденции усиления совокупности слабых внутримолекулярных взаимодействий число степеней свободы отдельных химических групп и конформационная подвижность олигопептидов в общем случае должны уменьшаться и, как следует из термодинамических (калориметрических) исследований, при $p > 50$ они способны образовывать достаточно устойчивые глобулы [12]. Такие структуры уже имеют ограниченный доступ ряда своих химических групп к возможным рецепторам, что может обусловить для них иной спектр функциональной активности.

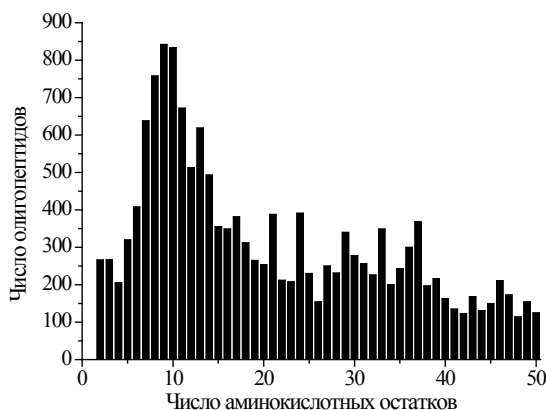


Рисунок 1. Распределение всех природных олигопептидных структур по числу аминокислотных остатков в базе EROP-Moscow (15437 последовательностей)

Таким образом, вблизи величины $p \sim 50$ в общем случае начинает наблюдаться стабилизация пространственной структуры пептидных молекул и их разделение на неглобулярные и глобулярные. Эта величина и была выбрана нами в качестве условной верхней границы длины олигопептидов и использована в качестве предельной длины вводимого в базу данных олигопептида, т.е. с учетом всех отмеченных представлений олигопептидный интервал должен быть записан как $2 \leq p < \sim 50$. Ввиду необходимости оперирования с конкретными значениями p , включая и граничные, верхнее ее значение было принято равным 50. Следовательно, область существования олигопептидов p в нашем случае (и в базе EROP-Moscow) заключена между величинами 2 и 50 и характеризуется неравенством $2 \leq p \leq 50$. Распределение числа всех занесенных в базу олигопептидов в этом интервале показано на рис. 1. Это распределение характеризуется максимумом при $p \sim 10$, положение которого пока не получило должного физико-химического и биологического обоснования.

Гриродные олигопептиды. Очевидно, что природными являются олигопептиды, обнаруживаемые в живой природе. Однако их биогенез может быть разным. Большинство известных регуляторных олигопептидов образуются в организме из специализированных полипептидных (белковых) предшественников в результате отщепления сигнального пептида и про-пептида(ов). Этот процесс характерен как для крупных белковых структур [13, 14], так и для олигопептидных регуляторов, содержащих от 2 до ~ 50 аминокислотных остатков [3, 15]. Простым примером белка является сывороточный альбумин быка, состоящий из 583 аминокислотных остатков [16]. Его предшественник, содержащий 607 остатков, распадается на: сигнальный пептид (остатки 1-18), про-пептид (19-24) и собственно сывороточный альбумин (25-607) [17]. В случае регуляторных олигопептидов, например, гормона кортиколиберина человека [18], его предшественник (194 остатка) включает сигнальный пептид (1-24), про-пептид (25-153) и гормон (154-194) [19].

Однако часто предшественники содержат информацию не об одной функционально значимой структуре. Типичным представителем такого полипептида является про-опиомеланокортин (ПОМС). Как следует из названия, в нем присутствуют разные структуры, обладающие также и разными функциями – регуляторов нервной (опиоиды) и эндокринной систем. Предшественник ПОМС, например, человека содержит 267 аминокислотных остатков [20], от которого сначала отщепляется сигнальный пептид (1-26). Остающаяся последовательность и представляет собой ПОМС, распадающийся затем на 4 части: альдостерон-стимулирующий пептид (27-102) [21], включающий последовательность γ -меланотропина (77-87) [22], пептид с неизвестной функцией (105-135) [23], АКГ (138-176) [24] с участком α -меланотропина (138-150) [24] и β -липотропин (179-267) [25], включающий в себя γ -липотропин (179-234) с последовательностью β -меланотропина (217-234) [26], а также β -эндорфин (237-267) [27] с последовательностями γ - и [28] α -эндорфинов [29]. Дипептидные участки 104-105, 136-137 и 177-178 являются лизил-аргининовыми (RK) парами, которые узнаются расщепляющими предшественник протеазами и высвобождаются [30].

Следует отметить, что первые пять аминокислотных остатков β -эндорфина представляют собой последовательность мет-энкефалина [31], но данный олигопептид не высвобождается из структуры ПОМС, а образуется из своего собственного специализированного предшественника [32]. Этот предшественник организован по тем же, как описано выше, принципам и содержит последовательности одного лей- и шести мет-энкефалинов. Содержание более одной копии одного и того же олигопептида не является редкостью и их число может быть весьма большим. Например, предшественник нейропептидов моллюска *Aplysia californica* содержит 28 структур тетрапептида FMRF и, кроме того, одну структуру FLRF [33]. Большинство этих олигопептидов разделены (фланкированы) лизил-аргининовыми парами в разных сочетаниях этих аминокислотных остатков.

После высвобождения из предшественников процесс формирования укороченных структур во многих случаях не заканчивается. Например, у олигопептидов уже давно отмечено сосуществование множественных форм, которые образуются в результате дальнейших ферментативных реакций, приводящих к образованию все более коротких олигопептидов. Так, расшифровка аминокислотной последовательности одного из первых известных олигопептидов – ангиотензина (ранее называвшегося гипертензином) – сразу привела к выявлению двух структур, состоящих из десяти (1-10) и восьми (1-8) аминокислотных остатков, которые были названы соответственно ангиотензинами I и II [34]. Однако позднее оказалось, что существуют еще по крайней мере четыре более короткие природные формы этих олигопептидов – ангиотензины III (2-8), IV (2-10), V (3-8) и VI (4-8) [35]. В результате детальных исследований были выявлены ферменты, участвующие в их образовании, и показано, что такие структуры могут существовать одновременно. Впоследствии стало ясно, что полиморфизм олигопептидов является довольно распространенным явлением, и он обнаружен у соматостатина [36-38], атриального натриуретического пептида [39, 40] и многих других олигопептидных регуляторов. Поэтому среди тысяч уже открытых олигопептидов может оказаться немало таких, которым также свойственен полиморфизм, но пока их частичные структуры экспериментально не идентифицированы.

Кроме того, появляется все больше и больше свидетельств тому, что в разных органах и тканях живых организмах присутствуют еще и пептидные структуры, которые образуются не из специализированных предшественников, а являются природными фрагментами хорошо известных белков. Большое число фрагментов α - и β -цепей гемоглобина было выявлено в мозге [41-43] и шишковидной железе [44] быка, казеина – в коровьем молоке [45, 46] и во множестве других источников. Очевидно, что такие фрагменты белков также необходимо считать природными.

Полная система олигопептидов. В процессе трансляции первично всегда образуются только линейные пептидные структуры, поэтому можно провести простейший математический анализ числа возможных линейных комбинаций аминокислотных остатков, т.е. числа возможных олигопептидов с разной аминокислотной последовательностью.

В соответствии с известной формулой число возможных природных пептидных структур N , составленных из разных комбинаций аминокислотных остатков и включающих аминокислотные повторы:

$$N_p = n^p,$$

где p – число аминокислотных остатков в молекуле, а n – число разных аминокислотных остатков, равное 20. В случае дипептидов, когда $p = 2$, $N_2 = 400$, трипептидов при $p = 3$, $N_3 = 8000$, тетрапептидов при $p = 4$, $N_4 = 160000$ и т.д. Таким образом, с ростом длины пептидной структуры быстро растет число возможных комбинаций остатков и на другом конце интервала $2 \leq p \leq 50$, т.е. при $p = 50$, где $N_{50} \sim 10^{34}$. Однако такое разнообразие аминокислотных последовательностей природой не реализуется. Еще в 1984 г. было показано, что все возможные комбинации аминокислотных остатков могут быть найдены в белках только при очень малых p , а, например, при $p = 8$ их число составляет уже всего лишь доли процента [47]. Таким образом, далеко не все комбинации аминокислотных остатков могут существовать в природе, но все же разнообразие возможных природных первичных структур следует признать гигантским и совокупность этих структур представляет собой полную систему природных олигопептидов в рассматриваемом интервале p . В нее входят олигопептиды как образующиеся из специализированных предшественников, так и фрагменты белков.

Физические особенности природных олигопептидов. Рассмотрение физических особенностей обусловлено тем, что многие образующиеся в живом организме олигопептиды обладают специфическими функциональными свойствами и эти свойства проявляются в результате реального физического взаимодействия (первичного акта) олигопептидных молекул с другими молекулярными структурами, например, с рецепторами. Кроме того, внутри молекулы олигопептида также осуществляются взаимодействия, определяющие ее пространственную структуру, дающую ей возможность участвовать во внешних взаимодействиях. В то же время конформацию молекулы в данный момент времени определяет совокупность внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Как уже отмечено выше, олигопептиды, не имеющие S–S связей, обладают большой конформационной подвижностью и способны подстраивать свою форму под конфигурацию рецепторной структуры. В результате образуются различные лиганд-рецепторные комплексы, где в роли лигандов выступают олигопептиды. Образование подобного комплекса представляет собой первый (элементарный) шаг последующей в дальнейшем функциональной реакции.

Конформационное многообразие одной молекулы олигопептида может быть продемонстрировано компьютерным моделированием с помощью многочисленных программ, позволяющих минимизировать энергию и оптимизировать конфигурацию. Это возможно при конструировании исходных молекул с разными стартовыми углами ϕ и ψ . На рисунке 2 показано, что при таком подходе получаются очень разные конформации, от полностью развернутой (рис. 2а) до компактной структуры с 3 водородными связями (рис. 2г). Первая структура (рис. 2а) по конфигурации очень близка к одной из тех, которая получена в результате рентгеноструктурного анализа [11, 48].

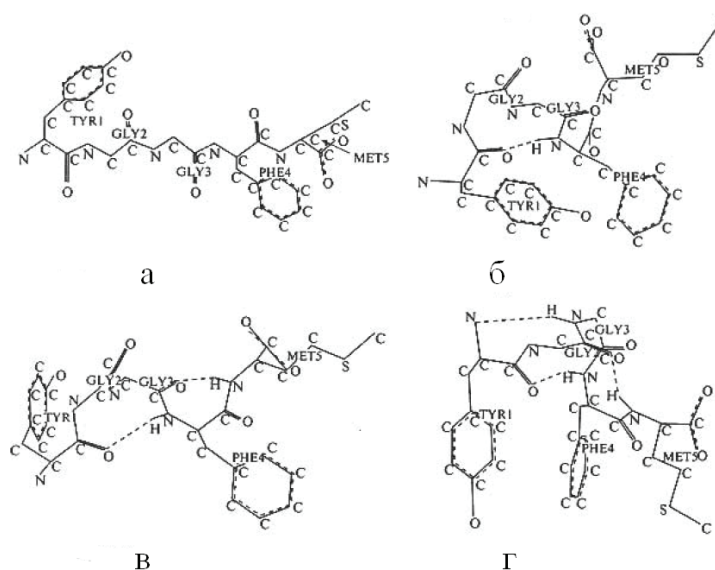


Рисунок 2. Пространственные структуры мет-энкефалина, полученные в результате компьютерного моделирования при разных стартовых углах: а – максимально развернутая; б-г – с одной-тремя внутренними водородными связями

В основе многообразия всех этих взаимодействий лежит химическое разнообразие аминокислотных остатков, которые обладают различными физическими характеристиками своих химических групп. К подобным взаимодействиям обычно относят ионные, ион-дипольные, диполь-дипольные (вандерваальсовские), водородные связи [6, 49], а также стэкинг (стопочные) взаимодействия [50]. Они называются слабыми, поскольку их энергии существенно (на порядки величины) меньше, чем у химических связей (например, пептидных или S–S связей), представляющих собой сильные взаимодействия. У слабых взаимодействий наибольшими энергиями обладают ионные, в которых участвуют положительно и отрицательно заряженные боковые группы аминокислотных остатков, а также незаблокированные заряженные ^+N - и ^-C -концевые группы олигопептида. Причем, чем меньше число остатков в олигопептиде, тем больше роль этих групп.

Возможная роль заряженных групп в осуществлении ионных взаимодействий была нами ранее исследована [51–53] при сравнении аминокислотных составов известных к тому времени 152 физиологически активных олигопептидов и 569 случайно выбранных белков [54]. В результате анализа оказалось, что содержание отрицательно заряженных остатков аспарагиновой (D) и глутаминовых кислот (E) у исследованных олигопептидов было достоверно в два раза меньше, чем у белков. Превалирование положительно заряженных аминокислотных остатков у олигопептидов и пониженное содержание отрицательно заряженных в сравнении с белками можно наблюдать и при сравнении всей совокупности современных данных баз EROP-Moscow и UniProt [9, 10]. На возможное особое значение положительного заряда в олигопептидах указывает также и то, что почти 30% структур EROP-Moscow на C-конце амидированы, т.е. лишены отрицательного заряда, в то время как N-конец в подавляющем числе случаев несет положительный заряд.

Кроме того, заметным оказалось то, что в олигопептидах чаще, чем в белках, встречаются остатки, с циклическими группами (F, H, P, W, Y). К ним следует также отнести и циклический остаток пироглутамин, встречающийся у ~ 5% природных олигопептидов. Он образуется в результате посттрансляционной модификации замыкания боковой группы N-концевого остатка глутамина (N) на N-концевую группу [13, 55, 56]. Эти циклические группы могут быть потенциальными участниками стэкинг взаимодействий.

В дальнейшем, когда число расшифрованных структур природных олигопептидов стало достаточно большим, оказалось возможным проанализировать аминокислотный состав совокупности олигопептидов с одинаковым типом функциональной активности. Существенное превалирование положительно заряженных групп (включая N-концевые) и аминокислотных остатков, содержащих циклическую группу, было показано при анализе олигопептидных токсинов [57], нейропептидов [58] и антимикробных олигопептидов [59]. Наиболее ярко физические особенности можно представить на примере антимикробных агентов, среди которых существует множество структур с большим содержанием положительно заряженных остатков лизина (K) и/или аргинина (R), и которые образуют α -спиральные структуры. Многочисленные примеры такого рода указывают на то, что положительно заряженные поверхностные области олигопептида являются основой для электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными группами (областями) рецепторной структуры (позднее похожие выводы были сделаны при изучении возможного участия электростатических взаимодействий в системе белок-белок [60, 61]). Другие же, более слабые взаимодействия, по-видимому, участвуют в подгонке пространственных структур олигопептидного лиганда и рецептора.

Очевидно, что пространственная конфигурация (конформация) олигопептида определяет возможность взаимодействия тех или иных химических групп олигопептида с рецептором. При этом олигопептиды, содержащие остатки C и, как правило, дисульфидные связи S–S обладают меньшим числом потенциально возможных конформаций. Однако и такие олигопептиды могут отличаться по характеру действия даже в случае большой линейной гомологии (сходства) их структур. Так, первичная структура эндотелинов – мускулосуживающих олигопептидов, необходимых для поддержания гомеостаза кровеносных сосудов сосудопитающихся [62], оказалась чрезвычайно близкой к структуре сильнейших токсинов – сарафотоксинов, содержащихся в яде синайской земляной гадюки *Atractaspis engaddensis* [63]. Все они состоят из 21 аминокислотного остатка, из которых четыре являются C, расположенными абсолютно одинаково в пептидной цепи. Таким образом, при наличии двух S–S связей, образующих бициклическую структуру, и сильно снижающих число степеней свободы, данные молекулы тем не менее могут принимать принципиально разные конформации и участвовать в совершенно разных лиганд-рецепторных образованиях. В результате при примерно одинаковых концентрациях эндотелин вызывает лишь некоторое повышение кровяного давления, а сарафотоксины – оказывают летальное действие, вызывая остановку сердца у подопытных животных.

На основании анализа совокупности природных олигопептидов, обладающих широким спектром функциональной активности, нами предложен [58] двухступенчатый механизм взаимодействия олигопептидного лиганда с рецептором. Первый шаг представляет собой сближение лиганда и рецептора на основе электростатического взаимодействия положительно заряженных групп (N-концевых и/или боковых) олигопептида с отрицательно заряженными участками рецептора. В результате этого происходит неспецифическое узнавание (грубое) места присоединения одного к другому. После этого (второй шаг) осуществляется их специфическое узнавание на основе детальной (тонкой) подгонки элементов участвующих в данном процессе структур. При этом к ионным добавляются еще более слабые взаимодействия олигопептида с рецептором, например, межмолекулярные водородные связи, гидрофобные, стекинг-взаимодействия и другие.

Таким образом, у целой молекулы олигопептида или у ее части формируется определенная конформация, характерная для данного типа связывания. Она обладает определенной совокупностью свойств, которую

Г.И. Чипенс предложил назвать сигнатурой [64]. Сигнатура может быть общей для структурно разных химических соединений и эти соединения способны выполнять одинаковую функцию. Среди природных веществ существует огромное число олигопептидов, которые обладают разной аминокислотной последовательностью, но в одинаковой степени взаимодействуют с одними и теми же рецепторами, вызывая один и тот же физиологический ответ (например, вызывать сокращение гладкой мускулатуры [65]). С другой стороны, одна олигопептидная молекула, обладая возможностью образовывать разные конформации, может описываться разными сигнатурами и, следовательно, способна взаимодействовать с разными рецепторами и вызывать разный физиологический ответ. Это свойство часто называется полифункциональностью (или полипотентностью – термин, предложенный А.М. Уголевым в 1990 г.). Хорошо известно, что огромное число природных олигопептидов (энкефалины, нейротензины, ангиотензины, соматостатины и многие другие) обладают широким спектром функциональной активности, и любой из этих олигопептидов потенциально может быть регулятором и нервной, и эндокринной, и иммунной системы [66, 67].

Взаимосвязь структуры и функций. Функциональный спектр полной системы природных олигопептидов, по-видимому, практически безграничен. С одной стороны, это объясняется огромным числом возможных разных аминокислотных последовательностей олигопептидов. С другой стороны, как следует из рассмотрения физических особенностей олигопептидов, одна молекула, элементы которой обладают большим числом степеней свободы, может принимать множество пространственных конфигураций (конформаций), позволяющих ей взаимодействовать с самыми разными рецепторными структурами и, таким образом, участвовать в разнообразных функциональных реакциях. При этом природные фрагменты более крупных пептидных молекул могут сохранять свои функции, как, например, эндорфины и энкефалины. Однако они могут не обладать функциями исходной молекулы, проявляя другие функциональные свойства. Так, N-концевой фрагмент (13 аминокислотных остатков) адренокортикотропного гормона быка, состоящего из 39 остатков, не обладает функцией АКГТГ высвобождать кортизол, а проявляет активность меланоцитостимулирующего гормона (α -меланотропина) [68, 69].

Функциональное разнообразие природных олигопептидов демонстрируется базой EROP-Moscow таблицами, в которых указано число олигопептидов, обладающих данным типом активности (http://erop.inbi.ras.ru/stat_func.php и http://erop.inbi.ras.ru/stat_func_a.php). В них упоминается почти 200 различных функциональных свойств. В верхней части первой из них (ранжированной) находятся наиболее часто встречающиеся природные олигопептиды: нейропептиды, антимикробные олигопептиды, токсины, гормоны и олигопептиды с идентифицированной первичной структурой, но с неизвестной функцией.

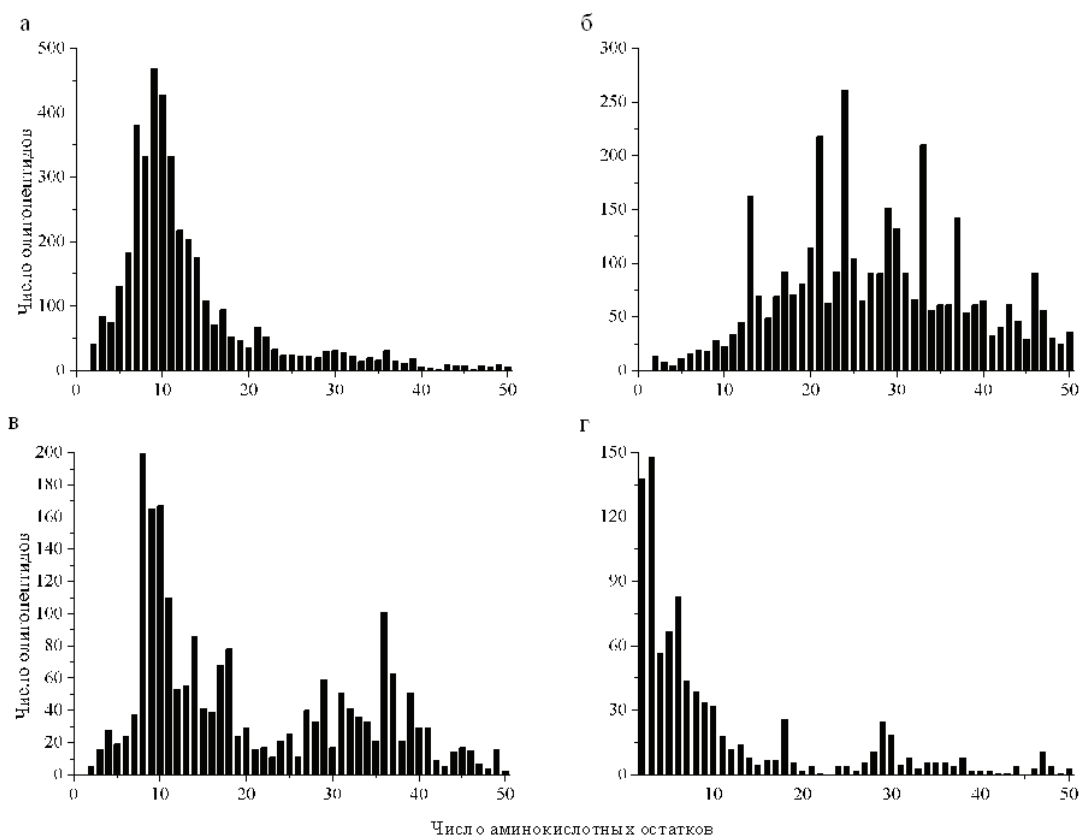


Рисунок 3. Распределение природных функционально различных олигопептидных структур по числу аминокислотных остатков в базе EROP-Moscow: а – нейропептиды (4035); б – антимикробные олигопептиды (2509); в – гормоны (2058); г – ингибиторы ферментов (903)

На рисунке 3 представлены графики распределения олигопептидов с заданной функцией по шкале числа аминокислотных остатков. Наиболее ярким и простым из них является распределение для нейропептидов. Как следует из данных рис. 3а, основная часть нейропептидов заключена в интервале, выбранном для всех данных EROP-Moscow (т.е. от 2 до 50 аминокислотных остатков) и характеризуется пиком вблизи 10 остатков. Очевидно, что именно малые размеры этих регуляторов позволяют им наиболее быстро участвовать в различных проявлениях нейрорегуляции.

В случае антимикробных агентов (рис. 3б) пик распределения сдвинут вправо, а последующее снижение (но еще далекое от нуля) числа этих олигопептидов, очевидно, свидетельствует о том, данный тип активности будет наблюдаться и у молекул, содержащих более 50 аминокислотных остатков. В базе UniProt представлено значительное число таких, более крупных антимикробных олигопептидов.

Более сложная картина наблюдается для распределения олигопептидных гормонов (рис. 3в). Она характеризуется как минимум двумя пиками, и олигопептиды, обладающие этим функциональным свойством, также могут находиться в значительном количестве за пределами интервала EROP-Moscow, что и подтверждается данными базы UniProt.

Еще один тип распределения наблюдается у природных олигопептидных ингибиторов ферментов (чаще всего ингибирующих ангиотензин конвертирующий фермент). Распределение для этих структур представлено на рис. 3г. Оно существенно отличается от предыдущих и близко гиперболическому. Как следует из приведенных данных, большинство таких ингибиторов содержат всего несколько аминокислотных остатков и, таким образом, как и многие нейропептиды, могут обладать высокой подвижностью.

Отмеченные структурно-функциональные особенности характерны в основном для природных олигопептидов, образующихся из специализированных предшественников. Несколько иной спектр функциональной активности может быть у олигопептидных фрагментов, образующихся из пищевых белков под действием протеолитических ферментов [70]. Однако в настоящее время существующей информации об этих олигопептидах недостаточно для того, чтобы делать соответствующие обобщения. Тем не менее, очевидно, что совокупность и тех и других представляет собой некий континуум (континуум – понятие, введенное И.П.Ашмариным и М.Ф.Обуховой [71]), который обеспечивает различные комбинации влияния олигопептидных регуляторов на различные биологические функции организма. Таким образом, в регуляции участвует пул, как эндогенных, так и экзогенных олигопептидных регуляторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа представляет собой попытку сделать обобщение структурно-функциональных исследований совокупности природных олигопептидов. К настоящему времени описано более 15000 олигопептидов, полученных из более чем 2000 биологических видов живых организмов. Однако число новых уникальных олигопептидных молекул быстро растет – в настоящее время каждый год открывается почти 1000 новых первичных структур. И в то же время, как бы эти исследования ни были интенсивны, многие олигопептидные регуляторы еще не идентифицированы ни структурно, ни функционально. Поэтому, обладая далеко не полной информацией, на современном этапе можно делать лишь некоторые предварительные заключения. Тем не менее, замечено, что при постоянном приросте числа идентифицированных олигопептидов некоторые определенные их общие характеристики остаются неизменными. Так, практически не изменяются как формы распределения по числу аминокислотных остатков у олигопептидов с определенным типом функциональной активности (рис. 3), так и у всей их совокупности (рис. 1). Остается практически неизменным суммарный аминокислотный состав этих молекул. И, кроме того, наибольшее число олигопептидов, содержащих около 10 аминокислотных остатков, также сохраняется в виде пика (рис. 1), несмотря на то, что такое наблюдение впервые было сделано для совокупности менее чем одной тысячи олигопептидов.

Получение в будущем новых данных о структуре и функциях природных олигопептидов позволит более полно охарактеризовывать функциональные возможности как регуляторных олигопептидов, образующихся из специализированных предшественников, так и многочисленных, но еще мало изученных фрагментов хорошо известных белков. Это поможет приблизиться к решению многих фундаментальных и прикладных проблем: например, прояснить совокупную роль олигопептидных регуляторов в эволюционных процессах или использовать их для создания лекарственных средств нового поколения.

Список литературы / References:

1. Pavlov I.P. Thérapie expérimentale comme methode nouvelle et extrêmement féconde pour recherches physiologiques. *Compt. rend. XIII Congrès international de médecine*, Paris, 1901, pp. 55-61.
2. Замятин А.А. Специализированный банк данных EROP-Moscow о свойствах природных регуляторных олигопептидов. *Нейрохимия*, 1990, т. 9, № 1, с. 71-82. [Zamyatin A.A. Special EROP-Moscow DB about properties of natural oligopeptides-regulators. *Neurochemistry*, 1990, vol. 9, no. 1, pp. 71-82. (In Russ.)]
3. Zamyatin A.A. EROP-Moscow: specialized data bank for endogenous regulatory oligopeptides. *Prot. Seq. Data Anal.*, 1991, vol. 4, no. 1, pp. 49-52.
4. Замятин А.А., Борчиков А.С., Владимиров М.Г., Воронина О.Л. Клиент-серверная база данных EROP-Moscow о природных олигопептидах с Интернет-доступом. *Нейрохимия*, 2005, т. 22, № 1, с. 17-32.

- [Zamyatnin A.A., Borchikov A.S., Vladimirov M.G., Voronina O.L. Client-server EROP-Moscow DB of natural oligopeptides with internet access. *Neurochemistry*, 2005, vol. 22, no. 1, pp. 17-32 (In Russ.)]
5. Zamyatnin A.A., Borchikov A.S., Vladimirov M.G., Voronina O.L. The EROP-Moscow oligopeptide database. *Nucleic Acids Res.*, 2006, vol. 34, pp. D261–D266.
6. Sewald N., Jakubke H.-D. *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002, 562 p.
7. *Advances in Food Biochemistry*. Boca Raton, CRC Press, ed. Y. Yildiz, 2010, 522 p.
8. Ji Y., Qiao H., He J., Li W., Chen R., Wang J., Wu L., Hu R., Duan J., Chen Z. Functional oligopeptide as a novel strategy for drug delivery. *J. Drug Target.*, 2017, vol. 25, pp. 597-607.
9. Замятнин А.А. Особенности совокупности природных олигопептидов. *Нейрохимия*, 2016, т. 33, № 4, с. 265-275. [Zamyatnin A.A. Features of natural oligopeptide complex. *Neurochemistry*, 2016, vol. 33, no. 4, pp. 265-275. (In Russ.)]
10. Zamyatnin A.A. Structural–functional diversity of the natural oligopeptides. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 2018, vol. 133, pp. 1-8.
11. Karle I.L. In: *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. NY: Academic Press, ed. E. Gross, J. Meienhofer, 1981, pp. 1-54.
12. Привалов П.Л. Энергетика структуры белковых молекул. *Биофизика*, 1985, т. 30, № 4, с. 722-733. [Privalov P.L. Energy structure of protein molecules. *Biophysics*, 1985, vol. 30, no. 4, pp. 722-733. (In Russ.)]
13. Замятнин А.А. Биохимические проблемы олигопептидной регуляции. *Биохимия*, 2004, т. 69, № 11, с. 1565-1573. [Zamyatnin A.A. Biochemical problems of oligopeptide regulation. *Biochemistry*, 2004, vol. 69, no. 11, pp. 1565-1573. (In Russ.)]
14. Замятнин А.А. Фрагментомика природных пептидных структур. *Усп. Биол. Химии*, 2009, т. 49, с. 405-428. [Zamyatnin A.A. Fragmentomics of natural peptide structures. *Usp. Biol. Chemistry*, 2009, vol. 49, pp. 405-428. (In Russ.)]
15. Zamyatnin A.A. Protein volume in solution. *Progr. Biophys. Bioeng.*, 1984, vol. 13, pp. 145-165.
16. Zimin A.V., Delcher A.L., Florea L., Kelley D.R., Schatz M.C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., Van Tassell C.P., Sonstegard T.S., Marçais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J.A., Salzberg S.L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.*, 2009, vol. 10, no. 4, pp. R42.01-R42.
17. Brown J.R. Structure of serum albumin: Disulfide bridges. *Fed. Proc.*, 1974, vol. 33, no. 5, pp. 1389-1389.
18. Shibahara S., Morimoto Y., Furutani Y., Notake M., Takahashi H., Shimizu S., Horikawa S., Numa S. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J.*, 1983, vol. 2, no. 5, pp. 775-779.
19. Romier C., Bernassau J.-M., Cambillau C., Darbon H. Solution structure of human corticotropin releasing factor by 1H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Protein Eng.*, 1993, vol. 6, no. 2, pp. 149-156.
20. Takahashi H., Teranishi Y., Nakanishi S., Numa S. Isolation and structural organization of the human corticotropin–beta-lipotropin precursor gene. *FEBS Lett.*, 1981, vol. 135, no. 1, pp. 97-102.
21. Seidah N.G., Rochemont J., Hamelin J., Lis M., Chretien M. Primary structure of the major human pituitary pro-opiomelanocortin NH2-terminal glycopeptide. Evidence for an aldosterone-stimulating activity. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, no. 15, pp. 7977-7984.
22. Shibasaki T., Ling N., Guillemin R. A radioimmunoassay for gamma 1-melanotropin and evidence that the smallest pituitary gamma-melanotropin is amidated at the COOH-terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, vol. 96, no. 3, pp. 1393-1399.
23. Seidah N.G., Rochemont J., Hamelin J., Benjannet S., Chretien M. The missing fragment of the pro-sequence of human pro-opiomelanocortin: sequence and evidence for C-terminal amidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 102, no. 2, pp. 710-716.
24. Harris J.I., Lerner A.B. Amino-acid sequence of the alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Nature*, 1957, vol. 179, no. 4574, pp. 1346-1347.
25. Li C.H., Chung D. Primary structure of human beta-lipotropin. *Nature*, 1976, vol. 260, no. 5552, pp. 622-624.
26. Harris J.I. Structure of a melanocyte-stimulating hormone from the human pituitary gland. *Nature*, 1959, vol. 184, no. 4681, pp. 167-169.
27. Dragon N., Seidah N.G., Lis M., Routhie R., Chretien M. Primary structure and morphine-like activity of human beta-endorphin. *Can. J. Biochem.*, 1977, vol. 55, no. 6, pp. 666-670.
28. Ling N., Burgus R., Guillemin R. Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophyseal origin with morphinomimetic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1976, vol. 73, no. 11, pp. 3942-3946.
29. Guillemin R., Ling N., Burgus R. Endorphins, hypothalamic and neurohypophyseal peptides with morphinomimetic activity: isolation and molecular structure of alpha-endorphin. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1976, vol. 282D, no. 8, pp. 783-785.
30. Loh Y.P., Parish D.C., Tuteja R. Purification and characterization of a paired basic residue-specific pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, no. 12, pp. 7194-7205.

31. Hughes J., Smyth T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris, H.R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 1975, vol. 258, no. 5536, pp. 577-579.
32. Noda M., Teranishi Y., Takahashi H., Toyosato M., Notake M., Nakanishi S., Numa S. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature*, 1982, vol. 297, no. 5865, pp. 431-434.
33. Scheller R.H., Kirk M.D. Neuropeptides in identified *Aplysia* neurons: precursor structure, biosynthesis and physiological actions. *Trends Neurosci.*, 1987, no. 10, pp. 46-52.
34. Skeggs L.T., Lentz K.L., Kahn J.R., Shumway N.P., Woods K.R. The amino acid sequence of hypertensin. II. *J. Exp. Med.*, 1956, vol. 104, no. 2, pp. 193-197.
35. Tsai B.S., Peach M.J., Khoshla M.C., Bumpus F.M. Synthesis and evaluation of (Des-Asp1)angiotensin I as a precursor for (Des-Asp1)angiotensin II ("Angiotensin III"). *J. Med. Chem.*, 1975, vol. 18, no. 12, pp. 1180-1183.
36. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 1973, vol. 179, no. 4068, pp. 77-79.
37. Arakawa Y., Tachibana S. Somatostatin-20: a novel NH₂-terminally extended form of somatostatin isolated from porcine duodenum together with somatostatin-28 and somatostatin-25. *Life Sci.*, 1984, vol. 35, no. 25, pp. 2529-2536.
38. Pradayrol L., Jornvall H., Mutt V., Ribet A. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.*, 1980, vol. 109, no. 1, pp. 55-58.
39. Geller D.M., Currie M.G., Wakitani K., Cole B.R., Adams S.P., Fok F.K., Siegel N.R., Eubanks S.R., Galluppi G.R., Needleman P. Atriopeptins: a family of potent biologically active peptides derived from mammalian atria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 120, no. 2, pp. 333-338.
40. Iimura O., Shimamoto K., Ando T., Ura N., Ishida H., Nakagawa M., Yokoyama T., Fukuyama S., Yamaguchi Y., Yamaji I. Plasma levels of human atrial natriuretic peptide in patients with hypertensive diseases. *Can. J. Physiol. Pharm.*, 1987, vol. 65, no. 8, pp. 1701-1705.
41. Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H. A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser. *Nature*, 1979, vol. 282, no. 5737, pp. 410-412.
42. Takagi H., Shiomi H., Fukui K., Hayashi K., Kiso Y., Kitagawa K. *Life Sci.*, 1982, vol. 31, no. 16-17, pp. 1733-1736.
43. Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И., Васильковский Б.В., Свиричев В.И., Назимов И.В. Выделение, структура и свойства новых эндогенных пептидов. *Биоорг. Химия*, 1992, т. 18, № 10-11, с. 1271-1311. [Ivanov V.T., Karelin A.A., Mikhaleva I.I., Vaskovskiy B.V., Sviriyayev V.I., Nazimov I.V. Isolation, structure and properties of new endogenous peptides. *Bioorg. Chemistry*, 1992, vol. 18, no 10-11, pp. 1271-1311. (In Russ.)]
44. Benson B., Ebels L. Structure of a pineal gland-derived antigonadotropic decapeptide. *Life Sci.*, 1993, vol. 54, no. 24, pp. PL437-PL443.
45. Ekeke N.U., Shaw C., Johnston C.F., Thim L. Isolation of the bombesin-immunoreactive peptide from bovine milk and its tentative identification as alpha-s1 casein 101-123. *Regul. Peptides*, 1992, vol. 40, no. 2, pp. 140-140.
46. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, 1995, vol. 78, no. 6, pp. 1253-1257.
47. Orcutt B.C., Barker W.C. Searching the protein sequence database. *Bull. Math. Biol.*, 1984, vol. 46, no. 4, pp. 545-552.
48. Mastropaolo D., Camerman A. Crystal structure of methionine-enkephalin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1985, vol. 134, no. 2, pp. 698-703.
49. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка*. Москва: Книжный дом "Университет", 2002, 376 с. [Finkelshtein A.V., Pticyn O.B. *Peptide physics*. Moscow: Book house "University", 2002, 376 p. (In Russ.)]
50. McGaughey G.B., Gagné M., Rappé A.K. pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, no. 25, pp. 15458-15463.
51. Замятин А.А. Аминокислотный состав эндогенных физиологически активных олигопептидов. *Докл. Акад. наук СССР*, 1987, т. 292, № 5, с. 1261-1264. [Zamyatin A.A. Aminoacid composition of endogenic physiologically active oligopeptides. *Rep. of Acad. of Science of USSR*, 1987, vol. 292, no. 5, pp. 1261-1264. (In Russ.)]
52. Замятин А.А. Физико-химические особенности эндогенных регуляторных олигопептидов. *Биофизика*, 1990, т. 35, № 4, с. 555-559. [Zamyatin A.A. Physico-chemical features of endogenic regulative oligopeptides. *Biophysics*, 1990, vol. 35, no. 4, pp. 555-559. (In Russ.)]
53. Zamyatin A.A. Specificity of the amino acid residue content in endogenous regulatory oligopeptides. *Prot. Seq. Data Anal.*, 1991, vol. 4, no. 1, pp. 57-60.
54. Nakashima H., Nashikama N., Ooi T. The folding type of a protein is relevant to the amino acid composition. *J. Biochem.*, 1986, vol. 99, no. 1, pp. 153-162.
55. Dimarchi R.D., Tam J.P., Kent S.B.H., Merrifield R.B. Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis. Minimization by rapid coupling. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1982, vol. 19, no. 1, pp. 88-93.
56. Abraham G.A., Podell D.N. Pyroglutamic acid. *Mol. Cell. Biochem.*, 1981, vol. 38, № 1, pp. 181-190.
57. Замятин А.А. Физико-химические и биологические особенности эндогенных олигопептидных токсинов. *Нейрохимия*, 1996, т. 13, № 4, с. 243-259. [Zamyatin A.A. Physico-chemical and biological features of endogenic oligopeptide toxins. *Neurochemistry*, 1996, vol. 13, no. 4, pp. 243-259. (In Russ.)]

58. Замятнин А.А., Воронина О.Л. Общие химические особенности эндогенных нейропептидов. *Нейрохимия*, 1997, т. 14, № 3, с. 263-272. [Zamyatin A.A., Voronina O.L. General chemical features of endogenic oligopeptide. *Neurochemistry*, 1997, vol. 14, no. 4, pp. 243-259. (In Russ.)]
59. Замятнин А.А., Воронина О.Л. Общие физико-химические и физиологические особенности эндогенных антибактериальных олигопептидов. *Усп. Биол. Химии*, 1998, т. 38, с. 165-197. [Zamyatin A.A., Voronina O.L. General physico-chemical and physiological features of endogenic antibacterial oligopeptides. *Soc. Biol. Chem.*, 1998, vol. 38, pp. 165-197. (In Russ.)]
60. Drozdov-Tikhomirov L.N., Linde D.M., Poroikov V.V., Alexandrov A.A., Skurida G.I. Molecular mechanisms of protein-protein recognition: whether the surface placed charged residues determine the recognition process? *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2001, vol. 19, no. 2, pp. 279-284.
61. Drozdov-Tikhomirov L.N., Linde D.M., Poroikov V.V., Alexandrov A.A., Skurida G.I., Kovalev P.V., Potapov V.Y. About factors providing the fast protein-protein recognition in processes of complex formation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2003, vol. 21, no. 2, 257-266.
62. Yanagisawa M., Kurichara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, vol. 332, no. 6163, pp. 411-415.
63. Takasaki C., Tamiya N., Bdolah A., Wollberg Z., Kochva E. Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon*, 1988, vol. 26, no. 6, pp. 543-548.
64. Чипенс Г.И. *Структура и функции низкомолекулярных пептидов*. Рига: Зинатне, 1980, 20 с. [Chipens G.I. *Structure and functions of low molecular weight peptides*. Riga: Zinatne, 1980, 20 p. (In Russ.)]
65. Замятнин А.А. Биофизические проблемы олигопептидной регуляции. *Биофизика*, 2003, т. 48, № 6, с. 1030-1039.
66. Замятнин А.А. Система природных физиологически активных пептидов. *Физиол. Журн. СССР им. И.М.Сеченова*, 1989, т. 75, № 5, с. 646-655. [Zamyatin A.A. System of natural physiologically active peptides. *Physiol. Journ. of USSR of I.M. Sechenov*, 1989, vol. 75, no. 5, pp. 646-655. (In Russ.)]
67. Замятнин А.А. “Великое объединение” природных олигопептидных регуляторов. *Нейрохимия*, 1997, т. 14, № 3, с. 313-315. [Zamyatin A.A. “Great unification” of natural oligopeptide regulators. *Neurochemistry*, 1997, vol. 14, no. 3, pp. 313-315. (In Russ.)]
68. Lee T.H., Lerner A.B., Buettner-Janusch V. On the structure of human corticotropin (adrenocorticotrophic hormone). *J. Biol. Chem.*, 1961, vol. 236, no. 11, pp. 2970-2974.
69. Graf L., Bajusz S., Patty A., Barat E., Cseh G. Revised amide location for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 1971, vol. 6, no. 4, pp. 415-418.
70. Замятнин А.А., Воронина О.Л. Фрагменты пищевых белков – регуляторные олигопептиды. *Биохимия*, 2012, т. 77, № 5, с. 622-632. [Zamyatin A.A., Voronina O.L. Fragments of food proteins - regulatory oligopeptides. *Biochemistry*, 2012, vol. 77, no. 5, pp. 622-632. (In Russ.)]
71. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Регуляторные олигопептиды. Функционально-непрерывная совокупность. *Биохимия*, 1986, т. 51, № 4, с. 531-544. [Ashmarin I.P., Obukhova M.F. Regulatory oligopeptides. Functionally-continuous set. *Biochemistry*, 1986, vol. 51, no. 4, pp. 531-544. (In Russ.)]

PHYSICO-CHEMICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS
OF COMPLETE SYSTEM OF NATURAL OLIGOPEPTIDES

Zamyatnin A.A.

A. N. Bach Institute of Biochemistry,
Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences
Leninsky prosp., 33, Moscow 119071, Russia; e-mail: aaz@inbi.ras.ru

*There is no real difference between structure and function;
there are two sides of the same coin.*

*If structure does not tell us anything about function,
it means we have not looked at it correctly.*

Albert Szent-Györgdi

Abstract. An analysis of the array of data on the structures and functions of molecules of natural peptides is carried out. The concept of an oligopeptide is considered not only from a chemical point of view, but also from the point of view of mathematical notions of small numbers. General principles of biogenesis of natural oligopeptides from specialized and non-specialized precursors are described. Therefrom, the concept of a complete system of given type molecules is formulated. It is shown which physical principles underlie the functional activity of oligopeptides. As an illustration, based on the information of the EROP-Moscow database on structural and functional characteristics of oligopeptides possessing neuronal, antimicrobial, hormonal and enzyme inhibitory activity, a number of mathematical, chemical, physical and biological features of the set of natural oligopeptides have been considered. There is the substantial difference of these substances from polypeptide molecules of proteins according to their physicochemical characteristics. These characteristics may be critical for understanding the molecular mechanisms of the action of oligopeptides that lead to the development of physiological effects.

Key words: oligopeptide, protein, fragment, structure, function, regulation, activity, biogenesis, EROP-Moscow database.

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 3, № 1, 2018

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 3, No. 1, 2018

Учредитель и издатель:

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация

Компьютерная верстка: Д.П. Воронин, И.В. Головченко

Рекомендован к печати Ученым советом
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Адрес редакции:

ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация
Тел. +7(8692) 43-51-10, e-mail: journal@sevbppc.ru

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-72655 от
16.04.2018, выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций

Публикуемые материалы прошли процедуру рецензирования и экспертного отбора.

Авторы несут ответственность за добросовестность фактов, цитат, имен
собственных, географических названий и другой информации. Редакция не несет
ответственности за нарушение авторами исключительных прав на результаты
интеллектуальной деятельности третьих лиц. Мнение редакции может не совпадать с
мнением автора. При перепечатке материалов ссылка на журнал «Актуальные
вопросы биологической физики и химии» обязательна.

Формат – 60x84/8. Бумага офсетная. Гарнитура – Times New Roman. Усл. печ. л. – 29,6.
Тираж – 60 экз. Подписано в печать 05.07.2018.

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе РИИЦ «Медиацентр»
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»,
ул. Курчатова, 7, Севастополь, 299015, Российская Федерация