

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Актуальные вопросы биологической физики и химии

Том 3, № 2
2018

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 3, № 2
2018**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 3, No. 2, 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, № 2, 2018

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

- В.А. Леонович, О.Н. Сорокина, М.А. Климов, П.Г. Пронкин, И.Г. Плащина, С.Н. Подойницын**
Микросепарационная ячейка для выделения целевого белка методом электрофореза в свободном потоке 245
- А.В. Локтюшкин, Е.Р. Ловягина, Б.К. Семин**
Ингибирование электрон-транспортной цепи фотосистемы 2 катионами тербия 250
- Т.А. Телегина, А.С. Низамутдинов, А.А. Буглак, А.Н. Шавров, Е.В. Лукинова, Ю.Л. Вечтомова, М.С. Крицкий**
Роль фотохимических превращений тетрагидробиоптерина в патогенезе и фототерапии витилиго.....255
- Н.Ю.Шилягина, К.А. Коньгин, А.Б. Костюк, С.А. Лермонтова, Л.Г. Клапшина, Балалаева И.В.**
Мониторинг внутриклеточной вязкости опухолевых клеток при ответе на фотодинамическое воздействие с помощью фотосенсибилизатора порфиразиновой природы 261
- A.G. Pogorelov, V.N. Pogorelova**
Modification of the incubation medium oxidative activity with electrochemically reduced water..... 268
- Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, А.Н. Голощанов, Е.Б. Бурлакова**
Изменение микровязкости мембран при развитии спонтанного лейкоза у мышей линии AKR.....274
- Е.Н. Кочкина, А.П. Черкашин, П.Д. Котова**
Механизм генерации Ca^{2+} -ответов на аденозин мезенхимными стромальными клетками человека.....279
- А.А. Мосунов, А.А. Елецкая, А.В. Бондаренко**
Исследование комплексообразования биологически активных веществ на SERS-подложках методами комбинационного рассеивания 285
- М.Ю. Саранцева, А.В.Бояхчан, Н.Б. Гудимчук**
Влияние фосфата на взаимодействие белка EB1 с микротрубочкой 290

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

- Е.Н. Богачева, А.А. Долгов, А.Л. Ксенофонтов**
Моделирование пространственной структуры потексвирусов 296
- Н.С. Васильева-Вашакмадзе**
О механизме вращения ротора FOF1 Na^{+} -АТФ-синтазы, мотора бактериальных жгутиков и механизме работы ионной помпы 302

Е.А. Бовт, Е.М. Кравченко, В.С. Дорошкевич, И.Д. Одарюк, О.В. Баранова Оценка ферментативной активности лакказы <i>Trametes Versicolor</i> квантово-химическими методами	312
---	-----

Г.А. Агаева, У.Б. Гасимова Конформационное поведение иммуностимулирующего пептида VAL-GLU-PRO-ILE-PRO-TYR.....	316
---	-----

Ю.В. Мухина Моделирование стэкинг-взаимодействия флавин-моно-нуклеотида с азотистыми основаниями ДНК	320
---	-----

Г.А. Агаева, М.Н. Бабаева Конформационные особенности двух эндогенных пептидов мозга MIF-1 и TYR-MIF-1.....	327
---	-----

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Н.О. Ронжин, О.А. Могильная, К.С. Артеменко, В.С. Бондарь Бифункциональная индикаторная система для определения фенола и глюкозы на основе наноалмазов и экстраклеточных грибных оксидаз	331
---	-----

А.Н. Смирнова, Л.И. Мазалецкая, Л.Н. Шишкина Ингибирующая эффективность генистеина в присутствии соевого лецитина.....	338
--	-----

Л.В. Бельская, Е.А. Сарф Рефрактометрия в исследовании селективности масляных экстрагентов растительного сырья.....	343
--	-----

А.П. Зажогин, Минько А.А., Патапович М.П., С.А. Павлюковец Ретроспективная и общая оценка содержания эссенциальных элементов и алюминия в волосах матери и ребенка методами атомно-эмиссионной спектроскопии	350
---	-----

А.П. Зажогин, Г.Т. Маслова, Ж.И. Булойчик, А.С. Мавричев, Л.А. Державец, А.С. Трубецкая, А.В. Титова Использование морфоструктурного анализа и лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии высохших капель плазмы крови для диагностики опухолей головного мозга.....	355
---	-----

А.П. Зажогин, Ж.И. Булойчик, Н.И. Нечипуренко, М.П. Патапович, И.Д. Пашковская Оценка содержания эссенциальных элементов в крови у пациентов с заболеваниями головного мозга методами атомно-эмиссионной спектроскопии.....	361
--	-----

В.А. Королева, М.Г. Холявка, С.М. Панкова, С.С. Ольшанникова, В.В. Ермолаева, Ф.А. Сакибаев, Т.Н. Шеломенцева, В.Г. Артюхов Физико-химические свойства фицина и папаина, свободных и иммобилизованных на матрице хитозана	367
--	-----

В.А. Лисютин, О.Р. Ластовенко, В.Л. Лучин Сопоставление измерений затухания ультразвука в губчатых костях с результатами теорий GS+F и Biot+GS	373
---	-----

Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, А.В. Вчерашняя, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, С.Н. Черенкевич Определение биологически активных летучих органических соединений твердофазной микроэкстракцией	379
--	-----

Г.А. Набережных, Д.К. Чистюлин, В.А. Хоменко, Е.В. Сидорин, О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова Влияние состава липидного матрикса и температуры на реконструкцию и функциональную активность OmpF порина из <i>Yersinia ruckeri</i>	384
В.В. Внуков, Р.В. Сидоров, Н.П. Милютина, Д.Ю. Гвалдин, А.А. Ананян, Д.Ю.Поспелов Показатели окислительно-нитрозильного стресса в крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда	388
С.А. Комарова, А.А. Олешкевич Определение индивидуальных особенностей шерсти мелкого рогатого скота биофизическими методами	393
А.А. Ананян, И.В. Черникова, Н.П. Милютина, Х.И. Хадзиева, С.В. Ящук Роль свободнорадикальных процессов и апоптоза лимфоцитов в крови при болезни паркинсона.....	396
А.А. Олешкевич Функциональное изменение эритроцитов животных при действии постоянного электрического поля	401
Е.Ю. Симоненко, А.А. Иванова, Е.В. Бурмистрова, В.В. Прядун, А.Н. Васильев, С.А. Яковенко Калориметрические параметры криопротектора на основе глицерина.....	406
В.В. Колесник, Н.В. Леконцева, А.О. Михайлина, В.А. Балобанов Поиск основ специфичности олигомеризации Sm-подобных белков из различных организмов	411
Л.В. Смаглий, В.С. Рыдченко, Ю.О. Ярцева, Ю.Г. Бирулина, И.В. Ковалев, С.В. Гусакова, А. В. Носарев, И.В. Петрова Роль газотрансмиттеров в механизмах пуринергической регуляции сократительной активности сосудистых гладкомышечных клеток	416
И.А. Черенков, К.С. Раевских, В.Г. Сергеев, М.Д. Кривилев Моделирование протеазной активности с использованием электрохимического интерфейса.....	422
А.С. Чернов, Ю.А. Ковалицкая, Р.Г. Васильев Светодиодное излучение красного и зеленого диапазонов увеличивает митохондриальный потенциал и модулирует работу генетического аппарата ранних эмбрионов мышей.....	427
ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА	
В.А. Лисютин, О.Р. Ластовенко, Н.В. Петренко Акустический метод оценки уровня биологического загрязнения дна водоема	433
Г.Ю. Ломакина, В.А. Корягина, Н.Н. Угарова Люцифераза светляков как внутриклеточный маркер температурного стресса бактерий ...	441
М.А. Pogorelova, A.L. Kuznetsov, O.A. Suvorov, A.G. Pogorelov Electrochemically reduced water removes biofilm formed with lactic bacteria.....	447
М.В. Солопов, Ю.А. Легенький, С.В. Беспалова Биосорбент на основе комплекса дрожжевых клеток и магнитных наночастиц для удаления ионов тяжелых металлов	451

CONTENTS

Volume 3, No. 2, 2018

GENERAL BIOPHYSICS

- V.A. Leonovich, O.N. Sorokina, M.A. Klimov, P.G. Pronkin, I.G. Plashchina, S.N. Podoynitsyn**
Microseparation cell for free-flow electrophoresis of the target protein 245
- A.V. Loktyushkin, E.R. Lovyagina, B.K. Semin**
Inhibition of photosystem II electron-transport chain by terbium ions..... 250
- T.A. Telegina, A.S. Nizamutdinov, A.A. Buglak, A.N. Shavrov, E.V. Lukinova, Yu.L. Vechtomova, M.S. Kritsky**
The role of photochemical transformations of tetrahydrobiopterin in the pathogenesis and phototherapy of vitiligo.....255
- N.Yu. Shilyagina, K.A. Konygin, A.B. Kostyuk, S.A. Lermontova, L.G. Klapshina, I.V. Balalaeva**
Monitoring of intracellular viscosity of cancer cells under photodynamic treatment with a porphyrazine photosensitizer 261
- A.G. Pogorelov, V.N. Pogorelova**
Modification of the incubation medium oxidative activity with electrochemically reduced water 268
- N.Yu. Herasimov, O.V. Nevrova, A.N. Holoshchapov, E.B. Burlakova**
Generation mechanism of Ca^{2+} -answers on human adenosine mesenchymal stromal cells..... 274
- E.N. Kochkina, A.P. Cherkashin, P.D. Kotova**
Structural studies of n-terminal dimerization domain of clamp protein using small-angle x-ray scattering (SAXS)..... 279
- A.A. Mosunov, A.A. Eletskaia, A.V. Bondarenko**
Investigation of the complex formation of biologically active substances on SERS-substrates by raman methods 285
- M.Y. Sarantseva, A.V. Boyakhchyan, N.B. Gudimchuk**
Effects of phosphate on protein EB1 interaction with microtubule 290

MODELLING IN BIOPHYSICS

- E.N. Bogacheva, A.A. Dolgov, A.L. Ksenofontov**
Modeling potexviruses spatial structure 296
- N.S. Vasilieva-Vashakmadze**
About mechanism of motor rotation of FOF1 Na^+ -ATP syntasis, bacterial motor and mechanism ion pump operation.....302

E.A. Bovt, E.M. Kravchenko, V.S. Doroshkevich, I.D. Odaryuk, O.V. Baranova

Evaluation of enzymatic activity of laccase from *Trametes Versicolor* by quantum-chemical methods.....312

G.A. Agaeva, H.B. Qasimova

Conformational behavior of immunostimulating peptide VAL-GLU-PRO-ILE-PRO-TYR 316

L.A. Krasnobaeva, L.V. Yakushevich

3D trajectories of the movement of kinks in inhomogeneous circular DNA..... 320

G.A. Agaeva, M.N. Babaeva

Conformational particularities of two endogenous peptides MIF-1 and TYR-MIF-1 327

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

N.O. Ronzhin, O.A. Mogilnaya, K.S. Artemenko, V.S. Bondar

Bifunctional indicator system for phenol and glucose detection based on nanodiamonds and extracellular fungal oxidases..... 331

A.N. Smirnova, L.I. Mazaletskaya, L.N. Shishkina

Inhibitory efficiency of genistein in the presence of the soy bean lecithin.....338

L.V. Bel'skaya, E.A. Sarf

Possibilities of application of saliva ftir-spectroscopy for the diagnosis of cancer 343

A.P. Zajogin, A.A. Minko, M.P. Patapovich, S.A. Pavlucovec

Retrospective and general estimation of the essential elements and aluminum content in the hair of mother and child by the atomic-emission spectrometry methods 350

A.P. Zajogin, G.T. Maslova, J.I. Bulovichik, A.S. Mavrichev, L.A. Derzhavets, A.S. Trubetskaya, A.V. Titova

Using of the morphostructural analysis and laser atomic-emission spectrometry of dried blood plasma drops in diagnosis of the brain tumors 355

A.P. Zajogin, J.I. Bulovichik, N.I. Nechipurenko, M.P. Patapovich, I.D. Pashkovskaya

Estimation of the essential elements content in blood of the patients with diseases of the brain using the atomic-emission spectrometry methods 361

V.A. Koroleva, M.G. Holyavka, S.M. Pankova, S.S. Olshannikova, V.V. Ermolaeva, F.A. Sakibaev, T.N. Shelometseva, V.G. Artukhov

Physical and chemical properties of free and immobilized on the chitosane matrix ficin and papain 367

V.A. Lisyutin, O.R. Lastovenko, V.L. Luchin

Comparison of ultrasound attenuation measurements in cancellous bones with the results of GS + F theory.....373

G.G. Martinovich, I.V. Martinovich, A.V. Vcherashniaya, N.K. Zenkov, E.B. Menshchikova, S.N. Cherenkevich

Biophysical and molecular mechanisms of redox regulation of tumor cells chemoresistance.....379

G.A. Naberezhnykh, D.K. Chistyulin, V.A. Khomenko, E.V. Sidorin, O.Yu. Portnyagina, O.D. Novikova Effect of the lipid matrix composition on reconstitution and functional activity of OmpF porin from <i>Yersinia Ruckeri</i>	384
V.V. Vnukov, R.V. Sidorov, N.P. Milutina, D.Y. Gvaldin, A.A. Ananyan, D.Y. Pospelov Parameters of oxidative-nitrosyl stress in blood and pericardial fluid in patients with coronary artery disease undergoing direct myocardial revascularization	388
S.A. Komarova, A.A. Oleshkevich Determination of individual characteristics of wool of small cattle by biophysical methods	393
A.A. Ananyan, I.V. Chernikova, N.P. Milyutina, H.I. Hadzieva, S.V. Yashuk The role of free radical processes and apoptosis of lymphocytes in blood with parkinson's diseases	396
A.A. Oleshkevich Functional changes in animal erythrocytes in a constant electric field	401
E.Yu. Simonenko, A.A. Ivanova, E.V. Burmistrova, V.V. Pryadun, A.N. Vasiliev, S.A. Yakovenko Calorimetric characteristics of glycerol-based cryoprotectant	406
V.V. Kolesnik, N.V. Lecontceva, A.O. Mikhailina, V.A. Balobanov Search for structural basics of the oligomerization specificity of Lsm proteins from various organisms	411
L.V. Smagliy, V.S. Rydchenko, Yu.O. Yartseva, Yu.G. Birulina, I.V. Kovalev, S.V. Gusakova, A.V. Nosarev, I.V. Petrova The role of gas-transmitters in the mechanisms of purinergic regulation of the contractive activity of vascular gladometer cells	416
I.A. Cherenkov, K.S. Raevskih, V.G. Sergeyev, M.D. Krivilev Modeling protease activity using the electrochemical interface	422
A.S. Chernov, Yu.A. Kovalitskaya, R.G. Vasilov Red and green range of led irradiation of influence on mitochondrial membrane potential and work of genetic apparatus in early mice embryos	427

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

V.A. Lisyutin, O.R. Lastovenko, N.V. Petrenko Acoustical method for esimating water bed biological contamination level	433
G.Yu. Lomakina, V.A. Koriagina, N.N. Ugarova Firefly luciferase as intracellular marker of a temperature stress of bacteria	441
M.A. Pogorelova, A.L. Kuznetsov, O.A. Suvorov, A.G. Pogorelov Electrochemically reduced water removes biofilm formed with lactic bacteria	447
M.V. Solopov, Yu.A. Legenkiy, S.V. Bespalova Biosorbent based on the complex of yeast cells and magnetic nanoparticles for removing heavy metal ions	451

МИКРОСЕПАРАЦИОННАЯ ЯЧЕЙКА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО БЕЛКА МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ

Леонович В.А., Сорокина О.Н., Климов М.А., Пронкин П.Г., Плащина И.Г.,
Подойницын С.Н.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, РФ; e-mail: alsiona@gmail.com
Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Предложена конструкция упрощенного сепарационного устройства и методики для выделения целевого белка из смеси методом зонного электрофореза в свободном потоке. Эффективность устройства была продемонстрирована теоретически и экспериментально на примере сепарации белков гемоглобина и сывороточного альбумина человека. Предложенный метод сепарации отличается простотой использования и хорошей производительностью.

Ключевые слова: микросепарационная ячейка, электрофорез.

ВВЕДЕНИЕ

Выделение целевого анализата является важным этапом биологического анализа, для реализации которого требуются простые, надежные и недорогие методы разделения. Одним из методов фракционирования и разделения анализируемых проб является электрофорез в свободном потоке (ЭФСП). В последние десятилетия принципы ЭФСП нашли свое применение при разделении таких биологических систем, как смеси белков [1-3], ионные пары отдельных компонентов [4], клетки [5], органеллы [6], протеомы [7-11].

При реализации ЭФСП поток анализируемой смеси, содержащей заряженные частицы, непрерывно поступает в сепарационную камеру в виде тонкого ламинарного течения, и разделяется под действием внешнего электрического поля, перпендикулярного основному потоку, на отдельные компоненты в соответствии с их электрофоретическими свойствами. ЭФСП обладает уникальными особенностями и преимуществами по сравнению с традиционными техниками сепарирования, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография или капиллярный электрофорез. К достоинствам ЭФСП можно отнести: высокую степень выхода исходного образца [12, 13], хорошее сохранение биологической активности [12-14], непрерывное разделение, низкую стоимость [13-15].

В зависимости от размеров сепарационной камеры ЭФСП можно разделить на: ЭФСП макро- и микрообъемов [13]. Макро-ЭФСП используется как этап препаративных технологий благодаря высокой пропускной способности и непрерывности сепарирования [13-16]. μ -ЭФСП применяется для решения аналитических задач по разделению проб микрообъема и определению их состава. μ -ЭФСП может использоваться при создании устройств «лаборатории на чипе» позволяющих наблюдать за химическими процессами в режиме реального времени [17]. На сегодняшний день развитие μ -ЭФСП сосредоточено на разработке и совершенствовании устройства и методики сепарации.

В зависимости от принципов, лежащих в основе фракционирования можно выделить следующие типы μ -ЭФСП: зональный (зонный) электрофорез (ЗЭФ), изоэлектрическое фокусирование, изотахофорез. Наиболее простая реализация устройства μ -ЭФСП характерна для ЗЭФ (рис. 1).

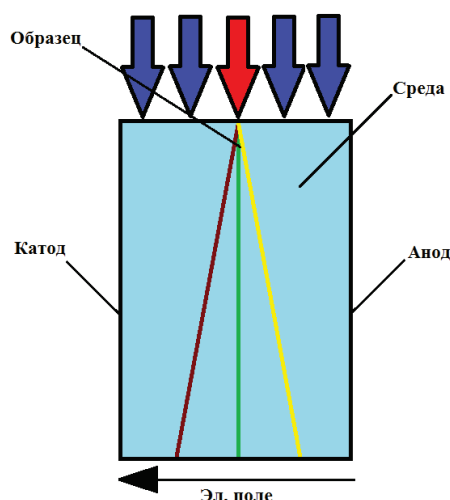


Рисунок 1. Простейшая схема организации электрофореза в свободном потоке [18]

Зональный электрофорез. Разделение частиц при ЗЭФ основывается на разнице в соотношении их массы и заряда. ЗЭФ проводят в однородном буферном растворе в постоянном электрическом поле. Принципы ЗЭФ используется при разделении образцов биомакромолекул [18-20] в устройствах μ -ЭФС. Однако разрешающая способность такого подхода не достаточно высока и позволяет разделять белки на фракции с сильно отличающимися значениями рН. При этом буфер, используемый в таких системах сепарации, должен иметь низкую ионную силу (например, Трис-боратный буфер). Разделение белков на фракции требует достаточно большой площади, для распределения потоков из-за чего объем камеры составляет не менее 30-50 мкл. Напряжение электрического поля, подаваемое на электроды, в таких системах должно составлять не менее 200-300 В для эффективного разделения из-за достаточного удаления электродов друг относительно друга. Из-за чего электроды необходимо помещать в отдельные камеры, соединенные системой каналов с основной камерой разделения, что бы избежать влияния электролиза воды. В результате изготовление камер пригодных для μ -ЭФС становится сложной и дорогостоящей технической задачей, для решения которой требуется специальное оборудование.

Применение ЗЭФ для разделения белковых фракций более актуально для решения задач по выделению одной фракции частиц, не имеющих заряда. В этом случае кислотность среды (рН) подбирается таким образом, что бы ее величина совпадала с изоэлектрической точкой частиц, выделяемой фракции. В результате частицы, имеющие заряд, отклоняются от основного потока и остаются в сепарационной камере, а незаряженные частицы собирают в коллекторе через выходное отверстие. Такие принципы разделения могут применяться для создания микрофлюидных аналитических устройств по типу «лаборатории на чипе», где важно выделить или очистить от балластных белков один целевой аналит.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ячейка μ -ЭФС. Реализация устройств для высоковольтного μ -ЭФС требует решения важных проблем, таких как пространственное разделение электродов от сепарационной камеры, что бы не допустить проникновения пузырей, возникающих в результате электролиза воды; джоулевское нагревание образца в камере в результате воздействия высоковольтного электрического тока; смешивание потоков электродных буферов с буфером сепарационной камеры; неоднородность гидродинамических потоков при разделении на несколько фракций и др. На рисунке 2 представлена 3D модель устройства для высоковольтного однокомпонентного μ -ЭФС, в котором решены данные проблемы. Была предложена простая конструкция камеры, изготовление которой проводится с помощью простой механообработки компонентов устройства, при этом объем сепарационной камеры не превышает 7 мкл.

В качестве материала для изготовления корпуса использовался листовой полиметилметакрилат (оргстекло) толщиной 5 мм. Каналы для электродов формируют фрезеровкой, отверстия для ввода и вывода буфера и пробы сверлением. В качестве электродов использовали анодонерастворимую проволоку (Pt 99,99).

На корпусе сепарационного устройства (рис. 2) располагается подвод для разделяемой суспензии (1), соединенный с рабочей зоной сепаратора (плоская камера размерами $20 \times 3 \times 0.12$ мм), которая оканчивается выводным отверстием (1°). Заряженные белки через полупроницаемые мембраны (2⁺ и 2⁻) отводятся из сепарационной камеры в камеры для электродов.

Проницаемые барьеры в сепарационной камере изготавливали из пористого ацетат целлюлозы с характеристическими параметрами пористости 80 % и размерами пор 5 мкм («Millepore») и 0,22 мкм («Владипор»).

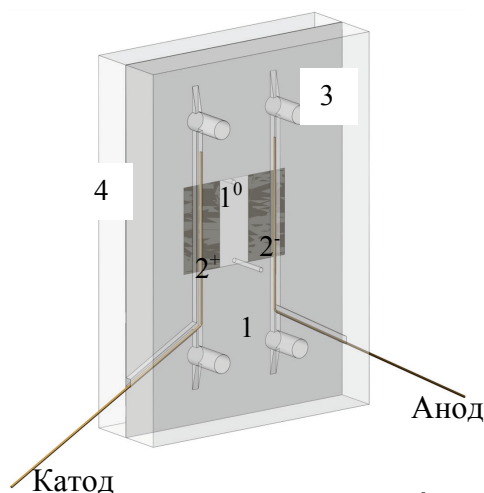


Рисунок 2. 3D модель устройства μ -ЭФС в собранном виде, где 1-1° – вводной и выводной каналы, соответственно, 2⁺-2⁻ – полупроницаемые мембраны, отделяющие камеру катода и анода соответственно, 3 – диэлектрическая прокладка, 4 – пластины корпуса

Для прокачки буферного раствора в электродных камерах были сделаны отдельные вводные и выводные отверстия и каналы. Скорость прокачки буферного раствора в электродных камерах многократно превосходила скорость прокачки образца в сепарационной камере.

Электрически нейтральные белки выводятся из устройства для дальнейшего детектирования и анализа. Высокое напряжение подводится к аноду и катоду, находящимися в отдельных камерах, отделенных от сепарационной камеры с помощью полупроницаемых мембран (2^+ и 2^-). Сепарационная камера формируется с помощью диэлектрической прокладки (3) – полиэтилен низкого давления (Parafilm). Толщина прокладки около 120 - 130 мкм.

Для подключения питающего напряжения используется высоковольтный источник питания Б5-50 М, позволяющий подавать постоянное напряжение в диапазоне от 0 до 300 В. Контроль величины подаваемого напряжения и электрического тока, формирующегося в сепарационной камере, осуществляли с помощью двухканального мультиметра АМ-1109 «Актаком» (Россия).

Модельная система. В качестве модельной системы для разделения использовали смесь следующих белков – сывороточного альбумина человека (САЧ) ($M_w = 68-69$ кДа, pI 4.8-5.2, Sigma) и гемоглобин человека (ГГ) ($M_w = 68$ кДа, pI 6.8-6.9, Serva, 24450). Эти белки имеют близкую молекулярную массу и достаточно сильно отличаются по своим изоэлектрическим точкам.

В качестве сепарационной среды, что бы увеличить эффективность разделения за счет улучшения электрофоретических свойств разделяемых объектов был использован 10 мМ буфер HEPES с pH 6,9, обладающий невысокой проводимостью и ионной силой 0,001. Для тестирования устройств использовались растворы белков САЧ и ГГ, а также их смесь в в 10 мМ HEPES одинаковой концентрации 1 мг/мл.

Контроль концентрации ГГ и САЧ проводился по спектрам поглощения и спектрам флуоресценции. Измерения спектров поглощения красителей проводились на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), флуоресцентные измерения – на спектрофлуориметре «Флюорат-02-Панорама» (Россия) в кварцевых полумикрокуветах. Изменение концентрации ГГ определялось относительно растворов сравнения (метод калибровочной кривой) по спектрам поглощения, регистрация спектров поглощения проводилась в видимой области в области полосы Соре ($\lambda_{abs} = 416$ нм) и в области Q-полос ($\lambda_{abs} = 540-580$ нм). Контроль относительного изменения концентрации альбумина выполнялся различными способами: по спектрам поглощения в УФ области ($\lambda_{abs} = 280$ нм, при обработке спектров учитывали поглощение гемоглобина), по собственной флуоресценции белка ($\lambda_{ex} = 290$ нм, $\lambda_{fl} = 340$ нм). Спектры флуоресценции САЧ корректировались на спектральную характеристику канала возбуждения и на поглощение раствора.

Измерение электрофоретических свойств белка проводилось на оборудовании Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания). Измерения производятся на длине волны 635 нм при оптической плотности раствора 0,1-0,4. В результате электрофоретических измерений была получена информация об электрофоретической подвижности белков в рабочем растворе и их дзета-потенциалах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента нам необходимо было знать электрофоретические свойства белков ГГ и САЧ в буферном растворе HEPES. На рисунке 3 представлены кривые распределения ζ -потенциала и электрофоретической подвижности выбранных белков, соответственно.

Из данных по ζ -потенциалу и электрофоретической подвижности выбранных белков видно, что при условиях эксперимента в среде 10 мМ HEPES pH 6,9 сывороточный альбумин человека обладает сравнительно высоким электрофоретической подвижностью, среднее значение которой достигает -1,9 мкм см/В·с (движение к аноду), в то время как гемоглобин оказывается в условиях близких к изоэлектрической точке и среднее значение его электрофоретической подвижности оказывается близким к 0.

Таким образом, в случае электрофоретического разделения заряженные молекулы САЧ должны удаляться из сепарационной камеры, а гемоглобин, наоборот проходит через микросепарационную камеру в коллектор для сбора образца.

В результате тестирования устройств нами были получены зависимости изменения концентрации белков САЧ и ГГ от напряжения на электродах сепарационного устройства (рис. 4).

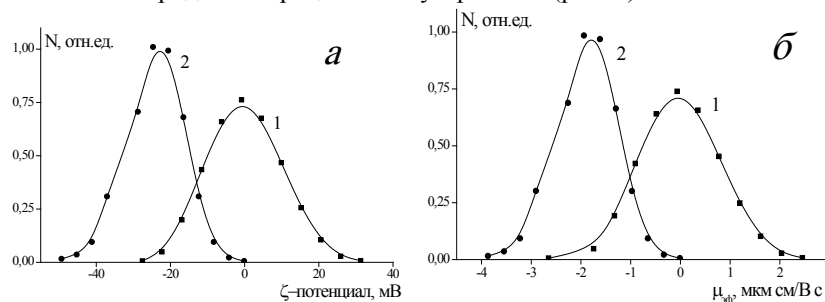


Рисунок 3. Кривые распределения дзета-потенциалов (а) и распределения электрофоретической подвижности (б) белков ГГ (кривая 1) и САЧ (кривая 2) в буферном растворе 10 мМ HEPES pH 6,9

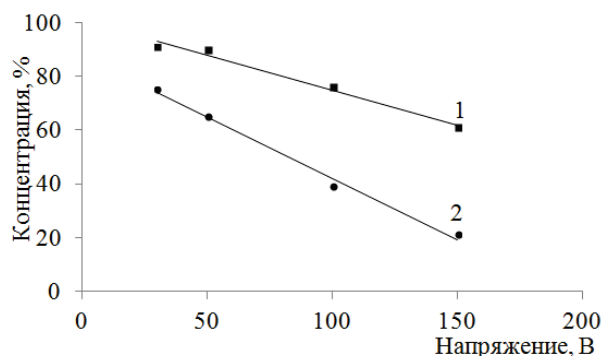


Рисунок 4. Изменение концентрации белков, получаемое в результате ЭФСП ГГ (1) и САЧ (2) от напряжения при постоянной скорости потока 1 мл/ч

Из рис. 4 видно, что при увеличении напряжения на электродах сепарационного устройства наблюдается уменьшение концентрации обоих белков как САЧ так и ГГ. При этом концентрация САЧ при максимальном напряжении 150 В уменьшается почти на 80 %, в то время как уменьшение концентрации ГГ не превышает 40 %.

Предлагаемое в работе сепарационное устройство показывает свою эффективность для разделения смесей белков по их электрофизическим свойствам методом зонного электрофореза в свободном потоке. Такие упрощенные устройства могут быть частью более сложных устройств, предназначенных в дальнейшем для решения аналитических задач, связанных с выделением и идентификацией целевого анализита.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-08-000704.

Список литературы / References:

1. Hoffmann P., Ji H., Moritz R.L. Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM 1215: a non-two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy. *Proteomics*, 2001, vol. 1, pp. 807-818.
2. Maida R., Krieger J., Gebauer T. Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkworm species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *Eur. J. Biochem.*, 2000, vol. 267, pp. 2899-2908.
3. Wang Y., Hancock W.S., Weber G. Free flow electrophoresis coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for a proteomic study of a human cell line. *J. Chromatogr.*, 2004, vol. 1053(A), pp. 269-278.
4. Kessler R., Manz H.J., Székely G. Use of free-flow electrophoresis for the purification of components separated by ion-pair chromatography. *J. Chromatogr.*, 1989, vol. 469, pp. 444-447.
5. Hansen E., Hannig K. Antigen-Specific Electrophoretic Cell Separation (ASECS): isolation of human T and B lymphocyte subpopulations by free-flow electrophoresis after reaction with antibodies. *J. Immunol. Methods*, 1982, vol. 51, pp. 197-208.
6. Eubel H., Lee C.P., Kuo J. Technical Advance: free-flow electrophoresis for purification of plant mitochondria by surface charge. *Plant J.*, 2007, vol. 52, pp. 583-594.
7. Zhang C., Manz A. High-speed free-flow electrophoresis on chip. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, pp. 5759-5766.
8. Nissim M., Shehab M. A. Functional and Complementary Phosphorylation State Attributes of Human Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1 (IGFBP-1) Isoforms Resolved by Free Flow Electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics*, 2009, vol. 8, pp. 1424-1435.
9. Islinger M., Li K. W., Maarten Loos M., Liebler S., Angermüller S. Peroxisomes from the heavy mitochondrial fraction: isolation by zonal free flow electrophoresis and quantitative mass spectrometrical characterization. *J. Proteome Res.*, 2010, vol. 9, pp. 113-124.
10. Ouvry-Patat S. A., Torres M. P., Quek H. H. Free-flow electrophoresis for top-down proteomics by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Proteomics*, 2008, vol. 8, pp. 2798-2808.
11. Moritz R., Ji H., Schutz F. A Proteome Strategy for Fractionating Proteins and Peptides Using Continuous Free-Flow Electrophoresis Coupled Off-Line to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76, pp. 4811-4824.
12. Malmström J., Lee H., Nesvizhskii A., Shteynberg D.J. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Proteome Res.*, 2006, vol. 5, pp. 2241-2249.
13. Raymond D.E., Manz A., Widmer H.M. Continuous sample pretreatment using a Free-Flow electrophoresis device integrated onto a silicon chip. *Anal. Chem.*, 1994, vol. 66, pp. 2858-2865.
14. Fonslow B.R., Barocas V.H., Bowser M.T. Using channel depth to isolate and control flow in a micro Free-Flow electrophoresis device. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, pp. 5369-5374.
15. Geng J., Shao J., Yang J. Reassemblable quasi-chip free-flow electrophoresis with simple heating dispersion for rapid microprep of trypsin in crude porcine pancreatin. *Electrophoresis*, 2011, vol. 32, pp. 3248-3256.

16. Kasička V. From micro to macro: conversion of capillary electrophoretic separations of biomolecules and bioparticles to preparative free-flow electrophoresis scale. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, pp. 40-52.
17. Raymond D., Manz A., Widmer H.M. Continuous separation of high molecular weight compounds using a microliter volume free-flow electrophoresis microstructure. *Anal. Chem.*, 1996, vol. 68, pp. 2515-2522.
18. Kwon J.S., Bowser M.T. Micro Free-Flow Electrophoresis. *Encyclopedia of Nanotechnology*, 2015, vol. 28, pp. 1-15.
19. Kobayashi H., Shimamura K., Akaida T. Free-flow electrophoresis in a microfabricated chamber with a micromodule fraction separator: continuous separation of proteins. *J. Chromatogr.*, 2003, vol. 990 (A), pp. 169-178.
20. Zhang C.-X., Manz A. High-speed free-flow electrophoresis on chip. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, pp. 5759-5766.
21. Fonslow B.R., Bowser M.T. Free-flow electrophoresis on an anodic bonded glass microchip. *Anal. Chem.*, 2005, vol. 77, pp. 5706-5710.
22. Medhat A. Al-Ghobashy Electrophoretic behavior of charge regulated zwitter ionic buffers in covalently and dynamically coated fused silica capillaries. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2014, vol. 52, pp. 71-78.

MICROSEPARATION CELL FOR FREE-FLOW ELECTROPHORESIS OF THE TARGET PROTEIN

Leonovich V.A., Sorokina O.N., Klimov M.A., Pronkin P.G., Plashchina I.G.,
Podoyntsyn S.N.

N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics RAS
Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: alsiona@gmail.com

Abstract. The construction of a simplified separation device and a method for isolating the target protein from a mixture of proteins by a free-flow electrophoresis method is proposed. The effectiveness of the device was theoretically and experimentally demonstrated on the example of separation of hemoglobin protein and human serum albumin. This method of separation is characterized by ease of use and good productivity.

Key words: microsection cell, electrophoresis.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 КАТИОНАМИ ТЕРБИЯ

Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Светозависимое окисление воды и выделение молекулярного кислорода в окислительных организмах осуществляется кислород-выделяющим комплексом (КВК) фотосистемы 2 (ФС2). Каталитическим центром КВК является кластер Mn_4CaO_5 , структура которого в настоящее время расшифрована. Присутствие катионов кальция обязательно для функционирования КВК, и их удаление при сохранении катионов марганца в каталитическом центре приводит к ингибированию функции выделения кислорода. Однако механизм участия Ca^{2+} в функционировании КВК до сих пор не установлен. Известно, что некоторые ионы редкоземельных элементов имеют сходные с ионами кальция физико-химические свойства и взаимодействуют с Ca^{2+} -связывающими белками. Такое связывание либо ингибирует функциональную активность белка, либо может частично восстанавливать её в отсутствие Ca^{2+} . В настоящей работе исследовано влияние одного из редкоземельных элементов (тербия) на скорость электронного транспорта в мембранных препаратах ФС2. Основной акцент сделан на сопоставлении влияния катионов тербия на функцию выделения кислорода и транспорт электронов через ФС2 к искусственному акцептору. Обнаружено, что Tb^{3+} ингибирует выделение кислорода более эффективно, чем восстановление искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндифенола на акцепторной стороне ФС2, то есть его действие приводит к разобщению этих процессов. Аналогичный эффект наблюдается при экстракции катионов кальция из КВК [Semin et al. Photosynth. Res. 98 (2008) 235]. Предполагается, что ингибирующий эффект катионов тербия связан с замещением Ca^{2+} и/или вытеснением периферических белков PsbP и PsbQ из ФС2.

Ключевые слова: фотосистема 2, тербий, кальций, кислород-выделяющий комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

Появление на Земле примерно 2,4 млрд лет назад кислородного фотосинтеза привело к масштабным перестройкам биосферы. Вероятно, накопление в атмосфере кислорода – побочного продукта окислительного фотосинтеза – открыло возможности для появления эукариотической клетки и многоклеточных растений и животных [1]. Светозависимое окисление воды, выделение молекулярного кислорода и восстановление пула хинонных акцепторов электронов осуществляет фотосистема 2 (ФС2) – пигмент-белковый комплекс, обнаруженный у цианобактерий, различных групп водорослей и высших растений. ФС2 содержит кислород-выделяющий комплекс (КВК), в состав которого входят 4 иона марганца, ион кальция и один или два иона хлора [2]. Установлено, что катионы кальция необходимы для функционирования КВК, так как их удаление при сохранении катионов марганца и Mn-стабилизирующего белка ингибирует светозависимое выделение кислорода [3]. Однако механизм участия Ca^{2+} в функционировании КВК до сих пор не установлен. Высказывались предположения, что ионы кальция принимают участие в связывании окисляемых молекул воды или модифицируют окислительно-восстановительный потенциал КВК [4].

Показано, что ингибиторы Ca^{2+} -связывающего регуляторного белка кальмодулина и ингибиторы кальциевых каналов могут снижать скорость транспорта электронов в ФС2 [5, 6]. Кроме того, аналогичными свойствами обладают ионы металлов – антагонисты ионов Ca^{2+} , например, Al^{3+} и Cd^{2+} [5]. Известно, что некоторые ионы редкоземельных элементов имеют сходные с ионами кальция физико-химические свойства, в частности, радиус и координационное число, и взаимодействуют с Ca^{2+} -связывающими белками. Такое связывание либо ингибирует функциональную активность белка, либо может частично восстанавливать её в отсутствие Ca^{2+} [7]. В работе Оно [8] изучалось взаимодействие некоторых лантаноидов с Ca^{2+} -связывающим участком ФС2. Полученные результаты позволили автору высказать предположение, что лантаноиды ингибируют активность КВК по смешанному типу, имея собственные участки связывания и конкурируя с Ca за связывание с Ca^{2+} -связывающим участком, причем сродство к нему уменьшается с увеличением радиуса металла. В настоящей работе исследовалось влияние одного из малоизученных ионов редкоземельных элементов тербия Tb^{3+} на скорость электронного транспорта в мембранных препаратах ФС2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Частицы ФС2 с активным КВК получали путем солюбилизации тилакоидных мембран рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. детергентом Тритон X-100 согласно методике [9]. Все измерения проводили в буфере А, содержащем 400 мМ сахарозу, 15 мМ NaCl, 50 мМ Mes (2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту), pH 6,5. Функциональную активность частиц ФС2 оценивали по скорости восстановления искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндифенола (ДХФИФ) и скорости выделения кислорода при фотоокислении воды в присутствии акцептора 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (ДХБХ). Концентрации акцепторов составляли 40 мкМ ДХФИФ и 200 мкМ ДХБХ. Кинетику фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ регистрировали фотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (Германия) при длине волны 600 нм. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции для депротонированной окисленной формы ДХФИФ, равный $21800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [10]. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода регистрировали амперометрически с помощью полярографа LP-7e (Laboratomi Pistroje, Чешская Республика) и закрытого электрода Кларка в термостатируемой ячейке при температуре 25 °С. Для калибровки диффузионного тока использовали значение концентрации кислорода в воде в равновесии с воздухом при 25 °С и атмосферном давлении, равное 253 мкМ. Источниками возбуждающего света были светодиоды XBDROY (Cree Inc., США) с максимумом испускания 450 нм. Кривые индукции флуоресценции (КИФ) измеряли с помощью портативного прибора Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания). Источником света служил светодиод с максимумом излучения 650 нм (спектральный диапазон 580-710 нм). Суммарную концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли согласно [11]; при всех измерениях она составляла 10 мкг/мл. Для удаления ионов марганца частицы ФС2 инкубировали в течение 15 минут в буфере с pH 8,5, содержащем 0,8 мМ Tris (трис(гидроксиметил)аминометан), при комнатном освещении (концентрация хлорофилла 500 мкг/мл). Далее препараты осаждали центрифугированием (3 мин, $16100 \times g$) и ресуспендировали в буфере А. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. Tb^{3+} добавляли к частицам ФС2 в виде раствора сульфата металла в буфере А. Перед измерениями препараты инкубировали с Tb^{3+} при комнатном освещении и температуре 25 °С в течение 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе проведено сравнительное исследование электрон-транспортной функции и способности к выделению кислорода ФС2 в присутствии ионов тербия. Результаты влияния Tb^{3+} на скорость восстановления ДХФИФ и выделения кислорода ФС2 мембранами представлены на рисунках 1 и 2.

На рисунке 1А приведены типичные кинетические кривые фотоиндуцированного изменения оптической плотности искусственного акцептора электронов ДХФИФ при 600 нм в присутствии контрольных препаратов ФС2 и препаратов ФС2 с 2 мМ Tb^{3+} в среде инкубации. Снижение оптической плотности обусловлено восстановлением ДХФИФ с образованием бесцветного продукта. Типичные кривые выделения кислорода частицами ФС2 приведены на рисунке 1Б. Оба процесса были практически линейными в течение как минимум 15 с после включения возбуждающего света для препаратов ФС2 как в отсутствие ионов Tb^{3+} , так и в их присутствии при всех использованных концентрациях (50 мкМ-2 мМ).

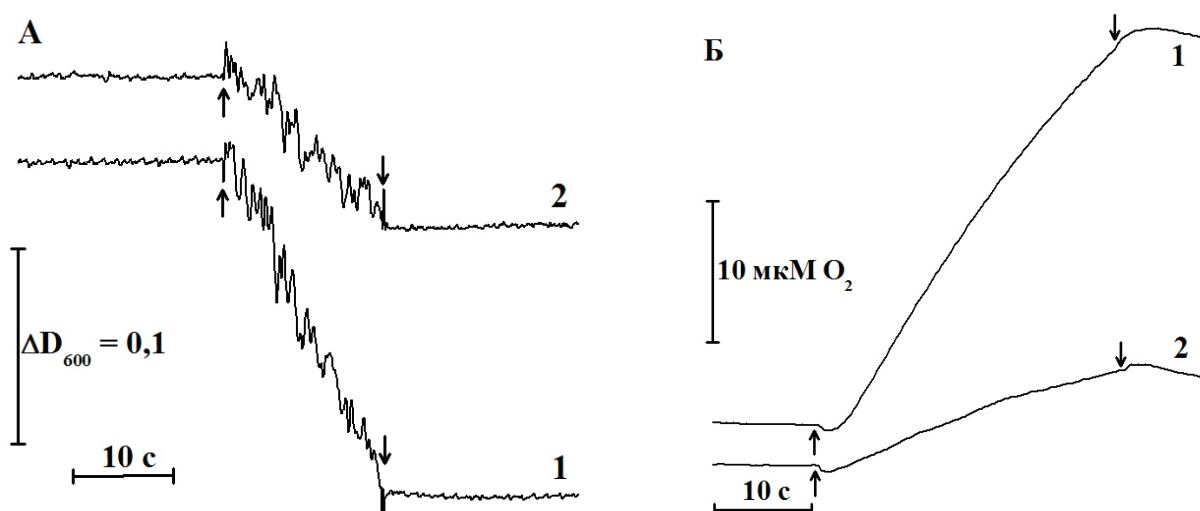


Рисунок 1. Кинетические кривые фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ (А) и выделения O_2 (Б) мембранными препаратами ФС2 в отсутствие Tb^{3+} (1) и в присутствии 2 мМ Tb^{3+} . Стрелками обозначены моменты включения (↑) и выключения (↓) возбуждающего света

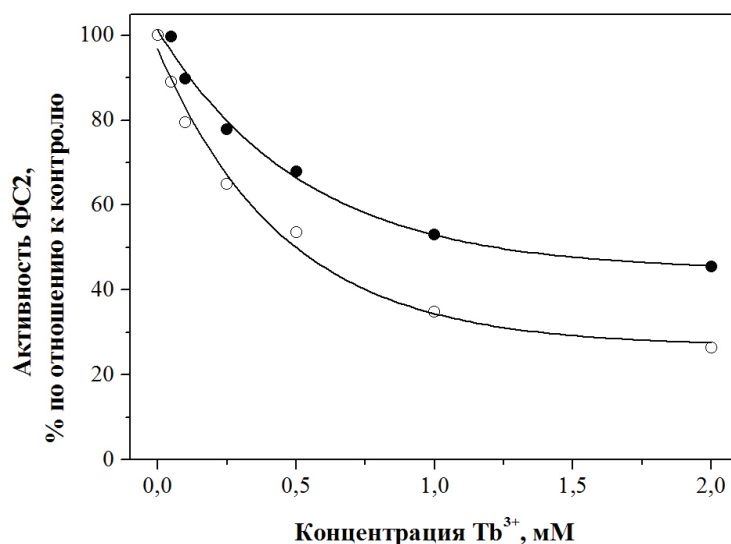


Рисунок 2. Влияние Tb^{3+} на скорость восстановления ДХФИФ (—●—) и выделения кислорода (—○—) частицами ФС2. 100 % соответствует скорости восстановления ДХФИФ 180 мкмоль/мг хлорофилла в час и скорости выделения O_2 450 мкмоль/мг хлорофилла в час

Зависимости активности ФС2 от концентрации Tb^{3+} , рассчитанные по скоростям восстановления ДХФИФ и выделения кислорода, приведены на рисунке 2. В присутствии Tb^{3+} снижалась как скорость восстановления ДХФИФ, так и скорость выделения O_2 на свету. Полученные нами результаты в целом согласуются с данными, приведенными в работах [5] и [12]. Однако следует отметить, что ингибирующий эффект тербия на фотоиндуцированное восстановление ДХФИФ выражен заметно слабее, чем на выделение O_2 . В частности, при максимальной использованной концентрации Tb^{3+} 2 мМ скорость выделения кислорода препаратами ФС2 снижается до 26 % от контрольного уровня, а скорость донирования электронов на ДХФИФ лишь до 45 %. Ранее подобный эффект значительного ингибирования светозависимого выделения кислорода при сохранении способности поставлять электроны в электрон-транспортную цепь был выявлен в препаратах ФС2, из которых были удалены ионы Ca^{2+} путем обработки 2 М NaCl в отсутствие экзогенных хелаторов [13]. Этот феномен, названный «эффектом разобщения», был обнаружен позднее и при обработке ФС2 ионами F^- , CH_3COO^- и NH_4^+ [14].

Однако обнаруженный нами эффект различия в эффективности ингибирования светозависимого восстановления ДХФИФ и выделения кислорода ФС2 в присутствии Tb^{3+} может быть связан с тем, что при определении активности двумя различными методами использовались разные электронные акцепторы (ДХФИФ и ДХБХ). Чтобы исключить эту возможность, мы исследовали влияние тербия на КИФ препаратов ФС2 и сравнили полученные кривые с КИФ ФС2 в присутствии 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевины (диурона – блокатора переноса электрона с первичного хинонного акцептора Q_A на вторичный хинонный акцептор Q_B) и КИФ ФС2, из которой удалены ионы марганца обработкой Tris-буфером в щелочной среде (ФС2(-Mn)). Важно отметить, что регистрация КИФ позволяет исследовать транспорт электронов на донорной и акцепторной стороне ФС2 в отсутствие экзогенных акцепторов. Полученные кривые приведены на рисунке 3.

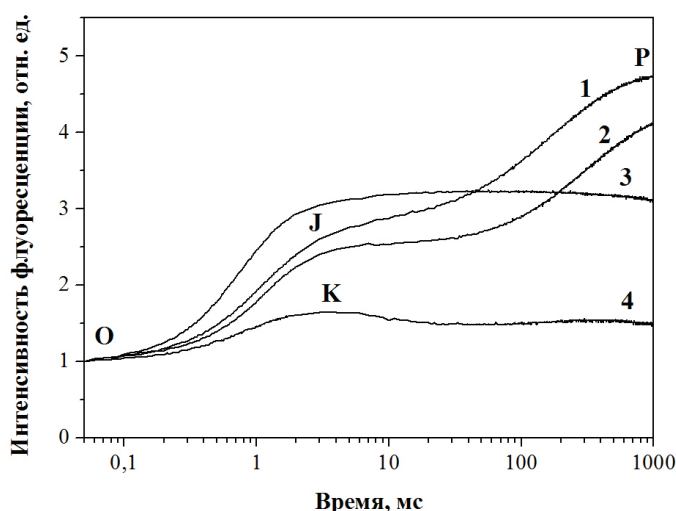


Рисунок 3. Кривые индукции флуоресценции различных препаратов ФС2: 1 – контроль (ФС2 без добавок); 2 – ФС2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} ; 3 – ФС2 в присутствии 40 мкМ диурона; 4 – ФС2(-Mn) без добавок

Построенная в полулогарифмических координатах КИФ нативной ФС2 (кривая 1, рис. 3) характеризуется наличием двух участков – О-И и И-Р. Участок О-И соответствует восстановлению первичного пластохинона Q_A , а участок И-Р – восстановлению вторичного пластохинона Q_B [15]. В присутствии диурана (кривая 3, рис. 3) флуоресценция монотонно возрастает и достигает максимума, соответствующего восстановлению только первичного акцептора Q_A . КИФ ФС2(-Mn) (кривая 4) характеризуется изначальным незначительным возрастанием интенсивности флуоресценции и достижением максимума К с последующим её падением. Пик К соответствует восстановлению Q_A на свету, дальнейшее падение интенсивности флуоресценции связано с окислением Q_A вторичным акцептором Q_B при отсутствии потока электронов со стороны КВК [16]. КИФ ФС2 в присутствии Tb^{3+} (кривая 2, рис. 3) по форме сходна с КИФ нативной ФС2: участок кривой И-Р сохраняется, хотя и характеризуется более медленным нарастанием интенсивности флуоресценции. При этом форма КИФ в присутствии тербия существенно отличается от формы КИФ препаратов ФС2 в присутствии диурана (заблокирован электронный транспорт на акцепторной стороне) и КИФ препаратов ФС2(-Mn) (заблокирован электронный транспорт на донорной стороне). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что в частицах ФС2, обработанных Tb^{3+} , электронный транспорт сохраняется и в отсутствие экзогенного акцептора.

Таким образом, можно заключить, что в присутствии ионов Tb^{3+} выделение O_2 частицами ФС2 ингибируется более эффективно, чем электронный транспорт, то есть наблюдается разобщение этих процессов. Этот эффект может быть связан с ингибированием функции Ca^{2+} в КВК, приводящим к нарушению функционирования S-цикла. Хотя природа донора электронов в частицах ФС2, обработанных тербием, к настоящему моменту неясна, можно предположить, что им является вода, которая в данном случае окисляется до пероксида водорода H_2O_2 или других продуктов неполного восстановления молекулярного кислорода [17].

Список литературы / References:

1. Lane N., Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*, 2010, vol. 467, pp. 929-934.
2. Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 2011, vol. 473, pp. 55-60.
3. Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F. Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations. *FEBS Lett.*, 1984, vol. 167, pp. 127-130.
4. McEvoy J.P., Brudvig G.W. Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical reviews*, 2006, vol. 106, pp. 4455-4483.
5. Nakatani H.Y. Inhibition of photosynthetic oxygen evolution by calmodulin-type inhibitors and other calcium-antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 121, pp. 626-633.
6. Carpentier R., Nakatani H.Y. Inhibitors affecting the oxidizing side of Photosystem II at the Ca^{2+} -and Cl^- -sensitive sites. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 808, pp. 288-292.
7. Evans C.H. *Biochemistry of the Lanthanides*. N.-Y.: Springer Science & Business Media, 1990, 444 p.
8. Ono T. Effects of lanthanide substitution at Ca^{2+} -site on the properties of the oxygen evolving center of photosystem II. *J. Inorg. Biochem.*, 2000, vol. 82, pp. 85-91.
9. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II. *FEBS Lett.*, 1983, vol. 153, pp. 231-234.
10. Armstrong J.M. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenolindophenol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, vol. 86, pp. 194-197.
11. Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, vol. 975, pp. 384-394.
12. Popovic R., Carpentier R., Morin L. Determination of fluorescence inductions in a PSII submembrane fraction affected by additives. *J. Plant Physiol.*, 1988, vol. 132, pp. 754-757.
13. Semin B.K., Davletshina L.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Decoupling of the processes of molecular oxygen synthesis and electron transport in Ca^{2+} -depleted PSII membranes. *Photosynth. Res.*, 2008, vol. 98, pp. 235-249.
14. Lovyagina E.R., Semin B.K. Mechanism of inhibition and decoupling of oxygen evolution from electron transfer in photosystem II by fluoride, ammonia and acetate. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, 2016, vol. 158, pp. 145-153.
15. Pospíšil P., Dau H. Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.*, 2000, vol. 65, pp. 41-52.
16. Strasser B.J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynth. Res.*, 1997, vol. 52, pp. 147-155.
17. Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca^{2+} -depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII. *Photosynth. Res.*, 2013, vol. 117, pp. 385-399.

INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II ELECTRON-TRANSPORT CHAIN BY TERBIUM IONS

Loktyushkin A.V., Lovyagina E.R., Semin B.K.

M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory str., 1, building 12, Moscow, 119234, Russia; e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com

Abstract. Light-dependent water oxidation and evolution of molecular oxygen in the oxygenic organisms is performed by oxygen-evolving complex (OEC) of photosystem II (PSII). Catalytic center of the OEC is the Mn_4CaO_5 cluster the structure of which is determined now. The presence of calcium cation in the OEC is necessary for OEC function and extraction of this cation from the OEC without depletion of Mn cations inhibits the oxygen evolution reaction. However, the mechanism of Ca^{2+} participation in the water splitting by OEC is unclear now. It is known that the ions of rare-earth metals have similar physical and chemical properties with Ca^{2+} ions and interact with Ca^{2+} -binding proteins. Possibly such interaction could either inhibit the protein function in the absence of Ca^{2+} or could partially reduce its function in the absence of Ca^{2+} . In the present study it was investigated the effect of the one of rare-earth metals – terbium – on the electron-transport rate in the membrane preparations of PSII. The focus of attention in our study was the correlation between the terbium effect on the oxygen evolution reaction and the electron transport to artificial electron acceptor. We found that Tb^{3+} inhibits the oxygen evolution more effectively than reduction of the artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol on the acceptor side of PSII that is terbium action provides the decoupling of these processes. Similar effect is observed in Ca-depleted PSII membranes [Semin et al. Photosynth. Res. 98 (2008) 235]. Taking these results into account we suppose that terbium inhibition effect is determined by its substitution of Ca^{2+} cation in the OEC and/or extraction of extrinsic proteins PsbP and PsbQ.

Key words: *photosystem II, terbium, calcium, oxygen-evolving complex.*

РОЛЬ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ И ФОТОТЕРАПИИ ВИТИЛИГО

Телегина Т.А.^{1,2}, Низамутдинов А.С.², Буглак А.А.³, Шавров А.Н.¹, Лукинова Е.В.²,
Вечтомова Ю.Л.^{1,2}, Крицкий М.С.¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ленинский проспект, 33, коп. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: telegina@inbi.ras.ru

²Казанский государственный университет

ул. Кремлевская, 18, г. Казань, 420008, РФ

³Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская набережная, 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Нарушение меланогенеза ведёт к развитию ряда патологий, включая витилиго. Тетрагидробиоптерин (H₄Bir) в качестве кофермента фенилаланингидроксилазы участвует в окислении фенилаланина в тирозин (предшественник меланина). H₄Bir легко окисляется кислородом *in vivo* и *in vitro*. При витилиго наблюдается трёх-пятикратный *de-novo* синтез, его избыток и последующее автоокисление рассматриваются в качестве важных факторов в патогенезе витилиго. Мы показали, что птериновые продукты автоокисления (дигидроптерин (H₂Ptr), дигидроксантоптерин, птерин) преобладают над биоптериновыми продуктами (дигидробиоптерин (H₂Bir), биоптерин). Показали, что ультрафиолетовое (УФ) излучение ускоряет автоокисление H₄Bir в присутствии окисленных производных, служащих фотосенсибилизаторами. Фотосенсибилизированное окисление H₄Bir может вносить вклад в патогенез витилиго. Установили, что основной отличительной чертой фотоокисления H₄Bir от его автоокисления является образование димеров дигидроптерина (H₂Ptr)₂ и дигидробиоптерина (H₂Bir)₂. Используя в качестве источников УФ излучения ксеноновые лампы и УФ перестраиваемые лазеры, в работе изучены зависимости реакции фотодимеризации от длины волны и интенсивности излучения. Показано, что облучение УФ лазером более эффективно по сравнению с облучением ксеноновой лампой. Установлено, что наибольшее количество димеров образуется при облучении раствора H₄Bir излучением с длинами волн 308-312 нм. Полученные данные обсуждены в контексте УФ-В узкополосной фототерапии витилиго.

Ключевые слова: тетрагидробиоптерин, УФ облучение, автоокисление тетрагидробиоптерина, фотоокисление тетрагидробиоптерина, азациклобутановые димеры, фототерапия витилиго.

5,6,7,8-Тетрагидробиоптерин (H₄Bir) является коферментом фенилаланингидроксилазы [1], которая катализирует окисление молекулярным кислородом фенилаланина в тирозин (предшественник меланина) на начальном этапе процесса меланогенеза. Нарушение меланогенеза происходит при ряде дерматологических заболеваний, в том числе при витилиго, которое характеризуется появлением депигментированных участков кожи. Тетрагидробиоптерин является полностью восстановленным птерином и легко окисляется кислородом (автоокисление) *in vivo* и *in vitro* [2]. При автоокислении наряду с окисленными птеринами образуются и активные формы кислорода (АФК) (O₂^{•-} супероксид-анион радикал и H₂O₂ –пероксид водорода). При витилиго H₂O₂ определяется в коже пациентов в миллимолярных концентрациях. Образование АФК приводит к окислительному стрессу, который рассматривается в качестве одного из существенных факторов в патогенезе витилиго. У пациентов с витилиго наблюдается трёх-пятикратный *de-novo* синтез H₄Bir [3-7] и образующийся избыток H₄Bir может подвергаться автоокислению.

Процесс автоокисления H₄Bir начинается со спонтанной реакции переноса электрона с тетрагидробиоптерина на молекулу кислорода, в результате которой образуется супероксид-анион радикал (O₂^{•-}) и тетрагидробиоптерин-катион радикал (H₄Bir^{•+}) [8]:



Или образуется тригидробиоптериновый радикал H₃Bir[•] и гидропероксильный радикал HOO[•] [9]:



Свободные радикалы и АФК участвуют в дальнейших реакциях активации молекулярного кислорода и окисления H₄Bir. В целом, автоокисление H₄Bir является радикальным цепным процессом [9,10,11]. Первым молекулярным продуктом автоокисления H₄Bir является хиноноидный 6,7-дигидробиоптерин (qH₂Bir) с временем жизни 1,5 минуты. Затем qH₂Bir изомеризуется в более стабильный 7,8 дигидробиоптерин (H₂Bir) или трансформируется в 7,8-дигидроптерин (H₂Ptr) путём отрыва бокового радикала. H₂Ptr легко окисляется кислородом до дигидроксантоптерина (H₂Xar) и птерина (Pterin), а H₂Bir окисляется до биоптерина (Bir). На рисунке 1 представлены молекулярные продукты, образующиеся в процессе автоокисления H₄Bir [2].

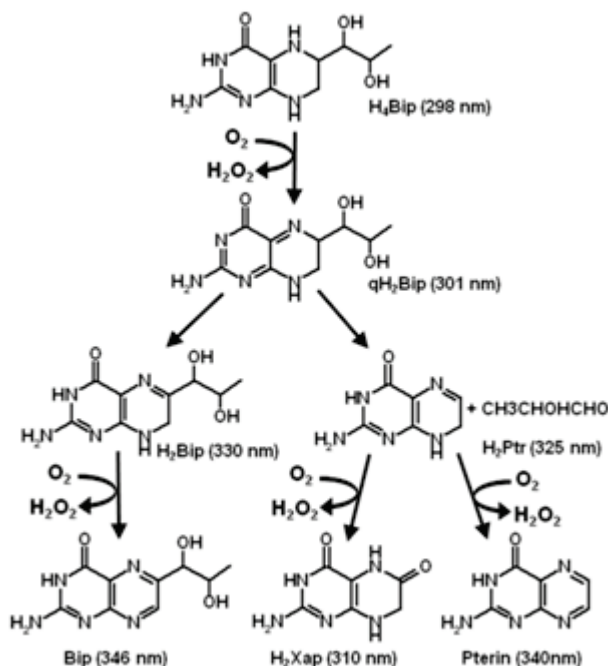


Рисунок 1. Схема автоокисления тетрагидробиоптерина, в скобках длинноволновые максимумы в спектрах поглощения

Методом HPLC-MS/MS-масс-спектрометрии удалось показать, что птериновые продукты автоокисления H₄Bip (дигидроптерин, дигидроксантиптерин и птерин) преобладают над окисленными биоптериновыми продуктами (дигидробиоптерин и биоптерин) [12]. Важным моментом при рассмотрении автоокисления избытка H₄Bip, сопровождающего витилиго, является образование H₂O₂ на каждом этапе окислительного процесса. Накопление H₂O₂ может приводить к формированию окислительного стресса.

Наше предположение, что УФ излучение, действуя прямо на H₄Bip (максимум в его спектре поглощения равен 298 нм) [11] может ускорять реакцию окисления с кислородом подтвердилось. УФ облучение при длине волны 300 нм увеличивало начальную скорость реакции окисления почти в три раза. Так, начальная скорость процесса окисления 43 мкМ водного раствора H₄Bip без облучения равнялась $(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$, с облучением она составляла $(18,1 \pm 1,0) \times 10^{-9} \text{ М с}^{-1}$. Квантовый выход равнялся $(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$. Более сильное воздействие на окисление H₄Bip оказывало излучение с длиной волны 350 нм. При этом облучении квантовый выход составлял $(7,7 \pm 1,2) \times 10^{-3}$. Молекулы H₄Bip не поглощают фотоны в области 350 нм, но в этой области поглощают окисленные птерины. Длина волны 350 нм близка к длинноволновому максимуму птерина (340 нм) и биоптерина (346 нм), которые являются продуктами автоокисления H₄Bip (рисунок 1). Было предположено, что окисленные птерины фотосенсибилизируют окисление H₄Bip. Действительно, в присутствии биоптерина излучение с длиной волны 350 нм значительно ускоряло процесс окисления H₄Bip и квантовый выход реакции окисления достигал $(9,7 \pm 1,5) \times 10^{-3}$. Была проведена серия экспериментов, в которых изучалась сенсибилизирующая активность биоптерина и устанавливался механизм сенсибилизированного биоптеринном окисления по данным квантово-химических расчётов. Экспериментально показано, что скорость окисления H₄Bip линейно зависит от концентрации биоптерина. Опыты с иодидом калия (селективный тушитель триплетных состояний птерина) показали, что окисление H₄Bip сенсибилизируется птеринном в триплетном состоянии. Согласно квантово-химическим расчётам, возможна прямая реакция переноса электрона с H₄Bip на биоптерин в триплетном состоянии, а сенсибилизированная биоптеринном генерация АФК возможна за счёт прямого переноса энергии, но не за счёт прямого переноса электрона [11, 13]. Показано, что механизм сенсибилизации за счёт транспорта электрона (механизм 1 типа) является доминирующим. Перенос энергии (механизм 2 типа) и генерация синглетного кислорода играют второстепенную роль. Механизмы этих фотопроцессов подробно описаны в нашей работе [11].

На основании полученных результатов можно заключить, что при УФ воздействии имеет место взаимодействие процессов автоокисления и фотоокисления H₄Bip по механизмам фотосенсибилизации I и II типа. При витилиго в депигментированных клетках эпидермиса происходит трёх-пятикратное накопление H₄Bip вследствие его *de novo* синтеза, а также накопление биоптерина [3]. В этих условиях возможно фотосенсибилизированное окисление H₄Bip с участием продукта его окисления – биоптерина, что может вести к дальнейшему развитию патологии при воздействии УФ излучения на депигментированные участки кожи.

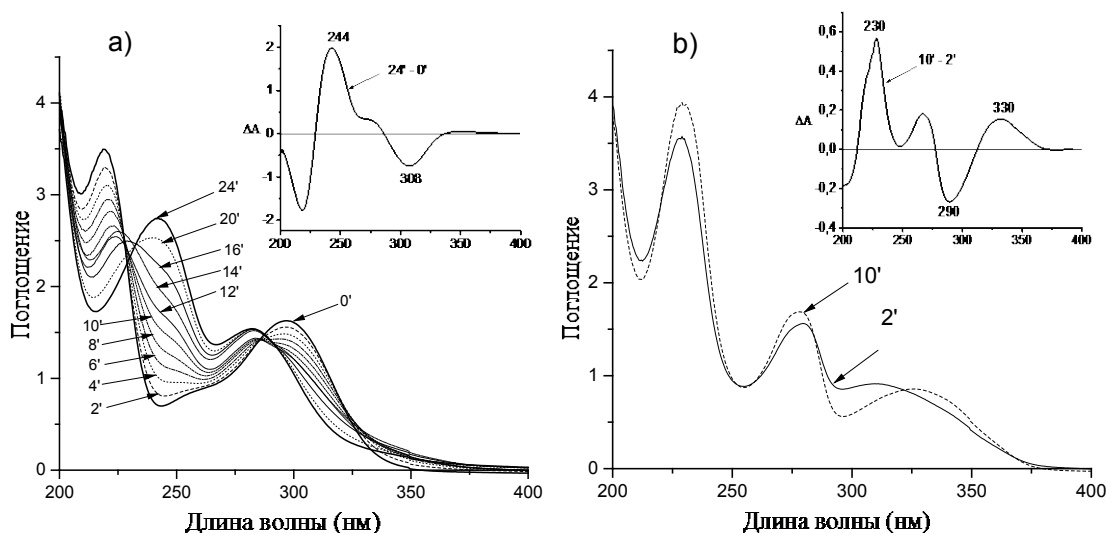


Рисунок 2. Кинетика (а) фотоокисления и (б) автоокисления тетрагидробиоптерина при облучении с длиной волны 312 нм; плотность мощности излучения 12,1 Вт/м². На вставке – разностный спектр ($A_t - A_0$)

Далее было изучено воздействие УФ излучения на окисление H_4Bir в широком спектральном диапазоне с использованием двух источников УФ излучения – ксеноновой лампы и ртутной лампы высокого давления ДРК 120 в комбинации со светофильтром УФС-6 (полоса пропускания 300-380 нм.) [12]. Было показано, что конечные продукты фотоокисления отличаются от продуктов автоокисления.

ВЭЖХ анализ продуктов фотоокисления выявил, что среди продуктов реакции появляется новое соединение, с временем удерживания на катионообменной колонке Partisil SCX, превышающим времена удерживания продуктов реакции темнового автоокисления (в основном, H_2Bir , Bir). При этом накопление нового соединения шло параллельно с нарастанием поглощения в области 240-250 нм. Спектр поглощения показал, что в результате фотоокисления H_4Bir накапливается соединение с максимумом поглощения в области 245 нм и плечом в области 275 нм. Спектральные характеристики исследуемого соединения были близки к спектральным характеристикам димеров дигидробиоптерина (H_2Bir)₂ (максимум поглощения при 246 нм и плечо при 280 нм), которые в очень маленьких количествах образуются при УФ облучении H_2Bir в отсутствие кислорода [14,15]. Дальнейшее изучение хроматографических, спектральных, флуоресцентных свойств и масс-спектрометрический анализ исследуемого соединения, а также сравнение с димерами, образующимися при облучении тетрагидроптерина (H_4Ptr), позволили нам сделать заключение, что при фотоокислении H_4Bir образуются преимущественно димеры дигидроптерина (H_2Ptr)₂ и в относительно меньших количествах димеры дигидробиоптерина (H_2Bir)₂ [12].

Одной из задач нашей работы, связанной с изучением механизма УФ-В фототерапии витилиго, было определение спектра действия реакции фотодимеризации. С этой целью изучалось фотоокисление H_4Bir при использовании в качестве источников УФ излучения ксеноновой лампы с монохроматором и перестраиваемого импульсного УФ лазера. Водные растворы H_4Bir с концентрацией $(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ М в 0,1 М Трис или фосфатном буфере облучали различным УФ излучением в спектральном диапазоне 300-350 нм. За протеканием темнового и фото процессов окисления следили по изменению спектров поглощения. В качестве примера на рисунке 2 приведена эволюция во времени спектров поглощения H_4Bir при фотоокислении (рис. 2а) и автоокислении в темноте (рис. 2б).

Спектральный анализ темнового процесса показал, что разностный спектр поглощения ($A_t - A_0$), представленный на вставке в основной спектр, является спектральной кривой, близкой к спектру поглощения H_2Bir с максимумами поглощения 230, 280 и 330 нм. В случае фотоокисления по мере протекания процесса увеличивалось поглощение в области 240-250 нм, что указывало на образование димеров. На разностном спектре (вставка на рисунке 2а), отражающем разницу ($A_t - A_0$) видно, что в результате облучения в течение 24 минут на длине волны 312 нм в растворе накапливались димеры, имеющие максимум поглощения в области 245 нм и плечо в области 275 нм. Эти данные свидетельствовали о том, что в результате фотореакции димеризации образовывались димеры, в основном, дигидроптеринового типа (H_2Ptr)₂. Были проведены опыты по облучению H_4Bir ксеноновой лампой с выделением узкополосного света с помощью монохроматора в спектральном диапазоне 300-325 нм с шагом в 2 нм. Темновой интервал во время облучения, в течение которого записывался спектр, составлял 1 минуту. В серии экспериментов было показано, что химический выход реакции фотодимеризации при каждой используемой длине волны находится в прямой зависимости от дозы облучения образца, т.е. интенсивности излучения и времени облучения. С учётом нормированных по интенсивности величин выходов реакции, мы определили, что наиболее эффективным излучением для протекания реакции фотодимеризации является излучение с длиной волны 312 нм.

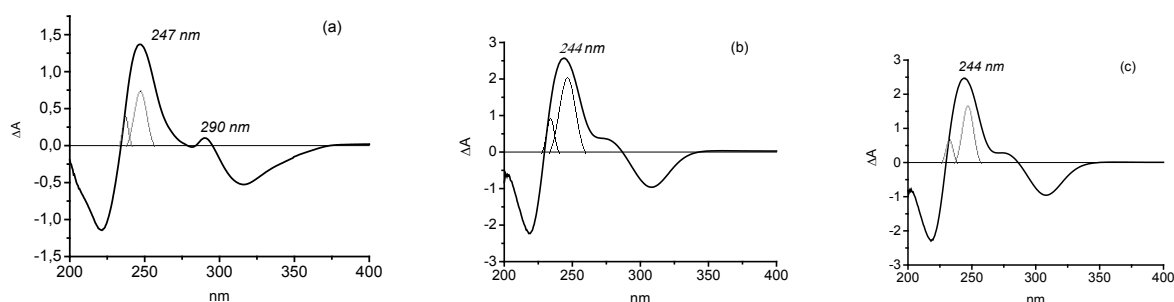


Рисунок 3. Разложение экспериментальных спектров продуктов фотореакции на гауссианы: а) облучение на длине волны 300 нм, б) на длине волны 312 нм, с) на длине волны 325 нм

С целью вычисления выхода димера относительно суммы продуктов реакции фотоокисления H_4Bir спектр продуктов был аппроксимирован суммой гауссовых функций, соответствующих полосам поглощения продуктов. Важными для оценки количества продуктов являются полоса поглощения с максимумом в области 230 нм, соответствующая участвующим в димеризации дигидроптерину (H_2Ptr) и/или дигидробиоптерину (H_2Bir), и полоса с максимумом в области 245 нм, соответствующая поглощению димера (H_2Ptr)₂. Как видно из полученных данных, приведенных на рисунке 3 для трёх длин волн облучения, наибольший выход димера (83 % от суммы продуктов реакции) наблюдался при облучении на длине волны 312 нм.

При облучении на 300 нм практически вообще не образуются дигидроптериновые димеры, поскольку полученный разностный спектр $\Delta A = (A_t - A_0)$ отличается от спектра поглощения димеров дигидробиоптерина, в котором должен быть максимум при 245 нм и перегиб в области 275 нм, связанный с поглощением пиримидиновым кольцом птериновой структуры. В разностном спектре при облучении 300 нм, отражающем спектр поглощения продуктов фотореакции, отсутствует плечо в спектре поглощения в области 275-280 нм.

В настоящее время популярным и более эффективным инструментом фототерапии витилиго является импульсно-периодическое воздействие, длительность импульса составляет порядка 10 нс, частота следования импульсов – десятки кГц, что определяет малые периоды воздействия, чередующиеся с периодами темноты. В рамках настоящей работы был исследован спектр действия именно импульсно-периодического лазерного излучения с длительностью импульса порядка 7 нс и частотой следования импульсов 10 Гц. Источником излучения являлся лазер на активной среде $Ce:LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4$, который позволяет получать излучение с перестройкой от 305 нм до 335 нм [16,17]. Также для облучения было использовано лазерное излучение с длинами волн 300 нм и 342 нм, полученное путем преобразования излучения 4-й гармоники лазера $Nd:YAG$ за счет эффекта вынужденного комбинационного рассеяния в ячейке, заполненной газом H_2 . Дело в том, что эта ВКР-ячейка была использована также для обеспечения накачки для указанного лазера $Ce:LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4$.

На рисунке 4(а) представлена эволюция спектров поглощения раствора тетрагидробиоптерина в результате облучения лазерным УФ излучением с длиной волны 311 нм. Следует отметить, что спектры поглощения продуктов фотоокисления отличаются от результатов для облучения непрерывным светом, а именно увеличивается поглощение в области 230 нм. По-видимому, импульсно-периодический характер облучения приводит к уменьшению дозы, то есть времени облучения, и генерация димеров является гораздо менее эффективной.

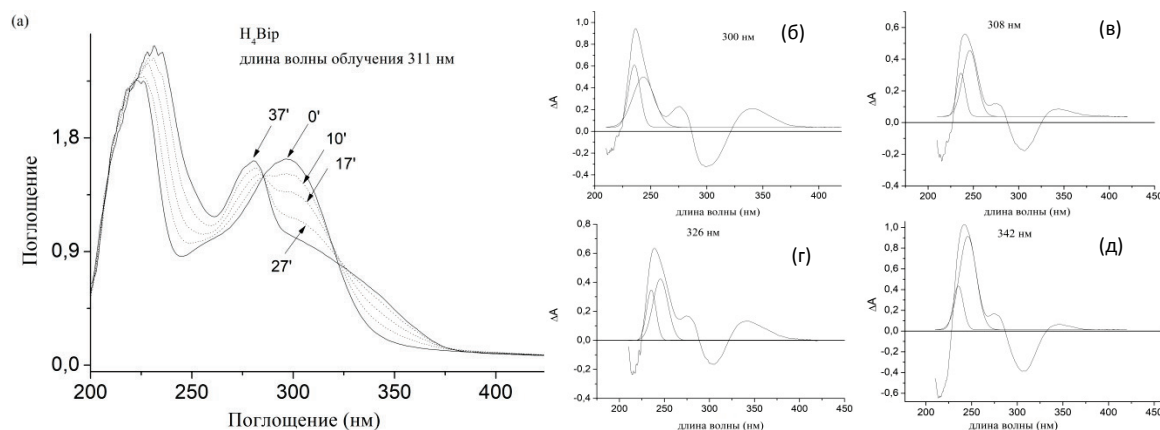


Рисунок 4. (а) кинетика фотоокисления тетрагидробиоптерина при облучении УФ лазером с длиной волны 311 нм, плотность энергии излучения 0,1 мДж/см², спектры продуктов фотоокисления при облучении УФ лазером с длиной волны 300 нм (б), 308 нм (в), 326 нм (г), 342 нм (д)

Таблица 1. Оценки относительного выхода димеров дигидроптеринов при фотоокислении H₄Bip с различными длинами волн и различными источниками

Длина волны облучения, нм	300 нм	308 нм лазер, 312 нм лампа	325 нм	342 нм
УФ лампа	Димер не образуется	83 %	54 %	Эксперимент не проводился
Лазер Ce:LiY _{0.3} Lu _{0.7} F ₄	60 %	65 %	61 %	75 %

Это выражается в смещении коротковолновой полосы поглощения в разностных спектрах продуктов фотоокисления в область 239-241 нм (рисунки 4 (б)-(д)).

При этом видно, что для всех длин волн облучения присутствует поглощение в области 275-280 нм, что свидетельствует о наличии димерных молекул. По-видимому, малая длительность импульса света, инициирующего фотореакции, приводит к более сложным процессам, например, поглощение из возбужденного состояния, что может повлечь включение иных механизмов образования димеров дигидроптеринов. Тем не менее, можно оценить относительный выход продуктов по процедуре, описанной ранее. Результаты представлены в таблице 1.

Результаты как экспериментов с непрерывным излучением лампы, так и с импульсно-периодическим лазерным светом, свидетельствуют об эффективности света с длиной волны 308-312 нм в фотоиндуцированном образовании димеров дигидроптеринов. Высокий выход димеров при облучении лазерным светом с длиной волны 342 нм, по-видимому, связан с тем, что эта длина волны соответствует поглощению дигидробиоптерина. Однако такое излучение будет влиять на ферментативный процесс восстановления хиноноидного дигидробиоптерина в цикле регенерации тетрагидробиоптерина с участием NADH, имеющим в спектре поглощения максимум при 340 нм.

В целом, длины волн соответствующие максимальному выходу димеров, 312 нм и 308 нм, соответствуют длинам волн, которые в настоящее время используются в медицинской практике для фототерапии витилиго и псориаза в приборах с люминесцентными лампами (311 нм), эксимерными лампами и эксимерными лазерами (308 нм). Каков механизм действия такого излучения? Установлено, что избыток H₄Bip и продукты его окисления ингибируют биосинтез меланина. Большое число реакций окисления H₄Bip, указанных на рисунке 1, ведут к накоплению пероксида водорода и окислительному стрессу при витилиго [3,4,5,6,18,19]. Образующийся пероксид водорода стимулирует через цитокины биосинтез избытка H₄Bip путём индукции ГТФ-циклогидролазы [20]. Таким образом, получается «порочный круг» в который включён избыток H₄Bip. Этот «порочный круг» может быть разорван реакцией фотодимеризации, в результате которой удаляется избыток H₄Bip.

Работа поддержана частично за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности [3.1156.2017/4.6].

Список литературы / References:

1. Kaufman S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1963, vol. 50, p. 1085-1093.
2. Davis M.D., Kaufman S., Milstein S. The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin. *Eur. J. Biochem.*, 1988, vol. 173, pp. 345-351.
3. Schallreuter K.U., Wood J.M., Pittelkow M.R., Gutlich M., Lemke K.R., Rödl W., Swanson N.N., Hitzemann K., Ziegler I. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science*, 1994, vol. 263, pp. 1444-1446.
4. Schallreuter K.U., Moore J., Wood J.M., Beazley W.D., Peters E.M.J., Marles L.K., Behrens-Williams S.C., Dummer R., Blau N., Thöny B. Epidermal H₂O₂ accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH4) recycling in vitiligo: identification of a general mechanism in regulation of all 6BH4-dependent processes? *J. Invest. Dermatol.*, 2001, vol. 116, pp. 167-174.
5. Schallreuter K. U. in book *Autoimmune Diseases of the Skin: Pathogenesis, Diagnosis, Management. Second edition*. Vitiligo, New-York: Springer Wein, ed. M. Hertl, ch. 13, 2005, pp. 367-384.
6. Schallreuter K. U. in book *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, ed. I. Laher, 2014, pp. 3697-3736.
7. Wood J. M., Chavan B., Hafeez I., Schallreuter K. U., Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H₂O₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 325, pp. 1412-1417.
8. Nishikimi M. The generation of superoxide anion in the reaction of tetrahydropteridines with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, vol. 166, pp. 273-279.
9. Kirsch M., Korth H.-G., Stenert V., Sustmann R., de Groot H. The autoxidation of tetrahydrobiopterin revisited. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 24481-24490.
10. Blair J. A., Pearson A. J. Kinetics and mechanism of the autoxidation of the 2-amino-4-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropteridines. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 2, 1974, vol. 2, pp. 80-88.

11. Buglak A. A., Telegina T. A., Lyudnikova T. A., Vechtomova Y. L., Kritsky M. S. Photooxidation of tetrahydrobiopterin under UV-irradiation: possible pathways and mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, 2014, vol. 90, pp. 1017-1026.
12. Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Buglak A.A., Vechtomova Y.L., Biryukov M. V., Demin V.V., Kritsky M.S. Transformation of 6-tetrahydrobiopterin in aqueous solutions under UV-irradiation. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2018, vol. 354, pp. 155-162.
13. Buglak A. A., Telegina T. A., Kritsky M. S. A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of singlet oxygen generation by pteridines. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, vol. 15, pp. 801-811.
14. Vignoni M., Cabrerizo F. M., Lorente C., Claparols C., Oliveros E., Thomas A. H. Photochemistry of dihydrobiopterin in aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.*, 2010, vol. 8, pp. 800-810.
15. Vignoni M., Lorente C., Cabrerizo F. M., Erra-Balsells R., Oliveros E., Thomas A. H. Characterization and reactivity of photodimers of dihydroneopterin and dihydrobiopterin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, vol. 11, pp. 979-987.
16. Nizamutdinov A.S., Semashko V.V., Naumov A.K., Korableva S.L., Marisov M.A., Efimov V.N., Nurtidina L.A. Characterization of Ce^{3+} and Yb^{3+} doped $LiF-LuF_3-YF_3$ solid solutions as new UV active media. *Proc. SPIE*, 2011, vol. 7994, p. 79940H.
17. Nurtidina L.A., Korableva S.L. Enhanced efficiency ultraviolet $LiY_xLu_{1-x}F_4:RE^{3+}$ ($RE = Ce, Yb$) laser. *Las. Phys. Lett.*, 2014, vol. 11, p. 125807.
18. Rokos H., Beazley W. D., Schallreuter K. U. Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H_2O_2 and pterin-6-carboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 292, pp. 805-811.
19. Jain A., Mal J., Mehndiratta V., Chander R., Patra S. K. Study of oxidative stress in vitiligo. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2011, vol. 26, pp. 78-81.
20. Shimizu S., Shiota K., Yamamoto S., Miyasaka Y., Ishii M., Watabe T., Nishida M., Mori Y., Yamamoto T., Kiuchi Y. Hydrogen peroxide stimulates tetrahydrobiopterin synthesis through the induction of GTP-cyclohydrolase I and increases nitric oxide synthase activity in vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, vol. 34, pp. 1343-1352.

THE ROLE OF PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATIONS OF TETRAHYDROBIOPTERIN IN THE PATHOGENESIS AND PHOTOTHERAPY OF VITILIGO

Telegina T.A.^{1,2}, Nizamutdinov A.S.², Buglak A.A.³, Shavrov A.N.¹, Lukinova E.V.²,
Vechtomova Yu.L.^{1,2}, Kritsky M.S.¹

¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences.
Leninsky prospect, 33, bld. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: telegina@inbi.ras.ru

²Kazan Federal University,
Kremlevskaja str., 18, Kazan, 420008, Russia

³St. Petersburg State University,
Universitetskaya emb., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia

Abstract. Melanogenesis disorder leads to several pathologies, including vitiligo. Tetrahydrobiopterin (H_4Bip) as the phenylalanine 4-hydroxylase coenzyme catalyzes the oxidation of phenylalanine to tyrosine (a melanin precursor). H_4Bip is easily oxidized by oxygen *in vivo* and *in vitro*. Vitiligo is accompanied by three-fivefold increased *de-novo* synthesis of H_4Bip , its excess and its further oxidation are essential factors in the pathogenesis of vitiligo. We have demonstrated that pterin products of H_4Bip autoxidation (dihydropterin (H_2Ptr), dihydroxanthopterin and pterin) predominate over biopterin products (dihydrobiopterin (H_2Bip) and biopterin). It was shown that ultraviolet (UV) irradiation accelerates the autoxidation while the products of oxidative degradation of H_4Bip act as photosensitizers. Photosensitized oxidation of H_4Bip can contribute to the pathogenesis of vitiligo. The main distinguishing feature of UV photooxidation of H_4Bip from autoxidation was the formation of dihydropterin (H_2Ptr)₂ and dihydrobiopterin (H_2Bip)₂ dimers. Here we reported on the dependences of the photodimerization reaction on the wavelength and intensity of radiation using xenon lamps and UV tunable lasers as sources of UV radiation. It was shown that UV irradiation with a laser is more efficient than that with xenon lamp. It was established that the greatest number of dimers were formed by irradiating the H_4Bip solution by radiation with a wavelength in the range 308-312 nm. The data obtained are discussed in the context of UV-B narrowband vitiligo phototherapy.

Key words: tetrahydrobiopterin, UV irradiation, autoxidation of tetrahydrobiopterin, photooxidation of tetrahydrobiopterin, azacyclobutane dimers, vitiligo phototherapy

МОНИТОРИНГ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ВЯЗКОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОТВЕТЕ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ С ПОМОЩЬЮ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ПОРФИРАЗИНОВОЙ ПРИРОДЫ

Шилягина Н.Ю.¹, Коньгин К.А.¹, Костюк А.Б.¹, Лермонтова С.А.^{1,2},
Клапшина Л.Г.^{1,2}, Балалаева И.В.¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: nat-lekanova@yandex.ru

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН

ул. Тropicина, 49, г. Нижний Новгород, 603137, РФ

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. В работе продемонстрирована возможность мониторинга ответа опухолевых клеток на фотодинамическое воздействие с помощью фотосенсибилизатора порфиразиновой природы со свойствами вязкостного сенсора. Исследование выполнено с использованием тетрапиррольного красителя – тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина. Показано, что порфиразин эффективно поглощает и флуоресцирует в области «окна прозрачности» биологических тканей и демонстрирует свойства флуоресцентного молекулярного ротора, проявляя высокую чувствительность параметров флуоресценции к изменениям вязкости среды. Установлено, что основными местами внутриклеточной локализации порфиразина являются околоядерная область клетки и ядерная оболочка или непосредственно примыкающие к ней структуры. Продemonстрирована высокая фотодинамическая активность порфиразина в отношении клеток эпидермоидной карциномы кожи человека. В экспериментах *in vitro* зарегистрировано увеличение времени жизни возбужденного состояния порфиразина в клетках после фотодинамического воздействия, свидетельствующее об увеличении локальной внутриклеточной вязкости и начавшихся необратимых дегенеративных процессах, влекущих за собой гибель опухолевых клеток.

Ключевые слова: порфиразин, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, флуоресцентный молекулярный ротор, внутриклеточная вязкость.

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является одним из интенсивно развивающихся методов лечения злокачественных новообразований. В основе ФДТ лежит метод локальной активации накопившегося в ткани флуоресцентного красителя-фотосенсибилизатора видимым светом, что в присутствии кислорода приводит к развитию свободно-радикальных реакций и, в конечном итоге, к гибели клеток-мишеней [6].

Несмотря на то, что ФДТ активно развивается, и область применения данного вида терапии все время расширяется, механизмы, лежащие в основе фотодинамической реакции, до конца не изучены. Следует отметить, что нерешенной представляется и задача раннего контроля эффективности ФДТ, а также индивидуализации дозовых нагрузок.

В качестве одного из подходов, направленных на контроль протекания ФДТ, в настоящее время предлагается использование флуорофоров, сочетающих свойства фотосенсибилизаторов и флуоресцентных молекулярных роторов [7]. Термин «молекулярные роторы» относится к соединениям, молекулы которых состоят из нескольких фрагментов, способных поворачиваться (вращаться) друг относительно друга. В средах с низкой вязкостью энергия, полученная молекулярным ротором вследствие поглощения кванта света, в основном расходуется на вращение (или поворот) отдельных групп в молекуле. В вязком окружении, где внутримолекулярное движение затруднено, энергия будет расходоваться на флуоресценцию, что приведет к возрастанию квантового выхода флуоресценции и увеличению времени жизни возбужденного состояния. [1]. Сочетание же свойств фотосенсибилизатора и сенсора вязкости потенциально может позволить осуществлять мониторинг физиологического состояния клетки по изменению вязкости её внутренней среды, поскольку известно, что гибель клетки сопровождается значительным увеличением внутриклеточной вязкости [10].

Целью данной работы является исследование возможности использования тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина в качестве фотосенсибилизатора и агента для мониторинга эффективности фотодинамической терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали соединение из класса порфиразинов – тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин $\text{pz}(\text{BnOPh})_4(\text{CN})_4$ (далее Pz) [12]. Данное соединение получено методом темплатного синтеза, разработанного в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН [8]. Структурная формула Pz представлена на рисунке 1.

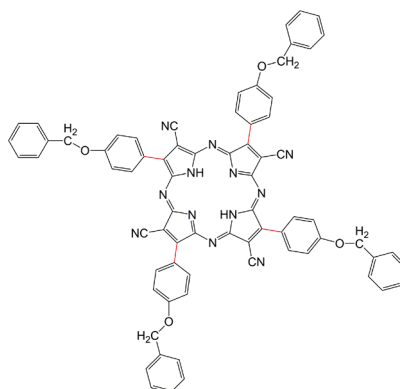


Рисунок 1. Структурная формула тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфирина (Pz)

Спектры поглощения и флуоресценции Pz регистрировали с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy MX (BioTek, США). Для этого готовили растворы Pz в деионизированной воде и спирто-глицериновых растворах различной вязкости. Концентрация Pz составляла 10 мкМ. Регистрацию спектров поглощения проводили в диапазоне длин волн 300-700 нм. Регистрацию спектров флуоресценции проводили в диапазоне 600-850 нм при длине возбуждения 360 нм.

Квантовый выход флуоресценции Pz определяли относительно родамина В (Sigma, США) в этаноле (0,65). Квантовый выход рассчитывали по формуле:

$$\varphi_1 = \frac{\varphi_2 F_1 D_2}{F_2 D_1}, \quad (1)$$

где φ_1 – квантовый выход флуоресценции порфирина; F_1 и D_1 – интенсивность флуоресценции и оптическая плотность порфирина соответственно; φ_2 – квантовый выход флуоресценции родамина В в этаноле (0,65); F_2 и D_2 – интенсивность флуоресценции и оптическая плотность родамина В соответственно.

Относительный квантовый выход флуоресценции Pz определяли для серии этанол-глицериновых растворов с процентным содержанием глицерина от 0 до 100 % с шагом 10 %. При построении зависимости квантового выхода флуоресценции Pz от вязкости раствора использовали табличные значения вязкости этанол-глицериновых растворов при температуре 25 °С.

Исследования внутриклеточной локализации, световой и темновой токсичности Pz и возможности мониторинга фотодинамической реакции проводили на клеточной линии эпидермоидной карциномы кожи человека A431 (номер по каталогу ATCC® CRL-1555™). Клетки культивировали в 25 см²-культуральных флаконах (Corning, США) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ на питательной среде DMEM (HyClone, США), содержащей 10 % бычьей фетальной сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Для снятия клеток с культурального флакона использовали раствор трипсин : ЭДТА (1:1) (ПанЭко, Россия), для промывки клеток использовали 10 мМ фосфатно-солевой буфер (PBS).

Для исследования внутриклеточной локализации Pz клетки A431 сажали в лунки тонкодонного 96-луночного планшета (Corning, США) в количестве 15 тыс. клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Затем питательную среду заменяли на 200 мкл раствора Pz (концентрация 5 мкМ) в среде с 10 % бычьей фетальной сывороткой и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 2,5 часов. Время инкубации с порфирином было определено на основании предварительных экспериментов по оценке динамики накопления Pz клетками. Изображения клеток получали с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия). При регистрации флуоресценции Pz использовали двухфотонное возбуждение на длине волны 800 нм. Флуоресценцию принимали в диапазоне 630-700 нм.

Для анализа жизнеспособности клетки A431 высаживали на 96-луночный планшет (Corning, США) в количестве 3 тыс. клеток на лунку и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение ночи. Затем питательную среду заменяли средой, содержащей Pz в различных концентрациях, и инкубировали клетки в течение 4-х часов. После инкубации среду с фотосенсибилизатором заменяли на полную культуральную среду, после чего клетки подвергали облучению в термостатируемых условиях при 37 °С при помощи специального светодиодного излучателя для создания равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах [2]. Дозу облучения (20 Дж/см²) контролировали длительностью освещения (16 минут 40 секунд) и мощностью светового потока (20 мВт/см²). Оценку жизнеспособности проводили через 24 часа после облучения при помощи МТТ-теста.

Время-разрешенный имиджинг проводили на системе лазерной сканирующей микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) с модулем FLIM (Becker & Hickl, Германия). Исследование времени жизни возбужденного состояния Pz в клетках до и через различные промежутки времени после облучения проводили при двухфотонном возбуждении на длине волны 800 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 640-710 нм. Полученные кривые затухания флуоресценции аппроксимировали

биэкспоненциальной зависимостью и по ним определяли средневзвешенное время жизни возбужденного состояния:

$$\tau_i = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2}, \quad (2)$$

где α_1 – доля 1-компоненты; α_2 – доля 2-компоненты; τ_1 – время жизни возбужденного состояния 1-компоненты; τ_2 – время жизни возбужденного состояния 2-компоненты.

Фотодинамическое воздействие при микроскопических исследованиях в дозе 20 Дж/см² осуществляли путем сканирования участка образца лазером с длиной волны 594 нм с мощностью на объективе 75 мВт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования нами были проанализированы оптические свойства Pz как потенциального фотосенсибилизатора. Показано, что диапазон поглощения для Pz регистрируется в области 340-400 нм и 550-650 нм, с двумя максимумами на 360 нм (коротковолновая область, полоса Core) и 590 нм (длинноволновая область, Q-полоса) (рис. 2). Коэффициент молярной экстинкции в длинноволновой области спектра составил $\sim 2 \cdot 10^5$ л·моль⁻¹·см⁻¹. Следует отметить, что такая структура спектра типична для тетрапиррольных макроциклических соединений [14]. Флуоресценция Pz регистрируется в области 625-825 нм, с пиком на 675 нм (рис. 2), что сходно со свойствами других представителей группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов [13, 15]. Исследование спектральных свойств Pz показало, что данное соединение поглощает и флуоресцирует в диапазоне длин волн, соответствующему окну прозрачности биологических тканей, что удовлетворяет одному из требований, которые предъявляются к «идеальным» фотосенсибилизаторам [6].

Для подтверждения принадлежности Pz к классу флуоресцентных молекулярных роторов нами были рассчитан относительный квантовый выход флуоресценции и определены значения времени жизни возбужденного состояния Pz в растворах различной вязкости. Отличительной чертой молекулярных роторов является сильная зависимость этих параметров флуоресценции от вязкости среды, связанная с индуцированным светом внутримолекулярным вращением или скручиванием [5]. Известно, что для соединений, которые обладают свойствами молекулярных роторов, зависимость флуоресцентных параметров от вязкости может быть описана с помощью уравнений Фёрстера-Хоффмана [4], связывающих квантовый выход флуоресценции (2) и время жизни возбужденного состояния (3) с вязкостью растворителя:

$$\lg(\varphi) = z + \alpha \lg(\eta), \quad (3)$$

где φ – квантовый выход флуоресценции; z и α – константы; η – вязкость.

$$\lg(\tau) = \lg(z / k_r) + \alpha \lg(\eta), \quad (4)$$

где τ – время жизни возбужденного состояния; η – вязкость; z и α – константы; k_r – константа скорости излучательного перехода.

Нами было установлено, что значение коэффициента α , характеризующего степень «вязкостной чувствительности» квантового выхода и времени жизни флуоресценции, составило 0,74 и 0,49 соответственно (рис. 3). Известно, что для молекулярных роторов коэффициент α равен, по разным источникам 0,5-0,75 [5]) или 0,37-0,67 [11, 16]. Таким образом, нами было показано, что Pz обладает свойствами флуоресцентного молекулярного ротора.

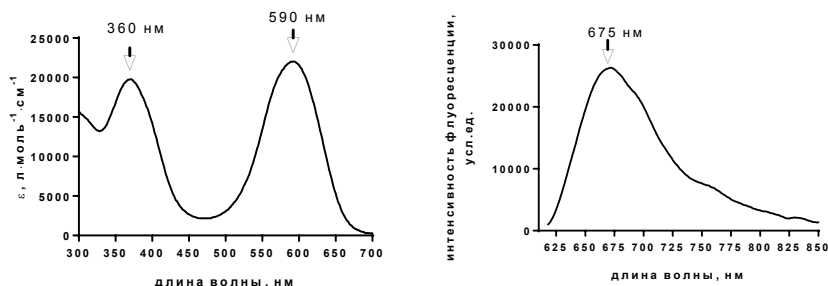


Рисунок 2. Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) Pz (10 мкМ) в воде, длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм

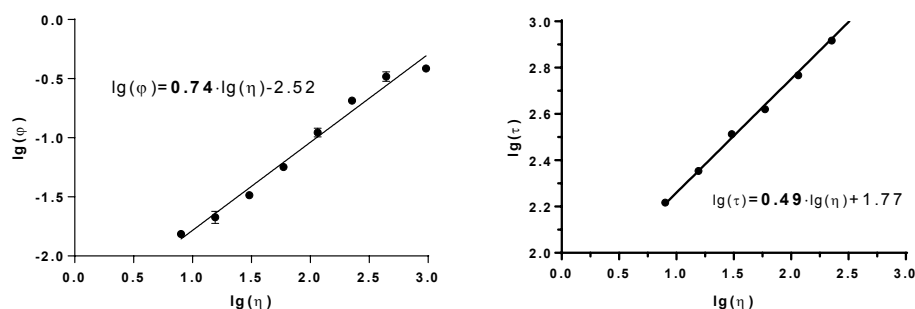


Рисунок 3. Зависимость квантового выхода (слева) и времени жизни флуоресценции (справа) Pz от вязкости среды

Ключевую роль в механизме фотоповреждения клетки играет внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора. Она определяет мишени, которые в первую очередь подвергнутся фотодинамическому воздействию. Это связано, прежде всего, с чрезвычайно малой (10-20 нм) диффузионной длиной синглетного кислорода и других АФК [3, 9]. Нами было показано, что основными местами внутриклеточной локализации Pz в клеточной культуре эпидермоидной карциномы человека являются околядерная область клетки и ядерная оболочка, либо непосредственно примыкающие к ней структуры. Накопление Pz в околядерной области и, в особенности, в ядерной оболочке может иметь важное значение для ФДТ, так как последняя наиболее чувствительна к фотоповреждению.

Нами была также проведена оценка световой активности Pz в отношении клеток A431 для подтверждения возможности использования Pz в качестве фотодинамического агента. На рисунке 5 показана зависимость жизнеспособности клеток линии A431 от концентрации Pz. Из рисунка видно, что исследуемый фотосенсибилизатор обладает выраженной фототоксичностью при облучении в дозе 20 Дж/см². Ингибирующая концентрация IC₅₀ при облучении составила 0,4 мкМ, тогда как в отсутствии освещения она превышала 10 мкМ.

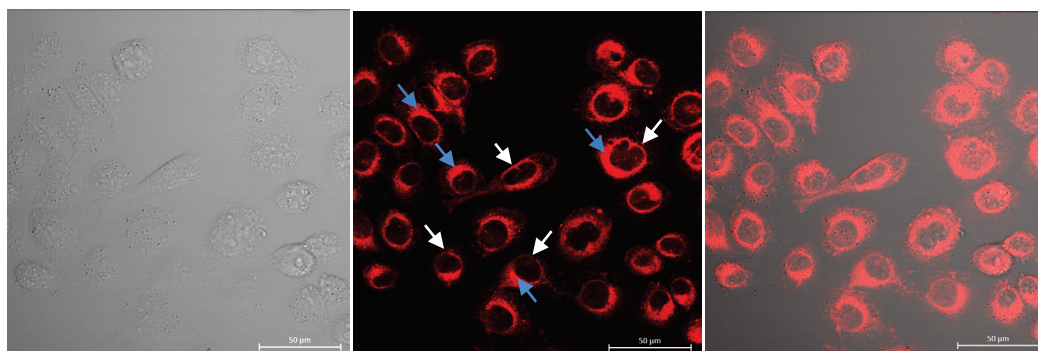


Рисунок 4. Внутриклеточная локализация Pz. Клеточная культура A431, концентрация Pz 5 мкМ, время инкубации 2,5 часа, длина волны возбуждения 594 нм, регистрация сигнала 630–700 нм. Размер изображений 212,5x212,5 мкм. Слева: изображение в проходящем свете, в центре: канал флуоресценции, справа: наложение каналов проходящего света и флуоресценции. Голубыми стрелками указана цитоплазма, белыми – ядерная оболочка

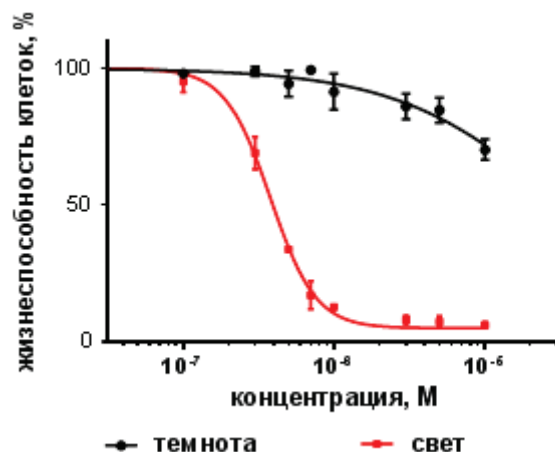


Рисунок 5. Зависимость жизнеспособности клеток A431 от концентрации в среде Pz. Черная кривая – инкубация в темноте, красная – 20 Дж/см²

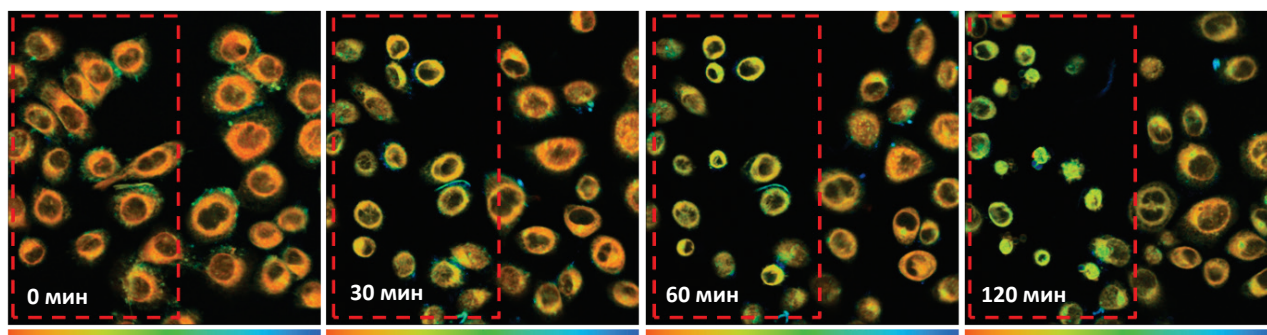


Рисунок 6. Изменение времени жизни возбужденного состояния Pz в клетках A431 при фотодинамическом воздействии. Метод FLIM. Размер изображений 212,5х212,5 мкм. Длина волны возбуждения 800 нм, диапазон регистрации сигнала 640-710 нм. Доза облучения 20 Дж/см² (лазер 594нм), область облучения выделена красным пунктиром. Псевдоцветная палитра отображает времена жизни в диапазоне от 400 до 2400 пс

Таким образом, Pz является одновременно фотосенсибилизатором (проявляет фотодинамическую активность в отношении опухолевых клеток в культуре) и флуоресцентным молекулярным ротором (характеризуется высокой вязкостной чувствительностью). По данным литературы известно, что гибель клеток сопровождается увеличением внутриклеточной вязкости [10], благодаря этому, мы имеем потенциальную возможность отслеживать протекание фотодинамической реакции по изменению фотофизических свойств Pz, а именно, времени жизни возбужденного состояния, зависящего от локальных вязкостных параметров. Для подтверждения этой гипотезы нами была проведена серия экспериментов, в ходе которых часть поля зрения микроскопа, в которой находились клетки, накопившие Pz, подвергалась облучению, при этом необлученная часть клеток играла роль контроля. При проведении мониторинга нами оценивалось морфологическое состояние клеток и изменение времени жизни возбужденного состояния Pz в клетках, которые подвергались фотодинамическому воздействию.

Нами было показано, что в облученной области (рис. 6), выделена красным пунктиром, клетки заметно округлились уже через 30 минут после воздействия, что напрямую свидетельствует об их фотодинамическом повреждении. В необлученной области клетки практически не поменяли своей изначальной морфологии. Кроме того, наблюдалось значительное увеличение времени жизни возбужденного состояния Pz в клетке в облученной области (рис. 6). Количественная оценка наблюдаемых явлений показала увеличение времени жизни возбужденного состояния Pz от 660 до 1040 пс (рис. 7, 8 слева). Некоторое изменение наблюдалось и в области, которая не подвергалась фотодинамическому воздействию, что мы связываем с дозой света, полученной при сканировании клеток с целью получения изображения. В данной области изменения значительно менее выражены – время жизни возбужденного состояния увеличивается от 680 до 800 пс (рис. 7 и 8 справа). Изменения времени жизни Pz в сторону увеличения могут свидетельствовать либо о возрастании локальной вязкости в клетках, либо о других стерических затруднениях, которые могут объясняться, в частности, связыванием Pz с макромолекулами клетки. Сильная зависимость фотофизических свойств, таких как квантовый выход и время жизни возбужденного состояния, от потенциального свободного объема делает возможным использование Pz в качестве сенсора для определения параметров микроокружения при протекании внутриклеточных процессов.

Кроме изменения времени жизни возбужденного состояния Pz происходило его постепенное фотообесцвечивание (рис. 7 и 8 слева), что свидетельствует о фотохимической деградации молекул фотосенсибилизатора в ходе фотодинамических реакций.

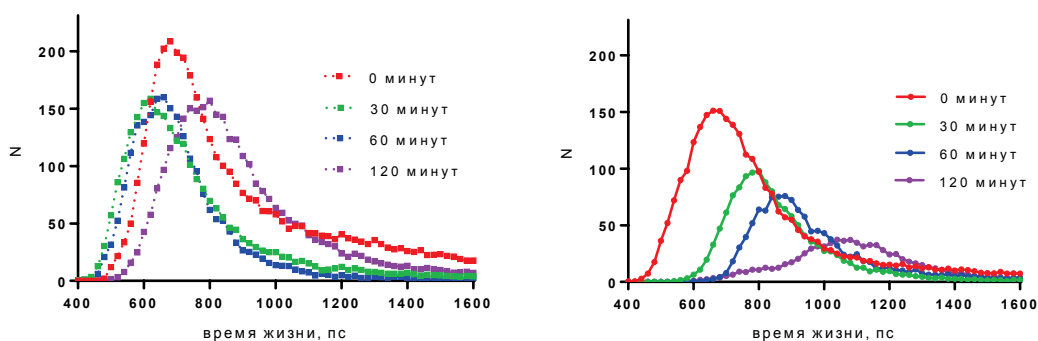


Рисунок 7. Зависимость распределения времени жизни возбужденного состояния Pz на полученных FLIM-изображениях в контрольной (слева) и облученной (справа) областях от времени, прошедшего с момента облучения. Доза облучения 50 Дж/см² (лазер 594 нм). N – количество пикселей на полученных FLIM-изображениях с соответствующим средневзвешенным временем жизни возбужденного состояния

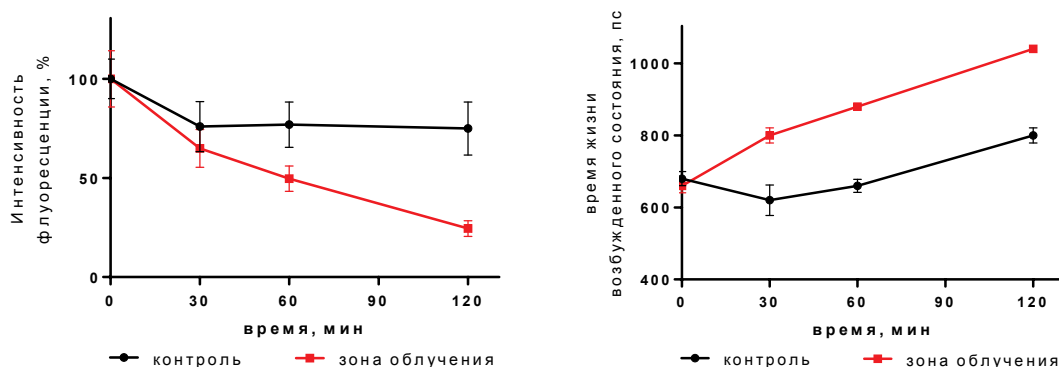


Рисунок 8. Зависимость интенсивности флуоресценции в % от исходной (слева) и времени жизни возбужденного состояния (справа) Pz в контрольной и облученной областях от времени, прошедшего с момента облучения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный в работе тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин относится к уникальной группе соединений, которые сочетают свойства эффективного фотодинамического агента и сенсора локальной вязкости. Данное соединение не только соответствует требованиям, которые предъявляются к «идеальным» фотосенсибилизаторам – поглощение и флуоресценция в «оптическом окне» прозрачности биологических тканей, высокая фотодинамическая активность в отсутствие выраженной темновой токсичности, накопление в важной внутриклеточной мишени клетки – ядерной оболочке, но и является флуоресцентным молекулярным ротором. Выраженная зависимость таких параметров флуоресценции, как квантовый выход и время жизни возбужденного состояния, от локальной внутриклеточной вязкости делает возможным использование порфиразина в качестве сенсора протекания внутриклеточных процессов, в том числе индуцированных фотодинамическим воздействием.

Таким образом, роторные свойства Pz как фотосенсибилизатора могут открыть новые перспективы в области исследования механизмов ответа клетки на фотодинамическое воздействие, позволяя с помощью измерения времени жизни возбужденного состояния фотосенсибилизатора отслеживать изменения внутриклеточной среды, которые, в свою очередь, коррелируют с функциональным состоянием клетки.

Работа выполнена в рамках Госзадания №6.3099.2017/ПЧ (химический синтез и исследование фотофизических свойств) и проекта МК 980.2017.4 (исследования на клеточных культурах).

Список литературы / References:

1. Ужинов Б.М., Иванов В.Л., Мельников М.Я. Молекулярные роторы – люминесцентные сенсоры локальной вязкости и вязкого течения в растворах и биологических системах. *Успехи химии*, 2011. т. 80, № 12, с. 1231-1243. [Uzhinov B.M., Ivanov V.L., Melnikov M.Ya. Molecular rotors as luminescence sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and organized systems. *RUSS CHEM REV*, 2011, vol. 80, no. 12, pp.1179-1190. (In Russ.)]
2. Шилиягина Н.Ю., Плеханов В.И., Шкунов И.В. Светодиодный излучатель для исследования *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии. *Современные технологии в медицине*, 2014, т. 6, № 2, с. 15-24. [Shilyagina N.Y., Plekhanov, V.I., Shkunov I.V., Shilyagin P.A., Dubasova L.V., Brilkina A.A., Sokolova E.A., Turchin I.V., Balalaeva I.V. LED Light Source for *in vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 15-22. (In Russ.)]
3. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, vol. 233, pp. 351-371.
4. Förster T., Hoffmann G. Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Farbstoffsysteme. *Z Phys Chem*, 1971, vol. 75, p. 6376.
5. Haidekker M., Brady T., Wen K., Okada C., Stevens H., Snell J., Frangos J., Theodorakis E. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 33, no. 6, pp. 415-425.
6. Hamblin M.R., Mroz P. History of PDT: The first hundred years. In: *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*. Norwood, MA: Artech House, Inc, 2008.
7. Izquierdo M. Angeles, Vyšniauskas Aurimas, Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers during photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, no. 3, pp.1089-1096.
8. Klapshina L.G., Douglas W.E., Grigoryev I.S., Ladilina E.Yu, Shirmanova M.V., Mysyagin S.A., Balalaeva I.V., Zagaynova E.V. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrazine complex for biophotonic applications. *Chem. Commun.*, 2010, no. 44, pp. 8398-8400.

9. Krasnovskii A.A. Photodynamic activity and singlet oxygen. *Biofizika*, 2004, vol. 49, no. 2, pp. 305-21.
10. Kuimova M.K., Botchway S.W., Parker A.W., Balaz M., Collins H.A., Anderson H.L., Suhling K., Ogilby P.R. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nat Chem*, 2009, vol. 1, pp. 69-73.
11. Kuimova M.K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, vol. 14, no. 37, pp. 12671-12686.
12. Lermontova S., Grigorev I., Shilyagina N., Peskova N., Balalaeva I., Shirmanova M., Klapshina L. New Porphyrine Macrocycles with High Viscosity-Sensitive Fluorescence Parameters. *Russian Journal of General Chemistry*, 2016, vol. 86, no. 6, pp. 1011-1018.
13. Lermontova S.A., Grigor'ev I.S., Ladilina E.Y., Balalaeva I.V., Shilyagina N.Y., Klapshina L.G. Porphyrine Structures with Electron-Withdrawing Substituents as the Base for Materials for Photonics and Biomedicine. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 4, pp. 301-315.
14. Makarov D.A., Yuzhakova O.A., Slivka L.K., Kuznetsova N.A., Negrimovsky V.M., Kaliya O.L., Lukyanets E.A. Cationic Zn and Al phthalocyanines: synthesis, spectroscopy and photosensitizing properties. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007, vol. 11, no. 8, pp. 586-595.
15. Shilyagina N.Yu., Peskova NN, Lermontova SA, Brilkina AA, Vodenev VA, Yakimansky AV, Klapshina LG, Balalaeva IV. Effective delivery of porphyrine photosensitizers to cancer cells by polymer brush nanocontainers. *Journal of Biophotonics*, 2017, vol. 10, no. 9, pp. 1189-1197.
16. Yoon H., Dakanali M., Lichlyter D., Chang W., Nguyen K., Nipper M., Haidekker M., Theodorakis E. Synthesis and evaluation of self-calibrating ratiometric viscosity sensors. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, vol. 9, no. 9, pp. 3530-3540.

MONITORING OF INTRACELLULAR VISCOSITY OF CANCER CELLS UNDER PHOTODYNAMIC TREATMENT WITH A PORPHYRAZINE PHOTOSENSITIZER

Shilyagina N.Yu.¹, Konygin K.A.¹, Kostyuk A.B.¹, Lermontova S.A.^{1,2}, Klapshina L.G.^{1,2}, Balalaeva I.V.¹

¹Lobachevsky University

Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia: e-mail: nat-lekanova@yandex.ru

²G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry of the RAS

Tropinin str., 49, Nizhny Novgorod, 603137, Russia

Abstract. The possibility of monitoring of cancer cells response to photodynamic treatment by the use of porphyrine photosensitizer as a viscosity sensor is shown. The research was done with tetrapyrrole dye – tetra(4- benzyloxyphenyl)tetracyanoporphyrine. The dye was shown to demonstrate effective absorption and fluorescence in biological transparent window. In addition, the dye has a molecular rotor properties showing high sensitivity of fluorescence parameters to media viscosity changes. Pre-nuclear region and nuclear membrane or its environment are shown to be the primary space of intracellular accumulation of the dye. The high photodynamic activity of the porphyrine was detected in relation to epidermoid carcinoma cells of human skin. The significant increase of fluorescence life-time of the dye inside the cells was registered after the photodynamic therapy. It may be concerned as an evidence of the local intracellular viscosity increase and a verification of irreversible degenerative processes onset, leading to the death of cancer cells.

Key words: porphyrine, photosensitizer, photodynamic therapy, fluorescent molecular rotor, intracellular viscosity.

MODIFICATION OF THE INCUBATION MEDIUM OXIDATIVE ACTIVITY WITH ELECTROCHEMICALLY REDUCED WATER

Pogorelov A.G., Pogorelova V.N.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS

Institutskaya str., 3, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia; e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Received by editor: 30.06.2018

Abstract. It has been shown that Dulbecco's incubation medium prepared with electrochemically reduced water compensates for oxidative stress induced by hydrogen peroxide addition (H_2O_2 , 0.2 mM) to the incubation medium. The incubation medium modified in this way does not affect the H_2O_2 induced apoptosis in an early mouse embryo. The embryonic cell in the experimental model of apoptosis shows the presence of characteristic morphological changes and decreased cell volume. These apoptosis-related changes were detected using laser-scanning microtomography.

Key words: *electrochemically reduced water, redox potential, early mouse embryo, apoptosis, hydrogen peroxide, quantitative laser microtomography.*

Upon water electrolysis, a metastable fraction, called the catholyte or electrochemically reduced water (ERW), is accumulated at the cathode cell. This fraction is characterized by alkaline pH and a negative redox potential [1, 2]. Comprehensive information on the problem of electrochemical activation of water has been presented in the current literature by V.M. Bakhir [3]. Clinical trials of the catholyte have shown its therapeutic properties, as manifested in improving the state of the gastrointestinal tract [4, 5] and in positive effects on diabetes [6], oncology [7], neurodegenerative changes [8], and multiple sclerosis [9]. The fact that curative waters of natural origins, for example, Tenryosui Hita (Japan), Nordenau (Germany), or Arkhyz spring water (Russia) have similar physical and chemical properties is intriguing. What is the nature of these unique properties of the catholyte? The ERW fraction has a negative redox potential and an antioxidant activity [10]. The simulation of the catholyte properties by saturation of the aqueous solution at a given alkaline pH with the molecular hydrogen had no physiological effect. The antioxidant features are possibly due to the presence of nanoparticles, which serve as a depot and a generator of atomic hydrogen and/or hydrogen-anion [1]. It has been assumed in the cited paper that in the catholyte these may be nanoparticles of platinum from the electrode material or mineral nanoparticles in the natural water.

It has been proposed that the antioxidant activity determines the ability of the catholyte to compensate for age-related accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the body [11]. Despite the attractiveness of the proposed hypotheses, it is worth taking the following consideration into account. The catholyte, before it enters the tissue, interacts in the lumen of the gastrointestinal tract with secreted fluid, which can change its properties unpredictably. In other words, the antioxidant capacity of the original ERW fraction may be significantly mitigated in the conditions of the experimental environment. A similar situation occurs in cellular biotechnology, where incubation media with stable physical-chemical parameters are used. Therefore, the aim of this work was to explore the extent to which replacement of ordinary water by the catholyte modifies the redox potential of the physiological medium. A model of apoptosis induced in vitro in early mouse embryos by hydrogen peroxide has been chosen as a biological test for the antioxidant properties of the final solution [12, 13].

MATERIALS AND METHODS

The result of the replacement of the ordinary water to the catholyte in the physiological solution was studied with three well-known media: Dulbecco's Modified Eagle's medium (phosphate buffer), M 16 (phosphate-carbonate buffer), and Tyrode's medium (phosphate-carbonate buffer). Dulbecco's medium is used to conduct short-term experiments that do not involve prolonged incubation of early mouse embryos.

The M 16 medium is widely used for culturing the early embryo of mammals [13]. Tyrode's solution is recommended for experiments, for example, on isolated heart with perfusion according to Langendorf. The electrolyte composition of the tested physiological fluids is shown in Table 1. Bidistilled water or its ERW fraction (the catholyte) was used for the preparation of the physiological media (Table 1). The pH and redox potential of the aqueous solution was measured using an Ecotest-120 pH-meter-ionometer (EKONIKS, Moscow). The redox potential was recorded with an EPV-1 platinum electrode; pH was determined by an ion-selective glass electrode; a silver chloride electrode was used as a reference electrode. We note that the reduction kinetics of the ERW fraction of bidistilled water are relatively fast; the redox potential increases from -800 mV during the first 15–20 min to a quasi-steady state close to -200 mV. However, in this experimental model, this time factor is moderated by the duration of the preparation of physiological solution and the subsequent procedure of apoptosis induction.

Early NMRI mouse embryos were used in the test on the biological activity, which was incubated in physiological Dulbecco's medium under conditions of apoptosis induced by hydrogen peroxide. The samples of isolated zygotes and two-cell embryos were prepared according to a method described previously in [15, 16]. Embryos were isolated from the oviduct according to a published procedure [17, 18]. Apoptosis was induced by incubation (40 min) of isolated embryos in Dulbecco's medium containing hydrogen peroxide at a concentration of 0.2 mM [12, 13, 19].

Table 1. The composition of salts (in mM) in the three physiological media, whose properties were tested in the experiment with the replacement of bidistilled water to the catholyte

Salt	Medium		
	Dulbecco's	M 16	Tyrode's
NaCl	136.8	94.7	136.9
KCl	2.68	4.78	5.0
KH ₂ PO ₄	1.47	1.19	–
MgSO ₄	–	1.19	–
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49	–	0.6
CaCl ₂	0.9	1.71	2.5
NaH ₂ CO ₃	–	25	7.7
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7.0	–	–
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1.25	–	1.3

The principles and details of the sample preparation based on the ultra-fast cryofixation of biological tissue were discussed in [20, 21]. The initial step is the cryofixation of the embryos in liquid propane (-188 °C). Frozen embryos were lyophilized under vacuum ($\sim 10^{-3}$ Pa) at low temperature (-100 °C) using an MBA 5 apparatus (Balzers, Liechtenstein). Upon completion of the low-temperature dehydration of the object, the sample was immersed in embedding medium prepared on the basis of Epon 812 epoxy resin. The use of cryogenic approaches enables one to preserve the shape, size, and structure of the cells close to the native state.

The distinctive morphological characteristics and a decrease in cell volume, which were recorded by quantitative laser microtomography, served as a criterion of apoptosis. The volume of the zygote or two-cell embryo was measured by quantitative three-dimensional reconstruction [17, 18, 22, 23]. The samples were examined in a Leica TCS SPE laser scanning microscope (Leica, Austria) in the transmitted light mode of a green laser with a wavelength of 532 nm. For this, a series of successive optical slices in the vertical direction with a step of 2 μ m was obtained. Given the low contrast of the obtained digital image, each slice was further treated according to a standardized algorithm [24]. An edge contour of a cell has been drawn on the obtained micrographs in the plane of a slice and a three-dimensional computer model of the object has been obtained using a series of the successive contours [25].

RESULTS AND DISCUSSION

Modification of the Incubation Medium by the Catholyte. Comparative data on pH and redox potential in the experiment on the bidistilled water replacement by the catholyte in the preparation of the physiological solution are shown in Table 2.

The analysis of data presented in Table 2 shows that the acidity of the physiological medium does not depend on whether water or the ERW fraction were used in the preparation of the buffer solution, but rather the choice of the solvent affects the redox potential. The salt composition of the buffer after dissolution causes opposite effects on the redox potential of the original water and the catholyte. A redox potential decrease in water solution and the redox potential increase in the solution prepared with the ERW fraction have been observed. In the case of the catholyte, the redox potential of Dulbecco's medium even changes sign to a positive value, but still remains much below the level of the buffer solution in water. These results demonstrate the relative reduction of the antioxidant activity of the catholyte in the physiological medium, but do not allow evaluation of its oxidative activity. For this, a unified algorithm of comparison has been used, which is based on the concentration of molecular hydrogen in an aqueous solution [2].

Table 2. The pH and redox potential of the physiological media prepared with bidistilled water or the catholyte

Physiological medium	pH (22 °C)		Redox potential, mV	
	bidistilled water (5.6) *	ERW (10.5) *	bidistilled water (470)	ERW (-800)
Dulbecco's	7.4	7.4	300	60
M 16	7.7	7.7	320	-140
Tyrode's	7.5	7.5	330	-100

* - bidistilled water: the physiological medium was prepared with bidistilled water, ERW: the physiological medium was prepared with the catholyte obtained from the original bidistilled water. The acidity or redox potential values of the original bidistilled water and its ERW fraction are in parentheses.

Table 3. The oxidative activity index rH_2 of the physiological media prepared with bidistilled water or the catholyte

Solvent	Mater medium				
	bidistilled water	ERW faction	Dulbecco's	M 16	Tyrodé's
Bidistilled water	28.6	—	27.8	29.1	28.8
ERW faction	—	5.4	21.6	17.2	17.6

In the cited work, the following expression is obtained after transformations:

$$rH_2 = A(E_h + \Delta) + 2pH, \quad (1)$$

where rH_2 is an index of the oxidative activity of an aqueous solution; A is the constant of proportionality (mV^{-1}); E_h is the oxidation-reduction potential (mV) measured with a platinum electrode; Δ is a correction (200 mV) for a silver chloride reference electrode with saturated KCl at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$); pH is the acidity of the medium.

The state where $rH_2 \approx 28$ is considered as a redox-neutral ($\text{pH } 7.2$, $E_h = 320 \text{ mV}$). The coefficient A is 0.026 mV^{-1} as determined by substituting these parameters into the expression (1). Table 3 shows the rH_2 index values for the original bidistilled water and the ERW fraction, as well as for Dulbecco's, M 16 and Tyrodé's physiological media. The rH_2 values were computed on the basis of the experimental data (Table 2) using expression (1).

According to the rH_2 index scale, a solution is considered as being antioxidant in the range $0 < rH_2 < 28$ and as prooxidant in the range $28 < rH_2 < 42$ [2]. The data comparison shows (Table 3) that the index of oxidative activity of double-distilled water and physiological solutions on its basis is close to a neutral state ($rH_2 \approx 28$). The replacement of water by the ERW fraction changes the status of the solution in the direction of the antioxidant state that to a lesser extent is expressed for Dulbecco's medium. Thus, the incubation medium modified by the catholyte has the potential to compensate for the ROS. Is this actually true? Table 4 shows the values of pH, redox potential, and the rH_2 index for Dulbecco's medium into which hydrogen peroxide is added to stimulate apoptosis in the early mouse embryo [12, 13, 19].

Comparison of the rH_2 index before and after the addition of hydrogen peroxide (Tables 3 and 4) shows the oppositely directed effects of ROS upon Dulbecco's solution. The modeling of the oxidative stress reduces the normal incubation medium (from 27.8 to 27.0) and oxidizes that prepared with the catholyte (from 17.2 to 23.1). It should be noted that in both cases, the addition of hydrogen peroxide leaves the physiological solution in the range of antioxidant status ($rH_2 < 28$).

The Biological Activity of the Catholyte in a Model of Induced Apoptosis. The biological effect of the ERW fraction was studied in a model of apoptosis induced by the hydrogen peroxide (0.2 mM, 40 min) in Dulbecco's medium in which early mouse embryos were incubated. It was assumed that the antioxidant status of the physiological medium prepared with the catholyte will arrest the apoptotic action of ROS. The expected effect should prevent the occurrence of morphological changes specific to apoptosis. Figure 1 shows photomicrographs of an intact mice zygote (fig. 1a) and mouse zygotes after natural (fig. 1b) and induced (fig. 1c) apoptosis and after apoptosis induced in Dulbecco's medium prepared with the catholyte (fig. 1d).

It can be seen in the photomicrographs that, in contrast to a healthy embryo (fig. 1a), there are cytoplasmic outgrowths, which is a characteristic sign of apoptosis, in other cases (figs. 1b-1d). In other words, in spite of the antioxidant status of the physiological solution with the catholyte, apoptosis occurred in the presence of ROS (40 min, 0.2 mM H_2O_2). Thus, the antioxidant balance of the catholyte compensates for oxidative stress but does not prevent the development of the induced apoptosis.

Table 4. pH, redox potential and index of oxidative activity (rH_2) of physiological Dulbecco's medium prepared with bidistilled water or the catholyte and the hydrogen peroxide addition

	Parameters of Dulbecco's medium containing 0.2 mM H_2O_2		
	pH	redox potential, mV	rH_2 index
Bidistilled water + H_2O_2	7.4	270	27.0
ERW faction + H_2O_2	7.4	120	23.1

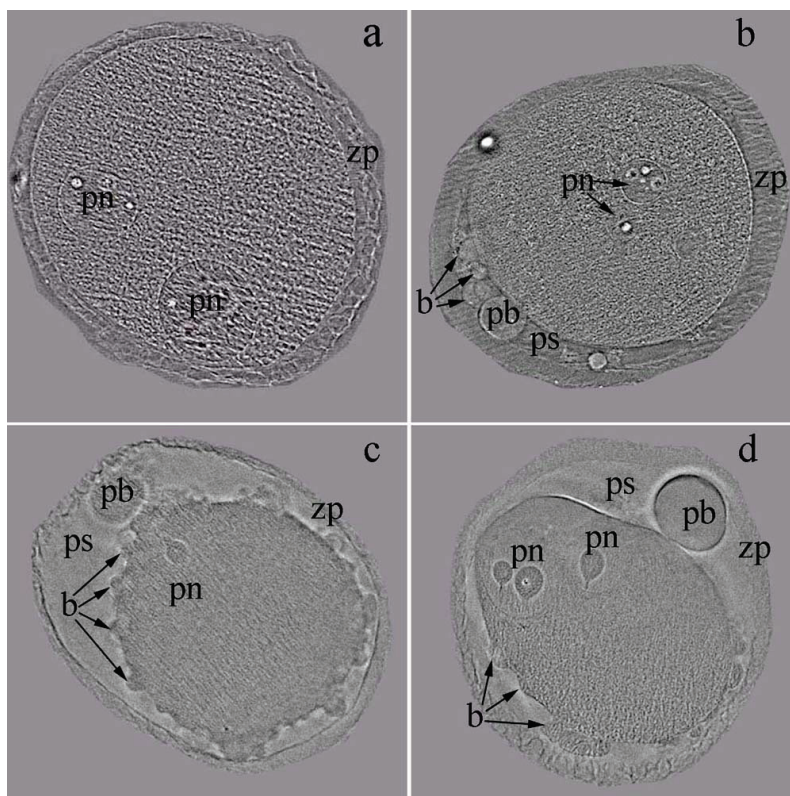


Figure 1. The image of a single-cell NMRI mouse embryo in an optical slice plane, obtained by the quantitative laser microtomography. (a) Control; (b) natural apoptosis; (c) experimental apoptosis caused by the addition of ROS (0.2 mM H_2O_2 , 40 min) to the ordinary Dulbecco's medium; (d) experimental apoptosis caused by the addition of ROS (0.2 mM H_2O_2 , 40 min) to Dulbecco's medium with the catholyte. Designations: b, protrusions; pb, polar body; pn, pronucleus; ps, the space between the envelope and the cell; zp, the envelope of the embryo

The cascade of events, their sequence and causes, as well as different scenarios of activation of apoptosis are highly debated topics [26-28]. It has been shown in two recent papers that shrinkage of cells, which is considered as a sign of the early stage of apoptosis, precedes the appearance of known morphological and biochemical signs [29]. The decreased cell volume could be due, for example, to potassium ion outflow via the K_{2p} channel, one of the members of the potassium channel family [30, 31]. The effect of mouse embryo shrinkage in natural apoptosis is illustrated by photomicrographs in figure 2.

The volume change of embryonic cells in vivo (fig. 2) is more pronounced than in laboratory models of apoptosis (fig. 1). However, in the latter case, as well, the apoptotic shrinkage is visually determined as the increase in extracellular space between the zygote and the envelope. For the purpose of assessing the statistical significance of the reduction in size of the embryo, its volume was measured in an experiment with induced apoptosis by the method of quantitative laser microtomography (fig. 3).

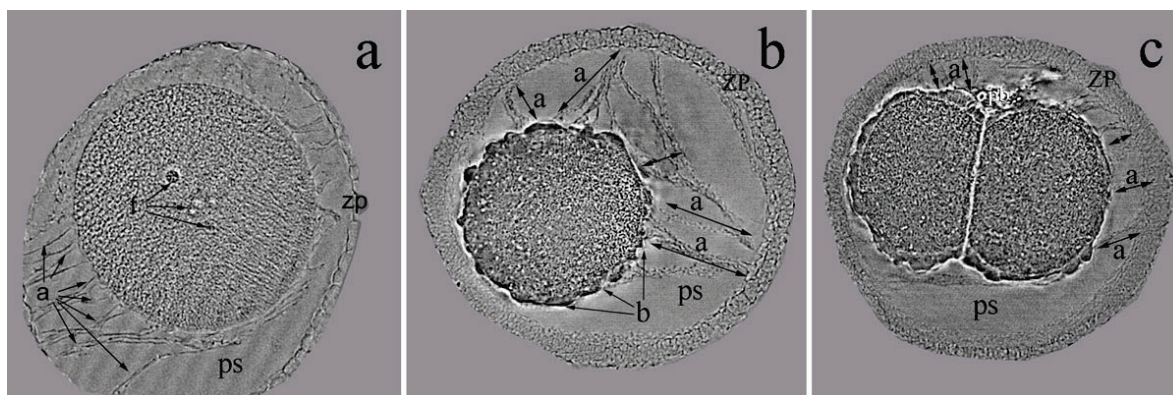


Figure 2. A photomicrograph of a mature oocyte and an early embryo of NMRI mouse in the state of natural apoptosis; the image has been obtained in the plane of an optical slice. (a) The shrunken oocyte; (b) the shrunken single-cell embryo; (c) the shrunken two-celled embryo. Designations: a, filaments connecting the cell and the envelope of the embryo; b, protrusions; pb, polar body; ps, the space between the envelope and the cell; zp, the envelope of the embryo

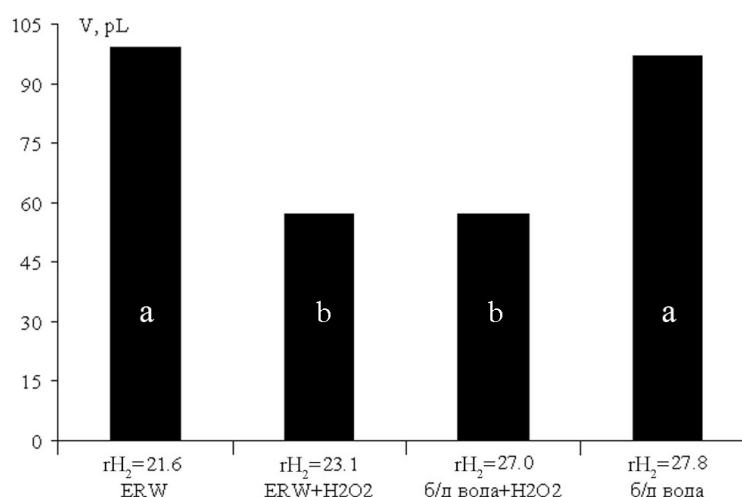


Figure 3. The volume of a two-cell mouse embryo in the experiment with induced apoptosis (0.2 mM H₂O₂, 40 min). The data are arranged according to the magnitude of the index of oxidative activity (rH_2). Designations: ERW, Dulbecco's medium prepared with the catholyte, b/d water, Dulbecco's medium prepared with bidistilled water; +H₂O₂, hydrogen peroxide added to Dulbecco's medium at a concentration of 0.2 mM; V , the volume of the embryo in picolitre. The data in the columns with different marking letters vary with the significance level $p < 0.05$. The significance of differences was assessed by Student's test, when the number of embryos was no less than 20 in each group

Figure 3 shows comparative data of the measurements of the two-cell mouse embryo volume relative to the oxidative activity index at different variants of the Dulbecco's medium. Note that apoptosis develops in the antioxidant region of the rH_2 index (~ 23 – 27), which in itself is unexpected. It is interesting that outside of this limited range, as in the usual medium ($rH_2 = 27.8$) and in the medium with the catholyte ($rH_2 = 21.6$) the signs of apoptosis are not observed. If such an effect of submillimolar concentration of hydrogen peroxide is to be discussed in terms of a redox-sensitive mechanism, it is necessary to note two limiting values. The value of rH_2 close to 23 can be regarded as the sensitivity, i.e., the level below which the effect does not occur. If the rH_2 value is above 27, the induced apoptosis is prevented, which may mean the desensitization of the mechanism. One target of the exogenous ROS molecules can be the thiol group in, for example, Cys-loop receptors [18]. In discussing these results it should be remembered that they were obtained in the experimental model with a relatively short interval of exposure. Perhaps the outcome of the catholyte action would be different during its long-term (chronic) consumption, for example, in the conditions of the lumen of the small intestine with active mechanisms of homeostasis stabilization.

Summarizing these results, we can conclude the following that Dulbecco's medium with the catholyte compensates for oxidative stress but does not prevent apoptosis induced by hydrogen peroxide (0.2 mM) in the early mouse embryo. The development of apoptosis in a limited range of rH_2 suggests the action of exogenous H₂O₂ molecules via a redox-sensitive mechanism. In this case, the targets for the H₂O₂ molecule are probably the thiol groups of Cys-loop receptors, K_{2p} potassium channel or VSOAC-like transporters of the Cl[−] anion, which are responsible for the compensatory cell volume decrease [32].

The authors are grateful to V.M. Bakhir for the opportunity to use the setting he developed for bidistilled water electrolysis in the laboratory conditions. This work was supported by Russian Science Foundation, project no. 16-16-00020.

References:

1. Shirahata S., Hamasaki T., Teruya K. Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, vol. 23, pp. 124-131.
2. Henry M., Chambron J. Physico-chemical, biological and therapeutic characteristics of electrolyzed reduced alkaline water (ERAW). *Water*, 2013, vol. 5, pp. 2094-2115.
3. Bakhir V.M., Pogorelov A.G. Universal Electrochemical Technology for Environmental Protection. *Int. J. Pharm. Res. & Allied Sci.*, 2018, vol. 7, pp. 41-57.
4. Koseki M., Tanaka Y., Noguchi H., Nishikawa T. Effect of pH on the taste of alkaline electrolyzed water. *J. Food Sci.*, 2007, vol. 72, pp. 298-302.
5. Tashiro H., Kitahara T., Fujiyama Y., Banba T. Clininical evaluation of alkali-ionized water for chronic diarrhea-placebo-controlled double blind study. *Dig. Absorpt.*, 2000, vol. 23, pp. 52-56.

6. Osada K., Li Y.-P., Hamasaki T., Abe M., Nakamichi N., Teruya K. Anti-diabetes effects of Hita Tenryosui water, a natural reduced water. *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Dordrecht: Springer, 2010, vol. 15, pp. 307-313.
7. Shirahata S., Murakami E., Kusumoto K.-I., Yamashita M., Oda M., Teruya K. Telomere shortening in cancer cells by electrolyzed-reduced water. *Animal cell technology: Challenges for the 21st century*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, pp. 355-359.
8. Kashiwagi T., Hamasaki T., Kabayama S., Takaki M., Teruya K., Katakura Y. Suppression of oxidative stress-induced apoptosis of neuronal cells by electrolyzed reduced water. *Animal cell technology meets genomics*, Dordrecht: Springer, 2005, pp. 257-259.
9. Abe M., Sato S., Toh K., Hamasaki T., Nakamichi N., Teruya K. Suppressive effect of ERW on lipid peroxidation and plasma triglyceride level. *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Dordrecht: Springer, 2010, vol. 16, pp. 315-321.
10. Shirahata S., Kabayama S., Nakano M., Miura T., Kusumoto K., Gotoh M., Hayashi H., Otsubo K., Morisawa S., Katakura Y. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, vol. 234, pp. 269-274.
11. Ignacio R.M.C., Joo K.-B., Lee K.-J. Clinical effect and mechanism of alkaline reduced water. *J. Food and Drug Analysis*, 2012, vol. 20, suppl. 1, pp. 394-397.
12. Liu L., Keefe D.L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol. Reprod.*, 2000, vol. 62, pp. 1828-1834.
13. Trimarchi J.R., Lin L., Smith P.J. S., Keefe D.L. Apoptosis recruits two-pore domain potassium channels used for homeostatic volume regulation. *Am. J. Physiol.*, 2002, vol. 282, pp. C588-C594.
14. Biggers J.D. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int. J. Dev. Biol.*, 1998, vol. 42, pp. 879-884.
15. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Pogorelova V.N. Influence of exposure to vitrification solutions on 2-cell mouse embryos: I. Intracellular potassium and sodium content. *CryoLetters*, 2007, vol. 28, pp. 403-408.
16. Pogorelova M.A., Golichenkov V.A., Pogorelova V.N., Kornienko E., Panait A.I., Pogorelov A.G. *Klet. Tekhnol. Biol. Med.*, 2011, no. 3, pp. 155-163.
17. Pogorelov A.G., Pogorelova V.N. Quantitative tomography of early mouse embryos: laser scanning microscopy and 3D reconstruction. *J. Microscopy*, 2008, vol. 232, pp. 36-43.
18. Pogorelov A. G., Pogorelova V. N. Dynamics of cell volume in early mouse embryos subjected to hypotonic shock. *Biophysics*, 2009, vol. 54, pp. 336-339.
19. Liu L., Trimarchi J.R., Keefe D.L. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. *Biol. Reprod.*, 1999, vol. 61, pp. 1162-1169.
20. Pogorelov A.G., Allachverdov B.L., Burovina I.V., Mazay G.G., Pogorelova V.N. Study of potassium deficiency in cardiac muscle: cryotechniques and X-ray microanalysis. *J. Microscopy*, 1991, vol. 12, pp. 24-38.
21. Pogorelov A.G., Katkov I.I., Smolyaninova E.I., Goldshtein D.V. Changes in intracellular potassium and sodium content of 2-cell mouse embryos induced by exposition to vitrification concentrations of ethylene glycol. *CryoLetters*, 2006, vol. 27, pp. 87-98.
22. Pogorelova M. A., Yashin V. A., Pogorelov A. G., Golichenkov V. A. Quantitative tomography of mouse early embryo. *Dokl. Akad. Nauk*, 2008, vol. 418, pp. 71-75.
23. Pogorelova M.A., Goldstein D.V., Pogorelov A.G., Golichenkov V.A. Quantitation of cellular volume of early mouse embryo subjected to anisotonic conditions. *Klet. Tekhnol. Biol. Med.*, 2009, no. 3, pp. 169-172.
24. Pogorelova M.A., Golichenkov V.A., Pogorelov A.G. Differential axial contrast of optical sections: laser microtomography and quantitative 3D reconstruction. *Optics and Spectroscopy*, 2014, vol. 116, pp. 488-493.
25. Pogorelova M.A., Panait A.I., Pogorelov A.G. Laser-scanning microscopy as applied to mouse early embryos: cytometry and analysis of cell morphology. *Biophysics*, 2016, vol. 61, pp. 445-452.
26. Littler D.R., Assaad N.N., Harrop S.J., Brown L.J., Pankhurst G.J., Luciani P., Aguilar M.-I., Mazzanti M., Berryman M.A., Breit S.N., Curmi P.M. G. Crystal structure of the soluble form of the redox-regulated chloride ion channel protein CLIC4. *FEBS Journal*, 2005, vol. 272, pp. 4996-5007.
27. Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A., Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, pp. 9487-9492.
28. Shimizu T., Numata T., Okada Y. A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, vol. 101, pp. 6770-6777.
29. Cohen G.M., Sun X.-M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.*, 1992, vol. 286, pp. 331-334.
30. Hur C.-G., Choe C., Kim G.-T., Cho S.-K., Park J.-Y., Hong S.-G., Han J., Kang D. Expression and localization of two-pore domain KC channels in bovine germ cells. *Reproduction*, 2009, vol. 137, pp. 237-244.
31. Hur C.-G., Kim E.-J., Cho S.-K., Cho Y.-W., Yoon S.-Y., Tak H.-M., Kim C.-W., Choe C., Han J., Kang D. K⁺ efflux through two-pore domain K⁺ channels is required for mouse embryonic development. *Reproduction*, 2012, vol. 143, pp. 625-636.
32. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.*, 1997, vol. 273, pp. C755-C789.

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАН ПРИ РАЗВИТИИ СПОНТАННОГО ЛЕЙКОЗА У МЫШЕЙ ЛИНИИ AKR

Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ: e-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Целью работы было изучение изменений структуры мембран при развитии спонтанного лейкоза у мышей линии AKR. Наблюдались похожие стадийные изменения текучести прибрежковых и липидных областей изучаемых мембран с отставанием стадий изменений в липидных областях от прибрежковых. Было показано, что структурное состояние мембран играет одну из важных ролей при развитии патологии.

Ключевые слова: микровязкость мембран, мыши линии AKR.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое количество исследований связано с изучением структуры и активности белков, в которых не учитывается липидный состав и структура мембран. Между тем, большинство белков и ферментов являются трансмембранными или мембраносвязанными, и их функциональность и активность напрямую зависят от липидного состава и структуры мембран.

В организме существует физико-химическая система регуляции клеточного метаболизма мембранами, основанная на связи между процессами пероксидного окисления липидов (ПОЛ) мембран с одной стороны и скоростью обновления липидов – с другой [1-3]. В процессе регуляции ПОЛ происходит изменение липидного состава, что, в свою очередь, приводит к изменению структуры мембран. Кроме того, известно, что многие мембранные белки и ферменты являются липидзависимыми и их активность тесно связана со структурным состоянием липидного бислоя [2]. Одной из важных структурных характеристик биологических мембран является микровязкость. Микровязкость липидного бислоя тесно связана с процессами окисления, поэтому при исследовании действия антиоксидантов на клеточные структуры необходимо изучать изменение вязкостных свойств липидного бислоя мембран.

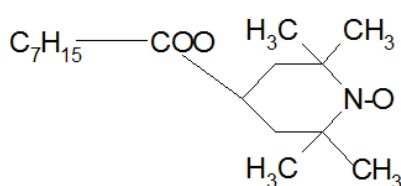
В настоящее время не вызывает сомнений эффективность действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах ($< 10^{-13}$ М) [5-7], механизм действия которых до конца не изучен. Одним из возможных механизмов действия является чувствительность текучести липидного бислоя к веществам не только в физиологических, но и малых концентрациях.

Поэтому в работе было изучено действие синтетического антиоксиданта фенозана в разных дозах на микровязкость липидных и прибрежковых областей мембран мозга мышей при развитии спонтанного лейкоза.

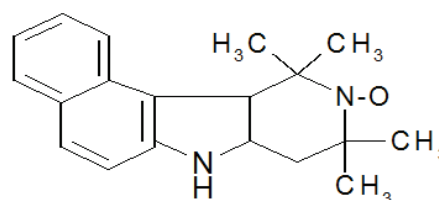
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах со спонтанным лейкозом использовали мышей линии AKR, самок, массой 25-30 г, подверженных развитию спонтанного лейкоза под действием вируса мышинного лейкоза. Животных получали из научно-исследовательской лаборатории экспериментальных биологических моделей. Мышей содержали в условиях вивария на стандартной диете. Средняя и максимальная продолжительность жизни самок составляла 254 ± 6 и 412 ± 14 суток соответственно. Объектом исследований служил головной мозг мышей, который извлекали ежемесячно на протяжении 3-9 месяцев. В каждом опыте использовали от 8-10 животных. Проведено 2-3 серии экспериментов. Микросомы и синапсомы получали методом дифференциального центрифугирования [8].

Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.



Зонд I



Зонд II

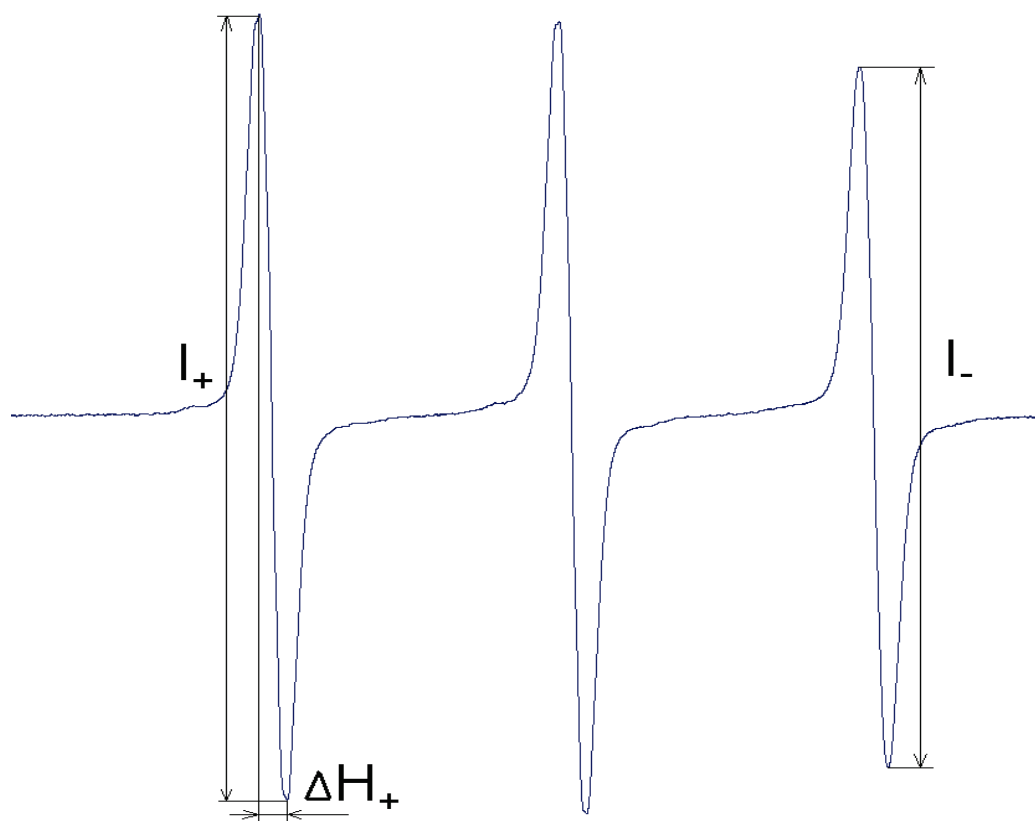


Рисунок 1. Пример спектра ЭПР спиновых зондов I и II

В работе [10] показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II - в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислое судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I "липидным", а зонд II – "белковым".

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле $\tau_c = 6.65 \times 10^{-10} \times \Delta H_+ \times ((I_+/I_-)^{0.5} - 1)$, приведенной в работе [11]. Регистрацию спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы "Brucker".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы было изучение изменений структуры мембран при развитии спонтанного лейкоза у мышей линии AKR. В процессе развития патологии у мышей (от 3-9 месяцев) обнаружены значительные изменения текучести мембран как синапсом (рис. 2b), так и микросом (рис. 2a). На ранней стадии (3-4 месяца) микровязкость приобелковых областей синапсом (рис. 2b) растет на 20 %, а затем в течение долгого периода падает до значений ниже изначальной τ_c . После седьмого месяца значение времени корреляции вращательной диффузии приобелкового зонда резко увеличивается (до 1,5 раз). Аналогичные изменения микровязкости приобелковых областей наблюдаются и в микросомах (рис. 2a). В липидных областях мембран синапсом и микросом наблюдаются подобные периодические изменения. Микровязкость липидных областей исследуемых мембран растет вплоть до 6го месяца, с шестого по 8 месяц падает, а на поздних стадиях снова показывает тенденцию к росту.

Как видно из полученных данных, наблюдаются похожие стадийные изменения текучести приобелковых и липидных областей изучаемых мембран с отставанием стадий изменений в липидных областях от приобелковых. Это означает, что при развитии спонтанного лейкоза в первую очередь изменяются функциональные характеристики белков, что, в свою очередь, приводит к изменению структурного состояния липидного бислоя. Такие изменения характерны при развитии опухолей [12], и указывают на то, что в процессе развития патологии происходит изменение состава липидов мембран на уровне их синтеза. Так, например, нами в работе [9] было показано, что удаление обонятельных луковиц у мышей приводит к симпатным изменениям микровязкостей липидной и приобелковых областей, тогда как у ложнопериоперированных животных эти изменения антипатны (Рис. 3). Таким образом, симпатные изменения, по-видимому, характерны при наличии патологических состояний, связанных с изменениями функционирования белков и ферментов, так как состав и структура липидного бислоя мембран тесно связана с функциональной активностью мембранных ферментов и белков.

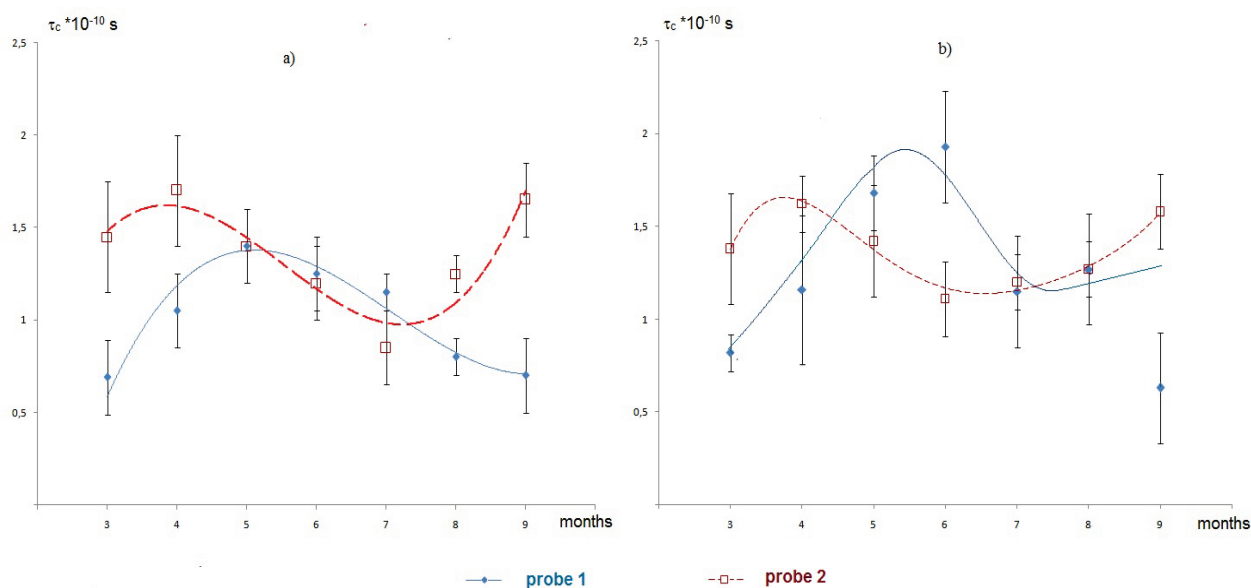


Рисунок 2. Динамика изменения времени корреляции вращательной диффузии при введении фенозана а – микросомы, б – синапсомы

На следующем этапе исследовали действие фенозана на микровязкость мембран микросом при развитии спонтанного лейкоза у мышей. Фенозан вводили в концентрациях $2 \cdot 10^{-14}$ и $3 \cdot 10^{-4}$ в латентный период развития патологии (3-6 месяцев). Изменения микровязкости микросомальных мембран через двое суток и через месяц показаны на рисунке 4 (а, б). Введение антиоксиданта в обеих дозах приводило к увеличению текучести липидных областей мембран (probe 1) через двое суток после введения. По истечении месяца после введения фенозана текучесть обеих областей мембран увеличивалась. Учитывая стадии изменения микровязкости при патологии (рис. 4), можно эффективно использовать введение фенозана с целью возвращения структурных характеристик к норме. Для этого необходимо вводить фенозан на 5-6 месяц, когда микровязкость мембран повышена, а через месяц резко снижается. Таким образом, введение фенозана приведет к тому, что в период от 5 до 7-8 месяцев текучесть липидного бислоя окажется близко к начальному контрольному уровню. Заметим, что время корреляции вращательной диффузии зондов через месяц после введения фенозана меняется в одну сторону относительно контроля. Такие изменения микровязкости характерны при развитии патологий [12].

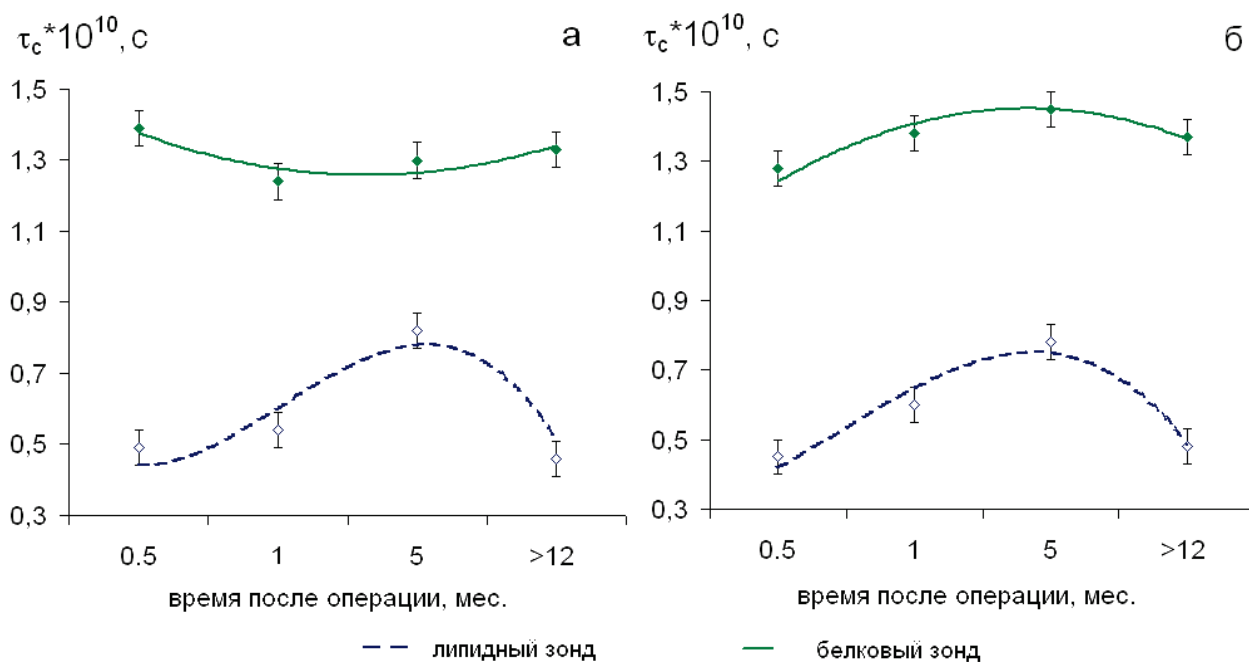


Рисунок 3. Изменение микровязкости мембран микросом мозга: а – при ложной операции; б – при удалении обонятельных лукович

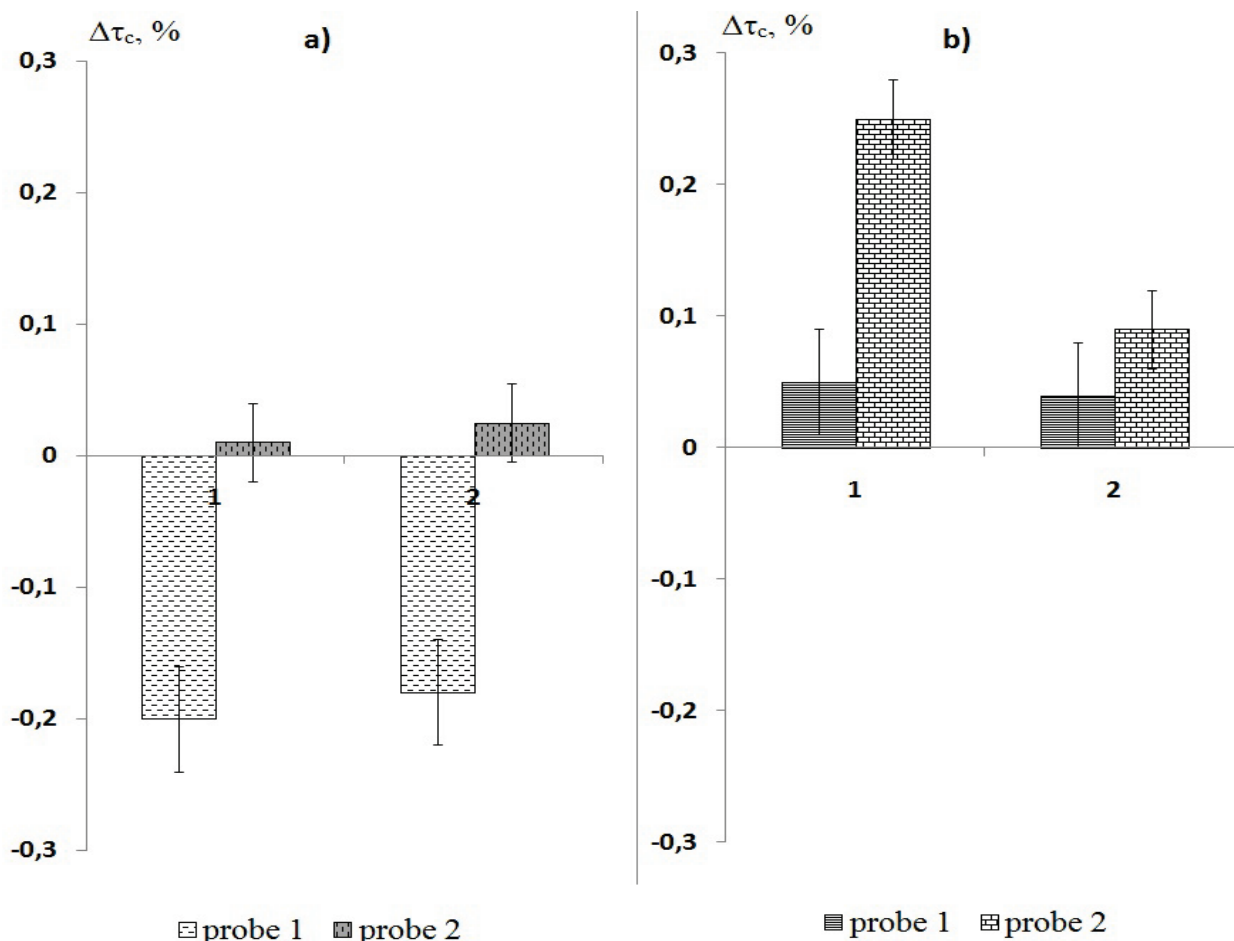


Рисунок 4. Относительные изменения времени корреляции вращательной диффузии зондов в микросомальных мембранах при введении фенозана в латентный период развития лейкоза: а – через 48 часов после введения; б – через месяц после введения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что структурное состояние мембран играет одну из важных ролей в метаболизме. Поэтому мы считаем, что при исследовании развития различных патологий, необходимо изучать изменение структуры липидного бислоя. При исследовании влияния препаратов и биологически активных веществ, в том числе и антиоксидантов, необходимо учитывать изменения текучести мембран, что может помочь увеличить эффективность их использования при терапии патологий различного этиопатогенеза.

Список литературы / References:

1. Аристархова С.А., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б. [и др.] *ДАН СССР*, 1976, т. 228, с. 215. [Aristarhova S.A., Arhipova G.V., Burlakova E.B. [et al.] *DAN USSR*, 1976, vol. 228, p. 215. (In Russ.)]
2. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. *Успехи химии*, 1985, т. 54, № 9, с. 540. [Burlakova E.B., Hrapova N.G. *Uspekhi himii*, 1985, vol. 54, no. 9, p. 540. (In Russ.)]
3. Бурлакова Е.Б. *Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты*, М.: Химия, 2005, т. 2, с. 10. [Burlakova E.B. *Himicheskaya i biologicheskaya kinetika. Novye gorizonty*, Moscow: Himiya, 2005, vol. 2, p. 10 (In Russ.)]
4. Геннис Р. *Биомембраны. Молекулярная структура и функции*. М.: Мир, 1997, 208 с. [Gennis R. *Biomembrany. Molecular structure and functions*. Moscow: Mir, 1997, 208 p. (In Russ.)]
5. Бурлакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз. *Вестник Российской Академии Наук*, 1994, 64(5), с. 425-431. [Burlakova E.B. The effect of ultralow doses. *Vestnik Rossijskoj Akademii Nauk*, 1994, 64(5), pp. 425-431 (In Russ.)]
6. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов. *Биофизика*, 2004, т. 49, с. 551-564. [Burlakova E.B., Konradov A.A., Mal'ceva E.L. The effect of ultralow doses of the biologically active agents and low-molecular physical factors. *Biofizika*, 2004, vol. 49, pp. 551-564. (In Russ.)]
7. Пальмина Н.П., Часовская Т.Е., Белов В.В., Мальцева Е.Л. Дозовые зависимости изменения микровязкости липидов биологических мембран, индуцированные синтетическим антиоксидантом фенозаном

калия. Докл. Акад. Наук., 2012, т. 443, с. 463-499. [Pal'mina N.P., CHasovskaya T.E., Belov V.V., Mal'ceva E.L. Dose dependences of the micrviscosity changes of the biological membrane lipids indused by the sintetic antioxidant phenosan-potassium. Dokl. Akad. Nauk., 2012, vol. 443, pp. 463-499 (In Russ.)]

8. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Изд-во Ленинград. ун-та, 1982, 272 с. [Prohorova M.I. *Methods of the biochemical investigations*. Ed. of Leningrad. un-ty, 1982, 272 p. (In Russ.)]

9. Герасимов Н.Ю., Голошапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Исследование методом ЭПР спиновых зондов изменений текучести мембран органелл мозга мышей с экспериментальной патологией, моделирующей болезнь Альцгеймера. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 2, с. 252-256. [Gerasimov N.Yu., Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Studying by the method of EPR of spin probes of the changes of fluidity of brain organell membrane from mice with experimental pathology modeling Alzheimer's disease. *Biofizika*, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 252-256. (In Russ.)]

10. Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г. [и др.] *Биохимия*, 1971, 36(6), с. 1149. [Binyukov V.I., Borunova S.F., Gol'dfel'd M.G. [et al.] *Biohimiya*, 1971, 36(6), p. 1149. (In Russ.)]

11. Вассерман А.М., Бучаченко А.Л., Коварский А.Л., Нейма И.Б. *Высокомолекулярные соединения*, 1968, т. 10А, с. 1930. [Vasserman A.M., Buchachenko A.L., Kovarskij A.L., Nejma I.B. *Vysokomolekulyarnye soedineniya*, 1968, vol. 10A, p. 1930. (In Russ.)]

12. Голошапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Термоиндуцированные структурные переходы в мембранах при введении антиоксидантов и злокачественном росте. *Биофизика*, 1980, т. 25, № 1, с. 97-101. [Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Thermoinduced structural transitions in membranes under antioxidant injection and with malignant growth. *Biofizika*, 1980, vol. 25, no. 1, pp. 97-101. (In Russ.)]

13. Bachurin S., Tkachenko I. [et al.] *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 2001, vol. 939, p. 219.

14. Grigorev V.V., Dranyi O.A., Bachurin S.O. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2003, 136(5), p. 474.

15. Grigoriev V.V., Proshin A.N., Kinzirkii A.S., Bachurin S.O. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2012, 153(3), p. 298.

16. Касаринская О.В., Виноградова Д.В., Шевцова Е.Ф., Зарипов В.Н. Модуляция свойств митохондрий как механизм нейропротекции. *Вестник молодых ученых ИвГУ*, 2014, вып. 14, с. 12-15. [Kasarinskaya O.V., Vinogradova D.V., SHEvcova E.F., Zaripov V.N. Mitochondria properties modulation as the mechanism of the neuroprotection. *Vestnik molodyh uchenyh IvGU*, 2014, iss. 14, pp. 12-15. (In Russ.)]

CHANGE OF MEMBRANES MICROVISCOSITY IN DEVELOPMENT OF SPONTANEOUS LEUKEMIA IN AKR MICE LINES

Herasimov N.Yu., Nevrova O.V., Holoshchapov A.N., Burlakova E.B.

N.M. Emanuel Institute of biochemical physics RAS

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia: e-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Abstract. Studying the changes of the membrane structure with the development of the spontaneous leucosis in AKR line mice was the aim of this paper. Similar phasic fluidity changes of lipidic and proteinic regions of the membranes with lag of the stages in lipidic areas with respect to proteinic regions was observed. It was shown that the structural state of membranes plays one of the central roles in the patalogy development.

Key words: membranes microviscosity, AKR mice lines.

МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ Ca^{2+} -ОТВЕТОВ НА АДЕНОЗИН МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Кочкина Е.Н., Черкашин А.П., Котова П.Д.

Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: kate-kochkina@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию пролиферирующих недифференцированных клеток, которые способны к дифференцировке в клетки как минимум костной, хрящевой и жировой тканей. Несмотря на значительный прогресс в исследовании МСК, текущие представления об их рецепторных и сигнальных системах весьма ограничены. В данной работе показано, что аденозин стимулирует Ca^{2+} сигнализацию в МСК, выделенных из жировой ткани человека. Установлена пороговая концентрация аденозина, охарактеризованы концентрационные зависимости амплитуды и лаг-периода ответов от концентрации агониста. Данные ингибиторного анализа в сочетании с незначительным влиянием наружного Ca^{2+} на Ca^{2+} сигналы, инициируемые аденозином, свидетельствовали о том, что в МСК рецепторы аденозина сопряжены фосфоинозитидным каскадом преимущественно с выбросом депонированного Ca^{2+} при незначительном вкладе входа наружного Ca^{2+} .

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки, аденозиновые рецепторы.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную популяцию клеток, включающую недифференцированные мультипотентные клетки, способные к дифференцировке в клетки как минимум костной, хрящевой и жировой тканей. МСК могут быть выделены из многих тканей взрослого организма, однако основными их источниками служат костный мозг и жировая ткань. МСК жировой ткани привлекают особое внимание исследователей по причине доступности их источника.

Большинство работ с МСК направлено на изучение механизмов их дифференцировки и поиск возможностей управления этим процессом, а также на анализ возможного применения МСК в терапевтических целях. Фундаментальным исследованиям сигнальных процессов в этих клетках уделяется гораздо меньшее внимание. При этом естественно полагать, что межклеточные и внутриклеточные коммуникации, паракринные и аутокринные регуляции, вовлекающие различные сигнальные молекулы и рецепторные системы, играют ключевую роль в физиологических процессах, детерминирующих жизнедеятельность МСК.

Известно, что МСК высвобождают АТФ, а на их внеклеточной поверхности функционируют несколько типов эктонуклеотидаз, последовательно гидролизующих АТФ до аденозина ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{аденозин}$). Также показано, что МСК экспрессируют аденозиновые рецепторы для мониторинга аденозина, который может оказывать регуляторное воздействие на их физиологические функции. Поэтому можно ожидать, что пуриnergическая сигнальная система является естественной частью системы регуляции клеточных функций МСК.

Данная работа была посвящена исследованию Ca^{2+} -сигнализации, инициируемой внеклеточным аденозином в цитоплазме МСК, выделенных из жировой ткани человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение МСК из жировой ткани и их культивирование. МСК человека выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров. Жировую ткань измельчали и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ед/мл) (Worthington, США) и диспазы (40 ед/мл) (Sigma, США) в соотношении объема ткани к объему ферментативного раствора 1:2. Суспензию инкубировали при 37 °C в течение 30-60 мин, периодически встряхивали. Затем к полученной суспензии для инактивации ферментов добавляли равный объем среды Advance Stem (HyClone, США), содержащей 10% Advance Stem Supplement (HyClone), и центрифугировали при 200 g 10 мин. Супернатант и верхнюю фракцию адипоцитов удаляли. Осадок ресуспендировали и лизировали эритроциты. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (BD Bioscience, США). Клетки ресуспендировали в среде роста (см. ниже), высаживали в чашки Петри в количестве 100 тыс. клеток/мл и инкубировали при 37 °C, 5 % CO_2 . На следующий день меняли среду для удаления неприкрепленных клеток. Выделенные МСК культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США) и/или в 12-луночной планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10 % Advance Stem Supplement (HyClone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. При достижении 80 % монослая клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем пассаживали в соотношении 1:3. В экспериментах использовали МСК 2–4 пассажей.

Подготовка клеток к эксперименту. Перед экспериментом клетки культивировали в 12-луночный планшет в среде роста (см. выше) без антибиотика в течение 12 ч. Затем клетки двукратно промывали

раствором Версена (Sigma). Для отделения от субстрата клетки инкубировали 2-3 мин в 200 мкл фермента HyQTase (HyClone). Фермент ингибировали добавлением 800 мкл полной ростовой среды, клетки ресуспендировали и помещали в пробирку для центрифугирования. Клетки концентрировали в нижней части пробирки при 50 g в течение 45 с. Клетки прикрепляли с помощью Cell Tak (BD Biosciences, США) на дно фотометрической камеры, представляющей собой покрывное стекло (Menzel_Glaser, Германия) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным Ca^{2+} -зондом Fluo-4. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23-25 °C) в присутствии проникающего аналога Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0,02 %) (Molecular Probes, США) 20 мин, в течение которых гидролиз внутриклеточными эстеразами ацетоксиметилевой группы Fluo-4 AM продуцировал остаточное количество Fluo-4. Затем клетки при 4 °C в течение 40 мин отмывали внеклеточным раствором, содержащим (мМ): 110 NaCl, 5,5 KCl, 2 CaCl_2 , 0,8 MgSO_4 , 10 HEPES, 10 глюкоза, в котором они выдерживались. В экспериментах с пониженным до цитоплазматического уровня содержанием Ca^{2+} , 2 мМ CaCl_2 во внеклеточном растворе заменяли на 0,5 мМ EGTA + 0,4 мМ CaCl_2 , в этом случае концентрация свободного Ca^{2+} составляла 260 нМ.

Микрофотометрия. Эксперименты проводились с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0,75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждалась на длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссия регистрировалась в области 535 ± 20 нм. Каждые 0,5 секунды регистрировались последовательные флуоресцентные изображения. Изменение концентрации цитозольного кальция в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$). Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

Фотолиз химических групп (uncaging). Одновременная загрузка клеток Fluo-4 и фоточувствительным Ca^{2+} хелатором NP-EGTA позволила оценивать изменение концентрации цитозольного Ca^{2+} за счет Fluo-4 и скачкообразно повышать ее в нужный момент за счет NP-EGTA. Стимуляции фотолиза происходила на длине волны 355 нм, для этого один из входов бифуркационного оптического волокна был соединен с лазером LCS-DTL-374QT (Лазер-Экспорт, Россия).

ОТ-ПЦР. Для проведения ОТ-ПЦР культивируемые МСК отделяли от субстрата. Из образца, содержащего 10^5 - 10^6 клеток МСК выделяли тотальную РНК с помощью набора RNeasy mini kit (Qiagen), следуя рекомендациям производителя. Изолированную РНК обрабатывали ДНКазой из набора DNA-Free (Ambion). Обратную транскрипцию проводили с использованием случайных праймеров-гексамеров ревертазы Superscript III (Invitrogen) 1 час при 50 °C. Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими праймерами с использованием готовой смеси для ПЦР с горячим стартом от Евrogen.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что популяция МСК гетерогенна по чувствительности к различным агонистам рецепторов, таким как АТР, карбахол, ГАМК, серотонин, норадреналин и др. [7]. В настоящей работе анализировали Ca^{2+} сигналы, инициируемые аденозинергическими агонистами в цитоплазме МСК, с использованием метода микрофотометрии (Ca^{2+} imaging) и Ca^{2+} -индикатора Fluo-4, также анализировали экспрессию генов аденорецепторов с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и ген-специфических праймеров.

МСК были проанализированы на предмет способности отвечать на аденозин в условиях пониженного до цитоплазматического уровня содержания Ca^{2+} (260 нМ). Все протестированные МСК ($n = 26$) генерировали практически нормальные по амплитуде и кинетике ответы на аденозин в среде с пониженным содержанием Ca^{2+} (рис. 1). Это свидетельствовало о том, что основной вклад в Ca^{2+} ответ на аденозин вносит выброс депонированного Ca^{2+} при незначительной роли Ca^{2+} входа.

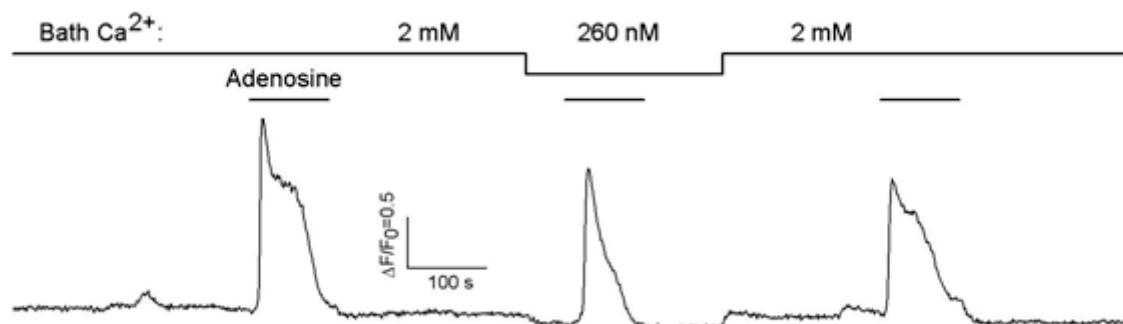


Рисунок 1. Репрезентативная регистрация ответов одиночной МСК, демонстрирующая незначительное влияние наружного Ca^{2+} на чувствительность МСК к аденозину (2 мМ). Верхняя линия иллюстрирует изменение концентрации внеклеточного Ca^{2+}

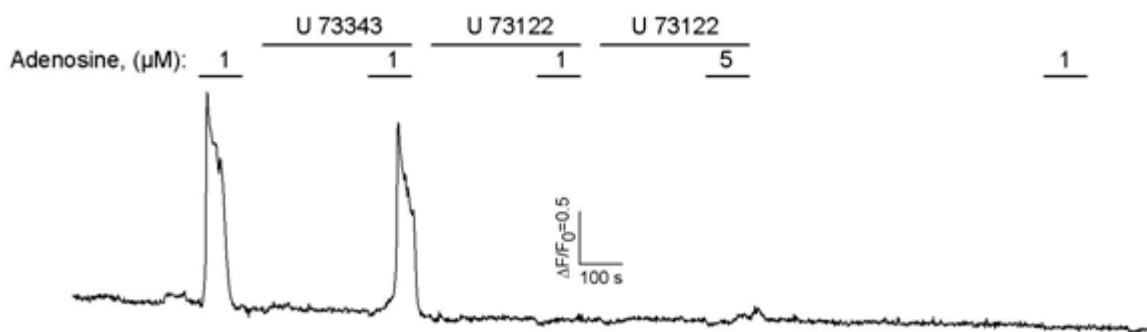


Рисунок 2. Репрезентативная регистрация ответов одиночной МСК, демонстрирующая вклад фосфоинозитидного каскада в Ca^{2+} -ответы МСК на аденозин. Ответы МСК на аденозин не подавляются неактивным аналогом ингибитора фосфолипазы С U73343 (2 мкМ), но полностью и необратимо подавляются ингибитором фосфолипазы С U73122 (2 мкМ)

В экспериментах, где МСК ($n = 17$) предварительно инкубировали в присутствии ингибитора фосфолипазы С (U73122), Ca^{2+} ответы на аденозин полностью и необратимо подавлялись (рис. 2). Действие U73122 в данном случае можно считать специфичным, т.к. предварительная инкубация тех же клеток с его неактивным аналогом (U73343) в той же концентрации не влияла на их способность отвечать на аденозин. Данный факт позволяет сделать однозначный вывод об участии фосфолипазы С в генерации МСК Ca^{2+} ответов на аденозин.

Известно, что в различных клетках высвобождение депонированного Ca^{2+} происходит при стимуляции рианодинных или IP_3 -рецепторов, являющихся лиганд-активируемыми Ca^{2+} каналами эндоплазматического ретикулума [1, 2]. Предварительная инкубация МСК с антагонистом IP_3 -рецепторов (2-APB) приводила к обратимому подавлению ответов на аденозин, тогда как ингибитор рианодинных рецепторов (Ryanodine) не влиял на способность клеток генерировать ответы на аденозин ($n = 12$) (рис. 3). Помимо IP_3 -рецепторов 2-APB также может блокировать вход наружного Ca^{2+} , в частности, через ионные каналы TRPC типа [4, 8, 10]. В нашем же случае ответы генерировались независимо от входа наружного Ca^{2+} (рис. 2) и возможным влиянием блокады входа наружного Ca^{2+} можно было пренебречь.

Таким образом, совокупность представленных данных (рис. 1-3) свидетельствует о том, что трансдукция аденозинового сигнала протекает в основном за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо, опосредованного работой фосфолипазы С и активацией IP_3 рецепторов. Иными словами, генерация Ca^{2+} ответов МСК на аденозин протекает при участии классического фосфоинозитидного пути.

В феноменологии ответов МСК на аденозин была замечена интересная особенность: амплитуда генерируемых Ca^{2+} ответов фактически не зависела от концентрации аденозина ($n = 21$) (рис. 4). Иначе говоря, аденозин никогда не вызывал детектируемых ответов при концентрациях ниже пороговой (50-500 нМ), в то время как при более высоких концентрациях аденозин вызывал максимальный или почти максимальный Ca^{2+} ответ. На рисунке 4А представлена регистрация Ca^{2+} ответов МСК на аденозин в широком диапазоне концентраций, на рисунке 4В концентрация аденозина в пороговой области изменялась с шагом 50 нМ.

Еще одной характерной чертой ответов на аденозин было то, что они были заметно отсрочены от момента аппликации агониста, и длительность задержки ответа падала с повышением концентрации агониста ($n = 11$) (рис. 5). Так, например, задержка ответов на пороговую концентрацию аденозина (0,1 мкМ) у клетки, представленной на рисунке 5А, составляла 106 с, тогда как при стимуляции ее аденозином в насыщающей концентрации (2 мкМ) она падала до 23 с, амплитуда же ответов при этом оставалась постоянной.

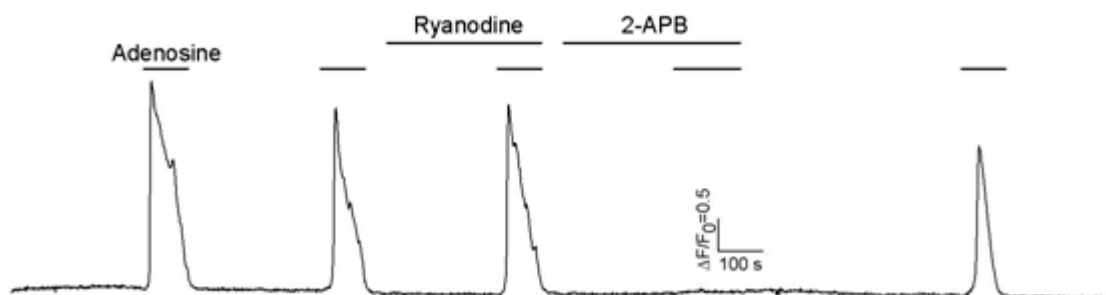


Рисунок 3. Репрезентативная регистрация ответов одиночной МСК, демонстрирующая вклад IP_3 -рецепторов в генерацию ответов на аденозин (2 мкМ), и отсутствие вклада рианодинных рецепторов. Антагонист IP_3 рецепторов (2-APB, 50 мкМ) полностью подавляет ответы на аденозин, в то время как ингибитор рианодинных рецепторов (Ryanodine, 50 мкМ) не влияет на способность МСК генерировать ответы на аденозин

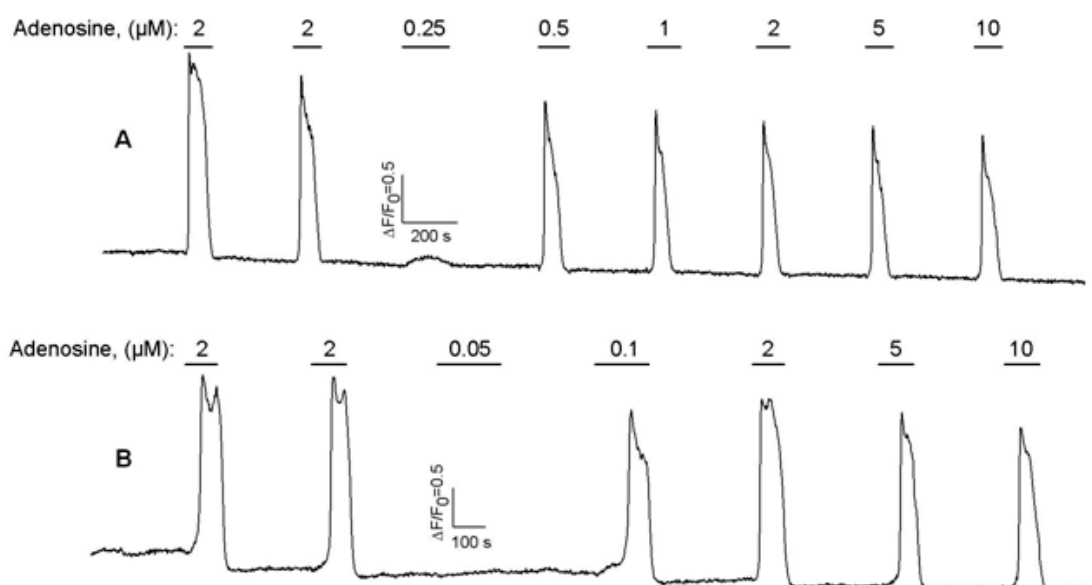


Рисунок 4. Репрезентативные регистрации ответов одиночных МСК, демонстрирующие генерацию ответов МСК на аденозин по принципу “всё или ничего”

Ответы МСК на аденозин, амплитуда которых следует принципу “все или ничего” и при этом задержка ответа градуально падает с концентрацией агониста, едва ли могут быть объяснены, если предположить, что трансдукционный процесс включает только стимуляцию фосфолипазы С и продукцию IP_3 , который в свою очередь стимулирует высвобождение депонированного Ca^{2+} через IP_3 -рецепторы. Поэтому мы предположили, что для генерации Ca^{2+} ответов на аденозин МСК используют два различных механизма. А именно, на первом этапе агонист вызывает небольшой Ca^{2+} сигнал, вероятно градуально зависящий от концентрации агониста (фосфоинозитидный каскад), а при достижении этим Ca^{2+} сигналом порогового значения, он усиливается до насыщающего с помощью Ca^{2+} -зависимого триггерного механизма. Возможно, эту роль играет описанный во многих работах механизм Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) [1, 2, 5].

Если эта идея верна, то любое (независимое от аденозина) достаточно быстрое и превышающее порог повышение внутриклеточного Ca^{2+} должно подхватываться механизмом Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} и преобразовываться в насыщающий Ca^{2+} ответ, подобный ответу на аденозин. Для проверки этого предположения мы анализировали реакцию аденозинэргических МСК на скачкообразное повышение внутриклеточного Ca^{2+} . С этой целью клетки одновременно загружались Fluo-4 и фоточувствительным Ca^{2+} хелатором NP-EGTA. Облучение хелатора в ультрафиолетовом (UV) диапазоне приводит к разрушению координационной сферы связывания Ca^{2+} и к его высвобождению [9], тем самым скачкообразно повышая уровень свободного Ca^{2+} в цитоплазме клетки. И действительно, вспышки ультрафиолета продолжительностью 4 секунды приводили МСК к генерации Ca^{2+} ответов по амплитуде и форме сходных с ответами на аденозин (рис. 6). Никакой из известных Ca^{2+} -зависимых механизмов не способен так усилить и придать такую форму первичному Ca^{2+} сигналу, вызванному фотолизом NP-EGTA, кроме механизма CICR.

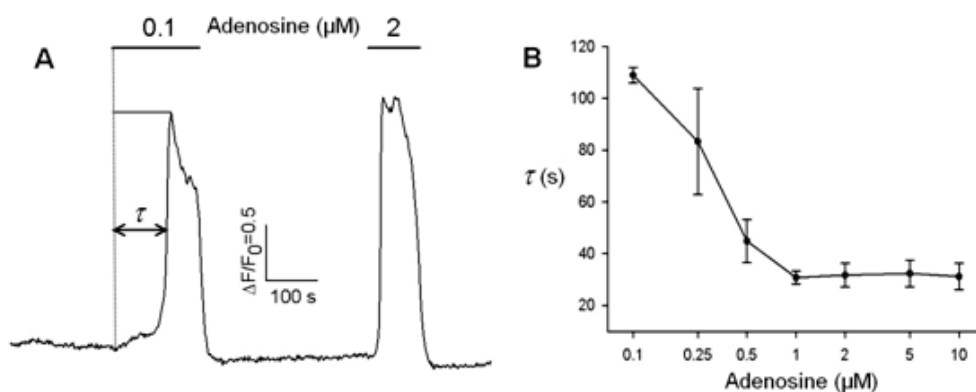


Рисунок 5. Зависимость задержки ответов МСК на аденозин от его концентрации: А – репрезентативные ответы одной МСК на аденозин в концентрациях 0,1 мкМ (пороговая) и 2 мкМ (насыщающая). Приведенные ответы имели задержку от момента аппликации аденозина 106 и 23 с соответственно. Длительность задержки (τ) рассчитывалась как время, необходимое для достижения ответом половины своего максимального значения. В – зависимость длительности задержки от концентрации аденозина. На рисунке представлены средние значения времени задержки $\pm$ стандартная ошибка ($n = 2-11$)

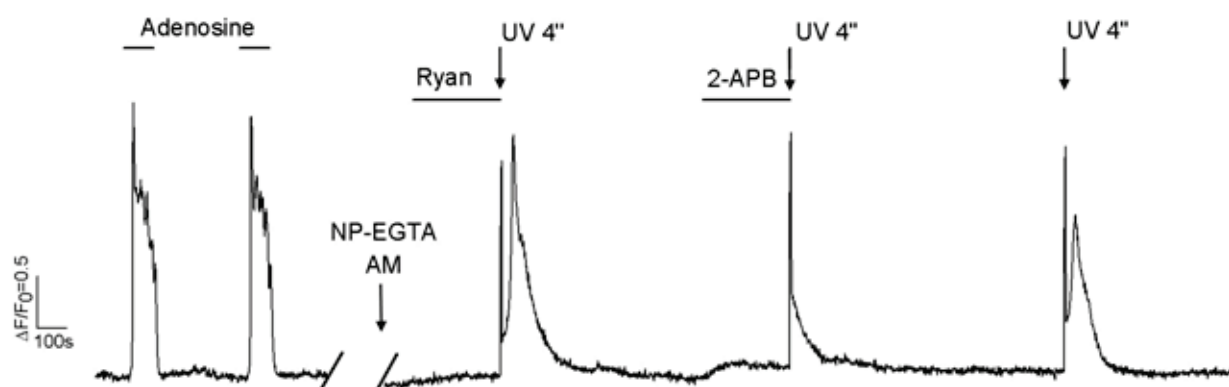


Рисунок 6. Репрезентативная регистрация ответов одиночной аденозинергической МСК, демонстрирующая вклад IP_3 рецепторов в генерацию Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} , и отсутствие такового у рианодинных рецепторов. Ингибитор рианодинных рецепторов (Ryanodine, 50 мкМ) не влияет на генерацию Ca^{2+} ответов на скачкообразное повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (UV), антагонист же IP_3 рецепторов (2-APB, 50мкМ) полностью подавляет эти ответы

На данный момент известно, что лавинообразный процесс CICR может происходить при участии IP_3 рецепторов и/или рианодинных рецепторов, которые оба являются Ca^{2+} -зависимыми Ca^{2+} -каналами, функционирующими в эндо/саркоплазматическом ретикулуме [3, 5, 6]. Для выяснения вклада этих внутриклеточных Ca^{2+} -каналов в CICR, индуцированном скачкообразным повышением концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , нами использовались ингибитор рианодинных рецепторов (ryanodine) и антагонист IP_3 рецепторов (2-APB). В присутствии ингибитора рианодинных рецепторов исследуемые клетки продолжали генерировать полноценные Ca^{2+} ответы на импульсное высвобождение Ca^{2+} за счет фотолиза NP-EGTA, в то время как 2-APB обратимо подавлял эти ответы ($n = 7$) (рис. 6). Таким образом, в МСК механизм CICR основан преимущественно на положительной обратной связи, формируемой за счет стимуляции IP_3 рецепторов цитоплазматическим Ca^{2+} .

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-34-00365).

Список литературы / References:

1. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003, pp. 517-529
2. Clapham D.E. Calcium signaling. *Cell.*, 2007, vol. 131, pp. 1047-1058.
3. Dupont G., Combettes L., Leybaert L. Calcium dynamics: Spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *Int Rev Cytol.*, 2007, vol. 261, pp. 193-245.
4. Harteneck C., Gollasch M. Pharmacological Modulation of Diacylglycerol-Sensitive TRPC3/6/7 channels. *Curr Pharm Biotechnol.*, 2011, vol. 12, pp. 35-41.
5. Iino M. Spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, 2010, pp. 244-256.
6. Kawamoto E.M., Vivar C., Camandola S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol.*, 2012, vol. 3, p. 61.
7. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.*, 2014, vol. 1843, pp. 1899-1908.
8. Mustafa T., Walsh J., Grimaldi M., Eiden L.E. PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca^{2+} channels in PC12 cells. *Cell Signal.*, 2010, vol. 22, pp. 1420-1426.
9. Perkins W.J., Kost S., Danielson M. Prolonged NO treatment decreases α -adrenoreceptor agonist responsiveness in porcine pulmonary artery due to persistent soluble guanylyl cyclase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2009, vol. 296, pp. L666-L673.
10. Xu S.-Z., Zeng F., Boulay G., Grimm C., Harteneck C., Beech D.J. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol.*, 2005, vol. 145, pp. 405-414.

GENERATION MECHANISM OF Ca^{2+} -ANSWERS ON HUMAN ADENOSINE
MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Kochkina E.N., Cherkashin A.P., Kotova P.D.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia: e-mail: kate-kochkina@yandex.ru

Abstract. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are a heterogeneous population of proliferating undifferentiated cells that are capable of differentiating into cells of at least bone, cartilaginous and adipose lines. Despite significant progress in the study of MSC, the current understanding of their receptor and signal systems is very limited. In this paper, it is shown that adenosine stimulates Ca^{2+} signaling in MSC isolated from human adipose tissue. The threshold concentration of adenosine was determined, dose-dependences of response magnitude and lag-period were characterized. The data of the inhibitor analysis as well as insignificant influence of external Ca^{2+} on adenosine responses suggested that in the MSC, adenosine receptors are coupled by the phosphoinositide cascade mainly to Ca^{2+} release from Ca^{2+} store, while Ca^{2+} influx insignificantly contributes to Ca^{2+} signaling induced by adenosine.

Key words: mesenchymal stromal cells, adenosine receptors.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА SERS-ПОДЛОЖКАХ МЕТОДАМИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕИВАНИЯ

Мосунов А.А.¹, Елецкая А.А.¹, Бондаренко А.В.²

¹Севастопольский государственный университет

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

² Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

ул. П. Бровки, 6, г. Минск, 220013, Республика Беларусь

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. В работе описано исследование комплексообразования биологически активных веществ (антибиотика топотекана, акридинового красителя профлавина, аналога витамина В₂ (рибофлавина), алкалоида кофеина), относящихся к различным классам соединений с использованием рамановской спектроскопии. Данное исследование важно для объяснения механизмов модуляции биологической активности препаратов, при их использовании в режиме комплексной терапии. В работе описана одна из методик усиления сигнала комбинационного рассеяния, путем нанесения исследуемого вещества на пластину с наноматериалами благородных металлов. Также дано краткое описание технологии изготовления данных подложек. В статье описан порядок проведения эксперимента на 3D сканирующем лазерном рамановском микроскопе Confotec® NR500, а также дан краткий анализ некоторых из полученных спектров. Сделаны предположения о причинах некоторой неудачи экспериментальной части и намечены пути решения данной проблемы.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, SERS-подложка, комплексообразование.

В последние годы методы рамановской спектроскопии (спектроскопии комбинационного рассеяния) стали широко признанным исследовательским инструментом. Они нашли свое применение в биологии, медицине, фармацевтике, криминалистике, химии биополимеров и наноматериалов, биотехнологиях и многих других областях науки и практической деятельности человека. Процесс комплексообразования биологически активных веществ является одним из основных способов модуляции их биофизической активности *in vivo* и *in vitro*. На данный момент разработано огромное количество экспериментальных методик исследования данного процесса, а также построено множество математических моделей разного уровня сложности, для описания связывания макромолекул. Одним из сравнительно новых подходов является использование рамановской спектроскопии в комплексе со специальными наноматериалами (SERS-подложками), предназначенными для увеличения значения полезного сигнала в тысячи и даже миллионы раз (для некоторых систем).

Цель работы – исследовать методами рамановской спектроскопии комплексообразование биологически активных соединений: антибиотика топотекана, акридинового красителя профлавина, аналога витамина В₂ (рибофлавина), алкалоида кофеина.

Рамановская спектроскопия представляет собой молекулярную спектроскопию для наблюдения за неэластично рассеянным светом и позволяет идентифицировать вибрационные состояния (фононы) молекул.

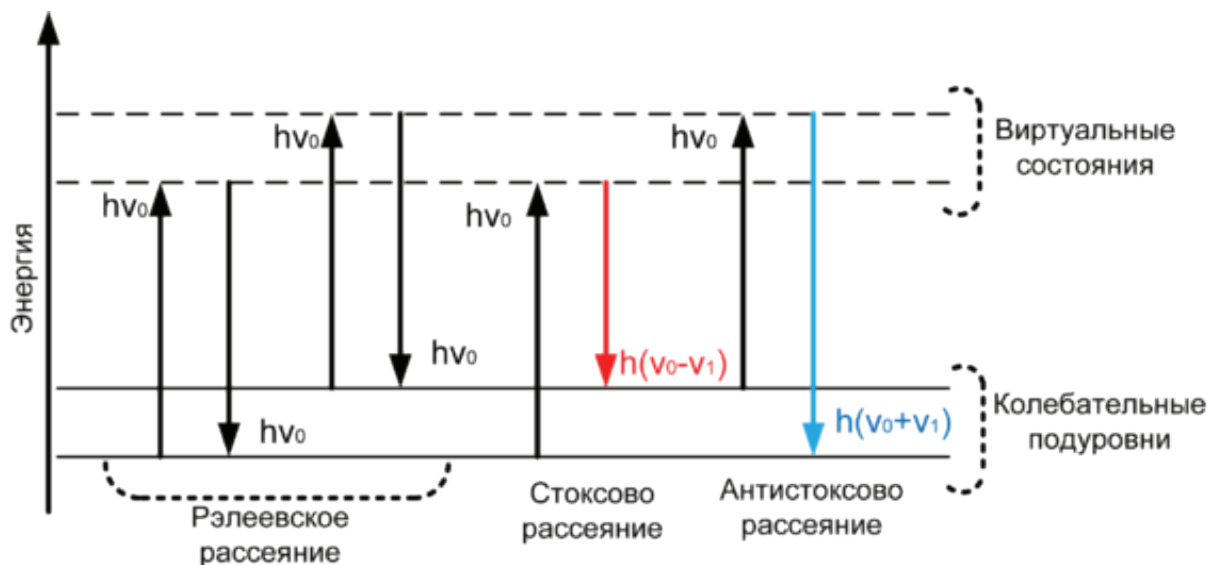


Рисунок 1. Диаграмма Яблонского, схема электронных переходов

Поэтому рамановская спектроскопия является бесценным аналитическим инструментом для молекулярного получения отпечатков пальцев и контроля изменений в молекулярной структуре связей (например, изменений состояний и нагрузок).

При воздействии на вещество электромагнитного излучения возможны различные электронные переходы, схематически представленные на диаграмме Яблонского (рис.1).

Стоксово рассеяние наблюдается при переходе молекулы с нижнего на верхний колебательный уровень в результате поглощения и рассеяния кванта света. Антистоксово рассеяние происходит при переходе молекулы с верхнего на нижний колебательный уровень. Интенсивность антистоксовых линий является очень низкой, т.к. вероятности перехода с верхних на нижние колебательные уровни малы, вследствие больших заселенностей нижних уровней [1]. Поэтому в практике рамановской спектроскопии используют стоксовы линии.

Самый эффективный способ добиться усиления сигнала рамановского рассеяния – поместить анализируемую молекулу вблизи наночастиц (НЧ) благородных металлов. При этом существует два подхода к реализации этого способа. Первый заключается в том, что металлическую НЧ располагают на острие иглы атомно-силового микроскопа и зондируют исследуемые молекулы, регистрируя с них сигнал рамановского рассеяния. В этом случае метод будет называться зондово-усиленная рамановская спектроскопия или TERS-спектроскопия (от англ. – tip enhanced Raman scattering). Во втором случае исследуемые молекулы помещают на поверхность НЧ металла и регистрируют рамановское рассеяние обычным способом. Этот метод называется поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия или SERS-спектроскопия (от англ. – surface enhanced Raman scattering). SERS-спектроскопия – самая удачная разновидность рамановской спектроскопии, которая одновременно позволяет получать максимальное усиление сигнала и наиболее удобна с точки зрения широкого применения на практике, поэтому именно о ней и пойдет речь в дальнейшем. Известно, что усиление сигнала при SERS-спектроскопии может происходить в результате переноса заряда между металлической НЧ и адсорбированной на ней молекулой (адсорбционно-химический механизм). При этом увеличение интенсивности рамановского сигнала достигает трех порядков. Однако больший вклад в усиление сигнала вносится благодаря возникновению в металлических НЧ плазмонных эффектов под воздействием внешнего электромагнитного излучения в результате коллективных колебаний свободных электронов. В случае поверхностно-ограниченных наноструктур, которыми являются НЧ, такие колебания приводят к периодическому изменению заряда на их поверхности. При совпадении частоты коллективных колебаний свободных электронов (квант таких колебаний называется плазмон) и частоты падающего света возникает поверхностный плазмонный резонанс, который приводит к многократному увеличению локального электромагнитного поля вблизи наноструктур. Таким образом НЧ металла выступают в качестве «наноантенн», благодаря которым усиление может достигать 14 порядков.

В целом механизмы взаимного влияния антиопухолевых препаратов на медико-биологическую активность друг друга могут иметь как ковалентный, так и нековалентный характер, проявляясь в специфической и неспецифической форме. Однако на сегодняшний день представления о механизмах совместного влияния различных биологически активных соединений при их одновременном использовании остаются достаточно поверхностными [2, 3]. Это связано с тем, что, во-первых, молекулярные мишени их действия в клетке могут быть различными и не всегда однозначно определенными, а во-вторых, в настоящее время до конца не выяснен даже механизм действия каждого из препаратов в отдельности.

Для проведения исследований были приготовлены растворы всех исследуемых веществ в одинаковой концентрации – 5 мМ. Для исследования комплексообразования равные объемы растворов каждого препарата были смешаны в пробирке, после чего исходные растворы были разбавлены в два раза, для обеспечения равной концентрации препаратов в комплексе и чистом виде. Растворы смешивали в следующих комбинациях: профлавин-кофеин, профлавин-топотекан, профлавин-флавиномонуклеотид. Приготовленные таким образом растворы наносились на SERS-подложки на основе посеребренного пористого кремния, которые были изготовлены следующим образом.

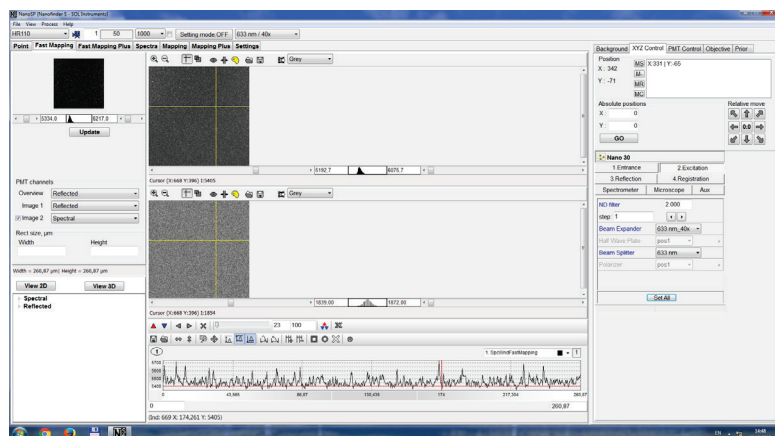


Рисунок 2. Пример поиска «горячей» точки на SERS-подложке

Для формирования пористого кремния были использованы пластины сильно легированного кремния монокристаллического электронного типа проводимости и кристаллографической ориентацией поверхности (100). Пористый кремний изготавливался путем электрохимического анодного травления (анодирования) образца кремниевой пластины размером 3×3 см во фторопластовой ячейке. Непосредственно перед проведением процесса анодирования образец кремниевой пластины подвергался обработке в растворе фтористоводородной кислоты (5 %) в течение 30-60 с для удаления с его поверхности пленки естественного оксида кремния SiO_2 . Плотность тока анодирования поддерживалась на уровне 100 mA/cm^2 , длительность анодирования составляла 85 с. В качестве раствора для анодирования был использован раствор, состоящий из HF (45 %), дистиллированной воды и изопропилового спирта, которые были смешаны в объемном соотношении 1:3:1. После анодирования раствор удалялся из ячейки и образец последовательно промывался в дистиллированной воде и изопропиловом спирте в течение 1-2 мин. Полученный пористый кремний представлял собой упорядоченный массив каналов пор диаметром 70-100 нм, перпендикулярных поверхности образца. Глубина пор составляла 5 мкм, а пористость полученного материала варьировалась в пределах 70-75 %. Необходимо отметить, что пористый кремний в данной работе использовался в качестве формообразующей подложки для создания плазмонных частиц серебра. Для этого было использовано иммерсионное осаждение. После промывки пористого кремния в ячейку добавлялся водно-спиртовой раствор 3 mM AgNO_3 . Время выдержки образцов в растворе составляло 70 мин.

Регистрация SERS-спектров проводилась на 3D сканирующем лазерном рамановском микроскопе Confotec® NR500 лаборатории молекулярной и клеточной биофизики Севастопольского государственного университета. Изучение экспериментальных образцов производилось с использованием лазера с длиной волны $\lambda = 633 \text{ nm}$. Мощность лазера соответствовала 10 мВт. Диаметр пятна лазера составлял около 1030 нм. В процессе исследования были получены микрофотографии всех образцов на инвертированном оптическом микроскопе Nikon Ti-S с использованием объектива Canon UPlan FLN 40x, $\text{NA} = 0,75$ и цветной CCD камеры для микроскопа с высоким разрешением (2048×1536 , $1/1,8''$, 12 бит). Кроме того для каждой SERS-подложки с нанесенным на нее анализом были построены рамановские изображения для быстрого поиска так называемых «горячих» точек. Эти точки появляются в местах, где расстояние между наночастицами серебра составляет 2-10 нм, в результате чего происходит наложение электромагнитных полей и обеспечивается наибольшее усиление рамановского сигнала. Пример такого сканирования приведен на рисунке 2.

Помимо нахождения «горячих» точек для получения качественного спектра необходимо выбрать оптимальный режим регистрации спектра. Это можно сделать путем варьирования следующего набора параметров: оптимальное количество сканов, продолжительность каждого скана, интервал между сканированиями, режим накопления сигнала, а также степень ослабления мощности лазерного излучения, возбуждающего образец, чтобы избежать его выгорания в процессе регистрации. Наилучшим образом все параметры удалось подобрать для антибиотика топотекана, в результате чего был получен спектр, приведенный на рисунке 3.

Данный спектр практически полностью соответствует спектру из литературных данных [4], приведенному на рисунке 4.

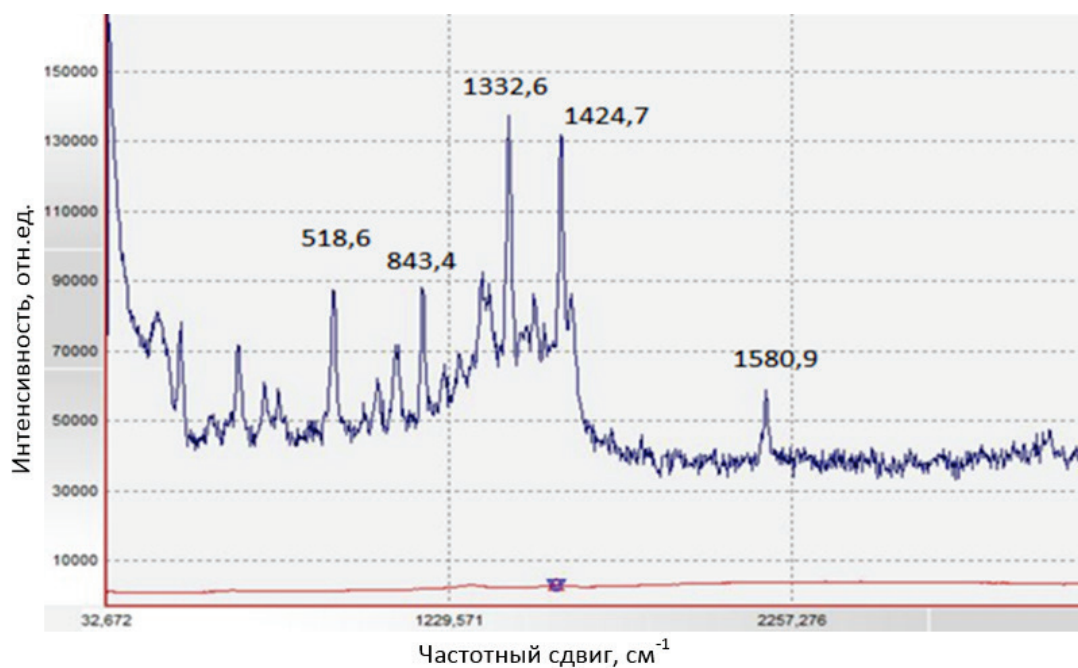


Рисунок 3. SERS-спектр антибиотика топотекана

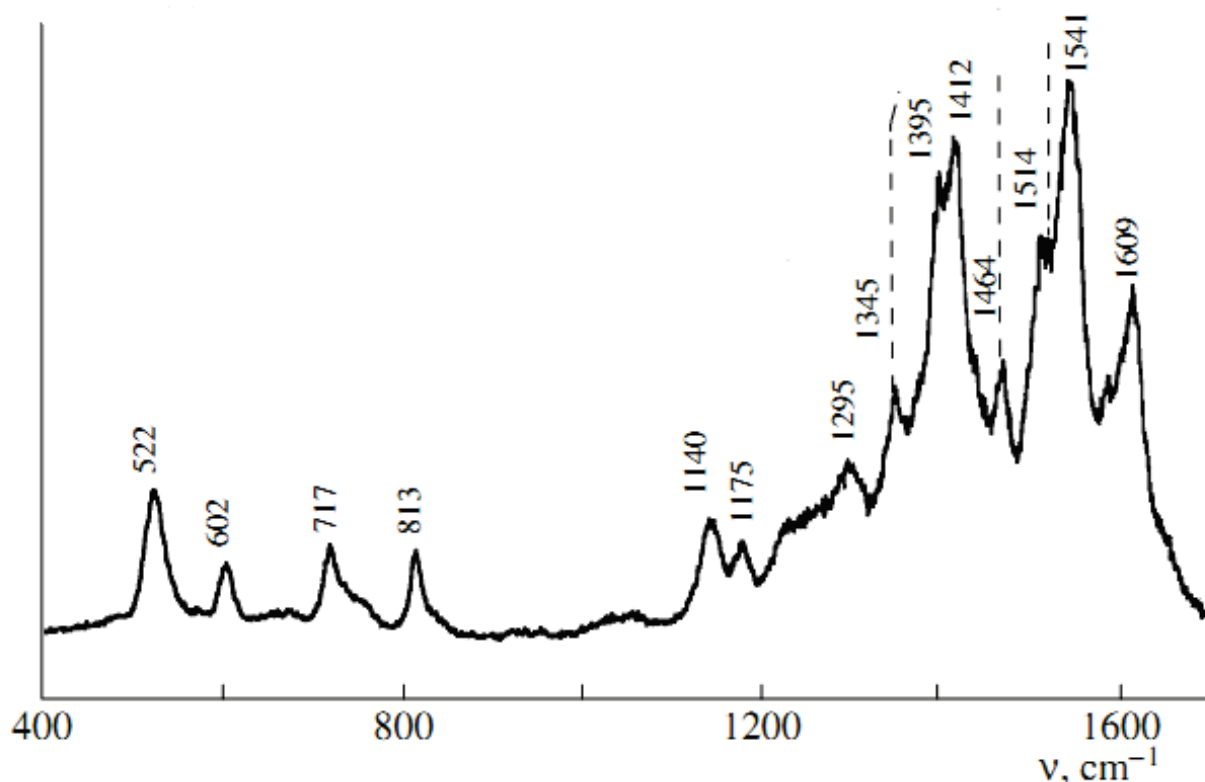


Рисунок 4. SERS-спектр водного раствора топотекана из работы [6] (концентрация раствора 10^{-4} М, длина волны возбуждающего лазера 514,5 нм)

В данном комплексе видно заметное ослабление интенсивности сигнала антибиотика в чистом виде (кривая 1) и в комплексе (кривая 2). Невысокое качество сигнала комплекса, наравне с низким качеством сигнала профлавина не позволяет проводить дальнейший анализ данного комплекса. Если судить по спектру 2, то на нем видны полосы аморфного углерода около 1376 и 1556 cm^{-1} , которые свидетельствуют о выгорании молекул аналита или о том, что на подложках адсорбировалось в процессе хранения достаточно большое количество органических молекул из окружающей среды. Более низкий сигнал может свидетельствовать о том, что в случае со спектром 1 сигнал регистрировался из «горячей» точки при оптимальных режимах в то время, как спектр 2 был получен в области, которая не характеризуется высокой SERS-активностью. Модулированный сигнал на спектре 3 вероятно обусловлен тем, что в области его регистрации не находились наночастицы серебра, так как в их присутствии должен гаситься фон люминесценции и присутствовать полосы, соответствующие хотя бы продуктам горения аналита. В то же время периодическая вариация сигнала характерна для спектров, регистрируемых с пористого кремния.

В качестве примера приведем сравнение трех спектров: профлавина, топотекана и их комплекса (рис. 5).

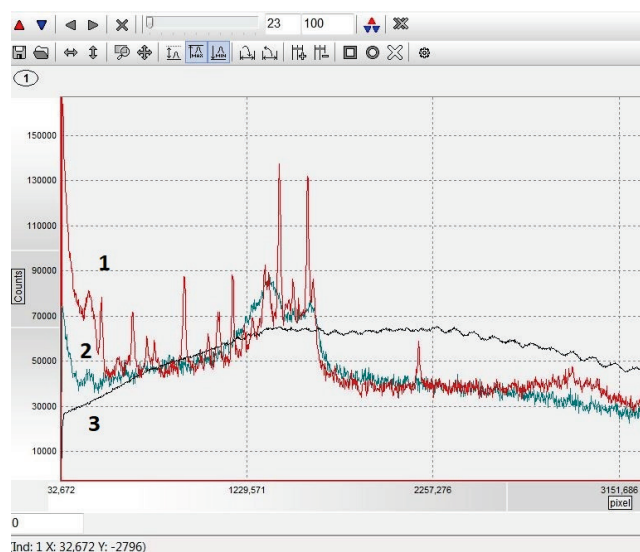


Рисунок 5. Сравнение спектров антибиотика топотекана (кривая 1), акридинового красителя профлавина (кривая 2) и их смеси (кривая 3)

В настоящий момент продолжается работа по подбору оптимальных режимов для получения качественных спектров всех анализируемых химических соединений и их комплексов. Также планируется провести повторные измерения с предварительной химической очисткой подложек.

Список литературы / References:

1. Сушинский М.М. *Комбинационное рассеяние света и строение вещества*. М.: Наука, 1981, 183 с. [Sushinsky M.M. *Combination scattering of light and the structure of matter*. M.: Nauka, 1981, 183 p. (In Russ.)]
2. Евстигнеев М.П. *Межмолекулярные взаимодействия биологически активных ароматических веществ и ДНК в водном растворе*. дис. ...докт. физ.-мат. наук: 03.00.02, Севастополь, 2006, 341 с. [Evstigneev M.P. *Intermolecular interactions of biologically active aromatic substances and DNA in aqueous solution*. Diss. ... doctor phys.-math. sci.: 03.00.02, Sevastopol, 2006, 341 p. (In Russ.)]
3. Эрнандес Сантьяго А.А. *Механизмы взаимодействия и конкурентного связывания с ДНК ароматических антиопухолевых препаратов*. Дис. кандидата физ.-мат. наук: 03.00.02, Севастополь, 2006, 133 с. [Ernandes Sant'yago A.A. *Mechanisms of interaction and competitive binding with DNA of aromatic antitumor drugs*. Diss. ... candidate phys.-math. sci.: 03.00.02, Sevastopol, 2006, 133 p. (In Russ.)]
4. Mochalov K.E., Strel'tsov S.A., Ermishov M.A., Grokhovskiy S.L., Zhuze A.L., Ustinova O.A., Sukhanova A.V., Nabiev I.R., V.A. Oleenikov Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy of Topotecan-DNA Complexes: Binding to DNA Induces Topotecan Dimerization. *Optics and Spectroscopy*, 2002, vol. 93, no. 3, pp. 416-423.

INVESTIGATION OF THE COMPLEX FORMATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON SERS-SUBSTRATES BY RAMAN METHODS

Mosunov A.A.¹, Eletskaia A.A.¹, Bondarenko A.V.²

¹Sevastopol State University

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

²Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics

P. Brovki str., 6, Minsk, 220013, Belarus

Abstract. In the article described investigation of complexation of biologically active agents (antibiotic topotecan, acridine dye proflavine, an analogue of vitamin B2 (riboflavin), the alkaloid caffeine), belonging to different classes of compounds using Raman spectroscopy. This study is important for explaining the mechanisms of modulation of biological activity of drugs, when they are used in the mode of complex therapy. The paper describes one technique for amplification of Raman signal, by applying a test substance to the plate with noble metals nanomaterials. A brief description of the technology for manufacturing these plates is also given. This article describes how to conduct an experiment on 3D laser scanning Raman microscope Confotec® NR500, as well as a brief analysis of some of the obtained spectra. The assumptions about the reasons for some failure of the experimental part are made and the ways of solving this problem are outlined.

Key words: Raman-spectroscopy, SERS-substrate, complexation.

ВЛИЯНИЕ ФОСФАТА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА EB1 С МИКРОТРУБОЧКОЙ

Саранцева М.Ю., Бояхчан А.В., Гудимчук Н.Б.

Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, корп. 2, Москва, 119991, РФ; e-mail: msarantseva@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия белка из семейства EB (End Binding protein) с микротрубочками (MT) *in vitro*. Согласно одной из гипотез, он имеет повышенное сродство к комплексу «тубулин-ГДФ-фосфат», откуда следует, что повышение концентрации неорганического фосфата в растворе должно увеличить аффинность EB1 к MT. Чтобы проверить данное предположение, проведены эксперименты по наблюдению кинетики накопления рекомбинантного белка EB1-eGFP на стабильных MT с помощью TIRF микроскопии (Total Internal Reflection Fluorescence) в присутствии таксола, подавляющего деполимеризацию MT. Так же произведены измерения динамических параметров MT и размера области связывания EB1-eGFP с динамическими MT. Сравнивая эти данные, полученные при разной концентрации дигидрофосфата натрия в растворе, можно делать выводы о влиянии фосфата на аффинность EB1 к MT, а значит, и о механизме их взаимодействия. Результаты исследования свидетельствуют против гипотезы о том, что EB1 связывается с ГДФ-фосфат-тубулином

Ключевые слова: микротрубочки, ГТФ-шапочка, EB1, MAPs.

ВВЕДЕНИЕ

Микротрубочки (MT) – это динамические компоненты цитоскелета, состоящие из белка тубулина, который при полимеризации присоединяется к концу MT в комплексе с гуанозинтрифосфатом (ГТФ). После присоединения тубулина молекула ГТФ гидролизуется до гуанозиндифосфата (ГДФ), высвобождая неорганический фосфат. Таким образом, лишь на растущем конце MT присутствуют тубулины, связанные с ГТФ, – так называемая ГТФ-шапочка. Считается, что ГТФ-шапочка защищает микротрубочку от деполимеризации. В живой клетке растущий конец MT предоставляет сайт связывания для исследуемого нами белка EB1 (Ending Bind protein). Этот белок регулирует полимеризацию MT в клетке и способствует связыванию других белков, которые не могут автономно распознавать конец MT [1].

На сегодняшний день не известно, как именно белок EB1 способен «узнавать» конец MT. Согласно одной из гипотез, он имеет повышенное сродство к ГТФ-шапочке. По другой гипотезе белок EB1 распознает промежуточную фазу механохимического цикла, когда гидролиз ГТФ уже произошел, но фосфат еще находится в кармане тубулина (рис. 1) [2]. В пользу последней гипотезы говорят данные о том, что максимум интенсивности флуоресценции меченого EB1, в отличие от других концевых белков, находится на расстоянии порядка сотен нм от плюс-конца [3]. Более того, показано, что EB1 лучше связывается с тубулином в комплексе с негидролизуемым аналогом ГТФ (GTP γ S), который, вероятно, структурно ближе к ГДФ-фосфату, чем к ГТФ [4, 5]. Если гипотеза о распознавании белком EB1 комплекса «тубулин-ГДФ-фосфат» верна, увеличение концентрации неорганического фосфата должно увеличить размера сайта связывания EB1 на MT и оказать влияние на динамические свойства MT. Задача исследования – проверить данное предположение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белка EB1-eGFP. Стандартными методами генной инженерии было проведено клонирование гена белка EB1. Плазмидой PET28a_h_EB1_eGFP трансформировали штамм Rosetta E.coli методом теплового шока. После инкубации клетки высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим хлорамфеникол (к нему устойчив штамм Rosetta) и канамицин (к нему устойчива плаزمид). Далее отобранную колонию выращивали в течение 12-16 часов при 37 °C при перемешивании. Оценку эффективности экспрессии проводили после разделения белков клеточного лизата в 10 % ПААГ по Лэммли и окрашивания геля Кумасси бриллиантовым синим R-250. Выделение рекомбинантного белка проводилось методом афинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой.



Рисунок 1. Схематическая иллюстрация модели ГДФ-фосфатной шапки, потенциально узнаваемой EB-белками

Наблюдение за флуоресценцией EB1-eGFP на МТ. Герметичные проточные камеры промывались с помощью перистальтического насоса. Камеры содержали затравки МТ, иммобилизованные на покровном стекле с помощью DiG-антител, и раствор белков EB1 и тубулина в буфере: BRB80 с 5 мг/мл БСА, 6 мг/мл глюкозы, 68 мкг/мл каталазы, 0,1 мг/мл глюкозооксидазы, 0,5 % β -меркаптоэтанола, 1 мМ ГТФ, 2 мМ дитиотреитола. Концентрации белков EB1 – 200 нМ, тубулина – 10,72 мкМ. Концентрация фосфата варьировалась. В экспериментах со стабильными МТ в буфере и затравках присутствовал таксол в концентрации 10 мкМ. Для наблюдения микротрубочек проточная камера помещалась под объектив инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E. Флуоресценция возбуждалась с помощью модуля Nikon LU-4A, содержащего лазер Coherent Diode с длиной волны 488 нм и мощностью 100 мВт. Температура объектива поддерживалась 32 °С.

Обработка результатов. При съёмке динамики микротрубочек в режиме TIRF ($\lambda = 488$ нм) наблюдается зелёная флуоресценция, присущая белку EB1-eGFP, который присоединяется к растущему концу и отсоединяется от тела микротрубочки непрерывно (рис. 2А). Таким образом рост микротрубочки сопровождается движением области наибольшего скопления EB1-eGFP, так называемой кометы EB1, имеющей экспоненциально убывающую яркость вдоль тела микротрубочки. В программе ImageJ стэк из кадров поля с интервалом 10 секунд используется для построения кимограмм – свёрток по времени для каждой микротрубочки (рис. 2В).

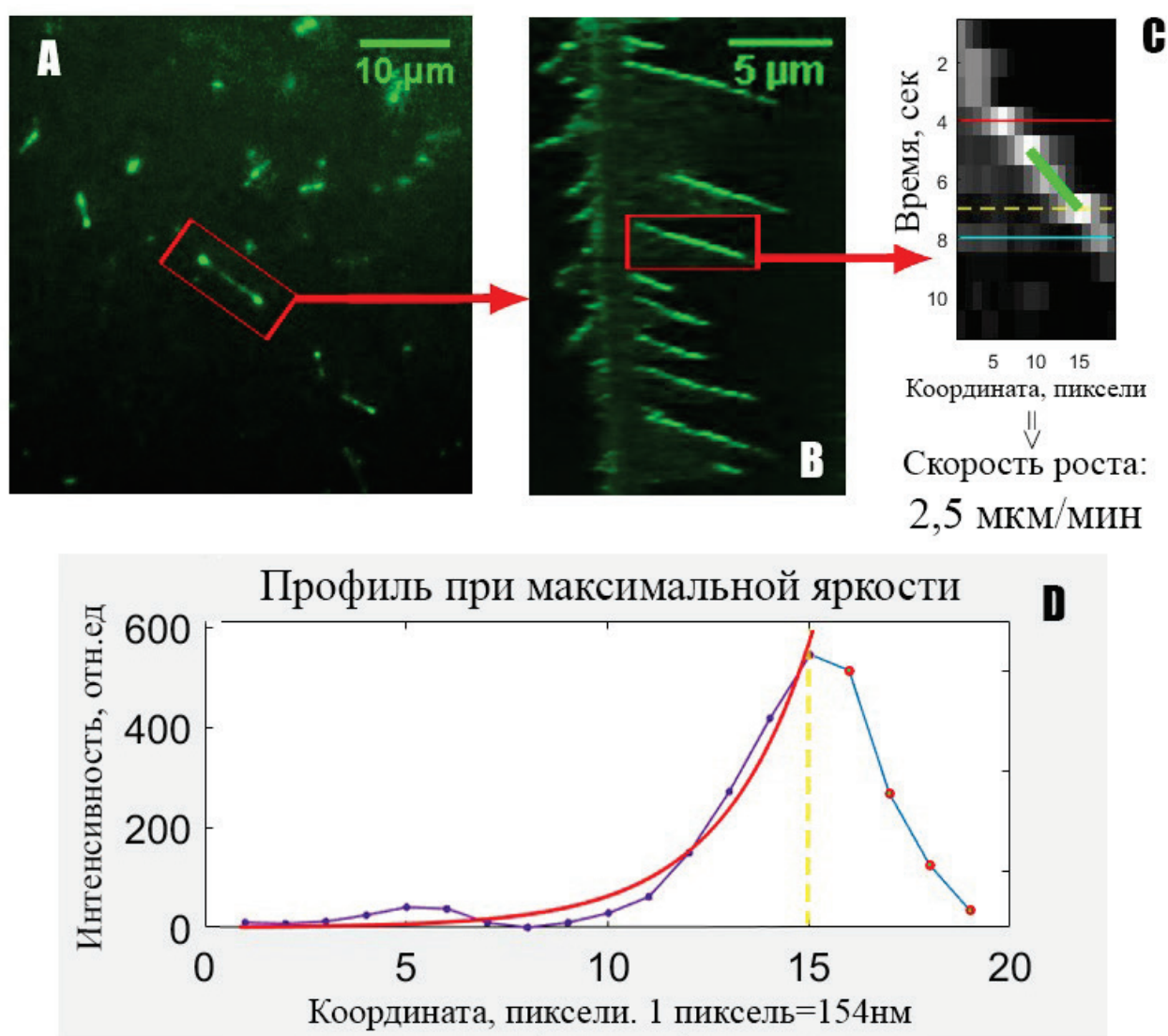


Рисунок 2. А. Фрагмент поля при съёмке динамики микротрубочек в режиме TIRF ($\lambda = 488$ нм). В. Кимограмма, построенная для выделенной микротрубочки с помощью ImageJ. С. Анализ одного акта катастрофы в Matlab. Скорость роста определена как котангенс угла наклона зелёной линии. Пунктирной линией обозначен момент максимальной суммарной интенсивности. D. Профиль интенсивности флуоресценции кометы в момент максимальной яркости. Красными точками обозначены реперные точки для аппроксимации пика функцией Гаусса, пунктирной жёлтой линией – положение максимума данной функции. Красной линией обозначен экспоненциальный фиттинг убывающего хвоста кометы

Для дальнейшей обработки в Matlab фрагмент кимограммы, соответствующий одному акту роста и катастрофы, преобразуется в численный массив яркости каждого пикселя (рис. 2С). После подсчета суммарной яркости по всем кадрам алгоритм автоматически распознаёт кометы EB1 по превышению порога в 40 % от максимальной суммарной яркости на протяжении семи последовательных кадров. Таким образом фиксируется временная область существования комет. Для аппроксимации профиля функцией Гаусса находим на переднем фронте кометы точку с интенсивностью, равной среднему арифметическому между максимальной и минимальной интенсивностью, далее фиксируется эта точка и от нее отступаем расстояние в 10 пикселей, чтобы захватить максимум профиля (сам максимум не подходит в качестве опорной точки из-за большого шума). Эта точка и ноль являются опорными для аппроксимации экспонентой (1) убывающего хвоста интенсивности в сторону тела микротрубочки (рис. 2D):

$$F(x) = A_0 e^{-x/l}. \quad (1)$$

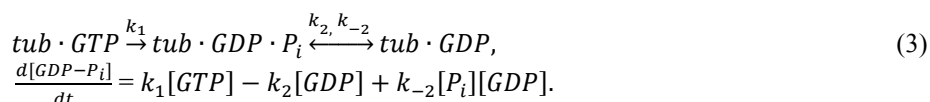
Программа выдаёт значение x показателя экспоненты. Длина в нм, на которой интенсивность свечения падает в e -раз, принимается за размер кометы EB1 и выражается через полученный показатель экспоненты x :

$$l_e = \frac{1}{x} \cdot 0,154, \quad (2)$$

где 0,154 – коэффициент перевода пикселей в нанометры.

В экспериментах со стабильными микротрубочками измерялась средняя интенсивность флуоресценции EB1-eGFP на единицу длины МТ в состоянии равновесия. Алгоритм обработки в ImageJ используется в соответствии со статьёй [7].

Выбор состава буферов. С одной стороны, в соответствии с уравнениями реакции:



Увеличение концентрации фосфата должно вести к смещению равновесия реакции в сторону комплекса «тубулин-ГДФ-фосфат», а значит, мы должны стремиться взять как можно большую концентрацию фосфата.

С другой стороны, однако, увеличение концентрации соли увеличивает ионную силу раствора, приводя к экранированию заряженных аминокислот и уменьшению эффективности взаимодействия EB1 и микротрубочки, сказываясь, в конечном итоге, на возможности достоверно детектировать связывание. Так же при добавлении солей не должен изменяться pH экспериментальной смеси, который поддерживается постоянным в буфере BRB-80 на значении pH 6,9. Эти условия оптимальны для полимеризации тубулина, поэтому отклонения недопустимы. Для компенсации влияния фосфата добавлялась щелочь КОН до требуемого значения pH.

Ионные силы растворов дигидрофосфата натрия и сульфата натрия (контроль) должны быть равны. Это позволит убрать из рассмотрения влияние ионной силы на результаты, и интерпретировать их лишь как следствие добавление фосфата.

Сульфат натрия ($c[Na_2SO_4] = c_s$) в водном растворе диссоциирует полностью как сильный электролит:

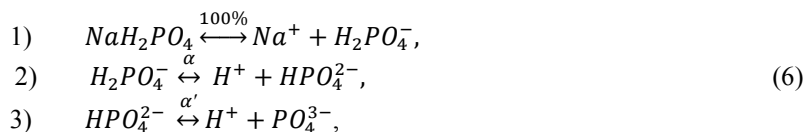


Ионная сила раствора сульфата может быть получена из формулы:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 = 3 \cdot c_s, \quad (5)$$

где c_i – молярные концентрации отдельных ионов; z_i – заряды ионов.

Дигидрофосфат натрия ($c[NaH_2PO_4] = c_p$) в растворе распадается на ионы ступенчато:



Так как диссоциация многоосновной кислоты наиболее активна по первой ступени, в убывающей степени – по следующим ступеням (степень диссоциации $\alpha \gg \alpha'$), в дальнейших расчётах рассматриваются только первые две ступени диссоциации. Ионная сила раствора:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 = \frac{1}{2} [Na^+] + (1 - \alpha)[H_2PO_4^-] + \alpha[HPO_4^{2-}] = \frac{1}{2} c_p (2 + 3\alpha). \quad (7)$$

Таблица 1. Коэффициенты диффузии и заряды ионов

Ион	z	$D_i \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$
Na^+	1	1,33
H_2PO_4^-	1	0,846
HPO_4^{2-}	2	0,69
SO_4^{2-}	2	1,07
K^+	1	1,96

Из-за отсутствия в литературе нужных значений констант диссоциации, была проведена экспериментальная оценка содержания ионов в растворах при постоянном pH 6,9, указывающем на степень диссоциации:

$$\text{pH} = \lg[H^+] = \lg(\alpha c_p). \quad (8)$$

Электрическая проводимость – непосредственно измеряемая величина с помощью кондуктометра – линейно зависит от концентраций ионов. В приближении отсутствия ионного взаимодействия, которое справедливо для сильно разбавленных растворов, получены теоретические значения для удельной электрической проводимости растворов с помощью уравнения Нернста-Эйнштейна:

$$EC = \frac{F^2}{RT} \sum_i D_i z_i^2 c_i, \quad (9)$$

где F – постоянная Фарадея; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура в Кельвинах; D_i – коэффициент диффузии i -го иона, значения указаны в таблице 1.

При малых концентрациях солей в приближении сильно разбавленных растворов удельная электропроводность зависит линейно от концентрации. (рис. 3). Это позволило установить соответствие между концентрациями солей и ионной силой:

$$I(c_p) = I\left(c_s = \frac{2}{3} c_p\right). \quad (10)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из таблицы 2 видно, что добавление NaH_2PO_4 в экспериментальный раствор не оказывает эффекта на частоту катастроф микротрубочек. Это косвенно свидетельствует о том, что ЕВ не связывается с тубулин-ГДФ-фосфатом, потому что иначе бы ожидался эффект стабилизации МТ из-за встраивания в тубулин фосфата, который удлинял бы стабилизирующую структуру на конце МТ, предотвращая деполимеризацию.

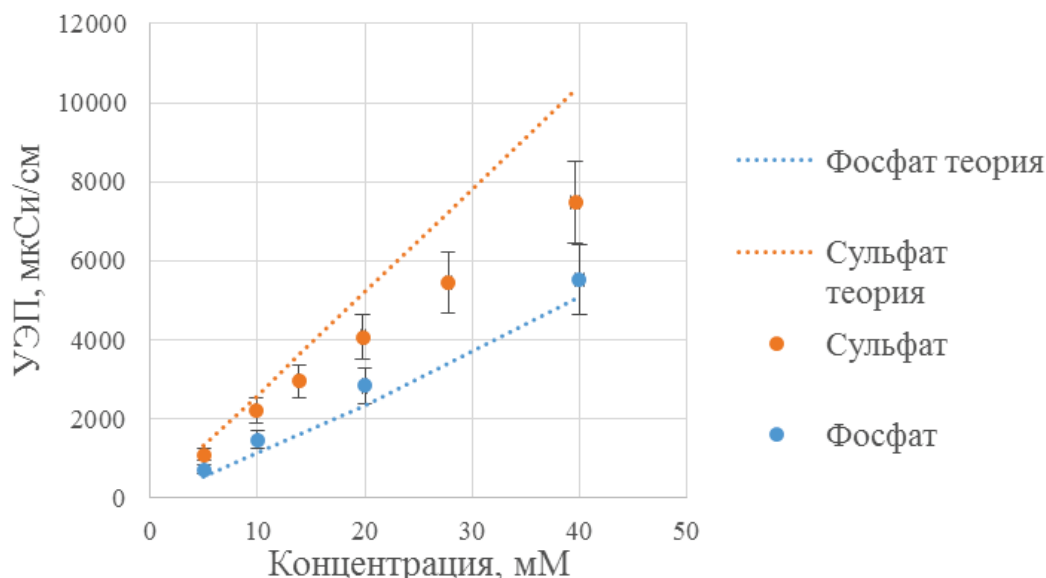


Рисунок 3. Зависимость удельной электропроводности от концентрации солей

Таблица 2. Параметры динамики МТ. в присутствии NaH_2PO_4 / Na_2SO_4 , $C(\text{тубулина}) = 10,72 \mu\text{M}$

	Ионная сила, мМ	Концентрация соли, мМ	Кол-во микро-трубочек	Скорость роста МТ, мкм/мин	Длина МТ, мкм	Частота катастроф, шт/30мин
Эксперимент	C (NaH_2PO_4)					
	31,9	16,78	69	$1,26 \pm 0,23$	$6,88 \pm 4,24$	$3,41 \pm 1,46$
	66,2	33,57	33	$1,35 \pm 0,23$	$5,52 \pm 3,18$	$4,42 \pm 1,56$
Контроль	C (Na_2SO_4)					
	32,2	11,16	26	$1,29 \pm 0,23$	$6,07 \pm 4,10$	$3,92 \pm 1,47$
	63,1	22,31	33	$1,52 \pm 0,28$	$5,23 \pm 3,23$	$5,11 \pm 1,75$

Далее логично проверить непосредственно, увеличивается ли область связывания EB1 (комета) на МТ при повышении концентрации фосфата. Обработка порядка сотни комет для каждой экспериментальной точки не выявила явной зависимости размера кометы EB1 от ионной силы раствора, а также значимого различия с контрольными точками. Для сравнения двух независимых выборок применён t-критерий Стьюдента.

Однако метод анализа размера комет, указанный выше, имеет свои недостатки: при определении показателя экспоненты не учитывается возможное накопление EB1 не только на плюс конце МТ, но и на самом теле микротрубочки. Действительно, фосфат может встраиваться вдоль всего тела микротрубочки, что не позволило бы задетектировать увеличение размера кометы. Отсюда возникла необходимость в дополнительной постановке эксперимента со стабилизированными таксом микротрубочками. В этом случае суммарная интенсивность флуоресценции EB1 на МТ соответствует максимальной возможной при доступном количестве сайтов связывания. Предварительные результаты серии экспериментов представлены в таблице 3 (указана SEM). Данные не отображают значимого увеличения числа сайтов связывания EB1 при добавлении фосфата в раствор.

Несмотря на литературные данные, косвенно свидетельствующие в пользу узнавания EB1 ГДФ-фосфатного состояния тубулина, проведенные в рамках данной исследовательской работы опыты не позволяют выявить достоверно предпочтительное связывание EB с ГДФ-фосфатом на микротрубочке. Это говорит в пользу господствующей гипотезы, что EB связывается все же с ГТФ-тубулином. Полученные результаты позволяют лучше понять механизм связывания EB1 с МТ а так же структуру плюс-конца МТ.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 16-34-60113 и 18-34-00944

Таблица 3. Средняя интенсивность флуоресценции EB1-eGFP на единицу длины МТ, отн.ед.

	20 мМ	60 мМ
Эксперимент: NaH_2PO_4	485 ± 3	457 ± 2
Контроль: Na_2SO_4	459 ± 2	400 ± 2

Список литературы / References:

1. Komarova Y. [et al.] Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J. Cell Biol.*, 2009, vol. 184, pp. 691-706.
2. Maurer S.P., Fourniol F.J., Bohner G., Moores C.A., Surrey T. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell*, 2012, vol. 149(2), pp. 371-382.
3. Maurer S.P., Cade N.I., Bohner G., Gustafsson N., Boutant E. Surrey T. EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Current Biology: CB*, 2014, 24(4), pp. 372-384.
4. Maurer S.P., Bieling P., Cope J., Hoenger A., Surrey T. GTPγS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108(10), pp. 3988-3993.
5. Zhang R., Alushin G.M., Brown A., Nogales E. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell*, 2015, vol. 162(4), pp. 849-859.

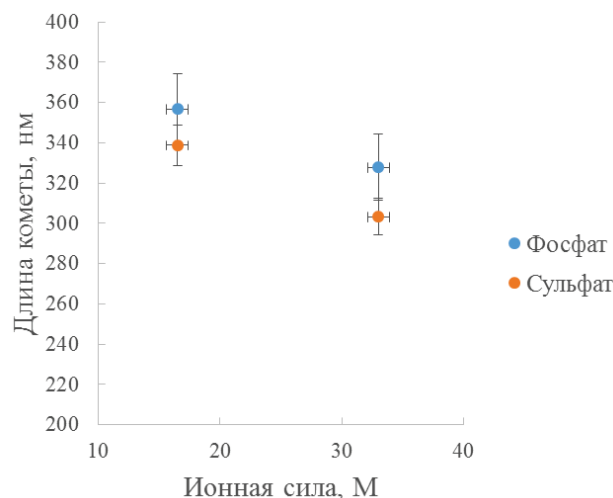


Рисунок 4. Зависимость длины кометы EB1-eGFP от ионной силы раствора

6. Zaytsev A.V., Mickb J.E., Maslennikov E., Nikashina B., DeLucab J.G., Grishchuk E.L. Multisite phosphorylation of the NDC 80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity. *Molecular Biology of the Cell*, 2015, vol. 26, pp. 1829-44.

EFFECTS OF PHOSPHATE ON PROTEIN EB1 INTERACTION WITH MICROTUBULE

Sarantseva M.Y., Boyakhchyan A.V., Gudimchuk N.B.

M.V. Lomonosov Moscow State University

Leninskiye Gory str., 1-2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: msarantseva@mail.ru

Abstract. This paper is devoted to investigation of the interaction of a protein from the EB family (End Binding protein) with microtubules (MT) *in vitro*. According to one of the hypotheses, it has an enhanced affinity for the «tubulin-GDP-phosphate» complex, suggesting that the addition of inorganic phosphate to solution should increase the affinity of EB1 to MT. To test this assumption, we conducted experiments to observe the kinetics of accumulation of recombinant EB1-eGFP protein on stable MTs using TIRF microscopy (Total Internal Reflection Fluorescence) in the presence of taxol, which suppresses the depolymerization of MT. Moreover, the dynamic MT parameters and the size of the binding region of EB1-eGFP with dynamic MTs were measured. Comparing these data obtained at different concentrations of sodium dihydrogen phosphate in solution, one can draw conclusions about the effect of phosphate on the affinity of EB1 to MT, and therefore on the mechanism of their interaction. The results of this study evidence against the hypothesis that EB1 binds to GDP-phosphate-tubulin

Key words: microtubules, GTP-cap, EB1, MAPs.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ПОТЕКСВИРУСОВ

Богачева Е.Н.¹, Долгов А.А.¹, Ксенофонтов А.Л.²¹Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, Москва, 119991, РФ: e-mail: bogen_chph@mail.ru

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

ул. Ленинские горы, 1, 119992, Москва, РФ: e-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Метод тритиевой планиграфии нашел применение к решению широкого круга задач современной биофизики, структурной химии, молекулярной и физико-химической биологии. Он основан на неселективном замещении водорода в углеводородных фрагментах молекул на его радиоактивный изотоп - тритий. Данные, полученные этим методом, в сочетании с разработанным нами имитационным алгоритмом тритиевой бомбардировки используются для получения информации о пространственной организации белков и их комплексов. На примере потексвируса картофеля X показана методика определения ориентации субъединиц в вирусе относительно оси спирали и их укладки при известной структуре субъединицы с учетом пространственных ограничений и экспериментальных данных тритиевой планиграфии. Это позволяет детализировать четвертичную структуру вируса и существенно сократить выбор возможных ориентаций субъединиц в вирионе.

Ключевые слова: структура потексвирусов, X-вирус картофеля, тритиевая планиграфия.

Прямые данные о структуре вирионов гибких нитевидных вирусов растений или их белков оболочки в свободном состоянии в высоком разрешении отсутствовали до недавнего времени. В связи с этим, гибкие спиральные вирусы растений изучали структурными методами с более низким разрешением, такими как электронная микроскопия, тритиевая планиграфия и различные оптические методы [1-3]. Трудности в изучении структуры гибких спиральных вирусов растений методами высокого разрешения (рентгеноструктурный анализ, криоэлектронная микроскопия) связаны прежде всего с лабильностью структуры этих вирусов, обусловленной содержанием в составе их белковой оболочки значительной доли неупорядоченных элементов. Только в 2012 г. удалось получить с помощью рентгеноструктурного анализа структуру белковой оболочки потексвируса мозаики папайи в высоком разрешении, а немного позднее получены структуры еще двух – вируса мозаики бамбука и вируса мозаики пепино [4-6]. Белковая оболочка этих потексвирусов состоит из семи альфа-спиралей, расположенных в довольно сложной топологии. Все они характеризуются межсубъединичным контактом на внешней поверхности вириона между N-концевым участком одной молекулы белковой оболочки и гидрофобным карманом коровой части другой белковой субъединицы, а также они формируют сложную сеть гидрофобных контактов на внутренней поверхности вириона, образованных C-концевыми участками белка.

Цель работы – создание метода определения ориентации субъединиц в вирионе, их укладки в спираль с учетом пространственных ограничений и установления зон контакта между субъединицами. Полученные варианты укладки сопоставлены с экспериментальными данными метода тритиевой планиграфии, позволяющего изучать поверхностный слой объекта с точностью до нескольких Å².

Согласно работе Стаббса и соавт. [2] по криоэлектронной микроскопии вириона X-вируса картофеля (ХВК) с разрешением 14 Å, в вирионе около 1300 идентичных субъединиц белковой оболочки, расположенных в спирали с диаметром 130 Å и шагом 35 Å, и вирусная РНК, расположенная внутри витков спирали. Каждый виток спирали состоит из 8,9 субъединиц, с каждой белковой субъединицей связаны пять нуклеотидов. РНК расположена на 33-35 Å от оси вириона. Первичная структура белка ХВК содержит 236 аминокислот и имеет значительную гомологию корового фрагмента с другими представителями рода потексвирусов, что и позволило предположить высокую гомологию их пространственных структур.

Метод тритиевой планиграфии нашел применение при решении широкого круга задач современной биофизики, структурной химии, молекулярной и физико-химической биологии. Он основан на неселективном замещении водорода в углеводородных фрагментах молекул на его радиоактивный изотоп - тритий. Малые размеры атома трития (0,9 Å), используемого в качестве нанозонда, позволяют обнаружить участки, локализованные в поверхностном слое макромолекулы. Получаемые с помощью этого метода данные о стерической доступности компонентов системы (макромолекулы в составе комплекса, аминокислотных остатков и даже отдельных атомных групп в макромолекуле) характеризуют структуру всего объекта. Метод применим к веществам, находящимся в различном фазовом состоянии, не имеет ограничений по молекулярной массе мишени. Тритиевую планиграфию с равным успехом можно использовать как для кристаллов, так и для растворов, метод позволяет изучать тонкие изменения структуры, а его высокая чувствительность может фиксировать такие конформационные переходы, которые “не чувствуют” другие методы, включая спектральные. В основе метода лежат химические реакции с участием горячих атомов трития. Энергетическая зависимость сечения химической реакции для горячих атомов водорода (трития) и оценка термализующей способности разных сред позволили выбрать условия, при которых реакция, приводящая к включению метки, происходит при однократном столкновении и характеризует стерическую доступность связи С-Н в составе

молекулы. Метод тритиевой планиграфии [7] успешно использовали для получения информации о пространственной организации белков, их комплексов и таких сложноорганизованных биологических объектов, как рибосома [8], нуклеосома [9], растительные [3, 10] и животные [11] вирусы. Бомбардировка исследуемого объекта пучком горячих атомов трития с последующим анализом внутримолекулярного распределения метки позволяет определить доступные фрагменты – остатки аминокислот, отдельные компоненты комплекса, составляющие его «поверхность», тесно связанную с пространственной структурой [9]. Построение модели пространственной структуры на основе данных о стерической доступности требует учета ряда экранирующих факторов: взаимной экранировки соседних по цепи остатков аминокислот, т.е. остатков в положениях $i \pm 1$; экранировки остатков, сближенных при образовании вторичной структуры. В α -спирали, например, это остатки в положениях $i \pm 3$, $i \pm 4$. Учитывая эти факторы, можно определить вклад в экранировку остатков, вносимый третичной структурой за счет сближения элементов вторичной структуры. Как первый, так и второй вклад, можно количественно определить с помощью компьютерного алгоритма, имитирующего условия бомбардировки.

Суть алгоритма состояла в следующем:

1. Макромолекулу представляли в виде совокупности атомов, аппроксимируемых ван-дер-ваальсовыми сферами. Координаты центров атомов брали из банка пространственных структур PDB. Размеры сфер увеличивали на эффективный радиус трития, равный $0,9 \text{ \AA}$ т.е. $R = R_a + 0,9 \text{ \AA}$.

2. Из всех атомов макромолекулы выделяли ковалентно связанные с атомами водорода (CH , CH_2 , CH_3), способными замещаться на тритий с образованием продукта, в котором тритий не может обмениваться на водород.

3. Ван-дер-ваальсовы сферы разбивали на элементарные площадки с площадью $dS = 4\pi R^2 / m$, где m – число разбиений, R – радиус сферы. Ориентация площадки задавалась нормалью $\mathbf{n}_i$.

4. Из расчетов исключали площадки, находящиеся в области перекрывания сфер. Составлялся список F_k номеров площадок k -го атома, не попавших в зоны перекрывания.

5. Доступную площадь уменьшали пропорционально ослаблению доли потока, падающей с направления $\mathbf{n}_j$, обусловленному затенением от атомов, видимых с площадки, что выполняется при $(\mathbf{n}_i \mathbf{n}_j) < 0$, $z_j < 0$. Если $\mathbf{d}$ – вектор, соединяющий центр площадки с центром видимого с площадки атома с номером k_1 (рис. 1) и α – угол между касательной к этой сфере, проведенной из центра площадки, и направлением потока, то доступное направление $\mathbf{n}_j$ определяется из условия $\mathbf{d} \cdot \mathbf{n}_j > d \cos(\alpha)$. Если направление оказывалось недоступным, то оно вычеркивалось из списка h_{ki} разрешенных направлений прилета атомов к i -той элементарной площадке на поверхности k -го атома.

6. Площадь доступной поверхности атома находили суммированием площадей доступных элементарных площадок, умноженных на f_{kij} – коэффициент ослабления, обусловленный затенением от видимых с i -той элементарной площадки на поверхности k -го атома несмежных атомов молекулы в j -том направлении.

Алгоритм может быть использован для имитации эксперимента как на уровне целой макромолекулы, так и изолированных элементов вторичной структуры: α -спиралей, β -складок. Последние могут быть построены с помощью стандартных для таких структур межатомных расстояний и углов ϕ и ψ . Как показывает расчет, различия между такими искусственно построенными и реальными структурами не очень существенны. Для тестирования имитационного алгоритма проводили сравнения расчетного и наблюдаемого в эксперименте распределения метки. На примере ряда белков показано, что компьютерный алгоритм адекватно описывает эксперимент с атомарным тритием.

В основе численного моделирования тритиевой бомбардировки лежит расчет потока для активных (способных к замещению водорода на тритий) атомов с учетом экранирования от других атомов. Если раньше такие задачи решались для биомолекул, то теперь это стало возможно и для более сложных объектов – вирусов, где необходимо учитывать и экранирование от других субъединиц.

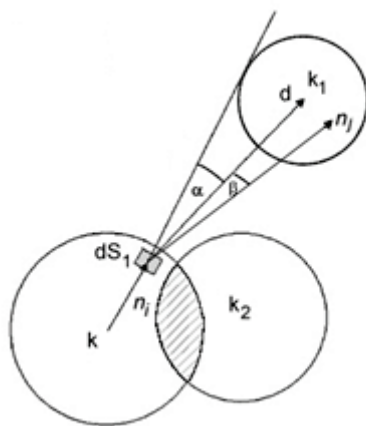


Рисунок 1. К расчету доступной площади (заштрихованные участки поверхности активного атома не учитываются) и экранирования потока другими атомами

Основное допущение при интерпретации данных тритиевой планиграфии – пропорциональность активности A и расчетного потока J :

$$J = \int j(\mathbf{n})(\mathbf{n} \cdot d\mathbf{S})d\Omega,$$

где $j(\mathbf{n})$ – распределение потока в направлении, заданном единичным вектором $\mathbf{n}$; $d\Omega$ – элемент телесного угла, соответствующий заданному направлению; интегрирование ведется по всем доступным направлениям и площади ван-дер-ваальсовых сфер атома за вычетом смежных областей. В самом деле, для активных атомов i и k скорость реакции замещения пропорциональна потоку J и по правилу Лопиталя:

$$\frac{n_i(t)}{n_k(t)} = \frac{\frac{dn_i}{dt}}{\frac{dn_k}{dt}} = \frac{J_i}{J_k},$$

здесь $n(t)$ – число прореагировавших с тритием атомов типа i и k .

При моделировании использовали:

1. Данные криоэлектронной микроскопии [1], из которых следует, что вирионы ХВК представляют собой гибкие нитевидные частицы длиной 5150 Å. 1270 субъединиц белковой оболочки образуют спираль с диаметром 130 Å, шагом 34,5 Å и 8,89 витков на оборот.

2. Модельный файл белковой оболочки ХВК субъединицы, содержащий координаты центров атомов, полученный на основе гомологичного моделирования белков оболочки потексвирусов с помощью программы Modeller [12].

3. Экспериментальные данные тритиевой планиграфии [3, 7, 10].

Ниже приведено распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам белковой оболочки (рис. 2), полученное по данным тритиевого мечения вирионов ХВК, с последующей фрагментацией белковой оболочки и разделением на пептиды, их кислотным гидролизом и аминокислотным анализом с одновременным определением радиоактивности из работы [10].

На основе этих данных решали задачу о нахождении общей ориентации субъединиц по отношению к оси спирали, максимально близких к данным тритиевой планиграфии – распределению активности тритиевой метки по аминокислотным остаткам RA_i . Для ее решения в силу трансляционной инвариантности достаточно выделить фрагмент, состоящий из базовой и смежных с ней субъединиц и далее в исходной системе координат, сдвинутой в центр базовой субъединицы, определять направления оси спирали и радиального направления от этой оси.

Тритиевая бомбардировка вируса из-за экранирования смежными субъединицами существенно отличается от опыта с отдельными субъединицами растворе, когда каждая ориентация молекулы равновероятна. Это дает возможность выделить ориентации белка в спирали, наиболее соответствующие эксперименту. Поэтому разработанный ранее алгоритм имитации бомбардировки изотропным потоком атомов трития одной биомолекулы [13] модифицирован новым фрагментом, учитывающим при расчете потока экранирование «соседями».

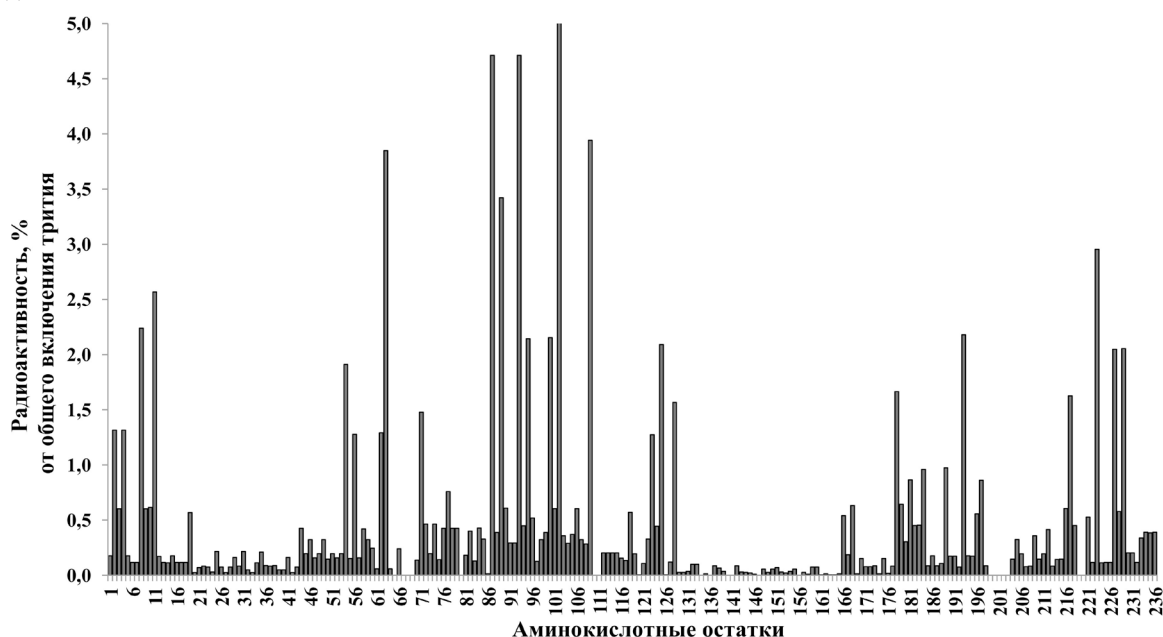


Рисунок 2. Распределение радиоактивности по аминокислотным остаткам субъединиц белковой оболочки [10]

В итоге разработанный для определения ориентации субъединиц с учетом пространственных ограничений алгоритм содержал следующие критерии:

1. Выполнение необходимых пространственных ограничений при спиральной укладке:

1.1. Расстояние до оси спирали меньше радиуса спирали $D/2 = 6,5$ нм, что выполняется, если модуль проекции вектора, соединяющего центры двух атомов на радиальное направление, меньше радиуса спирали: $|(r_i - r_j, e_p)| < D/2$.

1.2. Модуль проекции на азимутальное направление меньше хорды L : $|(r_i - r_j, e_p)| < L = 2R \sin(\pi/n) = 45 \text{ \AA}$.

1.3. Модуль проекции на ось спирали больше шага спирали $H = 34,5 \text{ \AA}$: $(r_i - r_j, e_z) > H$. (значения параметров – из работы [1], e – единичные векторы в соответствующем направлении, r – векторы центров атомов субъединицы).

1.4. Ван-дер-ваальсовы сферы атомов из различных субъединиц не должны пересекаться: $|r_i - r_k| < R_i + R_k$, r – радиус-вектор, R – ван-дер-ваальсов радиус.

1.5. Каждый атом одной субъединицы транслируется в соответствующий атом следующей поворотом относительно оси спирали на угол $\alpha = 2\pi/n$ и подъемом на H/n . При этом должно выполняться необходимое условие 1.4: транслированный атом должен быть вне исходной субъединицы.

2. Наилучшее соответствие опытным данным тритиевой планиграфии по коэффициенту корреляции между активностями аминокислотных остатков белка и расчетным потоком J .

Расчет J осуществляли по ранее разработанной методике имитации бомбардировки изотропным потоком атомов трития [13].

При определении смежных остатков, каждый из них аппроксимировали сферой, центр которой находился в геометрическом центре, $rc_i = \langle r \rangle$ ($\langle r \rangle$ – среднее значение векторов центров атомов остатка RA_i); радиус сферы $R_i = \max(|rc_i - r_j|) + r_{aj}$, где r_{aj} – радиус ван-дер-ваальсовой сферы j -го атома, r_j – векторов его центра. Остатки могут находиться в контакте, если расстояние между их центрами меньше суммы радиусов аппроксимирующих сфер, $|rc_i - rc_k| < R_i + R_k$.

Расчеты проводили в исходной системе координат с началом, сдвинутым в геометрический центр субъединицы. Программа написана на языке Maple.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее, в работе с нашим участием, проведено гомологичное моделирование структуры белковой оболочки в составе вирионов ХВК на основе известных структур высокого разрешения для вирионов мозаики папайи и мозаики бамбука, результаты которого показали, что структура основной (коровой) части, в составе вирионов у всех трех оболочек близки [12]. Белковая оболочка потексвирусов обладает глобулярным ядром и неупорядоченными N- и C- концевыми доменами. Вместе с тем, необходимо было подтвердить каким-либо прямым экспериментальным методом структуру белковой оболочки ХВК и его пространственную ориентацию в вирионе.

При поиске ориентации субъединиц из множества возможных направлений оси спирали и поворотов в перпендикулярной к этой оси плоскости отобраны удовлетворяющие вышеуказанным пространственным ограничениям: из 12000 вариантов осталось всего 122, т.е. $\approx 1\%$. Для 26 наиболее активных остатков рассчитывали поток и сравнивали с экспериментом. В силу трансляционной инвариантности достаточно ограничиться рассмотрением комплекса из одной субъединицы и примыкающих к ней (максимум 8 – предыдущая и последующая по ходу спирали, и по 3 на верхнем и нижнем витке). При расчете потока выбрасывали области пересечения смежных ван-дер-ваальсовых сфер, моделирующих атомы, и учитывали экранирование потока от несмежных атомов на пути потока. Рассчитанное значение коэффициента корреляции между расчетным потоком и данными тритиевой планиграфии составило 0,79-0,84.

При рассмотрении четвертичной структуры вируса для каждого варианта ориентации можно выделить группы остатков, входящие в зону контакта со смежными субъединицами, а также наиболее экспонированных к потоку. Для каждого варианта можно выделить группы остатков, наиболее экспонированных потоку и контактирующих с соседними по ходу спирали и находящимися сверху и снизу субъединицами. Отбирались группы остатков с наибольшими значениями проекций координат СА-атомов на выбранное направление, после чего находились общие для разных вариантов остатки.

Результаты сведены ниже в таблицу 1, где N – № направления; RA – номер остатка $z_{\max}$, $z_{\min}$ – остатки, контактирующие с верхним и нижним витком спирали соответственно, $r_{\max}$ – максимально экспонированные навстречу потоку, $y_{\max}$, $y_{\min}$ – контактирующие с последующей и предыдущей субъединицей.

Нумерация направлений $n = [\cos\varphi \sin\theta, \sin\varphi \sin\theta, \cos\theta]$ проведена по φ и $\cos\theta$. Направления соседствуют, если разница их номеров 1 или 25. Видно, что направления образуют довольно компактную область.

Таким образом, для повторяющегося фрагмента вируса, состоящего из субъединицы и ее примыкающих предыдущего и последующего по ходу спирали соседа, и пар субъединиц, расположенных сверху и снизу, т.е. с номерами $i, i-1, i+1, i+8, i+9, i-8, i-9$, определены ориентации, число смежных субъединиц и зоны контакта.

Таблица 1. Группы остатков, наиболее экспонированные потоку трития, и контакты с соседними по ходу спирали и контакты с нижним и верхним витками

	N	RA
Z max	45-48,69-72,95,96	10-14
Z min	45-48,70-72	104,105,177,181
	83,149,154-156	10-15
Г max	45,46,69-72	104,105,177,181
	108,109,134,135,159,160	230-231,233-237
У max	46-48,70,71	69,70,101,106,108,109
	72,83,95,96,107	7-10
	133-135,158-160	218-220,222,234-237
У min	45-47,69,70,159,160	32-35,37,38
	48,71,72,95,96	185-191,193

ВЫВОДЫ

Предложена методика определения ориентации субъединиц и определения зон контакта смежных субъединиц в вирусе с использованием данных тритиевой планиграфии, что позволяет детализировать четвертичную структуру вируса, существенно сократить выбор возможных ориентаций и уменьшить время расчетов другими методами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 18-04-00525а) и финансирования ИХФ РАН (тема 0082-2014-0001, № АААА-А17-117040610310-6).

Список литературы / References:

1. Kendall A., McDonald M., Bian W. [et al.] Structure of Flexible Filamentous Plant Viruses. *Virology*, 2008, vol.82, pp. 9546-9554.
2. Parker L., Kendall A., Stabbs G., Surface Features of Potato Virus X from Fiber Diffraction. *Virology*, 2002, vol. 300, Issue 2, pp. 291-295.
3. Baratova L.A., Grebenschikov. N. I., Dobrov E. N., Gedrovich A. V., Kashirin I. A., Shishkov A. V., Efimov A. V., Järvekülg L., Radavsky Y. L., Saarma M. 1992. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. *Virology*, vol. 188, iss. 1, pp. 175-180.
4. Agirrezabala X., Méndez-López E., Lasso G., Amelia Sánchez-Pina M.A., Aranda M., Valle M. The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses. *eLife*, 2015, vol. 4, p. e11795, DOI: 10.7554/eLife.11795L.
5. DiMaio F., Song Y., Li X., Brunner M.J., Xu C. Atomic-accuracy models from 4.5-Å cryo-electron microscopy data with density-guided iterative local refinement. *Nature Methods*, 2015, vol. 12, pp. 361-365.
6. Yang S., Wang T., Bohon J., Gagne M.E., Bolduc M., Leclerc D, Li H. Crystal Structure of the Coat Protein of the Flexible Filamentous Papaya Mosaic Virus. *J. Mol. Biol.*, 2012, vol. 422, iss. 2, pp. 263-273.
7. Баратова Л.А., Богачева Е.Н., Гольдманский В.И., Колб В.А., Спирин А.С., Шишков А.В. *Тритиевая планиграфия биологических макромолекул*. М.: Наука, 1999, 175 с. [Baratova L.A. Bogacheva E.N., Goldanskiy V.I., Kolb V.A., Spirin A.S., Shishkov A.V. *Tritium planigraphy biological macromolecules*. Moscow: Nauka, 1999, 175 p. (In Russ.)]
8. Shishkov A.V., Bogacheva E.N. Tritium planigraphy of biological macromolecules. *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Conformational Stability, Size, Shape and Surface of Protein Molecules*, N.-Y.: Nova Science Publishers, 2007, pp. 317-353.
9. Богачева Е.Н., Долгов А.А., Чуличков А.Л., Шишков А.В. Применение тритиевой планиграфии в фундаментальных исследованиях в области биофизики. *Сб. докладов XII Международной научной конференции «Физико-химические процессы при селекции атомов и молекул и в лазерных, плазменных и нанотехнологиях»*, 31.03.2008-04.04.2008, г. Звенигород (Ершово), с. 368. [Bogacheva E.N., Dolgov A.A., Chulichkov A.L., Shishkov A.V. The use of tritium planigraphy in basic research in the field of biophysics. *In digest of XII International Scientific Conference "Physico-chemical processes in the selection of atoms and molecules in laser, plasma and nanotechnologies"*, 31.03.2008-04.04.2008, Zvenigorod (Ershovo), p. 368. (In Russ.)]
10. Lukashina E., Ksenofontov A., Fedorova N. et al. Analysis of the role of the coat protein n-terminal segment in potato virus x virion stability and functional activity. *Molecular Plant Pathology*, 2012, vol. 13, pp. 38-45.
11. Shishkov A.V., Goldanskii V.I., Baratova L.A., Fedorova N.V., Ksenofontov A.L., Zhirnov O.P., Galkin A.V. The *in situ* spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, no. 14, pp. 7827-7830.
12. Семенюк П.И., Карпова О.В., Ксенофонтов А.Л. [и др.] Структурные особенности белков оболочки потексвирусов, выявляемые оптическими методами. *Биохимия*, 2016, т. 82, вып. 12, с. 1836-1846. [Semenyuk P.I., Karpova O.V., Ksenofontov A.L. [et al.] Structural features of the plexvirus membrane proteins, detected by optical methods. *Biochemistry*, 2016, vol. 86, iss. 12, pp. 1836-1846. (In Russ.)]

13. Богачева Е.Н., Богачев А.Н., Дмитриев И.Б., Долгов А.А., Чуличков А.Л., Шишков А.В., Баратова Л.А. Построение моделей пространственной структуры белков по данным тритиевой планиграфии. *Биофизика*, 2011, т. 56, № 6, с. 1024-1037. [Bogacheva E.N., Bogacheva A.N., Dmitriev I.B., Dolgov A.A., Chulichkov A.L., Shishkov A.V., Baratova L.A. Construction of models of the spatial structure of proteins according to tritium planigraphy. *Biophysics*, 2011, vol. 56, no. 6, pp. 1024-1037 (In Russ.)]

MODELING POTEXVIRUSES SPATIAL STRUCTURE

Bogacheva E.N.¹, Dolgov A.A.¹, Ksenofontov A.L.²

¹N.N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS

Kosygin str., 4, Moscow, 119991 Russia; e-mail: bogen_chph.ras.ru

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Moscow State University,

Leninskie Gory str., 1, Moscow, 119992, Russia; e-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru

Abstract. The method of tritium planigraphy has applied to solving a wide range of problems of modern biophysics, structural chemistry, molecular and physico-chemical biology. It is based on a non-selective substitution of hydrogen in hydrocarbon fragments of molecules for its radioactive isotope-tritium. The data obtained by this method, in combination with our imitation algorithm of tritium bombardment, was successfully used to obtain information on the spatial organization of proteins and their complexes. Details of the structure of the potexviruses are currently unknown. The example of potato virus X shows a technique for determining the orientation of subunits in the virus relative to the axis of the helix and their placement under a known subunit structure, taking into account spatial limitations and experimental data of tritium planigraphy. This allows us to detail the quaternary structure of the virion and significantly reduce the choice of subunits possible orientations in the virion.

Key words: *spatial structure of potato virus X, tritium planigraphy.*

О МЕХАНИЗМЕ ВРАЩЕНИЯ РОТОРА FOF1 Na⁺-АТФ-СИНТАЗЫ, МОТОРА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ И МЕХАНИЗМЕ РАБОТЫ ИОННОЙ ПОМПЫ

Васильева-Вашакмадзе Н.С.

Инженерная академия Грузии

ул. М. Костава, 77, корп. 8, Тбилиси, 10175, Грузия; e-mail: engacad@mail.ru, e-mail: nonavas@rambler.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. В данной работе рассматривается возможный механизм вращения молекулярного ротора на примере FOF1 Na⁺-АТФ-синтазы *Ilyobacter tartaricus*, *Propionigenium modestum*; механизм, лежащий в основе вращающего момента бактериальных жгутиков, а также возможный физический принцип, обеспечивающий работу ионной помпы - активного ионного транспорта. Показано, что механизм вращения молекулярных роторов, а также механизм переноса ионов против градиента концентрации – одинаков как для протонной, так и для натриевой биоэнергетики.

Ключевые слова: механизм вращения молекулярных моторов, вращающий момент ротора АТФ-синтаз, вращающий момент базальных телец бактериальных жгутиков, механизм активного транспорта ионов.

Функционирование живых организмов обеспечивается работой микроскопических систем – "молекулярных машин" - АТФ-синтаз, ионных помп АТФ-аз, базальных телец и т.д., механизмы которых, однако, ненаблюдаемы в принципе. Поэтому представляется целесообразным изучение механизмов этих систем с привлечением теоретических методов. Экспериментальный материал, а также законы биоэнергетики могут служить основой для поиска природы сил, создающих вращающий момент, способный приводить в движение роторы АТФ-синтаз, а также силы, переносящей ионы против градиента концентрации [1-5].

Известно, что протонные, как и натриевые FOF1 АТФ-синтазы (*Ilyobacter tartaricus*, *Propionigenium modestum*) имеют практически одинаковую структуру и конфигурацию - состоят из двух больших компартаментов - FO, F1 и малых (минорных) структур [6, 7]. Поэтому иногда приемлемо называть тип АТФ-синтазы, например "FOF1 Na⁺АТФ-синтаза", не упоминая организм, из которого получен этот фермент.

Обязательными элементами молекулярных "моторов" являются статор и ротор, а функционирование осуществляется вращением ротора при участии статора за счёт энергии от внешних источников, преобразованной в протонный или натриевый потенциал.

FOF1 Na⁺ АТФ-синтаза. В первой части нашей работы на примере FOF1 Na⁺ АТФ-синтазы из *Ilyobacter tartaricus*, *Propionigenium modestum* высказывается предположение, что в основе механизма вращения ротора FOF1 Na⁺АТФ-синтазы и других подобных молекулярных моторов лежит совокупность факторов, главные из которых - изменение трансмембранного потенциала при активировании клеток, вызывающее электрическую поляризацию – возникновение локальных кратковременных электронных токов в белковых субъединицах статоров; открытый ещё М. Фарадеем эффект образования магнитного поля вокруг движущихся зарядов, независимо от причины возникновения их движения; способность силы Лоренца создавать вращающий момент, действующий на заряды, движущиеся под углом к магнитному полю.

Во второй части рассматривается возможный принцип, лежащий в основе работы ионной помпы – активного транспорта ионов, осуществляемого Na⁺, K⁺-АТФ-азой (и аналогично -H⁺, K⁺АТФ-азой).

Показано, что в основе механизма "активного транспорта" ионов, при котором ионы Na⁺ (или H⁺) в процессе работы АТФ-аз выходят в экзоплазму, лежит совокупность факторов, из которых важными являются: различие между свойствами ионов с положительной (Na⁺, H⁺) и отрицательной (K⁺) гидратацией; аддитивность диамагнитной восприимчивости многоатомных комплексов; действие выталкивающей силы надиамагнитные ионы в неоднородном магнитном поле. Делается вывод, что это приводит (при определённых дополнительных условиях) к выбросу ионов Na⁺ (или H⁺) в экзоплазму.

Электрические и магнитные поля живых организмов. Прижизненные процессы животных, включая человека - передача нервных импульсов, работа мышечных клеток, сердца и т.д. сопровождаются появлением электрических и магнитных полей, которые фиксируются только при жизни и исчезают после гибели живого организма. Специальные установки – электро- и магнито - энцефалографы; «СКВИД»-ы, миографы, электро- и магнито - кардиографы и т.д. фиксируют прижизненные электрические и магнитные поля [8-11].

Известно, что в природе источниками электрических полей могут быть как движущиеся, так и неподвижные электрические заряды, в то время как причиной появления магнитных и электромагнитных полей могут быть только движущиеся заряды - электроны, ионы (относительно неподвижной системы отсчёта). Особенностью этих полей является то, что они исчезают вместе с прекращением движения зарядов [12].

Одним из видов движения зарядов в живых организмах являются ионные токи в ионных каналах, а также поляризация - локальный кратковременный сдвиг электронной плотности - «воротные токи», предшествующие ионным токам. [13, 14]. При функционировании живых организмов, которое обеспечивается работой "молекулярных машин", в том числе АТФ-аз, АТФ-синтаз, базальных телец и т.д., обнаруживается движение электронов и ионов – воротные и ионные микроскопические токи, которые являются источниками микроскопических, электрических, магнитных и электромагнитных полей [10, 11, 15].

Ионные каналы. Ионные каналы АТФ-аз, статоров FOF1 АТФ-синтаз, а также жгутиков бактерий, пронизывают насквозь цитоплазматическую мембрану клеток, оболочку бактерий или внутреннюю мембрану митохондрий. При этом, взаимно-противоположные - дистальные устья ионных каналов АТФ-аз, как и каналов FOF1 АТФ-синтаз попадают в зоны с различным ионным составом и соответственно, согласно известному соотношению Нернста - Гольдмана - электрической разностью потенциалов:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_k c_k^e p_k^e}{\sum_k c_k^i p_k^i}, \quad (1)$$

где φ – трансмембранная разность потенциалов; R – универсальная газовая константа; T – абсолютная температура; F – число Фарадея; C_k^e, C_k^i – концентрация ионов -того типа соответственно в экзо- и цитоплазму; P_k^e, P_k^i – проницаемость ионов k -типа в экзо- и цитоплазму. Вследствие известных особенностей локализации и ориентации ионных каналов, их α - спиральные субъединицы белковых компонент в состоянии покоя поляризованы (поскольку их внешнее и внутреннее устья выходят соответственно в зоны с различающимся ионным составом), т.е. обладают изначальным электрическим дипольным моментом $\vec{D}_0$ [12, 18]:

$$\vec{D}_0 = \alpha \vec{E}_0; \vec{E}_0 = \frac{\varphi_0}{l} \vec{n}, \quad (2)$$

где φ_0 – трансмембранный потенциал покоя; $\vec{E}_0$ – напряжённость электрического поля в толще мембраны; l – толщина мембраны. При изменении трансмембранной разности потенциалов φ_0 изменятся и электрический дипольный момент α - спиральных белковых субъединиц, образующих стенки ионного канала, пронизывающего мембрану. По определению, электрический дипольный момент молекулы можно представить в следующем виде [12, 16, 17]:

$$\vec{D} = \sum_k z_k e n_k \vec{r}_k, \quad (3)$$

где $\vec{D}$ – электрический дипольный момент молекулы; $z_k, e, n_k, \vec{r}_k$ – соответственно заряд, число и радиус-векторы зарядов k -того типа. Известно, что трансмембранная разность потенциалов создаёт напряжённость электрического поля в толще мембраны:

$$\vec{E} = -grad\varphi, \quad (4)$$

где $\vec{E}$ – напряжённость электрического поля; φ – трансмембранная разность потенциалов; l – толщина разделяющей мембраны. Внешнее устье цитоплазматического ионного канала открывается в экзоплазму, а внутреннее – в цитоплазму. Поэтому любое изменение ионного состава в локальной области вокруг внешнего или внутреннего устья ионного канала вызывает изменение градиента концентрации ионов и соответственно - трансмембранной разности потенциалов (1), что сопровождается электрической поляризацией – внутримолекулярным сдвигом электронной плотности - локальным "воротным" током [13, 14, 16]. Локальное смещение электронной плотности может происходить вдоль химических связей в белковых α -спиралях, что подтверждается экспериментальными наблюдениями [18, 19]. Сдвиг зарядов в белковых субъединицах ионного канала сопровождается изменением электрического дипольного момента α – спиральных белковых субъединиц:

$$\vec{D} = \vec{D}(t) = \alpha \vec{E}(t); \quad (5)$$

$$\vec{D}(t) = \sum_k z_k e n_k \vec{r}_k(t); \quad (6)$$

$$\frac{d\vec{D}}{dt} = \sum_k z_k e n_k \vec{v}_k = \vec{J}(t), \quad (7)$$

где $\vec{D}$ – электрический дипольный момент; $\vec{E}$ определено соотношением (4). Сдвиг зарядов – локальный ток $\vec{J}(t)$ (7) – это поляризационный процесс, который в химической номенклатуре называют мезомерным эффектом, если смещение электронной плотности происходит по системе π -электронных связей и индуктивным эффектом, если смещение электронной плотности происходит по σ -связям [19]. Движение зарядов в белках инициирует аллостерический эффект, т.е. изменение пространственной конфигурации или конформационный сдвиг в α -спиральных субъединицах [16]. В рамках классического подхода, а также на основе квантовой теории можно показать, что локальный ток в α -спиральных белковых молекулах порождает деформирующую силу, которая способна вызвать изменение пространственной конфигурации подобных систем и в частности – аллостерический эффект [20].

Применяя классический подход, деформирующую силу можно оценить, используя соотношение [16, 20]:

$$\vec{F}(t) = \frac{\mu_0}{4\pi} \mu \frac{N^2}{l} s J^2(t), \quad (8)$$

где $\overline{F(t)}$ – деформирующая сила; N, S, l – соответственно - число витков, поперечное сечение и длина α -спирали; $\vec{J}(t)$ – поляризационный ток, т.е. сдвиг электронной плотности вдоль межатомных связей; μ_0, μ – магнитная постоянная и магнитная проницаемость.

Молекулярные машины. Известно, что молекулярные машины не могут функционировать, т.е. совершать работу за счет внутримолекулярных сил. Это противоречит закону сохранения энергии – фундаментальному закону природы. Работа любых систем, в частности, вращение ротора АТФ-синтазы осуществляется с помощью заложенных в них Природой механизмов, преобразующих энергию от внешних источников через промежуточные виды энергии в механическую работу (законы биоэнергетики [1]). Наряду с механизмом вращения молекулярных моторов нас интересует вопрос о том, как осуществляется активный транспорт ионов в АТФ-азах, а также в FOF1 Na⁺-АТФ-синтазах из *Ilyobacter tartaricus* и *Propionigenium modestum*, когда эти молекулярные машины выполняют роль ионной «помпы» [6,7]. Трудность заключается в том, что силы природы в принципе невидимы, хотя результат их действия можно наблюдать. Прежде чем рассмотреть силы, обуславливающие активный транспорт ионов, мы остановимся на механизме вращения ротора FOF1 Na⁺ АТФ-синта.

Различие между ионными токами и поляризационными – «воротными токами». Поляризация молекул – это эффект смещения зарядов под действием внешнего электрического фактора, например, изменения электрохимического градиента, когда заряды (например, электроны) не покидают молекулу, а только смещаются в пределах молекулярного комплекса вдоль химических связей (часто его именуют мезомерным эффектом), образуя кратковременный локальный ток [13, 14, 18, 19]. Локальное смещение зарядов – «воротный» ток в α -спиральной белковой субъединице, т.е. поляризация, сопровождается изменением её электрического дипольного момента (если изначально она обладала им) или образованием дипольного момента (если она им не обладала). В отличие от поляризационного процесса (локального сдвига зарядов в пределах молекулы), ионный ток в открытом ионном канале представляет собой движение зарядов (ионов), не связанных с молекулой, из эктоплазмы в цитоплазму или наоборот.

Микроскопическое кратковременное магнитное поле «воротных» и ионных токов. Вокруг движущихся зарядов, независимо от причины, вызывающей их движение (это имеет место и в случае движения электронов в электронно-транспортной цепи), всегда возникает магнитное поле, исчезающее вместе с прекращением движения зарядов [12, 16, 17, 20]. Поэтому как воротные, так и ионные токи сопровождаются появлением магнитных полей, различающихся, однако, продолжительностью, направлением, формой и интенсивностью, в зависимости от конфигурации и интенсивности тока.

FOF1 Na⁺ АТФ-синтаза *Propionigenium modestum*, *Ilyobacter tartaricus*. Ротор или С-кольцо FOF1 Na⁺-АТФ-синтазы *Propionigenium modestum*, как и *Ilyobacter tartaricus* [6, 7] пространственно сближено, но не связано химической связью со статором – неподвижной компонентой. **ab₂** Компонента статора **ab₂** состоит из двух α -спиральных белковых нитей (рис. 1). Начиная от вершины F1, компонента **ab₂** обгибает поверхность F1, локализованную в цитоплазме и, пересекая мембрану, выходит в эктоплазму. Поэтому верхушка статора **ab₂** и его основание оказываются соответственно в зонах с разным ионным составом, между которыми существует согласно соотношению (1) трансмембранная разность потенциалов. Изменение ионного состава в эктоплазме при внешних воздействиях, равно как и изменения в цитоплазме, могут вызвать сдвиг разности потенциалов между внешним и внутренним устьем ионного канала, проходящего сквозь статор компоненту **ab₂**. Изменение разности потенциалов сопровождается электрической поляризацией α -спиральных субъединиц белковой компоненты ионных каналов статора.

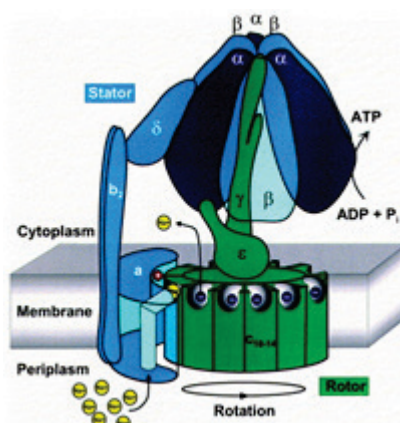


Рисунок 1. FOF1 Na⁺-АТФ - синтаза *Propionigenium modestum* [6]. Компартмент FO (на рисунке обозначен как ротор) напоминает ножку гриба, находящуюся в цитоплазматической мембране и вдаётся в эктоплазму. F1 (обозначен как статор) похож на шляпку гриба и локализуется в цитоплазме. Ионные каналы статора проходят сквозь компартмент **ab₂**, который пронизывает насквозь цитоплазматическую мембрану. Внешнее устье ионного канала открывается в эктоплазму, а внутреннее – в цитоплазму. Вращающаяся субъединица γ , заякоренная в центре ротора, образует связующий перешеек между FO и центральной зоной компартмента F1, полностью находящегося в цитоплазме

Как показывают электронно-микроскопические снимки (рис. 1), ротор представляет собой белковый комплекс, по форме близкий к цилиндрической, образованный 8-15 пачками из α -спиральных субъединиц. Это С-диск, который погружен в толщу цитоплазматической мембраны. Нижнее основание С-диска контактирует с экзоплазмой (или периплазмой, которая благодаря порам связана с экзоплазмой). В центре верхнего основания С-диска заякорена субъединица γ , ориентированная перпендикулярно к его поверхности. Субъединица γ пересекает цитоплазматическую мембрану и продолжается в цитоплазме, проходя через просвет в нижней части компартамента F1 и достигает его вершины (рис. 1). Как известно, между цито- и экзоплазмой в бактериях и живых клетках поддерживается разность потенциалов φ_0 , связанная с различием ионного состава между этими зонами. Поскольку субъединица γ , заякоренная в центре С-диска связана с цитоплазмой, а периферия – с экзоплазмой (рис. 1), то разность потенциалов между центром С-диска, в котором локализовано основание субъединицы γ и периферией С-диска в состоянии покоя совпадает с трансмембранной разностью потенциалов φ_0 и напряжённостью $\vec{E}_0$:

$$\vec{E}_0 = -\text{grad}\varphi_0. \quad (9)$$

Изменение ионного состава в цитоплазме или экзоплазме клетки может вызвать изменение трансмембранной разности потенциалов φ и напряжённости $\vec{E}$, а следовательно и величины напряжённости электрического поля между центром С-диска и его периферией, поскольку центр С диска через субъединицу γ проникает в цитоплазму, а периферия С-диска контактирует с экзоплазмой клетки.

При достаточно больших значениях $\vec{E}$ в электрическом поле возникает движение зарядов под действием силы $\vec{F} = q\vec{E}$. В данном случае это - радиальный локальный ток между центром и периферией С-диска.

Магнитное поле в ионном канале статора FOF1 Na⁺-АТФ-синтазы. При функционировании FOF1 Na⁺-АТФ-синтазы изменение ионного состава в цито- или экзоплазме инициирует изменение трансмембранной разности потенциалов, а, следовательно, разности потенциалов между нижним и верхним устьем ионного канала, проходящего сквозь статор - комплекс ab_2 , пронизывающий цитоплазматическую мембрану. При этом возникает поляризационный процесс – сдвиг зарядов в α -спиральных белковых субъединицах, образующих стенку ионного канала. Согласно законам электромагнетизма, вокруг тока любого происхождения, в том числе и поляризационного тока (локального сдвига зарядов), формируется магнитное поле. В случае вортного тока магнитное поле направлено вдоль большой оси α -спирали [16, 17, 21]:

$$\vec{B} = \mu_0 \mu \frac{N}{l} J \vec{n}, \quad (10)$$

где $\vec{B}$ – индукция магнитного поля; μ_0 – магнитная постоянная; μ – магнитная проницаемость, N – число витков; l – длина α -спирального фрагмента; J – поляризационный локальный ток, в α -спиральной субъединице; $\vec{n}$ – единичный вектор, направленный вдоль оси α -спирали.

При $\mu_0 \mu = 4\pi \cdot \frac{10^{-7} \text{ Гн}}{\text{м}}$; $N \sim 10^3$; $l \sim 10^{-7} \text{ м}$; $J \sim 10^{-15} \text{ А}$, получим $\vec{B} \sim 10^{-10} \text{ Тл}$.

Поскольку ионный канал статора ab_2 пронизывает цитоплазматическую мембрану, то магнитное поле вортного тока ориентировано перпендикулярно к поверхности мембраны. Его действие ощутимо вблизи внешнего и внутреннего устья. Магнитное поле не локально, и потому ротор FOF1 АТФ - синтазы (С-кольцо) попадает под действие магнитного поля статора (10). Заряды, движущиеся радиально в с - диске ротора находятся под действием силы электрического поля $\vec{F}_1 = q\vec{E}$. Приобретая скорость $\vec{v}$, заряды начинают испытывать влияние силы магнитного поля статора: $\vec{F}_2 = q[\vec{v}\vec{B}]$. Таким образом, результирующая сила – это сила Лоренца, которая складывается из двух составляющих – $\vec{F}_1$ и $\vec{F}_2$ (11).

$$\vec{F} = \vec{F}_1 + \vec{F}_2; \vec{F} = q\vec{E} + q[\vec{v}\vec{B}]; \quad (12)$$

$$\vec{F}_1 = q\vec{E}; \vec{F}_2 = q[\vec{v}\vec{B}], \quad (13)$$

где q, v – соответственно заряды и их скорость в роторе; $\vec{B}$ – магнитное поле (10), порождаемое статором. Составляющая $\vec{F}_2$ придаёт радиальную скорость $\vec{v}$ зарядам. Сила $\vec{F}_2$ действует перпендикулярно к направлению движения зарядов и поэтому создаёт вращающий момент $\vec{N}$, действующий на радиально движущиеся заряды:

$$\vec{F}_2 = q[\vec{v}\vec{B}] \rightarrow \vec{N} = q[\vec{R}\vec{F}_2]. \quad (14)$$

Под действием вращающего момента $\vec{N}$ (14) радиальный ток зарядов С-диска начинает вращаться и увлекает за собой всю систему ротора, включая жёстко связанную с ним субъединицу γ . При повороте основания субъединицы γ , заякоренной в центре ротора АТФ-синтазы, её противоположный конец вращается в просвете компартамента F1 между компонентами $\alpha\beta\beta_3$, что обеспечивает работу фермента. Существенно, что

при повороте ротора не меняется взаимно - перпендикулярная ориентация радиальной скорости $\vec{v}$ зарядов С-кольца относительно индукции $\vec{B}$ магнитного поля статора. Поэтому сила $\vec{F}_2$ (14), ответственная за наведение вращающего момента $\vec{N}$ (14), продолжает действовать в течение некоторого времени, обеспечивая многократное вращение ротора АТФ-синтазы. Таким образом, ротор АТФ-синтазы можно считать истинным молекулярным мотором.

Реполяризация. Реполяризация, т.е. изменение трансмембранной разности потенциалов на противоположную, $\varphi \rightarrow -\varphi$ сопровождается изменением направления электрического поля $\vec{E} \rightarrow -\vec{E}$ между центром С-диска (с заякоренной субъединицей γ) и его периферией. Поэтому локальный радиальный ток зарядов также меняет направление на противоположное. $\vec{v} \rightarrow -\vec{v}$. Однако магнитное поле обладает инерционностью [16, 17, 23]. В силу инерционности магнитное поле $\vec{B}$ статора некоторое время продолжает действовать в том же направлении. Изменение направления движения зарядов на противоположное $\vec{v} \rightarrow -\vec{v}$ вследствие инверсии электрического поля при неизменном направлении магнитного поля $\vec{B}$ сопровождается инверсией силы Лоренца, которая начинает действовать в обратном направлении:

$$\vec{F}_2' = q[-v\vec{B}] = -q[v\vec{B}] \rightarrow \vec{F}_2' = -\vec{F}_2. \quad (15)$$

Поэтому вращающий момент также меняет направление на противоположное:

$$\vec{N}' = -\vec{N}. \quad (15,a)$$

При этом С-диск, т.е. ротор, а с ним и субъединица γ , также начинают вращаться в обратном направлении.

Частота вращения ротора Na^+ -АТФ-синтазы. Исходя из экспериментальных данных, можно качественно оценить циклическую частоту ω ротора Na^+ -АТФ-синтазы - С-диска и связанной с ним субъединицы γ :

$$\frac{mv^2}{R} = q[|\vec{v}_r \vec{B}|] \quad m\omega^2 R = qv_r B; \quad (16)$$

$$\omega R = v \uparrow \rightarrow \omega = \frac{qBv_r}{mv} \quad v = \frac{\omega}{2\pi}; \quad v = \frac{1}{2\pi} \frac{qB}{m} \frac{v_r}{v}, \quad (17)$$

где R – радиус ротора; v_r – скорость зарядов между центром ротора и его периферией; v – линейная скорость вращения зарядов и увлекаемого ими ротора; ω – циклическая частота вращения зарядов ротора и увлекаемого ими самого ротора под действием силы Лоренца; $|\vec{B}| = B_z$, где B_z – z-составляющая магнитной индукции статора. Полагая $q \approx 1,6 \cdot 10^{-19}$ Кл; $m \approx 9 \cdot 10^{-31}$ кг; $B \approx 10^{-10}$ Тл; $\frac{v_r}{v} \sim 10^2$, получим $v \sim 10^2$ с⁻¹

Базальное тельце бактериального жгутика. В базальном тельце жгутиков бактерий происходят во многом схожие процессы с работой АТФ-синтазы [25, 37, 28]. Некоторые морские бактерии, например *Vibrio*, алкалофильный *Bacillus*, *Acetobacterium woodii* и другие используют ионы натрия вместо протонов. Ротор бактериального мотора (MS-диск или кольцо) внутренним (цитоплазматическим) основанием контактирует с цитоплазмой клетки, а остальная часть диска погружена в толщу цитоплазматической мембраны (рис. 2).

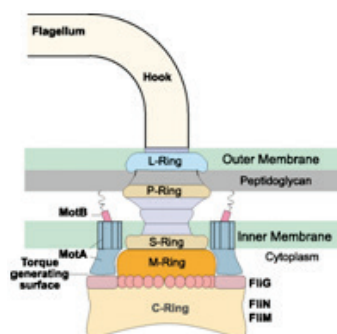


Рисунок 2. Архитектура бактериального жгутика. MotA, Motb - статоры с проходящими внутри ионными каналами простираются от цитоплазмы до пептидогликанового слоя. S-Ring, M-ring - роторы. Они локализованы в цитоплазматической мембране и своей нижней поверхностью соприкасаются с цитоплазмой. В центральной зоне верхней поверхности, локализованной в цитоплазматической мембране, её пронизывает основание жгутика, вдоль большой оси которого проходит канал, соединяющийся с экзоплазмой. Между экзоплазмой и цитоплазмой, а потому и между основанием внутрижгутикового канала и периферией ротора (MS-Ring) существует разность потенциалов и напряжённость электрического поля, в котором на заряды действует сила, сообщающая им радиальное движение – между центром и периферией ротора. Магнитное поле статоров создаёт силу Лоренца, которая инициирует вращающий момент, вызывающий вращение зарядов и вместе с ними - вращение SM - кольца с заякоренным в нём бактериальным жгутиком

В отличие от субъединицы γ , которая в FOF1 Na^+ -АТФ-синтазе, вращаясь вместе с С-кольцом ротора, проникает в цитоплазму и проходит через просвет вдоль центральной оси симметрии компартамента F1, бактериальный жгутик выходит из ротора – MS-кольца и попадает во внеклеточную среду – экзоплазму и, вращаясь вместе с ротором, обеспечивает движение бактерии во внешней среде [24-27].

Статор базального тельца бактериального жгутика. Статор бактериального жгутика MotA, MotB – это несколько α -спиральных протеиновых пучков, пронизывающих цитоплазматическую мембрану. Существенно, что их внутренние окончания погружены в цитоплазму, а внешние - находятся в периплазме или экзоплазме. Поэтому пучки из α -спиральных белковых субъединиц, образующих статор, обладают изначальным электрическим дипольным моментом $\vec{D}_0$. При внешних воздействиях, вызывающих изменение трансмембранного потенциала, согласно концепции Ходжкина и Хаксли [13], а также экспериментам Безаниллы и Армстронга [14], в белковых α -спиральных субъединицах, ионного канала возникает воротный ток. Как известно, любой ток зарядов создаёт не только электрическое, но и магнитное поле. Как это было показано для Na^+ -АТФ-синтазы, направление магнитного поля воротного тока статора перпендикулярно поверхности цитоплазматической мембраны и определяется аналогично (10). Магнитное поле статора не локально и может влиять на ротор, расположенный в непосредственной близости от статора.

Ротор базального тельца бактериального жгутика. MS- кольцо расположено в цитоплазматической мембране так, что "нижние" участки α -спиральных белковых субъединиц MS-кольца соприкасаются с цитоплазмой, а вся остальная часть пронизывает толщу цитоплазматической мембраны. В центре верхнего основания ротора заякорен жгутик, противоположный конец которого выходит во внешнюю среду (рис. 2). Расположение ротора таково, что его периферия через "нижнее" основание оказывается связанной с цитоплазмой, а внешнее окончание жгутика, пересекая цитоплазматическую мембрану, выходит в экзоплазму. Поэтому между центром ротора, где заякорен жгутик, и его (ротора) периферией должна существовать разность потенциалов ϕ , совпадающая с трансмембранной и соответственно, напряжённость электрического поля $\vec{E}$, имеющая радиальное направление:

$$\vec{E} = -\text{grad}\phi, \quad (18)$$

где $\vec{E}$ направлена от центра к периферии. При достаточно большой трансмембранной разности потенциалов создается электрическое поле между центром и периферией ротора, способное индуцировать радиальный ток зарядов в MS-диске, поскольку на каждый заряд в электрическом поле действует сила $\vec{F}$:

$$\vec{F} = q\vec{E}. \quad (19)$$

Статор базального тельца бактериального жгутикового мотора устроен аналогично статору FOF1 Na^+ -АТФ-синтазы (рис. 1, 2). В обоих случаях воротный ток в α -спиральных субъединицах белковой компоненты ионного канала создаёт магнитное поле. Ротор бактериального жгутика - система MS-колец вместе с основанием жгутика, локализованная в непосредственной близости от статора, попадает в магнитное поле статора. В магнитном поле статора, направленном перпендикулярно радиусу ротора, на радиально движущиеся заряды действует сила Лоренца (12), магнитная составляющая которой перпендикулярна скорости зарядов и магнитному полю. Поэтому создается вращающий момент $\vec{N}$, действующий на радиально движущиеся заряды:

$$\vec{F} = q[\vec{v}B] \rightarrow \vec{N} = [\vec{R}\vec{F}], \quad (20)$$

где $\vec{N}$ – вращающий момент, действующий на движущиеся заряды; $\vec{B}$ – магнитное поле, индуцируемое статором; $\vec{v}_r$ – радиальная скорость зарядов; $\vec{R}$ – радиус MS-диска. Применяя известные соотношения [17, 21], получим:

$$|\vec{F}| = qv_r B; v = \omega R; F_u = \frac{mv^2}{R} \rightarrow qv_r B = \frac{mv^2}{R}; \omega = \frac{qBv_r}{mv}; v = \omega/2\pi \approx 10^2 \text{ c}^{-1}, \quad (21)$$

где $\vec{B}$ – индукция магнитного поля статора; $\vec{R}$ – радиус -диска; q, m – соответственно величина заряда и его масса; v_r – скорость заряда вдоль радиуса MS-диска; ω – соответственно циклическая частота вращения заряда в MS-диске. Таким образом, сила Лоренца $\vec{F}$ (12) создаёт вращающий момент $\vec{N}$ (20), действующий на заряды, которые вращаются с циклической частотой ω (21), а поскольку заряды связаны со своими молекулами, то они увлекают во вращение всю систему, включая основание жгутика. Поэтому и жгутик вращается с циклической частотой ω (21) [22-25].

Ионы, переносимые против градиента концентрации в ионных помпах Na^+ -АТФ-синтазы. Ионы Na^+ , H^+ , способные к движению против градиента концентрации в ионном канале АТФ-аз в температурном интервале 0-70 °C гидратируются, в отличие от ионов K^+ , которые вплоть до температуры +70 °C проявляют отрицательную гидратацию, т.е. не способны к формированию гидратной оболочки [26-29]. Гидрокомплекс натрия ($\text{Na}^+ \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) имеет слабый электрический заряд вследствие экранировки иона молекулами воды (28), в

то время как K^+ обладает значительным зарядом. $e^+ = 1,6 \cdot 10^{-19}$ Кл. Вместе с тем, и Na^+ , и K^+ – диамагнитные ионы. Учитывая, что и ионы Na^+ , и молекулы воды диамагнитны, в силу аддитивности диамагнитной восприимчивости [30, 31] гидрокомплексы натрия ($Na^+ \cdot 2H_2O$), как и ионов водорода – гидроксония ($H^+ \cdot H_2O$) или ($H^+ \cdot 4H_2O$) обладают гораздо большей (по абсолютной величине) диамагнитной восприимчивостью, чем негидратированные ионы K^+ [32, 33]. Этими различиями электрических и магнитных свойств ионов K^+ по сравнению с ионами Na^+ и H^+ можно объяснить их разное поведение в ионном канале АТФ-азы в режиме активного транспорта. Магнитное поле вращающего тока в k -той α -спиральной субъединице белковой компоненты стенки ионного канала Na^+ , K^+ -АТФ-азы направлено вдоль оси α -спиральной субъединицы, т.е. перпендикулярно цитоплазматической мембране и может быть описано соотношением [12]:

$$\vec{B} = k \frac{N}{l} \vec{J} \vec{n}, \quad (22)$$

где $\vec{B}$ – индукция магнитного поля; N, l – соответственно число витков и длина α -спиральных субъединиц; $\vec{J}$ – вихревой ток; k – коэффициент пропорциональности, зависящий от системы единиц. В системе СИ $k = \mu_0 \mu$; $\vec{n}$ – единичный вектор, направленный вдоль оси α -спирали. В ионных каналах статора внешний портал (устье) в момент открытия приобретает воронкообразную форму, расширяющуюся к выходу в эктоплазму (или межмембранную зону) [4]. Поэтому, согласно законам физики, магнитное поле ослабевает на выходе в эктоплазму. В ионном канале, локализованном между цито- и эктоплазмой, действует одновременно и электрическое, и магнитное поля. В неоднородном магнитном поле на диамагнитные ионы действует выталкивающая сила, направленная в сторону ослабления поля, пропорциональная диамагнитной восприимчивости и градиенту магнитного поля [12, 16, 21] Поэтому суммарная сила здесь складывается из двух составляющих – электрической и магнитной:

$$\vec{F} = q\vec{E} - \chi B_z \frac{\partial B_z}{\partial z}, \quad (23)$$

где χ – диамагнитная восприимчивость иона или гидрокомплекса; B_z – z -составляющая магнитной индукции (ось z направлена вдоль оси ионного канала); $\vec{E}$ – напряженность электрического поля, связанная с трансмембранной разностью потенциалов:

$$\vec{E} = -\text{grad}\phi \approx -\frac{\phi}{l} \vec{n}. \quad (24)$$

О механизме активного транспорта ионов, осуществляемого АТФ-азами. Обратимся к соотношению Ланжевена для определения магнитной восприимчивости отдельного иона Na^+ и K^+ [31-33] В системе СИ:

$$\chi = \mu_0 \mu \frac{(Ze^2)}{m} \sum_i r_i^2, \quad (25)$$

где χ – диамагнитная восприимчивость иона; μ_0 – магнитная постоянная; μ – магнитная проницаемость; Ze – заряд иона; m – масса иона; r_i – средний радиус электрона. Магнитная восприимчивость гидрокомплексов в силу аддитивности магнитной восприимчивости является суммой магнитной восприимчивости иона и гидратной оболочки. Учитывая, что эктоплазматические устья ионных каналов на концах расширяются [4], можно заключить, что вблизи внешнего устья АТФ-азы магнитное поле становится неоднородным и ослабевает. Поэтому на диамагнитные ионы с диамагнитной восприимчивостью χ в ионном канале Na^+ , K^+ -АТФ-азы помимо электрической силы, действует сила неоднородного магнитного поля, направленная в сторону слабого поля [12, 16, 17, 21]:

$$F_m = \chi B_z \frac{\partial B_z}{\partial z}, \quad (26)$$

где B_z – z -составляющая магнитной силы, χ – магнитная восприимчивость иона B_z – z -составляющая магнитной индукции (ось z направлена вдоль оси ионного канала). Таким образом, в активированном ионном канале Na^+ , K^+ -АТФ-азы на ионы действует сила:

$$\vec{F} = \vec{F}_e + \vec{F}_m, \quad (27)$$

где

$$\vec{F}_e = q\vec{E}; \vec{F}_m = \chi B_z \frac{\partial B_z}{\partial z} \vec{n}. \quad (28)$$

Известно, что в системе активного транспорта ионы K^+ (с отрицательной гидратацией) не могут перемещаться против градиента концентрации, в отличие от гидратирующихся ионов H^+ или Na^+ (а также некоторых других). Перечислим некоторые различия между ионами K^+ и Na^+ . (Аналогично этому можно перечислить различия между ионами K^+ и H^+): Na^+ -ионы в водной среде гидратируются ($Na^+ \cdot 2H_2O$), начиная с температуры $\approx 10^\circ C$ в то время как ионы K^+ проявляют отрицательную гидратацию - отталкивают воду (до температуры $\approx 70^\circ C$). Диамагнитная восприимчивость - аддитивная величина и поэтому гидратированные ионы обладают гораздо большей диамагнитной восприимчивостью, чем негидратированные: $|\chi(Na^+ \cdot 2H_2O)| \gg |\chi(K^+)|$. Изменение разности потенциалов между внутренним и внешним устьями ионного канала, согласно известным данным [13, 14], вызывает электрическую поляризацию, сдвиг зарядов вдоль химических связей (появление воротного тока) в α -спиральных субъединицах белковой компоненты ионного канала. Согласно законам электричества, ток зарядов любой природы, независимо от причины, его вызывающей, сопровождается появлением магнитного поля в окружающей среде [12, 16, 21]. Индукция магнитного поля воротного тока, с учётом его конфигурации и локализации, параллельна оси ионного канала и определяется соотношением (10) [18, 19, 23]. Поскольку ионный канал статора АТФ-азы связывает экзоплазму и цитоплазму, т.е. зоны, характеризующиеся различным ионным составом и, следовательно, разностью электрических потенциалов, то в нём создаётся электрическое поле напряжённостью $\vec{E} = -\text{grad}\varphi$, направленной вдоль оси ионного канала [12, 16, 17, 21]. Внешнее устье ионного канала цитоплазматической FOF1 АТФ-азы расширяется на выходе в экзоплазму [4]. Поэтому магнитное поле воротного тока в ионном канале неоднородно - оно ослабевает в направлении к экзоплазме. В неоднородном магнитном поле на диамагнитные ионы действует сила, пропорциональная диамагнитной восприимчивости, направленная в сторону слабого поля. Таким образом, на положительно - заряженные диамагнитные ионы в каналах системы активного транспорта Na^+ , K^+ -АТФ-азы электрическая составляющая $q\vec{E}$ силы (23) оказывается направленной в сторону цитоплазмы, в то время как магнитная составляющая ориентирована противоположно - в сторону экзоплазмы. Поскольку ионы K^+ и гидрокомплексы Na^+ различаются электрическими и магнитными свойствами, то в ионном канале на них по-разному действуют электрическое и магнитное поля. Движение гидратированных диамагнитных ионов Na^+ против градиента концентрации в экзоплазму в системе активного транспорта Na^+ , K^+ -АТФ-азы может быть обусловлено тем, что магнитная составляющая силы (23) превосходит по величине противоположно направленную электрическую составляющую, в то время как ионы K^+ , в силу их свойства отрицательной гидратации испытывают сильное действие электрической составляющей, превосходящей магнитную, поэтому они движутся в цитоплазму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Согласно законам биоэнергетики, в истинных молекулярных моторах происходит преобразование энергии от внешних источников в промежуточные виды, используемые клетками для совершения работы. Мы рассмотрели возможный механизм этого процесса на конкретном примере - вращения ротора *Propionigenium modestum* и *Illobacter tartaricus*, а также вращения бактериальных жгутиков.

2. Высказывается предположение, что вращение ротора FOF1 Na^+ , K^+ -АТФ-синтазы обусловлено вращающим моментом, инициируемым силой Лоренца, магнитная составляющая которой создаётся магнитным полем статора. Многократность вращения без дополнительных источников энергии обеспечивается тем, что вращающий момент не уменьшается в течение времени, пока действуют внешние факторы.

3. Активный транспорт ионов H^+ или Na^+ , осуществляемый соответствующими АТФ-азами, обусловлен совокупностью нескольких факторов, из которых важнейшими являются: гидратация иона Na^+ , образующего комплексы ($Na^+ \cdot 2H_2O$), так и иона H^+ , образующий в водном окружении гидроксоний - ($H^+ \cdot H_2O$) или ($H^+ \cdot 4H_2O$). Гидрокомплексы ионов обладают более сильным диамагнетизмом, чем свободные ионы благодаря свойству аддитивности диамагнитной восприимчивости. Одновременно с этим, при гидратации происходит экранировка электрического заряда иона. Совокупность этих факторов приводит к снижению влияния электрического поля и вместе с тем, - к усилению выталкивающего действия неоднородного магнитного поля на гидрокомплекс иона в ионном канале. Ионы K^+ проявляют отрицательную гидратацию, вследствие чего они в водном окружении не гидратируются. Поэтому они сохраняют свой электрический заряд (незанированный) и вследствие отрицательной гидратации обладают слабым диамагнетизмом. Это приводит к тому, что электрическая составляющая силы (23) на них действует сильнее, чем магнитная составляющая, и они могут двигаться только в цитоплазму. Выход ионов натрия (или протонов) в экзоплазму, т.е. их движение против градиента концентрации обеспечивает увеличение трансмембранного потенциала, что приводит к восстановлению энергетического баланса клетки и вместе с тем свидетельствует о существовании равноправности протонной и натриевой биоэнергетики.

Список литературы / References:

1. Скулачев В.П. Законы биоэнергетики. СОЖ, МГУ им. Ломоносова, 1997, т. 01, с. 9-14. [Skulachov V.P. Bioenergetics laws. SOJ, MSU of Lomonosov, 1997, vol. 01, pp. 9-14. (In Russ.)]
2. Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-аза - вращающийся молекулярный мотор. УФН, 2010, т. 180, с. 931-956. [Romanovskiy Yu.M.,

- Tikhonov A.N. Molecular energy converters of living cells. Proton ATP-ase – a rotating molecular motor. *UFN*, 2010, vol. 180, pp. 931-956. (In Russ.)]
3. Kinosita K., Yasuda J.R., Noji H., Adachi K. A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2000, vol. 355(1396), pp. 473-489.
 4. Castillo J.P., Rui H., Basilio D., Das A., Roux B., Latorre R., Bezanilla F., Holmgren M. *Mechanism of potassium ion uptake by the Na(+)/K(+)-ATPase*. *Nat Commun.*, 2015, vol. 6, p. 7622.
 5. Скулачев В.П. *Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии*. М.: Высш. шк., 1989, 270 с. [Skulachev V.P. *Bioenergetics. Membrane energy converters*. Moscow: Visshaya shkola, 1989, 270 p. (In Russ.)]
 6. Kaim G. The Na⁺-translocating F₁F₀ ATP synthase of *Propionigenium modestum*: mechanochemical insights into the F₀ motor that drives ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2001, vol. 1505, iss. 1, pp. 94-107.
 7. Hakulinen J.K., Klyszeiko A.L., Hoffmann J., Eckardt-Strelau L. [et al.] Structural study on the architecture of the bacterial ATP synthase F motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109(30), pp. 357-359.
 8. Альтшулер С.А., Козырев Б.М. *Электронный парамагнитный резонанс*. М.: Наука, 1961, 672 с. [Altshuler S.A., Kozyrev B.M. *Electron paramagnetic resonance*. Moscow: Nauka, 1961, 672 p. (In Russ.)]
 9. Сликтер Ч. *Основы теории магнитного резонанса*. М.: Мир, 1981, 448 с. [Slikter C. *Bases of magnetic resonance theory*. Moscow: Mir, 1989, 448 p. (In Russ.)]
 10. Шестакова А.Н., Буторина А.В., Осадчий А.Е. Магнитоэнцефалография – новейший метод функционального картирования мозга человека. *Ж. экспериментальной психологии*, 2012, т. 5, № 2, с. 119-134. [Shestakova A.N., Butorina A.V., Osadchiy A.E. Magnetoencephalography - the newest method of functional mapping of the human brain. *J. of experimental psychology*, 2012, vol. 5, no. 2, pp. 119-134. (In Russ.)]
 11. Введенский В.Л., Ожогин В.И. *Сверхчувствительная магнитометрия*. М.: Наука, 1986, 199 с. [Vvedenskiy V.L., Ojogin V.I. *Supersensitive magnetometry*. Moscow: Nauka, 1986, 199 p. (In Russ.)]
 12. Парселл Э. *Электричество и магнетизм*. М.: Наука, 1965, 444 с. [Parcel E. *Electricity and magnetism*. Moscow: Nauka, 1965, 444 p. (In Russ.)]
 13. Hodgkin A.L., Huxley F.A. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiology*, 1974, vol. 117, no. 4, pp. 500-544.
 14. Bezanilla F., Armstrong C.M. Inactivation of the sodium channel. Sodium current experiments. *J. Gen. Physiol.*, 1977, vol. 70(5), pp. 549-66.
 15. Давыдов А.С. *Биология и квантовая механика*. М.: Наука, 1979, 296 с. [Davydov A.S. *Biology and quantum mechanics*. Moscow: Nauka, 1979, 296 p. (In Russ.)]
 16. Матвеев А.Н. *Электричество и магнетизм*. Лань, 2010, 464 с. [Matveyev A.N. *Electricity and magnetism*. Lan', 2010, 464 p.]
 17. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Электродинамика сплошных сред*. М.: Наука, 1982, 621 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Electrodynamics of Continuous Media*. Moscow: Nauka, 1982, 621 p. (In Russ.)]
 18. Malvankar N.S., Yalcin S.E., Tuominen M.T., Lovley D.R. Visualization of charge propagation along individual pili proteins using ambient electrostatic force microscopy. *Nature Nanotechnology Letters*, 2014, vol. 9, pp. 1012-1017.
 19. Waleed S.M., Jamal D.M., Starikov E.B., Cuniberti G. Electrical conductance in biological molecules. *Adv. Funct. Mater.*, 2010, pp. 1865-1883.
 20. Васильева-Вашакмадзе Н.С. О внутренней взаимосвязи между аллостерическим, мезомерным и индуктивным эффектами в α-спиральных белковых комплексах. *V Съезд Биофизиков России. Материалы*, 2015, т. 1, № 73, с. 153-156. [Vasilieva-Vashkamadze N.S. On the internal relationship between allosteric, mesomeric and inductive effects in α-helical protein complexes. *V Congress of Biophysicists of Russia. Materials*, 2015, vol. 1, no. 73, pp. 153-156. (In Russ.)]
 21. Сивухин Д.В. *Общий курс физики. III т.* М.: Наука, 1977, 704 с. [Sivuhin D.V. *General course of physics. Vol. III*. Moscow: Science, 1977, 704 p. (In Russ.)]
 22. Вихардполь Р. *Учение об электричестве*. М.: Физматгиз, 1962, 316 с. [Vihardpol R. *The study of electricity*. Moscow: Physmathgis., 1962, 316 p. (In Russ.)]
 23. Скулачев В.П. Электродвигатель бактерий. *СОЖ*, 1996, т. 9, с. 2-7. [Skulachov V.P. Bacterial electroengine. *SOJ*, 1996, vol. 9, pp. 2-7. (In Russ.)]
 24. Renui L. Stepwise formation of the bacterial flagellar system. *PNAS*, 2017, vol. 104, no. 17, pp. 7116-7121.
 25. Omoto C.K., Gibbons I.R., Kamiya D.R. Rotation of the Central Pair Microtubules in Eucaryotic Flagella. *Molec. Biology of the Cell.*, 1999, vol. 10, pp. 14-44.
 26. Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-аза – вращающийся молекулярный мотор. *УФН*, 2010, т. 180, с. 931-956. [Romanovskiy Yu. M., Tikhonov A.N. Molecular energy converters of living cells. Proton ATP-ase is a rotating molecular motor. *UFN*, 2010, vol. 180, pp. 931-956. (In Russ.)]
 27. Jensen R.B., Wang C.C., Shapiro L. Dynamic localization of proteins and due during a bacterial cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, vol. 3, pp. 167-176.
 28. Эрдеи-Груз Т.Н. *Явления переноса в водных растворах*. М.: Мир, 1976, 597 с. [Erdei-Hruz T.H. *Phenomena of transition in aquatic solution*. Moscow: Mir, 1976, 597 p. (In Russ.)]
 29. Прохоров А.М. *Энциклопедический словарь по физике*. М.: Сов. энциклопедия, 1983, 944 с. [Prokhorov A.M. *Encyclopedic vocabulary on physics*. Moscow: Soviet encyclopedia, 1983, 944 p. (In Russ.)]

30. Киттель Ч. *Физика твёрдого тела*. М.: Наука, 1967, 615 с. [Kittle C. *Physics of solid state*. Moscow: Nauka, 1967, 615 p. (In Russ.)]
31. Измаилов П.А. *Электрохимия растворов*. М.: Хим., 1976, 468 с. [Izmailov P.A. *Electrochemistry of solution*. Moscow: Chem., 1976, 468 p. (In Russ.)]
32. *Краткий справочник физико-химических величин*. Л.: Химия, ред. К.П. Мищенко, А.А. Равдель, 1987, 200 с. [*A brief reference book of physical and chemical quantities*. Leningrad: Chemistry, ed. K.P. Mishchenko, A.A. Ravdel, 1987, 200 p. (In Russ.)]
33. Желиговская Н.Н., Черняев И.И. *Химия координационных соединений*. М.: Высш. шк., 1966, 387 с. [Jeligoyskaya N.N., Chernyaev I.I. *Chemistry of coordinating substances*. Moscow: Vysshaya shkola, 1966, 387 p. (In Russ.)]

ABOUT MECHANISM OF MOTOR ROTATION OF FOF1 Na⁺-ATP SYNTHAZIS, BACTERIAL MOTOR AND MECHANISM ION PUMP OPERATION

Vasilieva-Vashakmadze N.S.

Engineering academy of Georgia

M. Kostava str., 77, building 8, Tbilisi, 10175, Georgia; e-mail: engacad@mail.ru, nonavas@rambler.ru

Abstract. In this paper, we propose a possible mechanism for the rotation of the molecular rotor by the example of FOF1 Na⁺-ATP-synthase *Propionigenium modestum*, the mechanism of the torque of bacterial flagella, and the work of the ion pump. It is shown that the mechanism of rotation of molecular rotors, the transfer of ions against the concentration gradient, is the same for both proton and sodium bioenergetics.

Key words: mechanism of molecular motors, the rotational torque of the ATP-synthase- rotor, the torque of the basal bodies of bacterial flagella, the mechanism of active ion transport.

ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛАККАЗЫ *TRAMETES VERSICOLOR* КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Бовт Е.А., Кравченко Е.М., Дорошкевич В.С., Одарюк И.Д., Баранова О.В.

ГОУ ВПО Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24. г. Донецк, 283001, ДНР; e-mail: bio-chem@mail.ru

Поступила в печать: 29.06.2018

Аннотация. В рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP рассчитаны геометрические, электронные и термодинамические характеристики молекул и катион-радикалов замещенных одно-, двух-, трехатомных фенолов. Определены кинетические параметры реакции лакказного окисления многоатомных фенолов, гидроксibenзойных кислот и аскорбиновой кислоты в цитратном буферном растворе pH = 4,6, 308 К. Активность лакказы *Trametes Versicolor* в реакции окисления фенолов сопоставлена с величинами потенциала ионизации изучаемых субстратов.

Ключевые слова: лакказа, фенолы, потенциал ионизации, спектрофотометрия, квантово-химические расчеты.

В настоящее время одной из актуальных проблем ферментативного катализа и биотехнологии является изучение каталитических свойств лакказ, выделенных из грибов [1, 2]. Известно, что эти ферменты эффективно разрушают лигнин, извлекая из растительных объектов низкомолекулярные вещества, обладающие в том числе и антиоксидантными свойствами. Лакказа (*n*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) относится к группе медьсодержащих оксидаз, катализирующих восстановление молекулярного кислорода до воды. В качестве восстановителей используются различные по природе соединения, которые выступают субстратами лакказы.

Лакказа *Trametes Versicolor*, находит широкое применение в самых разных технологических процессах, благодаря высокой удельной активности и относительно низкой субстратной специфичности [3]. Это значит, что число субстратов, которые фермент может использовать в качестве восстановителей кислорода, может определяться широким кругом органических веществ.

Окисление фенольных соединений лакказой может осуществляться по двум возможным механизмам НАТ (Hydrogen Atom Transfer) и PCET (Proton-Coupled Electron Transfer) [4]. Согласно первому механизму, происходит отрыв атома водорода как одновременный перенос электрона и протона с атомной орбитали (АО) на акцептор [5]. В тоже время возможен отрыв атома Н по второму пути, заключающийся в сопряженном переносе электрона и протона с разных АО замещенного фенола [4].

В зависимости от природы фенольного соединения и среды, в которой происходит окисление, возможна реализация как НАТ, так и PCET механизмов, а также их комбинация. Так как НАТ и PCET механизмы реализуются в одну стадию и приводят к одинаковым конечным продуктам, очень трудно их разделить и предсказать механизм реакции. С усовершенствованием вычислительной техники и разработкой новых неэмпирических методов, стало возможным количественное изучение механизмов сложных многостадийных реакций, в том числе и такого каталитического процесса, как окисление органических соединений фенольной природы молекулярным кислородом в присутствии лакказы *Trametes Versicolor*.

Целью данной работы является сопоставление рассчитанных квантово-химическим методом геометрических, электронных и термодинамических характеристик молекул, катион-радикалов и радикалов замещенных одно-, двух-, трехатомных фенолов с активностью лакказы *Trametes Versicolor*.

В качестве объектов исследования были выбраны одно-, двух- и трехатомные фенолы, а также их производные, представленные в таблице. Кинетику расходования многоатомных фенолов и накопления продуктов их лакказного окисления исследовали спектрофотометрическим методом на приборе SPECORD S300 UV VIS (Германия). Кинетические параметры ферментативного процесса (максимальная скорость реакции (V_{max} , $\text{мкМ}\cdot\text{с}^{-1}$), константа Михаэлиса – Ментен (K_m , мМ), каталитическая константа реакции (k_{cat} , с^{-1}), приведенная константа скорости реакции ($k_{cat}/K_m\cdot 10^4$, $(\text{М}\cdot\text{с})^{-1}$)) определяли из уравнения Михаэлиса – Ментен:

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E]_0[S]_0}{K_m + [S]_0},$$

где V_0 – начальная скорость, $\text{М}\cdot\text{с}^{-1}$; k_{cat} – эффективная каталитическая константа скорости процесса, с^{-1} ; K_m – константа Михаэлиса, М ; $[E]_0$ – начальная концентрация фермента, М ; $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, М . Для расчета k_{cat} использовали усредненное значение молекулярной массы лакказы – 67 кДа. Величины эффективных каталитических констант скорости реакции окисления субстратов представлены в таблице.

Методом DFT [6] с использованием гибридного функционала B3LYP/6-311G++ [7, 8] выполнены квантово-химические расчеты энтальпий образования молекул и катион-радикалов замещенных одно-, двух-, трехатомных фенолов. Минимизация геометрии осуществлялась методом квадратичного приближения

(quadratic approximation). Влияние растворителя (вода) учитывалось в рамках модели IEFPCM [9]. Все расчеты проведены в Gamess – US [9, 10], для визуализации использовался пакет Molden. Вычисления проводились в распараллеленном режиме с использованием Linux – кластера, состоящего из 8 рабочих станций.

Известно, что потенциал ионизации является одной из важнейших характеристик молекул, влияющий на их реакционную способность [11]. Потенциал ионизации PI_{PhOH} (кДж/моль) рассчитывали по формуле (1):

$$PI_{PhOH} = \Delta H_{(PhO^{\cdot+}H)}^0 - \Delta H_{(PhOH)}^0 \quad (1)$$

где $\Delta H_{(PhO^{\cdot+}H)}^0$ – стандартная теплота образования фенокисильного катион-радикала, кДж/моль; $\Delta H_{(PhOH)}^0$ – стандартная теплота образования молекулы фенола, кДж/моль. В таблице приведены потенциалы ионизации изучаемых соединений и некоторые кинетические параметры.

Значительный интерес представляет изучение взаимосвязи величин потенциалов ионизации и экспериментально полученной каталитической константой скорости k_{cat} лакказного окисления ряда исследуемых субстратов фермента (соединения 1-17 табл. 1). На рисунке приведена зависимость эффективной каталитической константы скорости k_{cat} лакказы *Trametes Versicolor* от потенциала ионизации PI производных гидрохинона (1-9).

Из рисунка 1 видно, что потенциалы ионизации и каталитические константы скорости в изучаемом ряду соединений связаны обратно пропорциональной корреляционной зависимостью с достаточно высоким значением коэффициента корреляции, равным 0,65. Очевидно, процесс окисления производных гидрохинона проходит по одинаковому механизму.

В тоже время для бензойных кислот, тролокса, флороглюцина, галловой и аскорбиновой кислот удовлетворительной корреляционной зависимости каталитической константы скорости от потенциала ионизации не выявлено. Это, вероятно, связано с тем, что гидроксibenзойные кислоты окисляются по механизму, отличающемуся от механизма окисления производных гидрохинона.

Также в эту корреляционную зависимость не попадают данные для соединений пирокатехинового ряда, что, очевидно, связано с проявлением орто-эффекта. Наличие установленных в данной работе корреляционных зависимостей представляет значительный интерес для изучения влияния молекулярной структуры на скорость реакции ферментативного окисления потенциальных субстратов лакказы.

Таблица 1. Расчетные значения потенциалов ионизации PI (кДж·моль⁻¹) и кинетических параметров реакции лакказного окисления

	Соединение	PI , кДж·моль ⁻¹	V_{max} , мкМ·с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	$k_{cat}/K_m \cdot 10^4$, (М·с) ⁻¹
1	Триметилгидрохинон	546			16,3	
2	2,3-дицианогидрохинон	631			16,0	
3	Метилгидрохинон	559	0,68	0,053	11,3 19,4	21,3
4	Гидрохинон	573	3,61	0,30	12,0	4,06
5	Третбутилгидрохинон	703			12,0	
6	Бромгидрохинон	590	0,61	0,057	10,1	17,7
7	Хлоргидрохин	596	0,77	0,082	12,9	15,7
8	2,5-дибромгидрохинон	604			9,8	
9	2,5-дихлоргидрохинон	616	1,08	0,21	18	8,6
10	Пирокатехин	593	6,50	0,73	21,7	2,95
11	Флороглюцин	608	0,50	0,17	1,66	0,97
12	Тролокс	530			13,7	
13	п-оксибензойная кислота	654	0,004	0,88	0,013	0,001
14	3,4-дигидроксibenзойная кислота	625	6,98	0,0018	23,4	130
15	2,5-дигидроксibenзойная кислота	598	4,35	0,0071	14,56	205
16	Аскорбиновая кислота	620	0,31	0,082	1,03	1,26
17	Галловая кислота	626	0,25	0,21	0,82	0,39

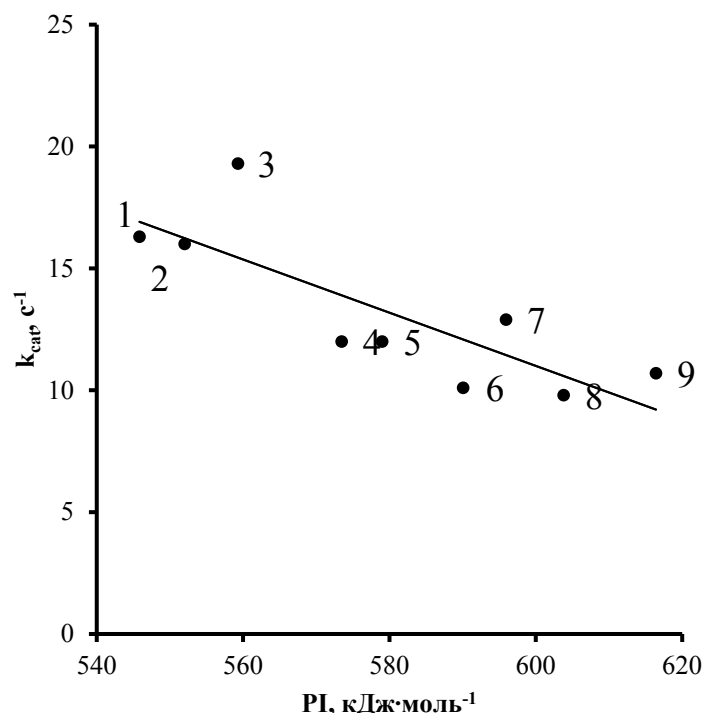


Рисунок 1. Корреляционная зависимость k_{cat} от потенциала ионизации PI для производных гидрохинона: 1 – триметилгидрохинон, 2 – 2,3-дицианогидрохинон, 3 – метилгидрохинон, 4 – гидрохинон, 5 – третбутилгидрохинон, 6 – бромгидрохинон, 7 – хлоргидрохинон, 8 – 2,5-дибромгидрохинон, 9 – 2,5-дихлоргидрохинон

Список литературы / References:

1. Морозова О.В. [и др.]. Лакказы-медиаторные системы и их использование: обзор. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2007, т. 43, с. 583-597. [Morozova O.V., Lakkaza-mediator systems and their use: a review. *Prikladnaya biochimia i mikrobiologia*, 2007, vol. 43, pp. 583-597. (In Russ.)]
2. Rodríguez-Delgado Gibrán M.M., José S.A.-N., Rodríguez-Delgado M. [et al.] Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, vol. 74, pp. 21-45.
3. Куликова Н.А., Кляйн О.И. [и др.] Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2011, т. 47, с. 619-634. [Kulikova N.A., Klein O.I. [et al.]. Use of basidiomycetes in technologies for processing and utilization of man-caused waste: fundamental and applied aspects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, pp. 619-634. (In Russ.)]
4. Sirjoosingh A., Hammes-Schiffer S. Sirjoosingh A. Proton-coupled electron transfer versus hydrogen atom transfer: generation of charge-localized diabatic states. *J. Phys. Chem. A*, 2011, vol. 115, pp. 2367-2377, DOI: 10.1021/jp111210c.
5. Hammes-Schiffer S. Proton-coupled electron transfer: Moving together and charging forward. *J. Am Chem. Soc.*, 2015, pp. 8860-8871, DOI: 10.1021/jacs.5b04087.
6. Burke K., Werschnik J., Gross E.K.U. Time-dependent density functional theory: Past, present, and future. *J. Chem. Phys.*, 2005, vol. 123, pp. 2206-2218.
7. Becke A.D. Densityfunctional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, 1993, vol. 98, pp. 5648-5652.
8. Lee C., Yang W., Parr R. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 1998, vol. 37, pp. 785-789.
9. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.*, 2005, vol. 105(8), pp. 2999-3094.
10. Young D. *Computational Chemistry*. Wiley-Interscience, 2001, 334 p.
11. Schmidt M.W. General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *J. Comput. Chem.*, 1993, vol. 14, pp. 1347-1363, DOI:10.1002/jcc.540141112.

EVALUATION OF ENZYMATIC ACTIVITY OF LACCASE FROM *TRAMETES VERSICOLOR*
BY QUANTUM-CHEMICAL METHODS

Bovt E.A., Kravchenko E.M., Doroshkevich V.S., Odaryuk I.D., Baranova O.V.

State Educational Institution of Higher Professional Education Donetsk National University

Universitetskaya str., 24. Donetsk, 283001; e-mail: bio-chem@mail.ru

Abstract. Geometric, electronic and thermochemical characteristics of molecules and cation-radicals of substituted mono-, di-, triatomic phenols have been calculated within the framework of the density functional theory (DFT) using the B3LYP hybrid functional. The kinetic parameters of the laccase oxidation reaction of polyatomic phenols and ascorbic acid in citrate buffer pH = 4,6, 308 K. The activity of laccase from *Trametes Versicolor* in the oxidation reaction of phenols is compared with the values of the ionization potential of the studied substrates.

Key words: laccase, phenols, ionization potential, spectrophotometry, quantum-chemical calculations.

КОНФОРМАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА VAL-GLU-PRO-ILE-PRO-TYR

Агаева Г.А.^{1,2}, Гасымова У.Б.²

¹Бакинский государственный университет
ул. 3.Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru

²Бакинский инженерный университет
Сумгаитское шоссе, 16 км, г. Баку, AZ-0101, Азербайджан

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Методом теоретического конформационного анализа были исследованы конформационные особенности иммуностимулирующего гексапептида Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, выделенного путем ферментативного расщепления из молекулы казеина человека. В результате расчетов были определены стабильные структуры молекулы в виде ограниченного набора низкоэнергетических конформаций. Было показано, что для этой молекулы энергетически наиболее предпочтительными оказались конформации, характеризующиеся компактно свернутой формой пептидного остова. Были определены величины двугранных углов основной и боковых цепей и оценены энергетические вклады внутри и межостаточных взаимодействий во всех оптимальных конформациях гексапептида. Сопоставление геометрических и энергетических параметров стабильных структур гексапептида позволило выявить конформационно подвижные и консервативные участки молекулы.

Ключевые слова: иммуностимулирующий гексапептид, фагоцитоз, конформация, теоретический конформационный анализ, подвижность.

Иммуностимулирующий гексапептид, соответствующий аминокислотной последовательности (59-64) молекулы казеина человека, Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, был впервые выделен путем ферментативного расщепления [1, 2]. После очистки, синтеза и биологического тестирования было показано, что этот гексапептид стимулирует фагоцитоз опсонизированных эритроцитов с помощью мышиных перитонеальных макрофагов. Внутривенное введение пептида взрослым мышам способствовало повышению сопротивляемости инфекции *Klebsiella pneumoniae*. Было также показано, что данный гексапептид способствует выделению оксида азота из нейтрофилов [3]. В свою очередь высокие концентрации оксида азота, которые возникают при этом процессе, вызывают цитотоксическое, антибактериальное, противовирусное, противогрибковое действие, а также активируют воспалительный процесс. Показано, что NO, вступая в реакцию с железо- и тиолсодержащими участками ферментов митохондриального дыхания, репликации ДНК инфекционных агентов, проявляет прямое бактерицидное действие. Он ингибирует многие вирусные протеиназы и факторы транскрипции, необходимые для вирусной репликации, а также усиливает противовирусный эффект интерферона- γ . Для изучения структурно-функциональных взаимосвязей молекулы иммуностимулирующего гексапептида, знание ее конформационного поведения в различных средах совершенно необходимо для определения механизма взаимодействия с одним типом различных рецепторов. С этой целью было проведено исследование пространственного строения молекулы гексапептида методом теоретического конформационного анализа на основе поэтапного фрагментарного подхода. На первом этапе исследования были исследованы конформационные особенности двух перекрывающихся по остатку изолейцина фрагментов – N-концевого тетрапептида и C-концевого трипептида. При расчете стабильных конформационных состояний гексапептида и его фрагментов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные вклады. Полярность среды была учтена путем введения определенной величины диэлектрической постоянной растворителя ($\epsilon = 10$). Для учета среды, имитирующей мембранное окружение величина диэлектрической проницаемости бралась равной 4, а энергия водородных связей и электростатических взаимодействий оценивались в полной мере. Длины связей и валентные углы пептидной группы и боковых цепей, а также торсионные потенциалы и величины барьеров вращения соответствуют значениям, предложенным Момани и др [4]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [5]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов ϕ , ψ и ω основной цепи и χ^i , боковых цепей. Углы ϕ и ψ основной цепи в конформациях находятся в низкоэнергетических областях стерической карты: R ($\phi, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$), B ($\phi = -180^\circ \div 0^\circ, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$), L ($\phi, \psi = 0^\circ \div 180^\circ$) и P ($\phi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R, B, L или P) значений углов ϕ и ψ . Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных пептидов и их фрагментов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (ϕ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R, B и L для каждого монопептида. Все формы основной цепи могут быть сгруппированы в два класса – шейпы e и f. Символом e обозначаются формы с развернутой основной цепью (BB, BR, RL, PR, LR, PL, LB и PP), а f – со свернутой (RR, RB, BL, BP, PB, LL, LP и PP).

Таблица 1. Величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы тетрапептида H-Val-Glu-Pro-Ile-C^a

N	Конформация	Шейп	Энергетический вклад различных типов взаимодействий атомов в потенциальную энергию тетрапептида (ккал/моль)				
			Е невал.взаим	Е эл.взаим	Е тор	Е общ	Е _{отн.}
1	R ₂ B ₃₂ B R ₂₂	fee	-13,3	3,9	1,1	-8,3	0
2	R ₂ B ₃₂ B R ₁₂		-12,3	3,8	1,6	-6,9	1,4
3	R ₂ B ₂₂ B R ₁₂		-12,6	3,8	2,5	-6,3	2
4	R ₃ B ₃₂ B R ₂₂		-10,9	3,8	1,5	-5,6	2,7
5	R ₂ B ₃₂ B R ₃₂		-9,7	4	1,1	-4,6	3,7
6	B ₂ B ₃₂ B R ₂₂	eee	-13	3,9	1,3	-7,8	0,5
7	B ₁ B ₃₂ B R ₂₂		-12,9	3,9	1,4	-7,5	0,8
8	B ₃ B ₃₂ B R ₂₂		-11,9	3,9	1,2	-6,8	1,5
9	B ₁ B ₃₂ B R ₁₂		-12,1	3,9	1,8	-6,5	1,8
10	B ₂ B ₃₂ B R ₁₂		-12	3,7	1,8	-6,5	1,8
11	R ₂ B ₁₂ R R ₂₂	fef	-10,9	5,3	1,3	-4,4	3,9
12	R ₂ B ₃₂ R R ₂₂		-10	4,6	1,1	-4,4	3,9
13	R ₂ B ₂₂ R R ₂₂		-10	5,1	1,1	-3,7	4,6
14	R ₂ B ₃₂ R R ₁₂		-8,6	4,6	1,5	-2,5	5,8
15	R ₂ B ₁₂ R R ₁₂		-9,4	5,3	1,9	-2,3	6
16	B ₂ B ₃₂ R R ₂₂	eef	-10	4,5	1,2	-4,3	4
17	B ₁ B ₃₂ R R ₂₂		-9,8	4,6	1,2	-4	4,3
18	B ₂ B ₁₂ R R ₂₂		-10,2	5	1,4	-3,8	4,5
19	B ₃ B ₃₂ R R ₂₂		-9,4	4,5	1,4	-3,8	4,5
20	B ₂ B ₂₂ R R ₂₂		-10,1	5,1	1,3	-3,8	4,5

Нумерация при форме цепи означает ориентацию боковой цепи: 1-60°, 2-180° и 3-(-60°). Отсчет двугранных углов вращения ϕ , ψ , ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [6]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [1, 7]. Геометрия аминокислот и система идентификаторов конформаций были взяты из работы [8].

Результаты конформационного исследования показали, что N-концевая тетрапептидная последовательность пептида является относительно подвижным участком и способным образовывать различные бета- и гамма-изгибы, благодаря наличию в цепи остатка пролина. В таблице 1 приведены величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы тетрапептида Val-Glu-Pro-Ile.

Исследование конформационных особенностей биологически активного C-концевого трипептида: Ile-Pro-Tyr проводилось на основе стабильных конформаций соответствующих монопептидов. Расчет показал, что для C-концевого трипептида энергетически предпочтительными оказались изгибные формы. Иными словами наличие остатка пролина, своеобразие циклического строения основной цепи которого приводит к изгибу цепи стабильных структур каждого фрагмента молекулы.

Таблица 2. Величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы трипептида H-Ile-Pro-Tyr-OH

N	Конформация	Шейп	Энергетический вклад различных типов взаимодействий атомов в потенциальную энергию трипептида (ккал/моль)				
			Е невал.вз	Е эл.взаим	Е тор	Е общ	Е _{относит}
1	B ₃₂ R B ₁₂	ef	-9,3	-1	1,8	-8,5	0
2	B ₃₂ R R ₃₂		-8	-1,9	1,6	-8,3	0,2
3	B ₁₂ R B ₁₂		-9,6	-1,1	2,5	-8,1	0,4
4	B ₁₂ R R ₃₂		-8,3	-1,7	2,6	-7,5	1
5	B ₃₂ B R ₃₂	ee	-7,2	-1,3	1,8	-6,7	1,8
6	B ₁₂ B R ₁₂		-6,6	-1,1	1,7	-6,1	2,4
7	B ₁₂ B B ₃₂		-7,9	-0,7	2,7	-5,9	2,6
8	B ₃₂ B B ₁₂		-6,4	-0,8	1,8	-5,4	3,1

Таблица 3. Двугранные углы (град) аминокислотных остатков молекулы гексапептида Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr в двух энергетически предпочтительных конформациях I - ($E_{\text{отн}} = 0,0$ ккал/моль), II - ($E_{\text{отн}} = 2,8$ ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		φ	ψ	ω	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4
Val ¹	I	-113	-65	182	179	181	179	-
	II	-116	135	180	179	181	179	-
Glu ²	I	-96	148	168	-60	180	88	-
	II	-63	150	173	-63	180	89	-
Pro ³	I	-60	-60	169	-	-	-	-
	II	-60	-50	179	-	-	-	-
Ile ⁴	I	-128	94	175	-57	185	173	188
	II	-91	124	177	-58	188	171	186
Pro ⁵	I	-60	-47	185	-	-	-	-
	II	-60	146	171	-	-	-	-
Tyr ⁶	I	-103	165	180	-54	90	180	-
	II	-140	-39	180	-64	99	180	-

В таблице 2 приведены величины энергетических вкладов различных типов взаимодействий в оптимальных конформациях молекулы трипептида Н-Ile-Pro-Tyr-ОН. Низкоэнергетические конформации пептидов отличаются в основном энергией дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки.

На втором этапе на основе стабильных конформаций тетрапептидного и трипептидного фрагментов были составлены и рассчитаны конформации для целого гексапептида. Практически самые низкоэнергетические конформации гексапептида отличаются друг от друга относительной стабильностью С-концевого трипептидного участка фрагмента. Расчет конформаций гексапептида позволяет сделать заключение, что эта молекула обладает заметной конформационной ограниченностью. Результаты конформационного анализа всей молекулы гексапептида выявили ограниченный набор его низкоэнергетических структур.

Как оказалось в свободном состоянии оптимальные конформации молекулы пептида отдают предпочтение формированию стабильного изгиба на участке Pro-Ile последовательности. Определение оптимальной конформационной динамики молекулы проводилось в поле стабильных конформационных состояний природной молекулы, что позволяет более конкретно оценить конформационные изменения при вариации ориентаций отдельных боковых цепей. Проведенное теоретическое исследование конформационных особенностей иммуностимулирующего гексапептида выявило конформационные аспекты их энергетической стабильности. По видимому, в зависимости от того в какой ориентации находится боковая цепь остатка в низкоэнергетической структуре могут стабилизироваться или дестабилизироваться предпочтительные межостаточные взаимодействия в этих конформациях.

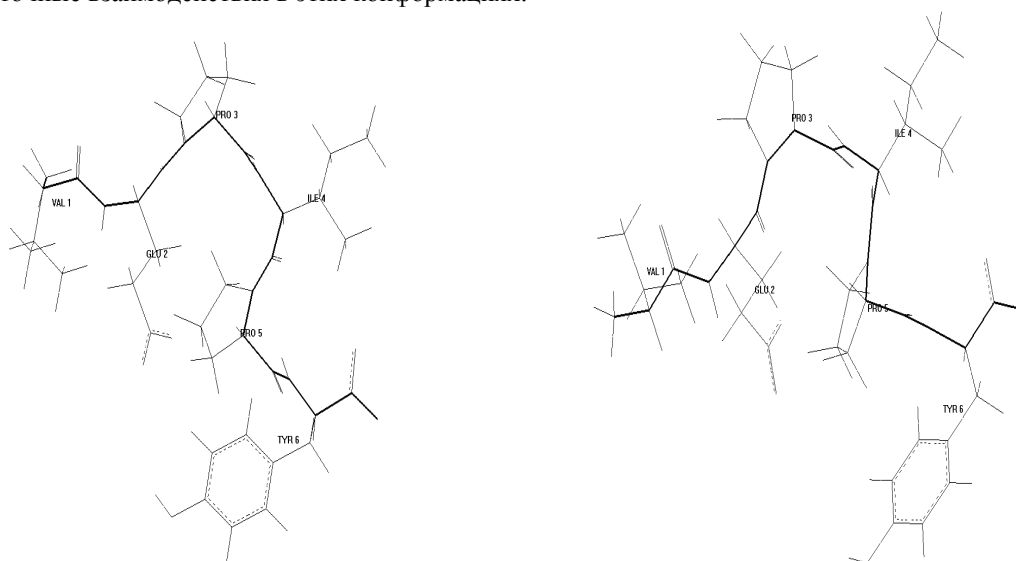


Рисунок 1. Проекция двух родственных конформационных состояний молекулы иммуностимулирующего гексапептида, построенных на величинах двугранных углов соответствующих структур (табл. 3)

В таблице 3 приведены геометрические параметры- величины двугранных углов основной и боковых цепей- двух энергетически наиболее предпочтительных структур молекулы иммуностимулирующего гексапептида. На рисунке приведены проекции двух родственных конформационных состояний молекулы иммуностимулирующего гексапептида, построенных на величинах двугранных углов соответствующих структур (табл. 3). Данное исследование выявило степень конформационной подвижности молекулы гексапептида.

Как видно в результате расчетов были определены похожие энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и одинаковое взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях гексапептида. Проведённое исследование показало, что иммуностимулирующий гексапептид в условиях полярной среды не реализует одно единственное пространственное строение, а формирует ограниченный набор низкоэнергетических конформаций с относительно жёстким С-концевым трипептидом и лабильным N-концом. Как показали расчеты в условиях, имитирующих мембранное окружение, возникает заметная дифференциация с еще большим энергетическим разрывом в пользу полусвернутой конформации гексапептида.

Список литературы / References:

1. Parker F., Migliore-samour D., Floc'h F., Zerial A., Werner G.H., Jollès J., Casaretto M., Zahn H., Jollès P., Immunostimulating hexapeptide from human casein : amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.*, 1984, vol. 45, pp. 677-682.
2. Jaziri M., Migliore-Samour D., Casabianca-Pignède M.-R., Keddad K., Morgat J.K., Jollès P. Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1992, vol. 1160, iss. 3, pp. 251-261
3. Rysz J., Redliński A., Mudyna J., Lucia M. Synthesis and immunomodulatory activity of novel analogues of human beta-casein fragment [54-59]. *Acta pol pharm.*, 2000, vol. 57, pp. 11-14.
4. Momany F., McGuire R., Burgess A., Scheraga H. Energy parameters in polypeptides. Geometric parameters, partial atomic charges, non bonded interaction for naturally occurring amino acid. *J. Phys. Chem.*, 1975, vol. 79, pp. 2361-2381.
5. Popov E.M. Quantative approach to conformations. *Int. J. Quantum Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737.
6. IUPAC-IUB Quantity. Units and Symbols in Physical Chemistry. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1988, vol. 39, 233 p.
7. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M The program for semiempirical calculation of conformations of the molecular complexes. *Russ. J. Struct. Khim.*, 1983, vol. 24, pp. 147-148.
8. Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M The spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Russ. Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 365-377.

CONFORMATIONAL BEHAVIOR OF IMMUNOSTIMULATING PEPTIDE

VAL-GLU-PRO-ILE-PRO-TYR

Agaeva G.A.^{1,2}, Qasimova H.B.²

¹Baku State University

Z. Khalilov str., 33, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

²Baku Engineering University

Sumqait Road, 16 km, AZ-0101, Baku, Azerbaijan

Abstract. By theoretical conformational analysis method have been investigated the conformational properties of immunostimulating hexapeptide, obtained from human casein by enzymatic digestion. Conformational analysis indicate that the spatial structure of hexapeptide can be described by set of low-energy conformations. It is shown that immunostimulating hexapeptide forms energetically favoured conformations with compact folded shapes of backbone. Calculations produced the values of all dihedral angles of the backbones and side chains and also intra- and inter-residue interactions energy contributions at the preferred conformations of hexapeptide. The comparison of the geometric and energetic parameters of stable conformations of hexapeptide permit to determine the conformational flexible and conservative segments of molecule.

Key words: immunostimulating hexapeptide, phagocytosis conformation, theoretical conformational analysis, flexibility.

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТЭКИНГ-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛАВИН-МОНО-НУКЛЕОТИДА С АЗОТИСТЫМИ ОСНОВАНИЯМИ ДНК

Мухина Ю.В.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Россия, 299053; e-mail: onica@rambler.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Исследован механизм взаимодействия флавин-моноклеотида (FMN) с азотистыми основаниями ДНК и с фрагментом ДНК. Полу- и неэмпирическими методами рассчитаны наиболее вероятные структуры комплексов FMN с основаниями, с парами оснований и с фрагментом ДНК. Определены структурные и термодинамические параметры комплексов FMN с парами оснований ДНК. Установлен вклад различных физико-химических сил взаимодействия в стабилизацию комплексов молекул. Сделаны выводы о молекулярном механизме взаимодействия FMN с основаниями ДНК.

Ключевые слова: флавин-моноклеотид, азотистые основания ДНК, полу- и неэмпирические методы, дисперсионное взаимодействие, интеркаляция.

В результате проведенных ранее исследований относительно механизмов медико-биологического действия ароматического витамина рибофлавина (RBF) и его производных (FMN и FAD), а так же его взаимодействия с ДНК, белками и ферментами клетки, выполненных различными методами, было предложено несколько возможных молекулярных механизмов, приводящих к проявлению биологического действия витамина. Так основной медико-биологический механизм воздействия FMN на функционирование клеток - участие в метаболизме в качестве кофермента в реакциях окисления и восстановления. Однако существует ряд свидетельств и о другом механизме действия: образование нековалентных гетерокомплексов с последующей в некоторых случаях химической деградацией БАС, а также конкурентное связывание с ДНК и флавоэнзимами. Известно об образовании комплексов между производными рибофлавина – FMN и FAD – с белком [1], о способности рибофлавина, в качестве простетических групп, образовывать устойчивые комплексы с апоферментами за счет гидрофобных или π - π взаимодействий между двумя идентичными ароматическими кольцами [2]. Было показано, что изоаллоксазоновый хромофор RBF способен встраиваться между параллельными плоскостями ароматических колец аминокислот тирозина и триптофана при его связывании с апоферментом куриного яичного белка [3]. Таким образом, можно предположить, что RBF способен взаимодействовать с ДНК по типу интеркаляционного или частично интеркаляционного связывания, и, следовательно, может являться конкурентом другим ароматическим лигандам за сайт связывания с рецепторами – ДНК и РНК в клетке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проведено исследование структурных и термодинамических особенностей комплексов витамина с азотистыми основаниями ДНК методом молекулярной механики, полу- и неэмпирическими методами, с использованием теории возмущений Меллера-Плессета второго порядка (MP2). Расчет пространственных структур комплексов был выполнен при помощи программ HyperChem и X-PLOR, водное окружение моделировали молекулами воды TIP3P, размещенными в кубическом боксе с ребром 35 Å, содержащем 1235 молекул воды. После чего, координаты атомов молекул в комплексах были использованы в качестве начального приближения для расчета точного распределения зарядовой плотности, дипольного момента, термодинамических параметров и оптимизации геометрических характеристик комплексов в вакууме с использованием программы неэмпирического расчета Gaussian 03W.

Для построения комплекса витамин - пара оснований использовалась прооптимизированная ранее структура молекулы FMN, структуры Уотсон-Криковских пар оснований (AT и GC) были взяты из банка данных кристаллической структуры ДНК B-формы.

Расчет ассоциатов FMN··(AT), FMN··(GC) был проведен исходя из идеализированной начальной геометрии: интеркалятор и пара оснований располагалась в параллельных плоскостях, отстоящих на расстоянии 3,4 Å, при этом главные оси систем были параллельны. В процессе расчета проводилась оптимизация полуэмпирическим методом вертикального расстояния между взаимодействующими молекулами, угла твист главных осей систем и смещения в плоскостях.

После получения оптимизированных комплексов был проведен расчет стабилизационной энергии взаимодействия методом MP2 с использованием базиса 6-31G* с диффузной функцией. Данный базис достаточно хорошо разработан для изучения образования стэкинг-кластеров, при этом диффузная d-функция важна для правильного описания атомов и слабых связей (например, водородных связей), для вычисления дипольного момента, поляризуемости и т.п. Это гауссианы с очень малыми экспонентами, медленно спадающими с увеличением расстояния от ядра. Диффузный гауссиан имеет обычно s- и p-тип, однако используются и другие диффузные функции. Установлено, что использование d-функции качественно

улучшает значение межмолекулярной корреляционной (дисперсионной) энергии. Это весьма существенно, поскольку известно, что дисперсионная энергия доминирует во вкладе в стабилизацию стэкинг-комплекса пар оснований и, как следствие, возможно обеспечивает основной вклад в стабилизацию интеркалятора в ДНК. Используемый для расчета неэмпирический метод MP2, основанный на теории функционала плотности, достаточно хорошо описывает не только электростатическую, поляризационную (индукционную) и дисперсионную энергии, но так же и эффект обмена зарядом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день известно, что при образовании интеркаляционного комплекса помимо вклада от дисперсионного (если ароматические полициклические системы обладают высокой поляризуемостью) и электростатического (при условии, что интеркалятор – высоко полярная или заряженная система) взаимодействий может давать вклад в стабилизацию комплекса так называемый «перенос заряда», если одна из взаимодействующих систем является хорошим электронным донором, другая – электронным акцептором. Charge-transfer комплекс определяется как донорно-акцепторный комплекс, характеризуемый электронным переходом в возбужденное состояние, в котором наблюдается частичный переход заряда от донора на акцептор. С целью установления являются ли исследуемые молекулы донорами или акцепторами электронов был произведен расчет энергий наивысшей занятой (HOMO – highest occupied molecular orbital) и наинизшей незанятой (LUMO – lowest unoccupied molecular orbital) молекулярных орбиталей.

Полученные значения энергий HOMO и LUMO (табл. 1) свидетельствуют о том, что основания ДНК являются хорошими электронными донорами, лучшим среди которых является гуанин, при этом, малая энергия LUMO для молекулы FMN, по сравнению с азотистыми основаниями, указывает на то, что FMN является акцептором электронов. Сделанный вывод свидетельствует о возможности дополнительной стабилизации стэкинг-ассоциата FMN-основание за счет обмена зарядом в донорно-акцепторном комплексе.

Произведенный расчет дипольных моментов (табл. 2) всех исследуемых в работе молекул и распределения атомарного заряда на них, после оптимизации геометрических характеристик, позволил предположить возможную ориентацию хромофоров флавин-моноклеотида и азотистых оснований в комплексах, учитывая взаимодействие электрических диполей.

В результате проведенных расчетов структур комплексов, используя различные стартовые конфигурации, при минимизации потенциальной энергии молекулярной системы получено значительное количество структур с различными конформационными параметрами. Далее был проведен отбор низкоэнергетических структур, причем, необходимо отметить, что геометрия таких оптимизированных структур в большинстве случаев была мало чувствительна к условиям внешней среды, так что введение водного окружения несущественно изменяет конформацию комплекса в сравнении со структурами, полученными в вакууме.

Полученные координаты атомов молекул в комплексе с использованием метода молекулярной механики были использованы в качестве начального приближения для оптимизации геометрических характеристик молекул в вакууме и для дальнейшего расчета энергетических характеристик, дипольного момента с использованием программы неэмпирического расчета Gaussian 03W.

При оптимизации структур была осуществлена минимизация общей потенциальной энергии молекулярных систем, при этом определены энергетические параметры с помощью неэмпирического метода HF, результаты расчетов представлены в таблице 3.

Таблица 1. Значения энергий HOMO и LUMO для азотистых оснований и FMN

Молекула	EHOMO, эВ	ELUMO, эВ
ADE	-8,64	3,25
THY	-9,48	2,30
GUA	-8,27	3,72
CYT	-9,24	2,84
FMN	-8,41	0,33

Таблица 2. Дипольный момент молекул в проекциях на оси координат и общий дипольный момент D, дебай

Молекула	Dx	Dy	Dz	D
ADE	-1,86	1,79	0	2,58
THY	-4,19	-3,20	0	5,27
GUA	3,31	-6,71	0	7,49
CYT	5,48	-5,82	0	7,99
FMN	-5,09	10,09	-0,37	11,31

Таблица 3. Энергетические параметры молекулярных систем*

Система	- E _{total} , ккал/моль	- H, ккал/моль	D, дебай
FMN-ADE	165826	35	5
FMN-GUA	172566	43	10
FMN-CYT	162362	71	11
FMN-THY	168483	118	9

*Примечание: Представленные параметры можно использовать только для сравнения с системами, рассчитанными тем же методом

Полученные приблизительно одинаковые значения для полной энергии, согласуются со схожей пространственной геометрией комплексов (рис. 1), при этом, более низкая энергия для системы FMN-GUA, возможно связана с максимальным перекрытием колец молекул в данном ассоциате, как следствие большего вклада от дисперсионного взаимодействия, а также большего вклада в общую стабилизационную энергию от эффекта обмена зарядом ввиду того, что GUA по сравнению с другими азотистыми основаниями обладает более выраженными электроно-донорными свойствами.

Отрицательные значения теплоты образования комплексов свидетельствуют об экзотермическом характере ассоциации, следовательно, процесс комплексообразования является термодинамически выгодным.

Анализ полученных пространственных структур комплексов FMN-ADE, FMN-GUA, FMN-CYT и FMN-THY, соответствующих минимальной потенциальной энергии, позволяет сделать следующие выводы: полученные низкоэнергетические структуры для всех 4 исследованных комплексов соответствуют противоположной ориентации электрических диполей, что в свою очередь, согласуется с равновесной ориентацией диполей в пространстве; все ассоциаты характеризуются параллельным расположением хромофоров взаимодействующих молекул, отстоящих друг от друга на расстоянии 3,4 Å, что свидетельствует о преобладающем дисперсионном взаимодействии ароматических (и частично ароматических) систем.

Отрицательные значения теплоты образования комплексов свидетельствуют об экзотермическом характере ассоциации, а следовательно, процесс комплексообразования является термодинамически выгодным.

Анализ структуры комплекса FMN – пара оснований ДНК. Для построения комплекса витамин - пара оснований использовалась прооптимизированная ранее структура молекулы FMN, структуры Уотсон-Криковских пар оснований (АТ и GC) были взяты из банка данных кристаллической структуры ДНК В-формы. С целью проведения детального анализа структур образующихся комплексов в работе была исследована зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от вертикального расстояния между взаимодействующими системами в области от 3,2 до 3,6 Å и более детально в области 3,3-3,4 Å. Полученные структуры комплексов представлены на рисунке 2 и соответствующие примененному методу расчета значения энергии стэкинг-взаимодействия E представлены в таблице 4.

На рисунках 3 и 4 представлены 3 кривые зависимости энергии стэкинг-взаимодействия, полученные при изменении расстояния между FMN и парой оснований с помощью MP2, HF и B3LYP расчетных методов. Как видно, MP2 и B3LYP методы позволяют достаточно точно описать поведение энергии взаимодействия от расстояния и имеют схожий вид с выявлением минимума на потенциальной кривой, соответствующий расстоянию 3,38 Å, которое практически совпадает с равновесным расстоянием в комплексе ароматических систем в кристалле.

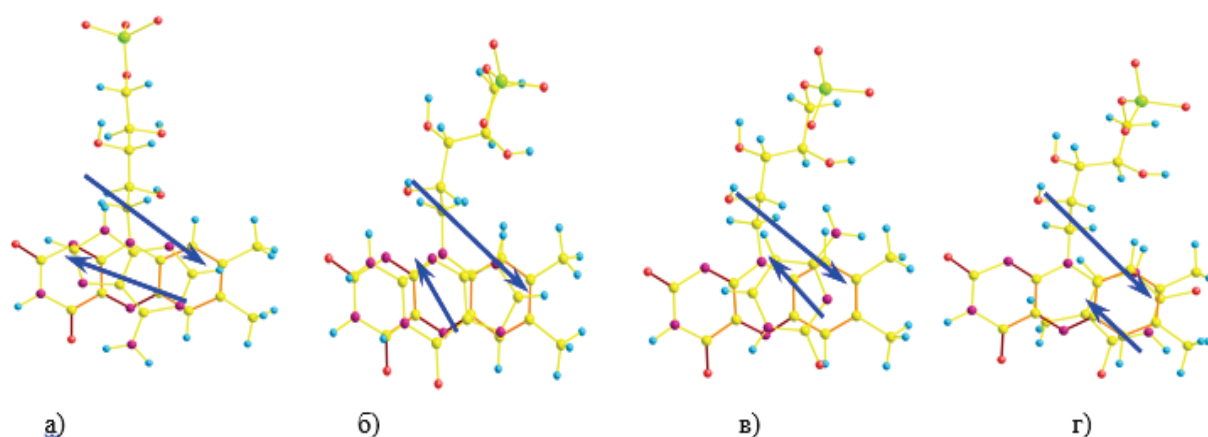


Рисунок 1. Расчетные структуры 1:1 комплексов с указанием диполей взаимодействующих молекул:
а) FMN-аденин, б) FMN-гуанин, в) FMN-цитозин, г) FMN-тимин

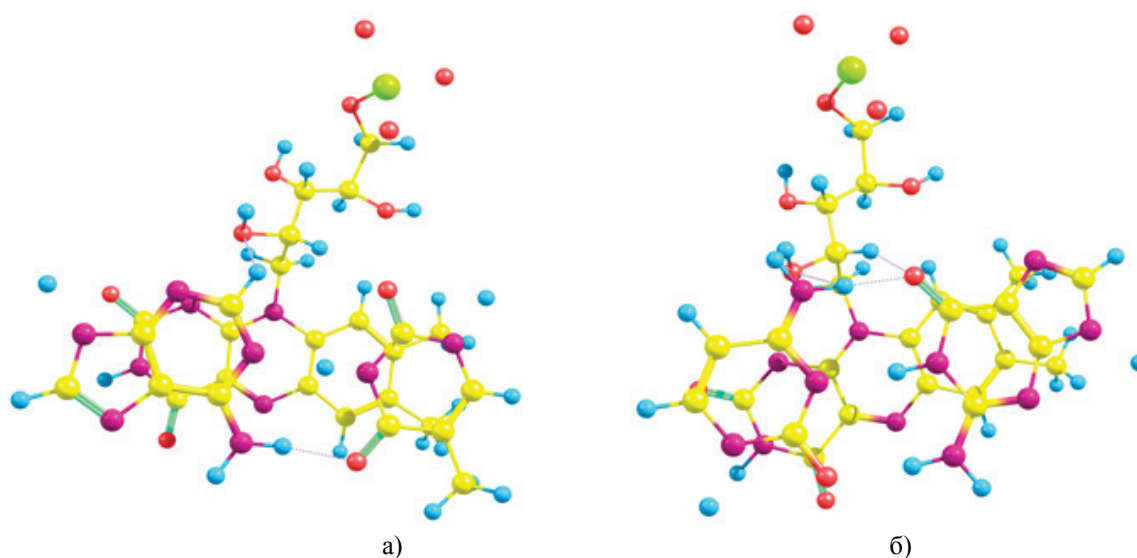


Рисунок 2. Структуры комплексов: а) FMN-AT, б) FMN-GC

Таблица 4. Энергия стэкинг-взаимодействия E , ккал/моль

Метод	MP2, -E, ккал/ моль		B3LYP, -E, ккал/моль		HF, -E, ккал/ моль	
Расстояние, г, Å	FMN-AT	FMN-GC	FMN-AT	FMN-GC	FMN-AT	FMN-GC
3,20	15,87	14,97	16,15	14	0,13	0,87
3,30	16,92	15,83	16,92	14,5	1,25	1,46
3,38	18,10	18,28	17,30	15,36	1,27	1,47
3,40	17,99	18,20	17,23	15,33	1,27	1,47
3,50	17,11	17,32	17,08	15,0	1,5	2,5
3,60	16,25	16,0	15,7	13,72	4,0	3,7

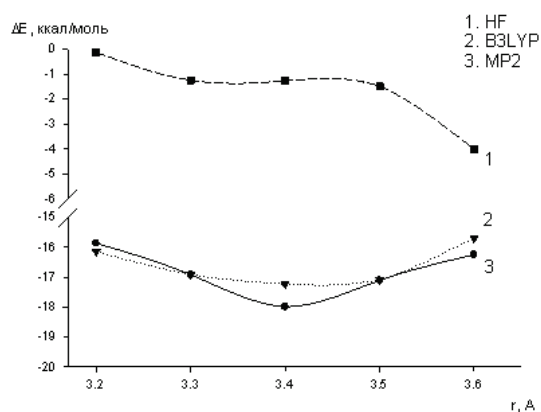


Рисунок 3. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от расстояния FMN-AT

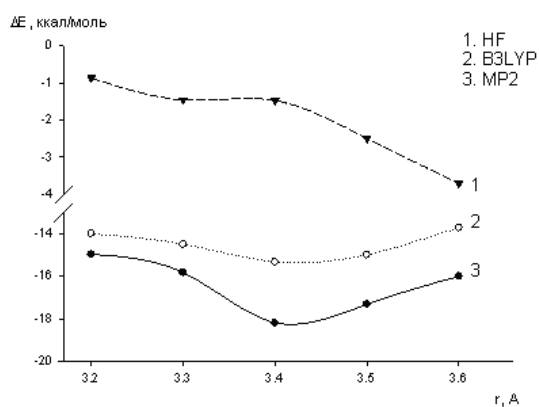


Рисунок 4. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от расстояния FMN-GC

Метод HF позволяет получить отличную от описанных выше методов форму потенциальной кривой, которая при этом не имеет выраженного минимума, что, в свою очередь, указывает на ограничение использования данного метода для точного описания интеркаляционного процесса.

Ситуация с ассоциатом FMN $\cdots$ (GC) парой, как видно из рис. 4, является схожей, некоторое отличие в энергиях взаимодействия обусловлено различием энергии образования AT и GC пар, поскольку структура их комплексов с FMN аналогична.

Известно, что интеркалятор может занимать различные ориентации по отношению к соседней паре оснований в сайте связывания. Некоторые молекулы встраиваются перпендикулярно паре оснований, при этом часть молекулы располагается в канавке, в то время как другие располагаются вдоль C4-C2 оси пары оснований. Известно, что ориентация интеркалятора определяется как электростатическими силами, так и стерическими эффектами, поскольку данные ароматические молекулы часто имеют громоздкие боковые группы.

Таким образом, далее в работе был проведен расчет зависимости энергии стэкинг-взаимодействия (E) от угла твист в образуемых комплексах с использованием тех же методов, какие были выбраны для расчета зависимости энергии от вертикального расстояния.

При расчете была задана начальная ориентация таким образом, чтобы ось молекулы витамина C13-C2 была параллельна оси пары оснований C4-C2, при этом центры масс пары оснований и ароматического хромофора витамина располагались друг под другом. Вертикальная дистанция была задана 3,38 Å, соответствующая минимуму на потенциальной кривой, при этом две взаимодействующие системы располагались копланарно. Начиная с указанной исходной геометрии в дальнейших расчетах производился поворот (скручивание) взаимодействующих систем вдоль оси димера интеркалятор – пара оснований, проходящей вдоль центра масс обеих подсистем. Начальная геометрия соответствовала углу твист 0°, расчет зависимости энергии стэкинг-взаимодействия от угла проводился во всей области от 0° до 360° с шагом 60°. Полученные результаты представлены в таблице 5.

На рисунках 5 и 6 представлены зависимости энергии от угла поворота, полученные с использованием MP2 и B3LYP методов для двух исследуемых комплексов.

Анализ зависимостей позволяет сделать вывод, что энергия стэкинг-взаимодействия в значительной степени зависит от угла интеркаляции ароматической молекулы и претерпевает изменение в 5 ккал/моль при повороте молекулы. Полученный вид зависимости указывает на существенный вклад дисперсионного взаимодействия, которое пропорционально геометрическому перекрытию ароматических систем.

Таблица 5. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействия от угла поворота

Метод	MP2		B3LYP	
	-E, ккал/моль		-E, ккал/моль	
Угол, α, °	FMN-AT	FMN-GC	FMN-AT	FMN-GC
0°	18,1	18,28	17,3	15,3
60°	16,2	13,6	15	14,4
120°	15,03	13	14,6	13,9
180°	19,2	15,9	20,2	19,3
240°	15,0	12,8	14,3	13,3
300°	15,87	13,4	14,7	14
360°	18,1	18,28	17,3	15,3

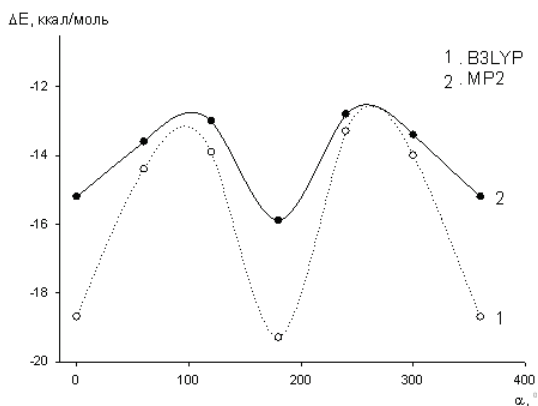


Рисунок 5. Зависимость энергии от угла поворота для FMN-AT пары

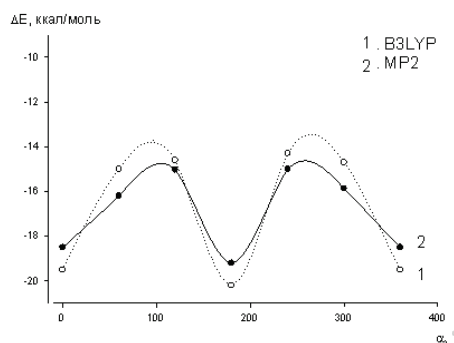


Рисунок 6. Зависимость энергии от угла поворота для FMN -GC пары

Видно, что как и в предыдущих расчетах, MP2 и B3LYP методы достаточно однозначно описывают поведение энергии в зависимости от угла взаимного поворота осей взаимодействующих систем, а метод HF (на рисунках 5, 6 не представлен), не учитывающий корректно дисперсионный вклад в общую энергию, не позволяет адекватно описать поведение потенциальной кривой.

Полученные зависимости энергии стабилизации E от расстояния и угла скручивания свидетельствуют о значительном вкладе дисперсионной энергии в стабилизацию исследуемых комплексов.

Расчет интеркаляционного комплекса FMN – динуклеотид ДНК. Для корректного теоретического описания FMN – ДНК комплекса необходимо применять ab-initio квантово-механический подход. Однако размер ассоциата ДНК - интеркалятор обычно ограничивает использование квантово-механических методов и приводит к необходимости использования эмпирического метода молекулярной механики. Этот метод не содержит индукционного вклада и эффекта обмена зарядом, также неточно ведет расчет дисперсионной энергии, однако возможно произвести приблизительный расчет стабилизационной энергии.

В данной работе метод молекулярной механики применялся лишь для получения начального приближения геометрии комплексов FMN-d(AA), FMN-d(GG), FMN-d(AG), для построения которых использовалась оптимизированная ранее структура молекулы витамина, динуклеотидный сайт двойной спирали ДНК В-формы был взят из кристаллической базы данных.

После получения начального приближения более точный расчет структуры проводился с использованием полуэмпирического метода AM1, при этом полученная геометрия комплекса была использована в дальнейших расчетах неэмпирическим методом MP2 с целью учета всех вкладов в энергию взаимодействия.

В работе была выбрана минимальная модель - динуклеотидный сайт связывания с целью возможности проведения расчета высоко точным методом MP2, при этом данная минимальная модель сайта связывания позволяет провести всесторонний анализ интеркаляционного комплекса.

При расчете оба фосфатных остатка были протонированы с целью уменьшить электростатический заряд фосфатной группы аналогично присутствию положительно заряженных противоионов натрия.

На рисунке 7 представлены полученные структуры комплексов с минимальной потенциальной энергией.

Стабилизационная энергия была определена как разность энергий комплекса молекул и его компонент и представлена в таблице 6.

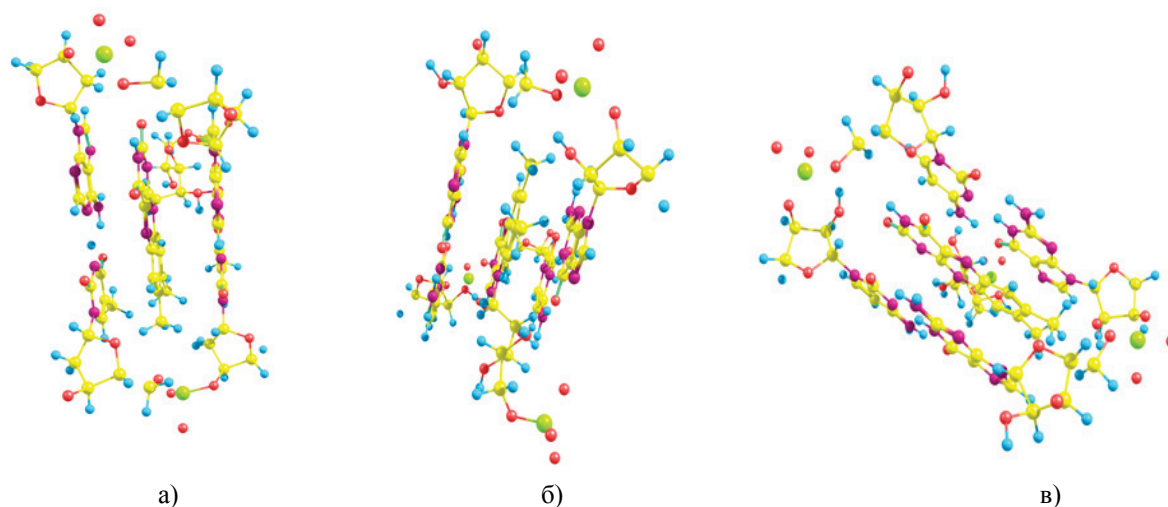


Рисунок 7. Структуры комплексов а) FMN-AA, б) FMN-GG, в) FMN-AG

Таблица 6. Стабилизационная энергия комплексов FMN – d(AA), FMN – d(GG), FMN – (AG)

Метод	MP2	B3LYP	HF
Комплекс	ΔE , ккал/ моль	ΔE , ккал/ моль	ΔE , ккал/ моль
FMN-d(AA)	-38,5	10,7	7,6
FMN-d(GG)	-37,1	11,2	4,2
FMN-(AG)	-36,7	12,0	1,8

Анализ полученных значений энергий взаимодействия полностью подтверждает сделанный ранее вывод о специфике выбора расчетного метода в соответствии поставленной задаче. Так метод функционала плотности MP2 наиболее точно произвел расчет стабилизационной энергии, в отличие от методов HF и B3LYP, что подтверждает нежелательное использование данных методов для описания процессов, включающих дисперсионное взаимодействие.

Расчетные структуры комплексов интеркалятор – динуклеотидный сайт ДНК (рис. 7) свидетельствуют о схожем характере интеркаляции ароматического хромофора молекулы FMN: так все полученные комплексы характеризуются копланарным расположением пар оснований и FMN на расстоянии 3,8 Å. При таком расположении достигается минимальная стабилизационная энергия ввиду максимального перекрытия ароматических систем и, как следствие, максимального вклада дисперсионных сил взаимодействия в стабилизацию комплекса.

Был также произведен расчет энергии при различном угле твист между главными осями взаимодействующих систем, при этом наблюдалось значительное увеличение энергии на 9 ккал/моль при изменении угла на 30°. Однако, ввиду наличия у молекулы FMN достаточно массивной боковой цепи расчет проводился в области от -60° до 60°, при этом минимум на потенциальной кривой энергии достигался при 20° между осями соседних пар оснований и FMN. При этом боковая цепь молекулы FMN, которая из-за наличия заряда является гидрофильной, ориентирована по центру большой канавки и таким образом возможно ее взаимодействие с молекулами воды.

Все полученные структуры характеризуются раздвижением пар оснований до расстояния 6,5 Å. Конечный комплекс становится более жестким, при этом как ДНК, так и интеркалятор теряют свою трансляционную и вращательную степени свободы.

Список литературы / References:

1. Davies D.B., Veselkov D.A., Djimant L.N., Veselkov A.N. Hetero-association of caffeine and aromatic drugs and their competitive binding with a DNA oligomer. *Eur. Biophys. J.*, 2001, vol. 30, pp. 354-366.
2. Lubas B., Soltysik M. Proton NMR study of the interaction of riboflavin with the egg-yolk apoprotein. *FEBS Letters.*, 1977, vol. 79, no. 1, pp. 179-182.
3. Monaco H.L. Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, no. 7, pp. 1475-1483.

MODELING the STACKING INTERACTIONS of FLAVIN-MONONUCLEOTIDE WITH the NITROGENOUS BASES of DNA

Mukhina U.V.

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053; e-mail: onica@rambler.ru

Abstract. The mechanism of the interaction flavin-mononucleotide (FMN) with bases DNA and with fragment DNA were explored. The most probable structures complex FMN with bases, with pair of the bases and with fragment DNA have been calculated by means of semi- and nonempirical methods. Structures and thermodynamic parameters of complex FMN with pair of the bases DNA have been determined. The contribution of different physical-chemical forces of the interaction in stabilization complexes of molecules has been installed. Conclusion about molecular mechanism of the interaction FMN with bases DNA has been made.

Key words: flavin-mononucleotide, bases DNK, semi- and nonempirical methods, dispersion interaction, intercalation.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДВУХ ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДОВ МОЗГА MIF-1 И TYR-MIF-1

Агаева Г.А.^{1,2}, Бабаева М.Н.²

¹Бакинский государственный университет

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

²Бакинский инженерный университет

Сумгаитское шоссе, 16 км, г. Баку, AZ-0101, Азербайджан

Поступила в редакцию: 02.07.2018

Аннотация. Пространственное строение и конформационные особенности двух эндогенных пептидов меланостатина (MIF-1, ингибирующий фактор меланоцитстимулирующего гормона) и Tyr-MIF-1 [Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂] были исследованы методом теоретического конформационного анализа. Как показал расчет пространственное строение молекул можно описать в виде ограниченного набора низкоэнергетических конформаций. Было показано, что для данных родственных молекул энергетически наиболее предпочтительными оказались конформации, характеризующиеся квазициклической структурой. Для каждой оптимальной конформации были определены величины двугранных углов основной и боковых цепей и оценены энергетические вклады внутри и межостаточных взаимодействий во всех оптимальных конформациях пептидов. Сопоставление геометрических и энергетических параметров стабильных структур двух пептидов мозга позволило выявить конформационно подвижные и консервативные участки молекул.

Ключевые слова: меланостатин (MIF-1, ингибирующий фактор меланоцитстимулирующего гормона), Tyr-MIF-1 [Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂], конформация, теоретический конформационный анализ.

Молекула MIF-1 является эндогенным трипептидом мозга с аминокислотной последовательностью Pro-Leu-Gly-NH₂ (PLG). Этот трипептид называют ингибирующим фактором меланоцитстимулирующего гормона, меланостатином. Большим количеством исследований было показано, что эта молекула проявляет разнообразные фармакологические эффекты в центральной нервной системе. Так, данный трипептид обладает терапевтическим потенциалом в лечении болезни Паркинсона и депрессии [1-4]. Было показано, для 50 % деградация данной молекулы в плазме крови человека происходит в течение пяти дней. Такая молекулярная устойчивость трипептида объясняется его молекулярным строением и делает его потенциальным терапевтическим агентом для человека. Помимо прочего MIF-1 проявляет антиопиоидную активность против действия морфина и энкефалина. Однако механизм клеточного действия данной молекулы не выяснен. Молекулярная устойчивость трипептида безусловно связан с его конформационными особенностями [4]. Другая родственная молекула Tyr-MIF-1 является эндогенным пептидом мозга с антиопиоидной активностью, который взаимодействует с допамиnergической и ГАМК-ергической системами. Он влияет на гастроинтестинальную активность. Внутривенное введение ланного тетрапептида стимулирует моторику гастроинтестинального тракта, связанную с участием допаминовых и холецистокининовых рецепторов. Было показано, этот тетрапептид также проявляет существенную антиопиоидную активность и даже продолжительнее чем другие опиатные молекулы связывается с опиатными рецепторами [5]. Как оказалось молекулы MIF-1 и Tyr-MIF-1 активны на животных моделях депрессии и болезни Паркинсона и у пациентов с этими расстройствами. Оба этих небольших пептида обладают способностью модулировать опиоиды, включая антиопиоидные действия. Конформационную модель для молекулы MIF-1, полученную методом обычной одномерной и двумерной (COZY и NOESY) 1H-спектроскопии ядерного магнитного резонанса на частоте 300 МГц. [6], охарактеризовали сближенностью аминокислотных групп пролильной части MIF-1 с N-концевым атомом кислорода глицинамида. Конформационные возможности Tyr-MIF-1 в водном растворе также были изучены методом 1H спектроскопии ЯМР и было обнаружено, что молекула медленно обменивается между двумя конформерами, вероятно, определяемыми цис-и-транс-состояниями остатка пролина. В основной конформации ароматическое кольцо тирозина достаточно близко для непосредственного взаимодействия с пролин-пирролидиновым кольцом [6]. Совместное теоретическое конформационное исследование этих двух природных пептидов мозга с одинаковой биологической активностью позволит выделить структурные критерии, необходимые для их функционирования и может способствовать созданию более эффективных аналогов в качестве потенциальных лекарственных препаратов. Учитывая некоторую неоднозначность и ограниченность результатов экспериментальных методов, особую актуальность приобретает задача конформационного исследования биологически испытанных пептидов и моделирования их антагонистов теоретическим расчетным методом. В настоящей работе проведено теоретическое моделирование конформационных особенностей молекул MIF-1 и Tyr-MIF-1, на основе знания энергетически предпочтительных пространственных структур природных пептидов методом теоретического конформационного анализа. Сходство выполняемых функций молекул MIF-1 и Tyr-MIF-1 и их аминокислотных последовательностей предполагает также сходство конформационных свойств и одинаковый механизм действия.

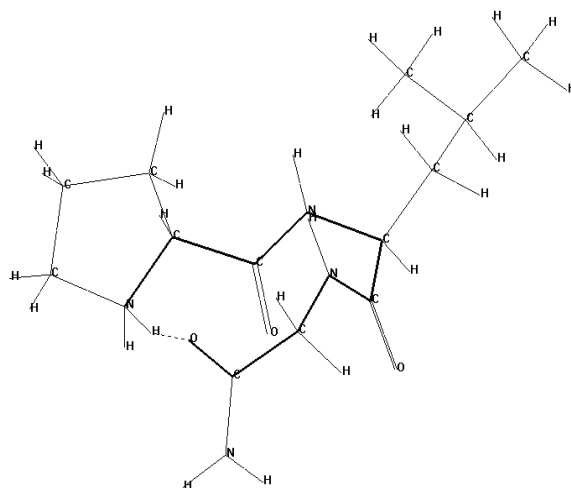


Рисунок 1. Проекция наиболее низкоэнергетической конформации молекулы Pro-Leu-GlyNH₂ (жирной линией показан пептидный остов молекулы)

Для определения механизма действия двух структурно похожих пептидов мозга с похожей активностью необходимо сопоставление их конформационных параметров, полученных одним и тем же методом. Поэтому становится важным определение пространственной организации этих молекул одним теоретическим расчетным методом. В данной статье приведены результаты исследования пространственного строения молекул MIF-1 и Tug-MIF-1, а также сопоставление их конформационных особенностей. В конформационном расчете пептидов учитывали энергетические вклады невалентных и электростатических взаимодействий, водородных связей и торсионных потенциалов.

Под формой основной цепи молекулы подразумевается последовательность форм остатков, определяемых низкоэнергетическими областями R ($\varphi = -180^{\circ}-0^{\circ}$, $\psi = -180^{\circ}-0^{\circ}$), B ($\varphi = -180^{\circ}-0^{\circ}$, $\psi = 0^{\circ}-180^{\circ}$), L ($\varphi = 0^{\circ}-180^{\circ}$, $\psi = 0^{\circ}-180^{\circ}$) и P ($\varphi = 0^{\circ}-180^{\circ}$, $\psi = -180^{\circ}-0^{\circ}$) на конформационной карте по двугранным углам основной цепи φ - ψ . Разнообразные формы, в свою очередь, распределены по шейпам пептидного остова, определяющим направленность хода основной цепи – шейпы e и f [7]. В расчетах были использованы программа и техника расчета [8], разработанные и примененные авторами в работе [9]. В качестве начальных приближений при расчете конформаций отдельных молекул послужили известные значения двугранных углов, соответствующих низкоэнергетическим состояниям монопептидов. Отсчет двугранных углов проводился согласно общепринятой номенклатуре [10].

Полученные расчетные низкоэнергетические структуры молекул MIF-1 и Tug-MIF-1 были представлены в виде отдельных семейств конформаций, различающихся между собой формой основной цепи, а внутри каждого семейства – положением первого остатка. Как известно, при параметризации силовых полей пептидных молекул наибольшее значение, как известно, придается возможности точного расчета разности энергий конформеров. Энергетически предпочтительное и многочисленное семейство составляют структуры, содержащие изгиб цепи на участке остатков, расположенных в позициях 2-3.

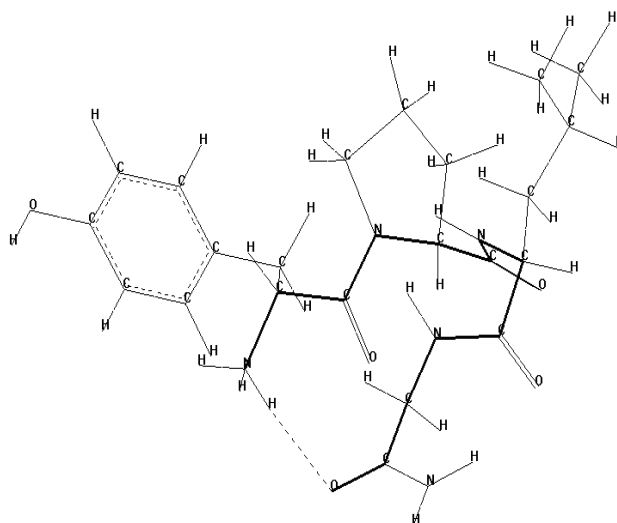


Рисунок 2. Проекция энергетически наиболее предпочтительной конформации молекулы Tug-Pro-Leu-GlyNH₂ (жирной линией показан пептидный остов молекулы)

Таблица 1. Величины двугранных углов (град) трипептида Pro-Leu-GLyNH₂ в низкоэнергетических конформациях для шейпа ff.

I. RR₃₃B (E_{отн} = 0 ккал/моль)

II. RR₃₂R (E_{отн} = 1,1 ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		φ	ψ	ω	χ ₁	χ ₂	χ ₃	χ ₄
Pro ¹	I	-60	-56	181	-	-	-	-
	II	-60	-56	179	-	-	-	-
Leu ²	I	-97	-58	182	-51	-58	185	180
	II	-93	-58	185	-52	177	186	180
Gly ³	I	-79	-73	179	-	-	-	-
	II	-88	-70	180	-	-	-	-

Конформационно жесткий участок реализуется в С- концевой трипептидной части. Эффективное взаимодействие электростатического характера с образованием водородной связи между атомами концевых остатков в похожих глобальных конформациях обеих пептидных молекул свидетельствует о формировании компактной квазициклической структуры. На рисунках 1 и 2 показаны проекции наиболее стабильных конформационных состояний трипептида Pro-Leu-GLyNH₂ и тетрапептида Tyr-Pro-Leu-GLyNH₂.

Следует отметить, что в наиболее низкоэнергетических конформациях пептидов образуются внутримолекулярные водородные связи, приводящие к квазициклизации структуры. В результате расчетов были определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов и взаимное расположение остатков в низкоэнергетических конформациях обоих пептидов. В таблицах 1 и 2 приведены величины двугранных углов (град) трипептида Pro-Leu-GLyNH₂ и тетрапептида Tyr-Pro-Leu-GLyNH₂ в низкоэнергетических конформациях. Полученные в результате расчета конформационные состояния молекул MIF-1 и Tyr-MIF-1 были сопоставлены с ранее исследованными различными методами трехмерными структурами пептидов. Как было показано в работе [6] пространственные структуры MIF-1 и Tyr-MIF-1 в условиях водной среды представляют собой конформации с изгибами вокруг остатка пролина. В настоящей работе энергетически предпочтительными и многочисленными оказались конформации, содержащие изгиб цепи в центральной части молекул.

Таким образом исследование пространственного строения MIF-1 и Tyr-MIF-1 показало, что обе молекулы обладают ограниченным набором стабильных структур, характеризующихся формированием изгиба основной цепи на участке остатков, расположенных в позициях 2-3 пептидов. Сопоставление конформационных особенностей двух гомологичных молекул MIF-1 и Tyr-MIF-1 выявило определенную аналогию их пространственной организации, а также позволило определить степень подвижности отдельных участков в их предпочтительных пространственных структурах. Полученные результаты могут способствовать более рациональному конструированию новых аналогов MIF-1 и Tyr-MIF-1 с эффективной фармакологической активностью.

Таблица 2. Величины двугранных углов (град) тетрапептида Tyr-Pro-Leu-GLyNH₂ в низкоэнергетических конформациях для шейпа eff.

I. B₃RR₃₂B (E_{отн} = 0 ккал/моль)

II. B₁RR₃₂R (E_{отн} = 1,1 ккал/моль)

III. B₃RR₃₂R (E_{отн} = 2,5 ккал/моль)

Остаток	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь			
		φ	ψ	ω	χ ₁	χ ₂	χ ₃	χ ₄
Tyr ¹	I	-126	153	174	-65	99	180	-
	II	-109	145	176	58	77	180	-
	III	-123	150	179	-68	96	180	-
Pro ²	I	-	-41	182	-	-	-	-
	II	-	-69	185	-	-	-	-
	III	-	-46	189	-	-	-	-
Leu ³	I	-93	-59	182	-53	177	185	180
	II	-116	-65	188	-57	176	183	180
	III	-95	-60	185	-54	178	184	180
Gly ⁴	I	-88	83	180	-	-	-	-
	II	-90	-83	180	-	-	-	-
	III	-88	-93	181	-	-	-	-

Список литературы / References:

1. Kastin A.J., Pan W. MIF-1/Tyr-MIF-1. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*, 2013, 2032 p.
2. Petersheim M.I., Moldow R.L., Halladay H.N., Kastin A.J., Fischman A.J. Conformational studies of N-Tyr-MIF-1 in aqueous solution by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Int J Pept Protein Res.*, 1992, vol. 40(1), pp. 41-8.
3. Xu D. Preliminary report on the effect of PLG (MIF-1) in the treatment of Parkinson's disease. *Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai*, 1986, vol. 6, pp. 328-329.
4. Khan R.S., Yu C., Kastin A.J., He Y., Ehrensing R.H., Hsueh H., Stone K.P., Pan W. Brain Activation by Peptide Pro-Leu-Gly-NH₂ (MIF-1). *International Journal of Peptides*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 112-118.
5. Kastin A.J., Pan W. Concepts for Biologically Active Peptides. *Curr Pharm Des.*, 2010, vol. 16(30), pp. 3390-3400.
6. Pan W., Kastin A.J. From MIF-1 to endomorphin: the Tyr-MIF-1 family of peptides. *Peptides*, 2007, vol. 12, pp. 2411-34.
7. Popov E.M. Quantative approach to conformations. *Int. J. Quantum Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737.
8. Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjaev N.M. The program for semiempirical calculation of conformations of the molecular complexes. *Russ. J. Struct. Khim.*, 1983, vol. 24, pp. 147-148.
9. Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godjaev N.M. The spatial organization of human hemokinin-1 and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Russ. Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 365-377.
10. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for the description of the conformation, of poly-peptide chains. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1971, vol. 229, pp. 1-17.

CONFORMATIONAL PARTICULARITIES OF TWO ENDOGENOUS PEPTIDES MIF-1 AND TYR-MIF-1Agaeva G.A.^{1,2}, Babaeva M.N.²¹Baku State University

Z. Khalilov str., 33, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru

²Baku Engineering University

Sumqait Road, 16 km, Baku, AZ-0101, Azerbaijan

Abstract. By theoretical conformational analysis method have been investigated the spatial structure and conformational properties of Pro-Leu-Gly-NH₂-melanocyte-stimulating hormone-release-inhibiting factor (MIF-1) and Tyr-MIF-1 [Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂]. Conformational analysis indicate that the spatial structure of these can be described by set of low-energy conformations. It is shown that each of endogenous peptides forms energetically favoured conformations with compact quasicyclic structure. Calculations produced the values of all dihedral angles of the backbones and side chains and also intra- and inter-residue interactions energy contributions at the preferred conformations of peptides. The comparison of the geometric and energetic parameters of stable conformations of two brain peptides permit to determine the conformational flexible and conservative segments of molecules.

Key words: Pro-Leu-Gly-NH₂-melanocyte-stimulating hormone-release-inhibiting factor (MIF-1), Tyr-MIF-1 [Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂] conformation, theoretical conformational analysis.

БИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИНДИКАТОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА И ГЛЮКОЗЫ НА ОСНОВЕ НАНОАЛМАЗОВ И ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ГРИБНЫХ ОКСИДАЗ

Ронжин Н.О., Могильная О.А., Артеменко К.С., Бондарь В.С.

Институт биофизики Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН”

Академгородок, д. 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: roniol@mail.ru

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. С помощью адсорбции экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) светящегося гриба *Neonothopanus nambi* на модифицированные наноалмазы (МНА) детонационного синтеза сконструирована бифункциональная индикаторная система для обнаружения глюкозы и фенола в водной среде. Установлено, что изучаемые ферменты прочно связываются частицами МНА и проявляют после этого каталитическую активность. В модельных экспериментах *in vitro* показано, что полученная индикаторная система (комплекс МНА-ферменты) может многократно использоваться для тестирования глюкозы и фенола и проявляет функциональную активность в течение длительного (до 1 месяца) хранения при 4 °С. Полученные данные открывают перспективы конструирования на основе частиц МНА и ферментов высших грибов нового класса многоцветных индикаторных тест-систем для медицинской и экологической аналитики.

Ключевые слова: наноалмазы, светящийся гриб, мицелий, β -глюкозидаза, глюкозооксидаза, пероксидаза, индикаторная система.

Создание новых эффективных аналитических средств биомедицинского назначения является одной из актуальных биотехнологических задач. Ученые многих стран мира изучают возможности конструирования таких систем индикации и диагностики посредством иммобилизации различных биомаркеров (прежде всего, ферментов) на разных типах носителей. Общеизвестно, что индикаторные системы на основе ферментов в значительном числе случаев обеспечивают высокую селективность и чувствительность детекции аналитов, обладают относительной простотой и быстротой анализа. Для разработки новых аналитических средств перспективными носителями являются наночастицы разной физико-химической природы – исследованиям их применимости в создании тест-систем для медицинской диагностики и экологического мониторинга посвящено большое количество работ [1-8].

Следует сказать, что при создании средств индикации и диагностики часто используемыми пептидными биомаркерами являются ферменты класса оксидоредуктаз (КФ 1). В частности, изучается возможность конструирования аналитических тест-систем с помощью иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидаз на разных носителях (в том числе, наночастицах) [5, 9-11]. Для исследователей, которые работают в данной области, интерес могут представлять оксидазы высших грибов, в частности, глюкозооксидаза и пероксидазы. Эти ферменты базидиомицетов достаточно хорошо исследованы, изучается их применимость в аналитике [12, 13]. Для иммобилизации биомаркеров при конструировании аналитических тест-систем в качестве матрицы могут быть использованы модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, обладающие высокой седиментационной устойчивостью в водных суспензиях и адаптированные для биомедицинских исследований [14, 15]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, прежде всего, химически полиморфной, активной поверхности [16, 17], МНА проявляют высокие адсорбционные свойства к различным соединениям (включая, соединения пептидной природы) [18-21].

В недавних исследованиях мы показали, что обработка β -глюкозидазой или хитиназой инкубируемого в деионизованной воде мицелия светящегося гриба *Armillaria borealis* приводит к выходу грибных экстраклеточных оксидаз в среду инкубации [22]. Эти данные имеют самостоятельное биотехнологическое значение и демонстрируют возможности в относительно мягких условиях получать из биомассы мицелия базидиомицетов препараты, обогащенные экстраклеточными грибными ферментами и содержащие малое количество балластных примесей. В свою очередь, это создает предпосылки для упрощения их дальнейшего выделения в чистом виде. В то же время, наличие таких препаратов открывает перспективы в изучении их применимости для создания новых индикаторных и диагностических тест-систем с помощью иммобилизации экстраклеточных грибных ферментов на разных носителях, например, МНА.

Цель настоящего исследования состояла в изучении применимости МНА и экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) из светящегося гриба *Neonothopanus nambi* для конструирования бифункциональной индикаторной системы определения глюкозы и фенола и оценке ее пригодности для аналитических целей.

В исследованиях использовали МНА, полученные из наноалмазов детонационного синтеза российского производства (ООО «Реал-Дзержинск», Россия) разработанным нами ранее способом [14]. В экспериментах использовали фракцию МНА со средним размером кластеров наночастиц (d_{50}) в гидрозолях 50 нм, выделенную из водной суспензии МНА дифференциальным центрифугированием (Centrifuge Avanti J-E, «Beckman Coulter»,

USA). Распределение размеров кластеров МНА в полученной фракции оценивали с помощью Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd.», UK). Сухой порошок МНА получали высушиванием выделенной фракции в ротаторном испарителе Rotavapor R-215 («Buchi», Switzerland). Для работы использовали гидрозолю МНА с концентрацией 10,0 мг/мл, который готовили добавлением к навеске порошка наночастиц деионизованной (ДИ) воды, полученной с помощью системы Milli-Q System («Millipore», USA).

В работе использовали мицелий светящегося базидиомицета *N. nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) ИБФ СО РАН, ФИЦ «КНЦ СО РАН», который получали при культивировании гриба в погруженных условиях. Процесс выращивания гриба останавливали на 7-9 сутки при переходе в стационарную стадию роста, когда питательные вещества в среде культивирования истощались, и прирост биомассы мицелия замедлялся. Выращенные пеллеты мицелия многократно промывали большими объемами ДИ воды для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Для получения экстраклеточных оксидаз гриба пеллеты мицелия обрабатывали β -глюкозидазой (КФ 3.2.1.21) из сладкого миндаля («Serva», Germany), раствор фермента готовили в 10 мМ фосфатном буфере (pH 6,0). Отмытые пеллеты помещали в свежую ДИ воду, содержащую β -глюкозидазу (концентрация фермента 0,5 МЕ/мл), и инкубировали при 25 °C в течение 24 ч при постоянном, медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин на шейкере OS-10 («BIOSAN», Latvia). После инкубации пеллет воду отбирали и диализовали ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 30 кДа на системе Stirred Cell («EMD Millipore Amicon, Darmstadt», Germany) для концентрирования полученных экстраклеточных ферментов и удаления низкомолекулярных балластных примесей. Для более полного удаления низкомолекулярных соединений в ходе ультрафильтрации проводили трехкратную замену ДИ воды в диализуемом образце. Полученную надмембранную фракцию (концентрат) использовали в экспериментах. Концентрацию белка в образцах ферментных растворов определяли микробиуретовым методом.

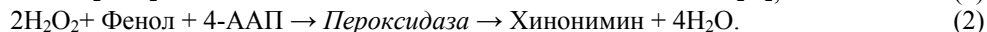
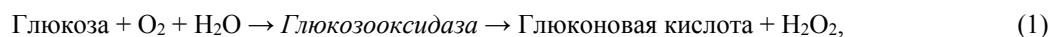
Индикаторные комплексы МНА-ферменты получали адсорбцией изучаемых оксидаз на наночастицы. Для этого аликвоты концентрата и гидрозоля МНА смешивали при весовом соотношении компонентов 1:1 (белок : наночастицы). Суспензии инкубировали при 23 °C в течение 1 ч при постоянном перемешивании на шейкере OS-10 со скоростью 150 об/мин. МНА с иммобилизованными ферментами собирали центрифугированием при 16000 g (Centrifuge 5415R, «Eppendorf», Germany) в течение 10 мин при 4 °C. Супернатанты отбирали для оценки количества не связавшихся с МНА ферментов. Для проверки десорбции связавшихся с наночастицами оксидаз осадки МНА трижды промывали разными элюентами. В этих целях использовали раствор 120 мМ NaCl и буферы разного состава: фосфатный (100 мМ, pH 7,0), Трис-HCl (50 мМ, pH 6,5) и Бис-трис-пропановый (50 мМ, pH 6,5). Осадки МНА каждый раз ресуспендировали в новой порции промыточного раствора, собирали центрифугированием и отбирали супернатанты для оценки пероксидазной и глюкозооксидазной активностей. Отмытые комплексы МНА-ферменты ресуспендировали в ДИ воде и использовали для исследований.

В работе использованы следующие реагенты: 4-аминоантипирин (4-ААП) и D-глюкоза квалификации «ч.д.а.» («Реахим», Россия), фенол («Fluka», Germany), 3 %-й раствор пероксида водорода (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», Россия). Рабочие растворы реагентов готовили *in situ* в ДИ воде.

Наличие глюкозооксидазной и пероксидазной активностей в концентрате до и после его обработки МНА, в промыточных растворах, а также активность иммобилизованных на наночастицы ферментов, оценивали реакцией окислительного азосочетания. Реакция катализируется пероксидазой с образованием окрашенного продукта (хинонимин):



При определении глюкозооксидазной активности образование цветного продукта обеспечивается двумя последовательными реакциями:



При тестировании пероксидазной активности конечная концентрация ингредиентов в объеме реакционной смеси составляла: 0,03 % H_2O_2 , 0,10 мг/мл 4-ААП, 0,56 мг/мл фенола. При определении глюкозооксидазной активности в реакционную смесь вместо пероксида водорода добавляли глюкозу в концентрации 10 мг/мл. В обоих случаях реакцию инициировали добавкой 100 мкл исследуемого раствора свободных ферментов или 500 мкл суспензии комплексов МНА-ферменты. После добавления всех ингредиентов образцы перемешивали в течение 3 секунд на Vortex-Genie 2 g-560E («Scientific Industries, Inc.», USA) и инкубировали при температуре 23 °C в течение 30 мин. Количество образовавшегося цветного продукта оценивали на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Japan) по величине оптической плотности при длине волны 506 нм. При определении активности ферментов, иммобилизованных на наночастицы, после проведения реакции комплексы МНА-ферменты удаляли из образцов центрифугированием (Centrifuge 5415R). Супернатанты отбирали и оценивали количество образовавшегося продукта.

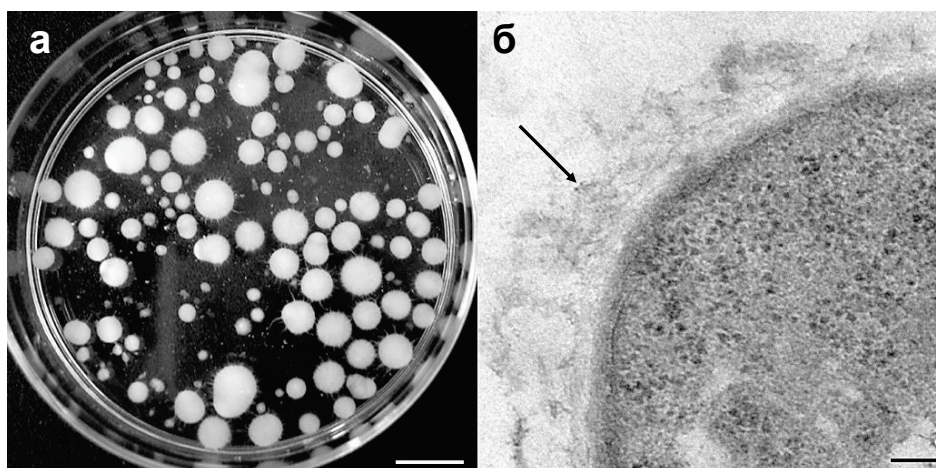


Рисунок 1. Внешний вид пеллет мицелия *N. nambi* (а), масштаб 10 мм; ультраструктурное изображение грибной гифы с развитой слизистой капсулой (показано стрелкой) (б), масштаб 100 нм

Микроскопические исследования мицелия выполнены на световом микроскопе Axiolmager M2 («Carl Zeiss», Germany). При электронно-микроскопических исследованиях мицелия подготовку препаратов для получения ультратонких срезов проводили по стандартной методике. Срезы просматривали на электронном микроскопе HT770 («Hitachi», Japan).

Как показали эксперименты, выбранный нами способ глубинного выращивания гриба *N. nambi* позволяет получать пеллеты мицелия шарообразной формы (рис. 1а), имеющие шероховатую поверхность за счет большого количества выростов – пучков гиф. При использованных в работе условиях культивирования гриба (объем питательной среды, скорость ее перемешивания, температура и время выращивания) диаметр получаемых пеллет составлял 2-7 мм.

При световой микроскопии ультратонких срезов мицелия было показано, что клеточная стенка гиф имеет двух- или многослойное строение, к цитоплазматической мембране прилегает более плотный слой. Снаружи клеточная стенка гиф покрыта слизистой капсулой, которая визуализируется как более рыхлый, в отличие от клеточной стенки, сетчатый слой (рис. 1б). Известно, что экстраклеточные оксидазы высших грибов локализуются в клеточной стенке и слизистой капсуле клеток [23-25]. Основными компонентами клеточной стенки являются хитин, β -D-глюкан и гликопротеины. Снаружи клеточная стенка гиф покрыта полисахаридной капсулой, которая имеет поры и также состоит из β -D-глюкана [26-29]. Во внешней оболочке гифы и межклеточном пространстве разветвленные глюканы формируют гелеобразную сеть, которая необходима для функционирования иммобилизованных в ней ферментов, в частности, пероксидаз [26-28].

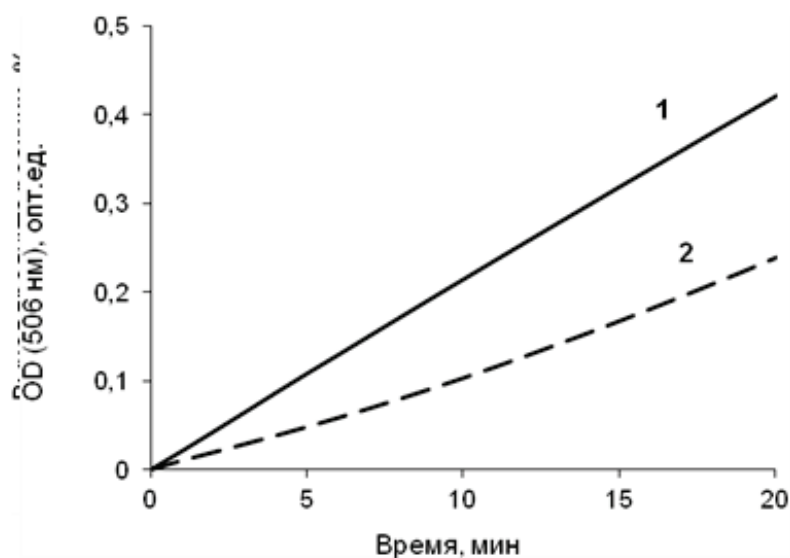


Рисунок 2. Динамика образования цветного продукта реакции окислительного азосочетания, катализируемой экстраклеточными оксидазами гриба *N. nambi* в концентрате: тестирование проведено с использованием смеси глюкоза–4-ААП–фенол (1) и смеси H_2O_2 –4-ААП–фенол (2)

В экспериментах было установлено, что после инкубации мицелия *N. nambí* в ДИ воде, содержащей β -глюкозидазу, в ней регистрируется наличие глюкозооксидазной и пероксидазной активностей. На это указывают результаты тестирования концентрата при проведении реакции азосочетания в двух вариантах – с использованием смесей реагентов H_2O_2 – 4-ААП – фенол и глюкоза – 4-ААП – фенол (рис. 2). В обоих случаях наблюдается образование окрашенного продукта. Из приведенного рисунка следует, что образование продукта идет эффективнее при определении глюкозооксидазной активности. Мы предполагаем, что меньший выход продукта при тестировании пероксидазной активности мог быть связан с неоптимальной концентрацией пероксида водорода, выбранной нами для проведения реакции. В дальнейших экспериментах для определения активности изучаемых оксидаз была использована смесь реагентов глюкоза – 4-ААП – фенол. В этом случае в катализе участвуют оба изучаемых фермента, и образование продукта свидетельствует об их функциональной активности.

Полученные результаты указывают на выход экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambí* в среду инкубации при обработке мицелия β -глюкозидазой и согласуются с механизмом действия этого фермента – гидролиз концевых остатков β -D-глюканов. Как уже говорилось выше, разветвленные глюканы образуют гелеобразную сеть во внешней оболочке гиф и межклеточном пространстве, в которой локализованы экстраклеточные оксидазы. Очевидно, что при распаде гелеобразной сети под действием β -глюкозидазы эти ферменты будут выходить во внешнюю среду.

Исследования показали, что обработка концентрата МНА сопровождается эффективной адсорбцией изучаемых ферментов на наночастицы (рис. 3). Как видно из рисунка, после обработки и удаления МНА центрифугированием выход продукта реакции в супернатанте составлял около 10 %, по сравнению с выходом в исходном концентрате. Было установлено, что изучаемые экстраклеточные оксидазы гриба *N. nambí* прочно связываются частицами МНА – трехкратная отмывка частиц разными элюентами не приводила к десорбции ферментов (рис. 3). При всех использованных нами вариантах элюции суммарный выход продукта в промывках составлял не более 2 % по сравнению с выходом в исходном концентрате. Феномен столь прочного связывания частицами МНА экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambí* пока непонятен и требует дальнейшего изучения. При этом было показано, что иммобилизованные на частицах МНА оксидазы проявляют функциональную активность и катализируют образование цветного продукта в ходе двухстадийной реакции глюкозооксидаза-пероксидаза(ы) (рис. 3).

В экспериментах была продемонстрирована многократность использования полученного комплекса МНА-ферменты для детекции (рис. 4). Видно, что при последовательном четырехкратном проведении реакции азосочетания с использованием одного и того же комплекса наблюдается практически одинаковый выход цветного продукта. С одной стороны, это указывает на то, что иммобилизация экстраклеточных оксидаз гриба *N. nambí* на МНА позволила получить индикаторную тест-систему многократного действия. В то же время, следует подчеркнуть, что полученный комплекс МНА-ферменты является бифункциональной системой индикации, которая может быть использована в медицинской диагностике для определения глюкозы и в экологическом мониторинге для обнаружения фенола.

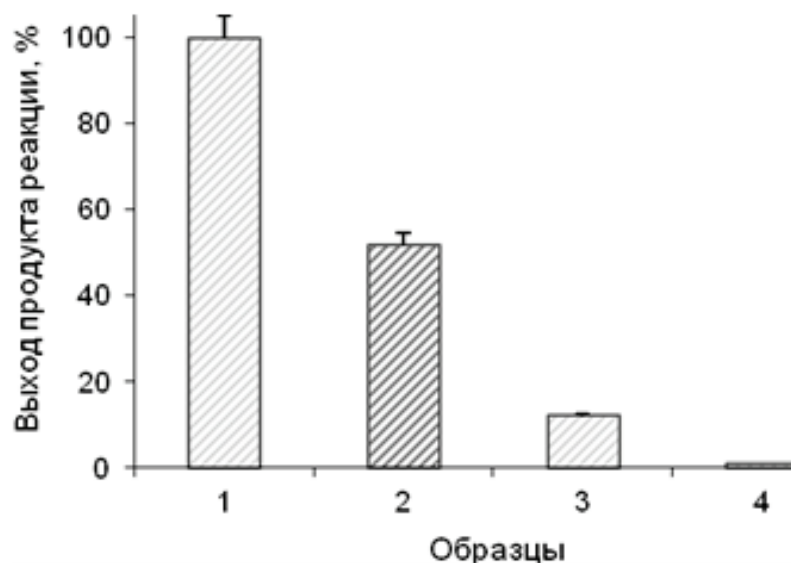


Рисунок 3. Выход продукта реакции азосочетания, катализируемой экстраклеточными оксидазами гриба *N. nambí* в образцах: концентрат (1), комплекс МНА-ферменты (2), супернатант после обработки концентрата наночастицами (3), суммарная отмывка комплекса МНА-ферменты раствором 120 мМ NaCl (4); данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на выход продукта в концентрате

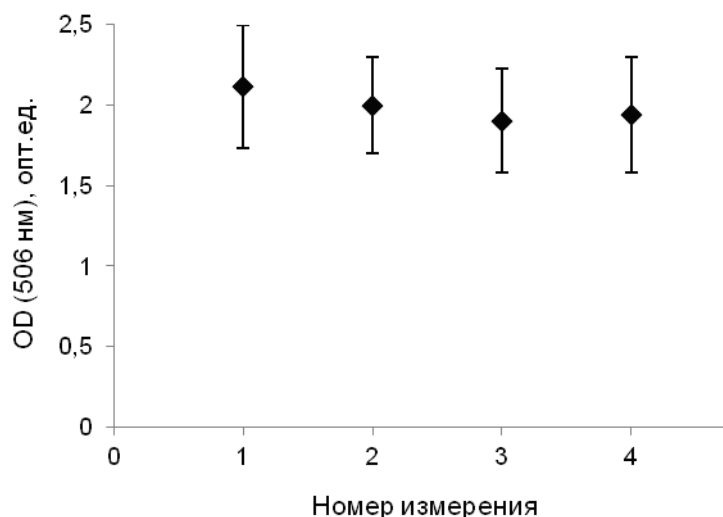


Рисунок 4. Выход продукта реакции азосочетания, катализируемой комплексом МНА-ферменты при его последовательном четырехкратном использовании

В исследованиях было установлено, что иммобилизованные на наночастицы оксидазы сохраняют свою функциональную активность при длительном (в течение месяца) хранении комплекса МНА-ферменты в виде водной суспензии при 4 °С (рис. 5). Это позволяет говорить о высокой стабильности полученной индикаторной тест-системы. Из представленных данных видно, что при хранении в течение указанного периода времени тест-система обеспечивает практически одинаковый выход цветного продукта реакции азосочетания.

Таким образом, результаты проведенных исследований демонстрируют применимость МНА взрывного синтеза и экстраклеточных оксидаз (глюкозооксидаза и пероксидазы) светящегося гриба *Neonothopanus nambi* для создания многократовой бифункциональной индикаторной системы, позволяющей проводить определение глюкозы и фенола. Это открывает перспективы конструирования на основе МНА и ферментов высших грибов нового класса полифункциональных тест-систем индикации и диагностики многократного действия для медицинской и экологической аналитики.

Исследования выполнены при финансовой поддержке из средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 0356-2017-0020).

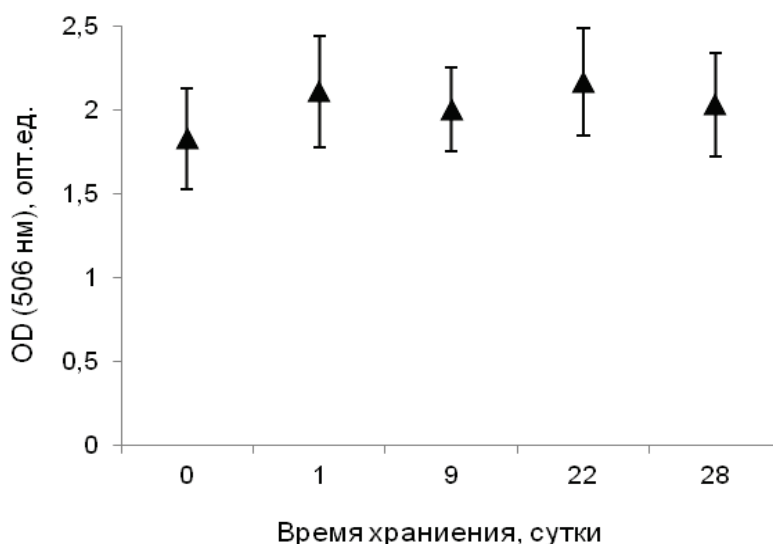


Рисунок 5. Выход продукта реакции азосочетания, катализируемой комплексом МНА-ферменты в зависимости от времени его хранения в ДИ воде при 4 °С

Список литературы / References:

1. Artiles M., Rout C.S., Fisher T.S. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, vol. 63, pp. 1352-1360.
2. Zamborini F.P., Bao L., Dasari R. Nanoparticles in measurement science. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 84, pp. 541-576.

3. Fisher P., Fadley C.S. Probing nanoscale behavior of magnetic materials with soft X-ray spectroscopy. *Nanotech. Rev.*, 2012, vol. 1, pp. 5-15.
4. Lad A., Agrawal Y.K. Nanodevices for monitoring toxicological behavior of therapeutic agent. *Rev. Nanosci. Nanotech.*, 2012, vol. 1, pp. 217-227.
5. Ronzhin N.O., Baron A.V., Mamaeva E.S., Puzyr A.P., Bondar V.S. Nanodiamond-based tests systems for biochemical determination of glucose and cholesterol. *J. Biomater. Nanobiotech.*, 2013, vol. 4, pp. 242-246.
6. Hatamie A., Zargar B., Jalali A. Copper nanoparticles: a new colorimetric probe for quick, naked-eye detection of sulfide ions in water samples. *Talanta.*, 2014, vol. 121, pp. 234-238.
7. 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.
8. Wang Y., Hu S. Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2016, vol. 16, pp. 7852-7872.
9. Ciauriz P., Bravo E., Hamad-Schifferli K. Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates. *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, vol. 414, pp. 73-81.
10. Yang H., Wei W., Liu S. Monodispersed silica nanoparticles as carrier for co-immobilization of bi-enzyme and its application for glucose biosensing. *Spectrochim. Acta. Part A*, 2014, vol. 125, pp. 183-188.
11. Tan H., Guo S., Dinh N., Luo R., Jin L., Chen C. Heterogeneous multi-compartmental hydrogel particles as synthetic cells for incompatible tandem reactions. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, p. 663.
12. Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M.J., Liers C., Lunde T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, vol. 87, pp. 871-897.
13. Wong C., Wong K., Chen X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 78, pp. 927-938.
14. 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.
15. 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.
16. Gibson N., Shenderova O., Luo T.J.M., Moseenkov S., Bondar V., Puzyr A., Purtov K., Fitzgerald Z., Brenner D.W. Colloidal stability of modified nanodiamond particles. *Diam. Relat. Mater.*, 2009, vol. 18, pp. 620-626.
17. Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S. Modification and comparative study of commercial nanodiamonds. *Full. Nanotub. Carb. Nanostruct.*, 2015, vol. 23, pp. 93-97.
18. Bondar V.S., Pozdnyakova I.O., Puzyr A.P. Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins. *Phys. Solid State.*, 2004, vol. 46, pp. 758-760.
19. Puzyr A.P., Purtov K.V., Shenderova O.A., Luo M., Brenner D.W., Bondar V.S. The adsorption of aflatoxin B1 by detonation-synthesis nanodiamonds. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2007, vol. 417, pp. 299-301.
20. Purtov K.V., Burakova L.P., Puzyr A.P., Bondar V.S. Interaction of linear and ring forms of DNA molecules with nanodiamonds synthesized by detonation. *Nanotechnology*, 2008, vol. 19, pp. 1-3.
21. Baron A.V., Osipov N.V., Olkhovskiy I.A., Puzyr A.P., Bondar V.S. Binding the immunoglobulins of human serum by nanodiamonds. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2014, vol. 457, pp. 158-159.
22. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Artemenko K.S., Bondar V.S. Morphological properties and levels of extracellular peroxidase activity and light emission of the basidiomycete *Armillaria borealis* treated with β -glucosidase and chitinase. *Mycosphere*, 2017, vol. 8, pp. 649-659.
23. Daniel G., Nilsson T., Pettersson B. Intra- and extracellular localization of lignin peroxidase during the degradation of solid wood and wood fragments by *Phanerochaete chrysosporium* by using transmission electron microscopy and immuno-gold labeling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, vol. 55, pp. 871-881.
24. Ruel K., Joseleau J.-P. Involvement of an Extracellular Glucan Sheath during Degradation of Populus Wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, pp. 374-384.
25. Takano M., Hayashi N., Nakamura M., Yamaguchi M. Extracellular peroxidase reaction at hyphal tips of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694 and in fungal slime. *J. Wood Sci.*, 2009, vol. 55, pp. 302-307.
26. Latge J.-P., Beauvais A. Functional duality of the cell wall. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014, vol. 20, pp. 111-117.
27. Bowman S.M., Free S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 2006, vol. 28, pp. 799-808.
28. Ene I.V., Walker L.A., Schiavone M., Lee K.K., Martin-Yken H., Dague E., Gow N.A.R., Munro C.A., Brown A.J.P. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. *mBio*, 2015, vol. 6, e00986-15 (2015). doi:10.1128/mBio.00986-15
29. Barrasa J.M., Gutierrez A., Escaso V., Gullen F., Martinez M.I., Martinez A.T. Electron and fluorescent microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, pp. 325-332.

BIFUNCTIONAL INDICATOR SYSTEM FOR PHENOL AND GLUCOSE DETECTION BASED ON NANODIAMONDS AND EXTRACELLULAR FUNGAL OXIDASES**Ronzhin N.O., Mogilnaya O.A., Artemenko K.S., Bondar V.S.**

Institute 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: roniol@mail.ru

Abstract. A bifunctional indicator system for glucose and phenol detection has been constructed by adsorption of extracellular oxidases (glucose oxidase and peroxidases) of luminous fungus *Neonothopanus nambi* onto modified nanodiamonds (MND) synthesized by detonation. It has been found that the studied enzymes are strongly bound by MND particles and exhibit catalytic activity. Model experiments *in vitro* have shown that created indicator system (MND-enzymes complex) can be repeatedly used for glucose and phenol testing and exhibit their activity after storage at 4 °C for a long time (up to 1 month). The data obtained open the prospects for developing a new class of reusable multifunctional indicating and diagnostic test-systems on the basis of MND particles and higher fungi enzymes for medical and ecological analytics.

Key words: *nanodiamonds, luminous fungus, mycelium, β -glucosidase, glucose oxidase, peroxidase, indicator system.*

ИНГИБИРУЮЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНИСТЕИНА В ПРИСУТСТВИИ СОЕВОГО ЛЕЦИТИНА

Смирнова А.Н., Мазалецкая Л.И., Шишкина Л.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина., 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию: 28.06.2018

Аннотация. Эффективность ингибирования инициированного окисления этилбензола генистеином и его смесями с соевым лецитином исследовали волюмометрическим методом. Установлено, что генистеин взаимодействует с пероксирадикалами этилбензола. Рассчитан его параметр ингибирования $fk_7 = 4,2 \cdot 10^4$ л/(моль с) и проведена оценка величины стехиометрического коэффициента ингибирования f , нижняя граница которого превышает значение 3,5. Следовательно, в реакции с пероксирадикалами этилбензола участвуют не менее двух ОН-групп, входящих в состав молекулы генистеина. Лецитин, являющийся смесью природных липидов, ускоряет инициированное окисление этилбензола и существенно снижает эффективность ингибирования генистеина. При этом уменьшение эффективности ингибирования не является линейным в зависимости от концентрации лецитина в реакционной смеси. Этот эффект наиболее выражен при низкой концентрации лецитина (1 мг/мл), в то время как увеличение концентрации лецитина от 1 до 15 мг/мл практически не приводит к дальнейшему снижению эффективности ингибирования генистеина. Полученные данные свидетельствуют о необходимости детального изучения механизма антиоксидантных свойств флавоноидов в сложных системах.

Ключевые слова: инициированное окисление, антиоксидантные свойства, генистеин, природные фосфолипиды.

Флавоноиды, одни из наиболее распространённых соединений в растительной клетке, выполняют разнообразные важные функции в жизни растений и используются в качестве биологически активных веществ в различных системах [1]. Флавоноиды являются природными антиоксидантами (АО) класса замещенных фенолов. К наиболее изученным фенолам этого класса относятся кверцетин и дигидрокверцетин. Дигидрокверцетин, который оказался менее токсичным по сравнению с кверцетином, наряду с антиоксидантными (АО) свойствами характеризуется капилляропротекторным, дезинтоксикационным, противоотечным действием и используется в качестве биологически активной добавки [2].

К представителям биоантиоксидантов класса флавоноидов относится генистеин, который является основным изофлавоном сои, широко используемой в пищевой промышленности. Генистеин относится к растительным гормонам, отвечающим за процесс старения. В настоящее время выпускаются биологически активные добавки на основе генистеина [3], установлены его радиопротекторные свойства [4].

Если рассматривать АО свойства флавоноидов, то необходимо отметить изменение их эффективности в зависимости от их химической структуры, а также в присутствии некоторых компонентов сложных биологических систем. Во всех сложных системах наряду с АО содержатся фосфолипиды (ФЛ), которые, как было установлено в работах [5-8], влияют на АО активность фенольных антиоксидантов. Так, в присутствии лецитина эффективность антиоксидантного действия флавоноидов – кверцетина и дигидрокверцетина заметно снижается [5].

Целью настоящей работы было изучение антирадикальной активности генистеина в модельной системе и влияние лецитина на его ингибирующую эффективность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиокислительную активность генистеина и влияние на нее добавок лецитина изучали с использованием кинетического метода поглощения кислорода. Модельным углеводородом служил этилбензол, в качестве инициатора использовали АИБН. Скорость инициирования $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с), температура 60 °С. Раствор генистеина в этилбензоле термостатировали при температуре опыта, затем добавляли раствор лецитина и инициатора и через 1,5 мин (мертвое время установки) осуществляли регистрацию объема поглощенного кислорода во времени. Из кинетических кривых определяли начальные скорости окисления.

Генистеин, синтезированный в НППЦ "Фармзащита" ФМБА России и любезно предоставленный нам для исследований, использовали без дополнительной очистки. Концентрацию генистеина варьировали в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Исходный раствор генистеина готовили в смеси этилбензол: этиловый спирт = 3,5 : 1,5 (исходная концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л).

Влияние лецитина на ингибирующую эффективность генистеина определяли при постоянной концентрации генистеина ($C_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Концентрацию лецитина изменяли в пределах от 1 мг/мл до 15 мг/мл.

Из раствора 10 %-ного соевого лецитина (Харьков, Украина) отгоняли спирт, в полученный лецитин добавляли этилбензол: исходная концентрация составляла 300 мг/мл. Качественный и количественный состав ФЛ, содержащихся в лецитине, определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [9], поскольку лецитин представляет собой смесь природных липидов. Использовали силикагель типа Н "Sigma" (USA), стеклянные пластинки размером 100•120 мм. Разделение ФЛ на фракции проводили в предварительно насыщенной хроматографической камере в системе растворителей: хлороформ - метанол - ледяная уксусная кислота - дистиллированная вода в соотношениях 12,5 : 7,5 : 2 : 1. Пластины проявляли в парах йода. Количественный анализ фракций ФЛ проводили на спектрофотометре "ПЭ-5400 ВИ" при длине волны 815 нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Подробности разделения ФЛ на фракции методом ТСХ описаны в работе [10].

Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом вариационной статистики. Экспериментальные данные обрабатывали, используя пакет программ Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены начальные участки кинетических кривых поглощения кислорода при окислении этилбензола в отсутствие (кривая 1) и в присутствии трех различных концентраций генистеина (кривые 2-4). Видно, что по сравнению с неингибированной реакцией добавки генистеина приводят к снижению скорости поглощения кислорода, что свидетельствует о взаимодействии генистеина с пероксирадикалами. Для расчета параметра ингибирования, т.е. произведения fk_7 , где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, k_7 – константа скорости взаимодействия АО с пероксирадикалами, начальные скорости представляли в координатах уравнения:

$$W_0/W - W/W_0 = fk_7[\text{InH}]_0/(k_6W_i)^{0.5}, \quad (I)$$

где W_0 и W – скорости инициированного окисления этилбензола в отсутствие и в присутствии добавок; W_i – скорость инициирования; k_6 – константа скорости квадратичной рекомбинации пероксирадикалов.

Как видно из данных, представленных на рисунке 2, наблюдается прямолинейная зависимость отношения скоростей от концентрации введенного генистеина в координатах уравнения (I), из тангенса угла наклона которой рассчитали параметр $fk_7 = 4,2 \cdot 10^4$ л/(моль с). При расчете принимали $k_6 = 1,9 \cdot 10^7$ л/(моль с) [11].

Для оценки величины f был проведен опыт с начальной концентрацией генистеина, равной $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, в течение 157 мин. Как видно из рисунка 3, в течение этого времени скорость окисления (рис. 3, кривая 2) не достигает скорости неингибированной реакции (рис. 3, кривая 1). Поэтому из полученных данных представлялось возможным лишь сделать оценку нижней границы величины $f > 3,5$. Расчет проводили с использованием метода [12].

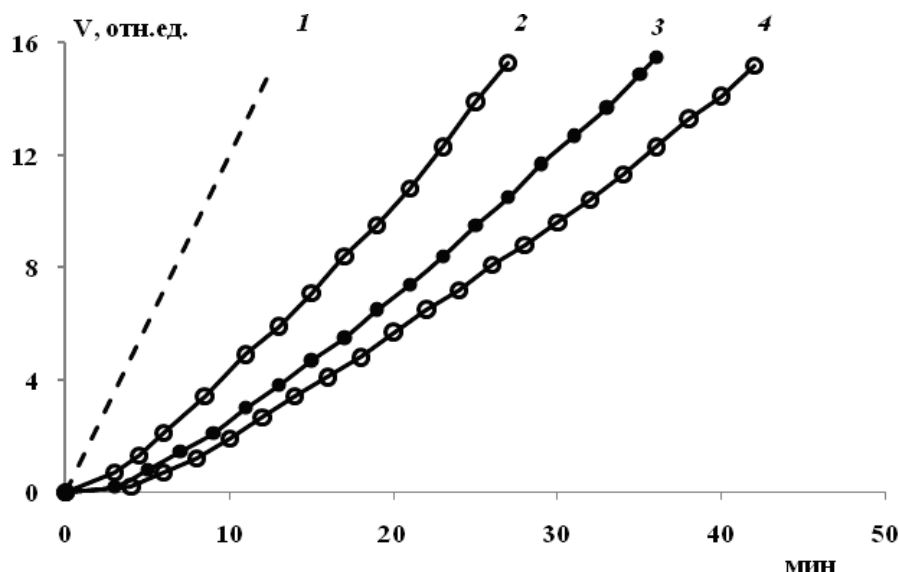


Рисунок 1. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении этилбензола без добавок (1) и в присутствии генистеина: (2) - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (3) - $7,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (4) - $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с)

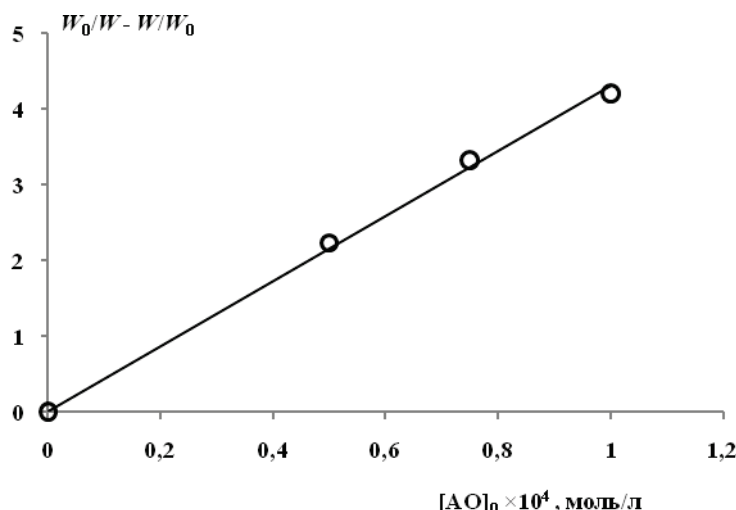


Рисунок 2. Зависимость начальной скорости окисления от концентрации генистеина в координатах уравнения I. Этилбензол, 333 К, $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с)

Полученный результат свидетельствует о том, что в реакции со свободными радикалами участвует не менее двух ОН-групп, входящих в состав молекулы генистеина.

Таким образом, генистеин является ингибитором свободнорадикальных реакций, при этом на одной молекуле гибнет более трех радикалов. Для сравнения в случае кверцетина и дигидрокверцетина в реакции инициированного окисления метилолеата на одной молекуле гибнет 2 и 2,6 радикалов соответственно [5].

Ранее для флавоноидов – кверцетина и дигидрокверцетина было обнаружено снижение эффективности ингибирования в присутствии добавок лецитина [5]. В настоящей работе аналогичный результат был получен для генистеина.

Как известно, лецитин представляет собой смесь природных липидов, что подтверждают данные ТСХ. Используемый в работе лецитин в составе общих липидов содержал 40% ФЛ, среди которых основной фракцией является фосфатидилхолин ($85,7 \pm 1,3$ %). Среди минорных фракций преобладали сфингомиелин ($4,4 \pm 0,6$ %) и фосфатидилэтаноламин ($3,4 \pm 0,4$ %). Остальные минорные фракции представлены в существенно меньших количествах: фосфатидная кислота – $1,9 \pm 0,4$ %, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин – $1,9 \pm 0,1$ %, лизоформы ФЛ – $1,8 \pm 0,4$ %, кардиолипин – $0,9 \pm 0,1$ %.

Введение лецитина в окисляющийся этилбензол приводит к увеличению скорости реакции, которая возрастает по мере увеличения количества введенного лецитина (рис. 4, кривая 1). Ускорение окисления этилбензола в присутствии лецитина позволяет рассматривать лецитин как более активный субстрат окисления по сравнению с этилбензолом. При концентрации 15 мг/мл скорость возрастает ~ в 1,5 раза.

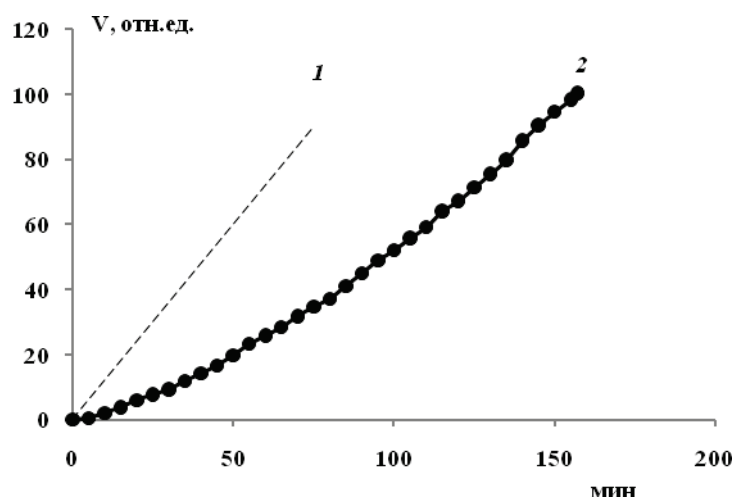


Рисунок 3. Кинетические кривые поглощения кислорода при окислении этилбензола без добавок (1) и в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л генистеина (2). Температура 333 К, $W_i = 5 \cdot 10^{-8}$ моль/(л с)

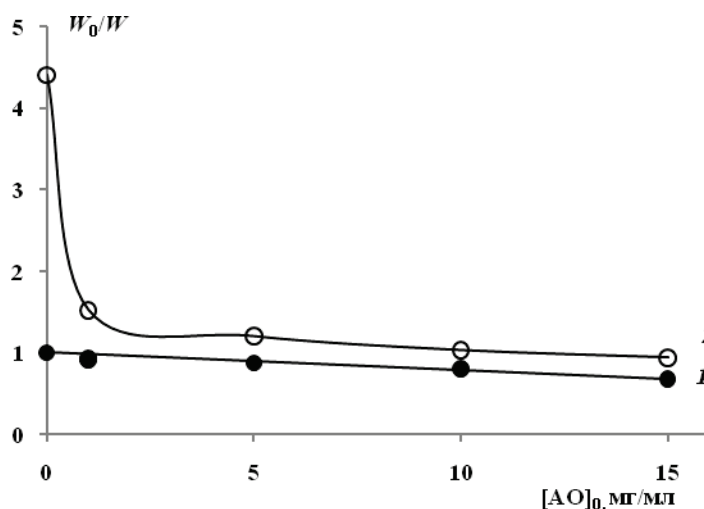


Рисунок 4. Зависимость отношения скорости окисления в отсутствие добавок к скорости в присутствии лецитина (1) или его смеси с $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л генистеина (2) от начальной концентрации лецитина.

В присутствии лецитина наблюдается снижение ингибирующей активности генистеина (рис. 4, кривая 2). Зависимость изменения эффективности ингибирующего действия представляет собой кривую, на начальном участке которой влияние лецитина наиболее существенно, в то время как последующее увеличение концентрации от 1 до 15 мг/мл приводит к слабому изменению величины W_0/W (здесь W_0 – скорость окисления в присутствии одного генистеина, W – скорость окисления в присутствии смеси генистеина с лецитином). Наблюдаемая закономерность не согласуется с аналогичным параметром, полученным для одного лецитина и, следовательно, не может быть объяснена увеличением скорости окисления за счет наличия в системе более реакционноспособного лецитина. Возможно, что снижение антирадикальной активности генистеина в присутствии лецитина может быть обусловлено их взаимодействием, в результате которого образуется частица с меньшей реакционной способностью. Отсутствие изменений ингибирующей активности генистеина, начиная с концентрации лецитина 5 мг/мл, может быть обусловлено тем, что лецитин образует ассоциаты, которые в меньшей степени влияют на реакционную способность АО.

Таким образом, генистеин тормозит процесс свободнорадикального окисления, реагируя с пероксильными радикалами, активность которого заметно снижается в присутствии добавок лецитина. Однако сложный характер изменения эффективности ингибирования генистеина в зависимости от концентрации лецитина в реакционной смеси свидетельствует о необходимости детального изучения механизма антиоксидантных свойств флавоноидов в сложных системах.

Список литературы / References:

1. *Фенольные соединения: свойства, активность, инновации*. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». М.: ИФР РАН, ред. Н.В. Загоскина, 2018, 625 с. [*Phenolic Compounds: properties, activity, innovations*. Collected scientific articles on materials of X International Symposium “Phenolic Compounds: fundamental and applied aspects”. M: IPP RAS, ed. N.V. Zagoskina, 2018, 625 p. (in Russ.)]
2. *Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты*. М.: Научный мир, ред. Н.В. Загоскина, Е.Б. Бурлакова, 2010, 400 с. [*Phenolic Compounds: fundamental and applied aspects*. M: Scientific World, ed. N.V. Zagoskina, E.B. Burlakova, 2010, 400 p. (in Russ.)]
3. Тарумов Р.А., Гребенюк А.Н., Башарин В.А., Ковтун В.Ю. Биологические свойства фитоэстрогена генистеина. *Медицина экстремальных ситуаций*, 2014, № 2(48), с. 55-68. [Tarumov R.A., Grebenyuk A.N., Basharin V.A., Kovtun V.Yu. Biological properties of phytoestrogen genistein. *Medicine of emergency situations*, 2014, no. 2(48), pp 55-68 (in Russ.)]
4. Тарумов Р.А., Башарин В.А., Гребенюк А.Н. Противолучевые свойства современных антиоксидантов. *Рентгенология и радиология*, 2012, т. 13, с. 682-700. [Tarumov R.A., Basharin V.A., Grebenyuk A.N. Radioprotective properties of modern antioxidants. *Rentgenology and radiology*, 2012. vol. 13, pp. 682-700 (in Russ.)]
5. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. Влияние лецитина на эффективность антиоксидантного действия флавоноидов и α -токоферола. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2010, т. 46(2), с. 148-152. [Mazaletskaia L.I., Sheludcheko N.I., Shishkina L.N. Lecithin influence on the effectiveness on the antioxidant effect of flavonoids and α -tocopherol. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46(2), pp. 135-139. (In Russ.)]
6. Бурлакова Е.Б., Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. Ингибирующее действие смесей

фенольных антиоксидантов и фосфатидилхолина. *Изв. РАН. Серия химическая*, 1995, № 6, с. 1053-1059. [Burlakova E.B., Mazaletskaya L.I., Sheludcheko N.I., Shishkina L.N. Inhibitory Effect of the Mixtures of Phenol Antioxidants and Phosphatidylcholine. *Russian Chemical Bulletin*, 1995, no. 6, pp. 1014-1020. (In Russ.)]

7. Mazaletskaya, L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N. Inhibitory efficiency of antioxidant and phospholipid mixtures under the different oxidation extent of methyl oleate. *Chemistry & Chemical technology*, 2012, vol. 6, no. 1, pp. 35-41.

8. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н., Кучин А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю. Влияние лецитина на ингибирующую эффективность изоборнилфенолов, *ЖФХ*, 2012, т. 86, № 9, с. 1532-1538. [Mazaletskaya L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N., Kutchin A.V., Fedorova I.V., Chukicheva I.Yu. Influence of Lecithin on the Inhibitory Efficiency of Isobornylphenols. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2012, vol. 86, no. 9, pp. 1532-1538 (in Russ.)]

9. Барсукова Л.И. *Биологические мембраны: Методы*. М.: Мир, 1990, 423 с. [Barsukova L.I. *Biological Membranes: Methods*. M.: Mir, 1990, 423 p. (In Russ.)]

10. Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. The combined effect of surfactant and acute irradiation at low dose on lipid peroxidation processes in tissues and DNA content in blood plasma of mice. *Oxidation Communications*, 2001, vol. 24(2), pp. 276-286.

11. Цепалов В.Ф., Шляпинтох В.Я. Константы скоростей элементарных реакций процесса окисления этилбензола молекулярным кислородом. *Кинетика и катализ*, 1962, т. 3, № с. 870-876. [Tsepalov V.F., Shlyapintokh V.Ya. Rate constants of elementary reactions of ethylbenzene oxidation process by molecular oxygen. *Kinetic Catal.*, 1962, vol. 3, pp. 870-876 (in Russ.)]

12. Цепалов В.Ф., Харитонов А.А., Гладышев Т.П., Эмануэль Н.М. Определение констант скорости и коэффициентов ингибирования фенолов-антиоксидантов с помощью модельной цепной реакции. *Кинетика и катализ*, 1977, т. 18, № 5, с. 1261-1267. [Tsepalov V.F., Kharitonova A.A., Gladyshev T.P., Emanuel N.M. Definition of rate constants and inhibition factors of phenols-antioxidants using model chain reaction. *Kinetic Catal.*, 1977, vol. 18, no. 5, pp. 1261-1267 (in Russ.)]

INHIBITORY EFFICIENCY OF GENISTEIN IN THE PRESENCE OF THE SOY BEAN LECITHIN

Smirnova A.N., Mazaletskaya L.I., Shishkina L.N.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences

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

Abstract. Efficiency of the inhibition of the ethylbenzene initiated oxidation by genistein and its mixtures with the soy bean lecithin is investigated by the volumetric method. Genistein is established to interact with peroxy radicals of ethylbenzene, its inhibitory parameter is calculated ($fk_7 = 4,2 \cdot 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and the estimation of the stoichiometric inhibition coefficient f value is performed, the low limit of which is more 3,5. Hence, two OH-groups or more among the genistein molecule composition take part in the reaction with peroxy radicals of ethylbenzene. Lecithin being a mixture of natural lipids accelerates the initiated oxidation of ethylbenzene and substantially reduces the inhibitory efficiency of genistein. Besides, the reduction of the inhibitory efficiency is not linear in the dependence on the lecithin concentration in reaction mixture. This effect is the most pronounced at the low concentration of lecithin, while the increase of the lecithin concentration from 1 to 15 mg/ml does not practically result to further diminution of the inhibitory efficiency of genistein. Data obtained allow us to conclude about a necessity of the detail studying of the antioxidative properties of flavonoids in the complex systems.

Key words: initiated oxidation, antioxidative properties, genistein, natural phospholipids.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ СЛЮНЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Бельская Л.В., Сарф Е.А.

Омский государственный педагогический университет

ул. Набережная Тухачевского, 14, г. Омск, 644043, РФ; e-mail: Ludab2005@mail.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Показана принципиальная возможность диагностики рака легкого и молочной железы с использованием метода ИК-Фурье-спектроскопии. Статистически достоверные отличия для ИК-спектров слюны больных раком легкого наблюдаются в спектральном диапазоне 1070-1240 см^{-1} и могут быть отнесены к нуклеиновым кислотам. Для группы пациентов с раком молочной железы отличий в спектрах значительно больше: различаются по интенсивности полосы поглощения фосфодиэфирных групп, нуклеиновых кислот и фосфолипидов (1300 и 800 см^{-1}), метильных и метиленовых групп молекул белков, липидов, а также карбоксильных групп жирных кислот и аминокислот (1500-1300 см^{-1}), ДНК и РНК (1700-1580 см^{-1}), а также метильных и метиленовых групп насыщенных и ненасыщенных алкильных цепей (3050-2800 см^{-1}). Выявлены коэффициенты I1398/I454 и I1240/I1310, изменение которых на фоне онкологической патологии статистически достоверно.

Ключевые слова: слюна, инфракрасная спектроскопия, диагностика, рак легкого, рак молочной железы.

Все заболевания человека сопровождаются биохимическими изменениями в инфицированных клетках, тканях и органах, и эти изменения обычно происходят до изменения морфологии клеток и появления клинически выраженных симптомов. Поскольку ИК-Фурье-спектроскопия может отражать эти изменения на молекулярном уровне, ее можно использовать как инструмент для раннего выявления заболеваний [1]. С конца 1980-х по настоящее время ИК-Фурье-спектроскопия была использована для исследования ряда онкологических заболеваний, включая рак толстой кишки, гортани, желудка и т.д. [2-5]. ИК-Фурье-спектроскопия также была применена для диагностики рака легких [6-8]. В частности, при исследовании мокроты были выделены пять полос поглощения (1656, 1577, 1411, 1024 и 964 см^{-1}), которые могут разделять спектры больных раком легких от нормальных спектров с использованием многофакторного анализа [9]. В другом исследовании было проведено сравнение опухолевой и здоровой ткани легких с помощью ИК-Фурье-спектроскопии, при этом было выделено четыре относительных коэффициента интенсивности, такие как I1640/I550, I1460/I400, I1240/I1310 и I1080/I160 [10]. Yano et al. проанализировали ИК-спектры тканей легких, и обнаружили, что отношение I1045/I467 можно использовать для разделения злокачественных и нормальных тканей [11]. Вышеприведенные исследования показали, что ИК-Фурье-спектроскопия является мощным инструментом для диагностики рака легких.

Слюна в ИК-спектроскопии в настоящее время находит ограниченное применение, в частности для диагностики заболеваний полости рта [12, 13]. В нескольких исследованиях получены многообещающие результаты, связанные с количественным анализом биохимических компонентов, что позволяет получать информацию о биохимическом составе слюны в реальном времени без использования реагентов [14, 15]. Тем не менее применение слюны для диагностики онкологических заболеваний с использованием ИК-Фурье-спектроскопии в литературе не описано. В связи с чем целью настоящего исследования являлось определение принципиальной возможности применения ИК-Фурье-спектроскопии слюны для диагностики онкологических заболеваний на примере рака легкого и рака молочной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 2 группы: основную (с диагнозом рак легкого и рак молочной железы) и контрольную группу (условно здоровые). Основная группа включала 40 больных раком легкого (плоскоклеточный рак – 16, аденокарцинома – 16, нейроэндокринные опухоли – 8 человек); 50 больных раком молочной железы. Контрольная группа включала условно здоровых пациентов, у которых при проведении плановой диспансеризации не было выявлено патологии легких и молочных желез. Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–75 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 2 мл. Образцы слюны собирали утром натощак путем сплевывания в стерильные пробирки, центрифугировали при 7000 об/мин. Образцы

объемом 50 мкл высушивали на подложке из селенида цинка в термостате при 37 °С. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» (СИМЕКС) в диапазоне 500-4000 см⁻¹.

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследование проведено усреднение ИК-спектров для образцов, принадлежащих к каждой исследуемой группе (рис. 1). Для каждой группы на ИК-спектре слюны можно выделить три основные группы макромолекул: липиды (3000-2800 см⁻¹), белки (1700-1600 см⁻¹ и 1560-1500 см⁻¹) и нуклеиновые кислоты (1250-1000 см⁻¹). Широкая полоса поглощения при 3273 см⁻¹ соответствует амиду А. Узкая полоса средней интенсивности при 2057 см⁻¹ относится к тиоцианатным анионам (SCN⁻). Данная полоса характерна именно для слюны и проявляется в области спектра, которая обычно не содержит никакого пикового поглощения из биологических образцов. Две узкие полосы, расположенные при 1649 см⁻¹ и 1543 см⁻¹, классифицированы как полосы поглощения амида I и II, соответственно. Полоса, наблюдаемая при 1075 см⁻¹ в спектрах слюны, соответствует фрагментам сахаров. Оставшиеся менее интенсивные полосы поглощения соответствуют метиленовым группам боковых цепей аминокислот в белках и липидах (1452 см⁻¹), боковых цепей аминокислот (1396 см⁻¹), амиду III /фосфолипидам (1286-1320 см⁻¹) и фрагментам сахаров, гликозилированных белков и фосфатным группам в нуклеиновых кислотах (1080-950 см⁻¹).

Качественных отличий между спектрами слюны исследуемых групп не выявлено, тем не менее ИК-спектры могут характеризовать наличие патологических процессов в организме человека. Поэтому на следующем этапе исследования было проведено сравнение интенсивностей полос поглощения в ИК-спектрах слюны больных раком легкого, раком молочной железы и здоровых добровольцев (табл. 1, 2). При этом группа больных раком легкого включала пациентов только мужского пола, поэтому для корректной оценки полученных результатов контрольная группа также разбита по полу (табл. 1).

Показано, что статистически достоверные отличия для ИК-спектров слюны больных раком легкого наблюдаются в спектральном диапазоне 1070-1240 см⁻¹ (табл. 1). Полосы в данном спектральном диапазоне могут быть отнесены к нуклеиновым кислотам [16]. Слюна содержит внеклеточную ДНК, а геномный анализ показал, что 70 % ДНК слюны происходит из плазмы крови и 30 % от микробиоты полости рта [17]. Известно, что в крови человека, а значит и в слюне, содержание свободных (внеклеточных) нуклеиновых кислот повышено при некоторых патологических процессах (онкологическое заболевание, воспаление, травма и т.п.) [18].

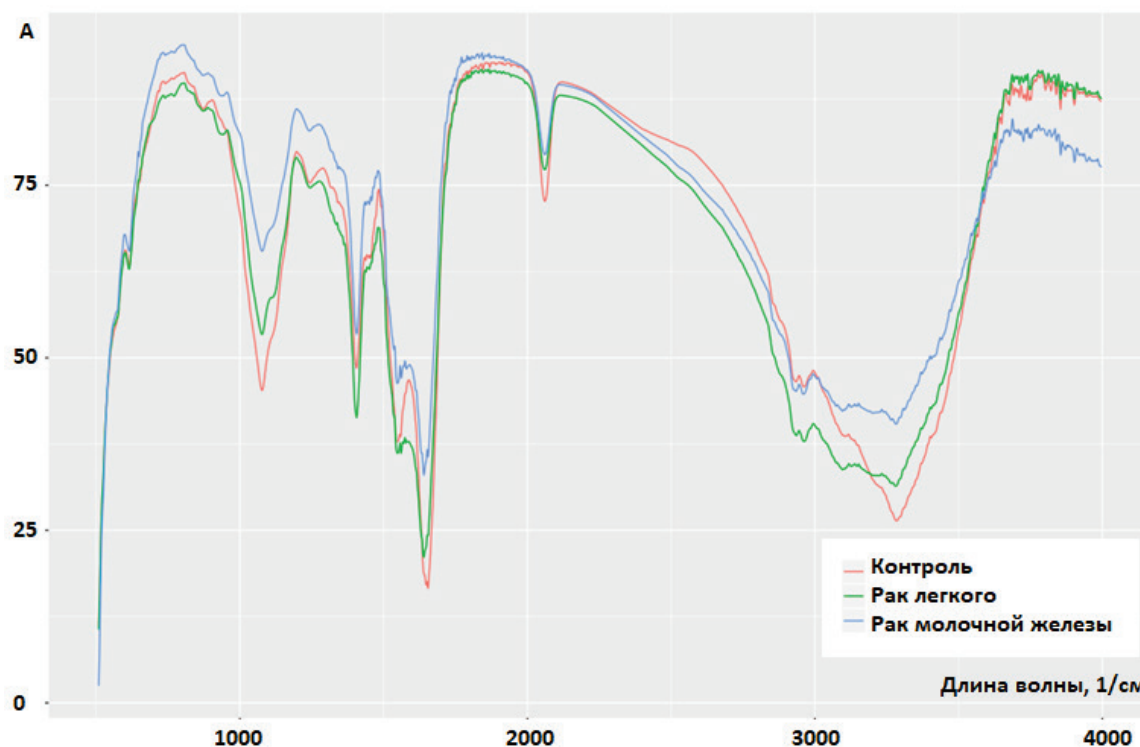


Рисунок 1. ИК-спектр слюны образцов исследуемых групп

Таблица 1. Интенсивность полос поглощения в спектрах здоровых мужчин и пациентов с раком легкого

Длина волны, см ⁻¹	Контроль (М), n=71	Рак легкого, n=40	p-value
613-615	35,3 [29,0; 41,0]	35,6 [31,6; 41,7]	0,5273
860	11,5 [6,4; 18,3]	11,4 [6,1; 19,0]	0,8042
925-935	14,9 [9,3; 22,5]	16,7 [8,0; 21,9]	0,9638
960-970	18,3 [14,3; 26,1]	16,5 [10,0; 23,5]	0,0972
1070-1080	57,2 [44,8; 65,6]	44,2 [35,5; 54,7]	<u>0,0007</u>
1120-1130	46,4 [37,2; 53,4]	37,4 [29,6; 49,4]	<u>0,0060</u>
1155-1165	34,7 [28,4; 41,9]	28,7 [22,8; 38,1]	<u>0,0152</u>
1240	26,6 [20,8; 32,6]	21,6 [16,4; 30,4]	<u>0,0447</u>
1310	26,4 [21,4; 32,7]	24,1 [19,1; 34,2]	0,2564
1400	52,9 [45,3; 67,5]	58,4 [47,6; 69,3]	0,8150
1460	36,2 [29,4; 47,2]	33,0 [25,4; 43,8]	0,1153
1550	70,5 [56,7; 79,9]	62,7 [55,0; 76,1]	0,1678
1640	93,9 [78,2; 97,2]	83,5 [63,5; 98,9]	0,2653
1735	17,5 [10,3; 22,3]	13,2 [9,8; 19,4]	0,1834
2060	23,6 [13,4; 36,9]	19,4 [12,8; 28,6]	0,2337
2850	44,2 [34,8; 52,9]	47,1 [37,0; 58,4]	0,5365
2875	47,9 [36,7; 55,5]	50,7 [38,7; 62,9]	0,4784
2930	58,5 [45,2; 66,9]	61,9 [49,0; 73,0]	0,5365
2950	59,3 [46,9; 68,0]	62,1 [50,3; 74,5]	0,5319
3070	65,7 [49,7; 75,5]	66,4 [54,4; 78,8]	0,8751
3266	82,1 [64,9; 87,8]	72,6 [43,3; 88,1]	0,1185
3280	83,4 [65,8; 89,1]	72,9 [43,8; 89,1]	0,0958

Так, в крови онкологических больных обнаружены происходящие из опухолевых клеток фрагменты ДНК, «опухолевые» мРНК и микроРНК [19, 20]. Присутствие в крови как здоровых людей, так и онкологических больных, циркулирующих ДНК и РНК обусловлено двумя процессами: клеточным распадом (апоптозом и некрозом) и клеточной секрецией [21]. Клеточный распад ведет к высвобождению клеточного содержимого, фрагментации молекул и их фагоцитозу. Циркулирующие в кровотоке опухолевые клетки также могут вносить вклад в пул внеклеточных молекул [22]. В зависимости от механизма клеточной гибели и молекулярной структуры, они в разной степени подвержены воздействию внеклеточной среды, богатой нуклеазами: двунитевые ДНК защищены лучше, чем однонитевые мРНК, а наиболее устойчивы микроРНК – в силу своих малых (22-24 основания) размеров. Установлено, что нормальные клетки претерпевают, как правило, упорядоченный процесс апоптоза с образованием и поступлением в кровоток дискретных фрагментов преимущественно мононуклеосомного размера (около 150 пар оснований), тогда как для опухолевых клеток более характерен некроз (образующиеся при этом ДНК гетерогенны и имеют размер в интервале 200-400 пар оснований) [20]. В зависимости от стадии процесса и, соответственно, от размера опухоли доля «опухолевых» ДНК варьирует в широких пределах (от 3 до 93 % общей массы циркулирующей ДНК) [23].

Для группы пациентов с раком молочной железы отличий в спектрах значительно больше (табл. 2). Колебания фосфодиэфирных групп, нуклеиновых кислот и фосфолипидов, обнаруженных между 1300 и 800 см⁻¹, считаются полезными спектральными биомаркерами для выявления рака [24]. Для характеристики клеточной активности (например, при прогрессирования рака) может быть использована полоса поглощения 970 см⁻¹, которая описывает процессы фосфорилирования белков, а также содержание клеточной ДНК [25]. В спектральной области 1500-1300 см⁻¹ могут быть обнаружены колебания метильных и метиленовых групп молекул белков, липидов, а также карбоксильных групп жирных кислот и аминокислот [26]. Область 1700-1580 см⁻¹ считается очень важной, поскольку полосы поглощения в этой зоне могут характеризовать ДНК и РНК, а также давать информацию об изменениях конформационной структуры белков [27, 28]. Полосы 1740-1710 см⁻¹ в основном приписываются поглощению фосфолипидов, однако полоса при 1714 см⁻¹ может быть отнесена к поглощению нуклеиновых кислот, что может использоваться в качестве прогностического маркера, в частности при лейкемии [29].

Таблица 2. Интенсивность полос поглощения в спектрах здоровых женщин и пациентов с раком молочной железы

Длина волны, см ⁻¹	Контроль (Ж), n=99	РМЖ, n=35	p-value
613-615	35,9 [31,8; 42,8]	33,1 [29,8; 36,8]	<u>0,0316</u>
860	9,8 [5,6; 19,1]	5,4 [3,2; 11,5]	<u>0,0083</u>
925-935	14,6 [7,6; 20,1]	10,0 [4,7; 16,2]	<u>0,0430</u>
960-970	17,9 [12,1; 23,8]	9,3 [6,8; 17,5]	<u>0,0001</u>
1070-1080	52,3 [42,9; 63,9]	31,7 [22,7; 42,9]	<u>0,0000</u>
1120-1130	41,9 [33,6; 48,8]	28,1 [19,0; 37,3]	<u>0,0000</u>
1155-1165	32,4 [25,3; 38,4]	20,7 [14,0; 29,6]	<u>0,0000</u>
1240	23,4 [18,6; 28,3]	14,9 [9,8; 22,6]	<u>0,0000</u>
1310	21,8 [18,2; 27,9]	17,9 [11,4; 25,8]	<u>0,0050</u>
1400	44,6 [36,8; 56,4]	44,8 [28,9; 60,7]	0,4957
1460	31,2 [25,9; 37,5]	24,2 [15,7; 31,2]	<u>0,0013</u>
1550	60,6 [48,2; 68,3]	50,7 [37,5; 70,6]	0,1956
1640	86,6 [61,2; 96,8]	62,7 [43,4; 84,3]	<u>0,0008</u>
1735	13,8 [9,5; 18,9]	9,6 [7,6; 13,3]	<u>0,0009</u>
2060	23,6 [12,8; 32,8]	16,1 [11,5; 25,2]	<u>0,0410</u>
2850	38,0 [28,6; 47,9]	40,8 [30,7; 54,9]	0,2009
2875	39,6 [29,9; 50,4]	41,9 [31,3; 58,1]	0,2492
2930	49,2 [38,6; 60,6]	52,9 [36,5; 69,3]	0,3823
2950	49,9 [38,8; 62,3]	52,8 [36,3; 70,4]	0,4704
3070	55,2 [41,9; 68,7]	54,1 [38,4; 72,0]	0,8060
3266	73,9 [50,9; 85,9]	53,6 [42,3; 72,0]	<u>0,0047</u>
3280	75,3 [52,1; 87,3]	54,3 [42,8; 72,9]	<u>0,0035</u>

Интервал 3050-2800 см⁻¹, который содержит колебания метильных и метиленовых групп насыщенных и ненасыщенных алкильных цепей, может оказаться полезным для оценки проницаемости мембран клеток, а также процессов окислительной модификации белков [30].

Следует отметить, что во всем спектральном диапазоне интенсивность полос поглощения при раке молочной железы и раке легкого ниже, чем для образцов контрольной группы (табл. 1, 2). Исключение составляет диапазон 2800-3050 см⁻¹, что может быть связано более выраженными процессами перекисного окисления липидов клеточных мембран и нарастанием эндогенной интоксикации на фоне онкологической патологии.

Полученные результаты подтверждаются использованием многомерных статистических методов, в частности дискриминантного анализа (рис. 2). На диаграмме рассеяния канонических значений видно, что точки, соответствующие образцам контрольной группы, располагаются левее вертикальной оси «0-0», тогда как точки, соответствующие пациентам с раком молочной железы и легкого, расположены правее. Четкого разделения относительно горизонтальной оси не отмечено, что, по-видимому, обусловлено общими для данных групп изменениями в организме человека при онкологической патологии.

Из литературных данных известно, что дополнительную диагностическую значимость могут иметь не только интенсивности поглощения на определенных длинах волн, но и соотношения интенсивностей отдельных пиков. Так, потенциально информативным может быть отношение интенсивностей пиков 2955/2921 см⁻¹, которое показывает соотношение разветвленных и неразветвленных молекул липидов и жирных кислот (CH₃/CH₂). На фоне онкологической патологии это соотношение ниже, чем в норме [31]. Это указывает на то, что липиды и жирные кислоты в клетках рака печени имеют менее разветвленные цепи и / или более длинные цепи, чем в нормальных клетках печени. Соотношение интенсивностей пиков 1744/1082 см⁻¹ может представлять соотношение липиды (жирные кислоты) / нуклеиновые кислоты. Повышение данного коэффициента при раке свидетельствует о том, что содержание липидов и жирных кислот увеличивается по сравнению с нуклеиновыми кислотами. Отношение интенсивностей пиков 1640/1535 см⁻¹ можно использовать для отражения вторичных белковых структур [32]. Отношение интенсивности полос поглощения 1398/1454 см⁻¹ также характеризует изменения во вторичной структуре белков, а также процессы, связанные с нарушением гипометилирования [28].

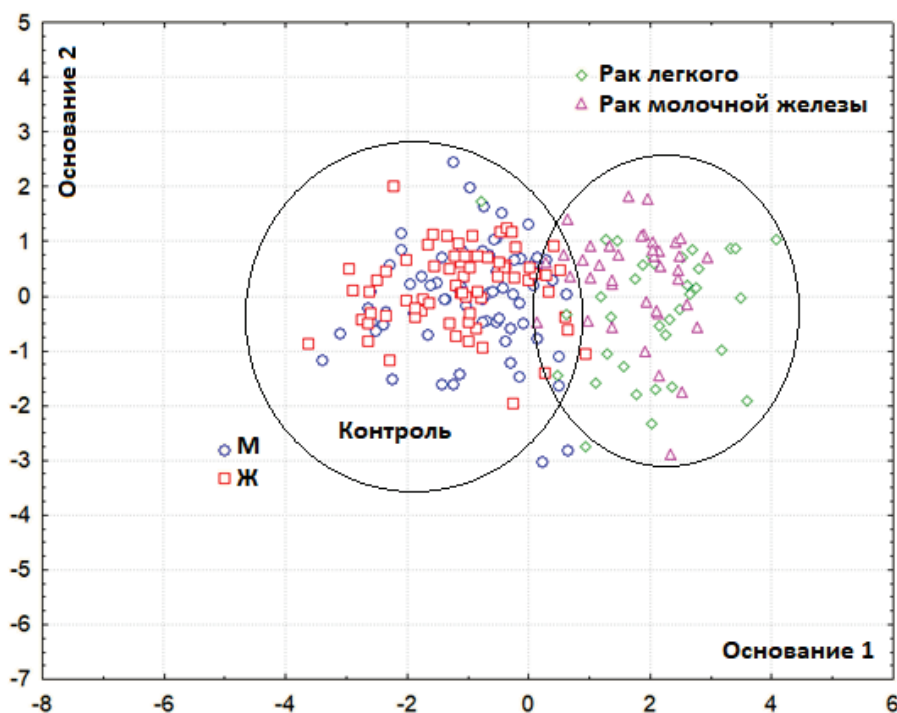


Рисунок 2. Диаграмма рассеяния канонических значений для исследуемых групп

Zhang et al. сравнивали раковые и нераковые ткани легких с помощью FTIR-спектроскопии, и они обнаружили, что четыре относительных коэффициента интенсивности, такие как I_{1640}/I_{1550} , I_{1460}/I_{1400} , I_{1240}/I_{1310} и $I_{1080}/I_{1160} \text{ cm}^{-1}$, являются полезными факторами для разделения злокачественных и здоровых тканей [10].

Показано, что для обеих групп изменение соотношений пиков при переходе от здоровых добровольцев к онкологическим больным однотипно (табл. 3, 4). При этом статистически достоверно увеличивается соотношение I_{1398}/I_{1454} , которое представляет собой отношение интенсивности полос поглощения метиленовых групп боковых цепей аминокислот (1398 cm^{-1}) и боковых цепей аминокислот в белках и липидах (1454 cm^{-1}). Соотношение I_{1460}/I_{1400} представляет собой величину, обратную соотношению I_{1398}/I_{1454} , поэтому закономерно уменьшается при переходе от контрольной группы к основным. Соотношение I_{1240}/I_{1310} уменьшается, причем более существенно уменьшение интенсивности полосы поглощения фосфолипидов (1240 cm^{-1}), чем амида III (1310 cm^{-1}). Для рака молочной железы статистически достоверно также уменьшение соотношения I_{1640}/I_{1535} , характеризующее интенсивности полос поглощения амида I и амида II (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показана принципиальная возможность диагностики рака легкого и молочной железы с использованием метода ИК-Фурье-спектроскопии. Выявлены коэффициенты I_{1398}/I_{1454} и I_{1240}/I_{1310} , изменение которых на фоне онкологической патологии статистически достоверно.

Таблица 3. Соотношение интенсивностей пиков в спектрах здоровых мужчин и пациентов с раком легкого

Отношение интенсивностей	М, n=155	РЛ, n=40	p-value	$\pm\Delta$, %
I 2955/2921	1,016 [1,008; 1,026]	1,017 [1,002; 1,026]	0,6175	+0,1
I 1744/1082	0,314 [0,213; 0,390]	0,321 [0,254; 0,455]	0,2806	+2,2
I 1640/1535	1,276 [1,168; 1,423]	1,247 [1,138; 1,340]	0,4280	-2,3
I 1398/1454	1,541 [1,339; 1,726]	1,743 [1,458; 1,946]	0,0060	+13,1
I 1460/1400	0,649 [0,579; 0,747]	0,574 [0,514; 0,686]	0,0060	-11,6
I 1240/1310	1,004 [0,936; 1,044]	0,887 [0,832; 0,954]	0,0000	-11,7
I 1080/1160	1,554 [1,365; 1,833]	1,514 [1,409; 1,669]	0,5692	-2,6

Таблица 4. Соотношение интенсивностей пиков в спектрах здоровых женщин и пациентов с раком молочной железы

Отношение интенсивностей	Ж, n=128	РМЖ, n=35	p-value	±Δ, %
I 2955/2921	1,013 [0,999; 1,020]	1,006 [0,990; 1,022]	0,2451	-0,7
I 1744/1082	0,272 [0,202; 0,427]	0,309 [0,230; 0,452]	0,1468	+13,6
I 1640/1535	1,351 [1,227; 1,521]	1,184 [1,124; 1,317]	0,0001	-12,4
I 1398/1454	1,417 [1,252; 1,740]	1,786 [1,591; 1,991]	0,0000	+26,0
I 1460/1400	0,706 [0,575; 0,799]	0,560 [0,502; 0,629]	0,0000	-20,7
I 1240/1310	1,013 [0,968; 1,061]	0,887 [0,825; 0,955]	0,0000	-12,4
I 1080/1160	1,614 [1,457; 1,834]	1,584 [1,430; 1,730]	0,2751	-1,9

Список литературы / References:

1. Bunaciu A.A., Hoang V.D., Aboul-Enein H.Y. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2015, vol. 45(2), pp. 156-165.
2. Zwielly A., Mordechai S., Sinielnikov I., Salman A., Bogomolny E., Argov S. Advanced statistical techniques applied to comprehensive FTIR spectra on human colonic tissues. *Med. Phys.*, vol. 37(3), pp. 1047-1055.
3. Sheng D., Wu Y., Wang X., Huang D., Chen X., Liu X. Comparison of serum from gastric cancer patients and from healthy persons using FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, vol. 116, pp. 365-369.
4. Baker M.J., Gazi E., Brown M.D., Shanks J.H., Clarke N.W., Gardner P. Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer. *J. Biophotonics*, 2009, vol. 2, pp. 104-113, DOI: 10.1002/jbio.200810062.
5. Ostrovsky E., Zelig U., Gusakova I., Ariad S., Mordechai S., Nisky I., Kapilushnik J. Detection of Cancer Using Advanced Computerized Analysis of Infrared Spectra of Peripheral Blood. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2013, vol. 60(2), pp. 343-353.
6. Ollesch J., Theegarten D., Altmayer M., Darwiche K., Hager T., Stamatis G., Gerwert K. An infrared spectroscopic blood test for non-small cell lung carcinoma and subtyping into pulmonary squamous cell carcinoma or adenocarcinoma. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2016, vol. 5, pp. 129-144, DOI: 10.3233/BSI-160144.
7. Ma X.D., Jiang S.P., Wang W., Li C.X., Wang H.Y. Comparison study on FTIR Spectra of finger nails of normal people and patients with lung cancer. *Chin. J. Spectrosc. Lab*, 2007, vol. 24, pp. 456-459.
8. Sun X., Xu Y., Wu J., Zhang Y., Sun K. Detection of lung cancer tissue by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy - a pilot study of 60 samples. *Journal of surgical research*, 2013, vol. 179, pp. 33-38.
9. Lewis P.D., Lewis K.E., Ghosal R., Bayliss S., Lloyd A.J., Wills J., Godfrey R., Kloer P., Mur L.A.J. Evaluation of FTIR Spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum. *BMC Cancer*, 2010, vol. 10, pp. 3-10, DOI: 10.1186/1471-2407-10-640.
10. Wang X., Shen X., Sheng D., Chen X., Liu X. FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, vol. 122, pp. 193-197.
11. Yano K., Ohoshima S., Gotou Y., Kumaido K., Moriguchi T., Katayama H. Direct measurement of human lung cancerous and noncancerous tissues by fourier transform infrared microscopy: can an infrared microscope be used as a clinical tool? *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 287, pp. 218-225.
12. Giorgini E., Balercia P., Conti C., Ferraris P., Sabbatini S., Rubini C., Tosi G. Vibrational Spectroscopy in Body Fluids Analysis. *Journal of Molecular Structure*, 2013, vol. 1051, pp. 226-232.
13. Yip H.K., To W.M. An FTIR study of the effects of artificial saliva on the physical characteristics of the glass ionomer cements used for art. *Dental Materials*, 2005, vol. 21, pp. 695-703.
14. Khaustova S., Shkurnikov M., Tonevitsky E., Artyushenko V., Tonevitsky A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst*, 2010, vol. 135, pp. 3183-3192, DOI: 10.1039/c0an00529k.
15. Perez-Guaita D., Ventura-Gayete J., Pérez-Rambla C., Sancho-Andreu M., Garrigues S., de la Guardia M. Protein determination in serum and whole blood by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, vol. 404(3), pp. 649-656.
16. Bogomolny E., Argov S., Mordechai S., Huleihel M. Monitoring of viral cancer progression using FTIR microscopy: a comparative study of intact cells and tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol. 1780(9), pp. 1038-1042.
17. Nonaka T., Wong D.T.W. Saliva-Exosomics in Cancer: Molecular Characterization of Cancer-Derived Exosomes in Saliva. *The Enzymes*, 2017, vol. 42, pp. 125-151.
18. Кондратова В.Н., Ботезату И.В., Шелепов В.П., Лихтенштейн А.В. Внеклеточные нуклеиновые кислоты как маркеры опухолевого роста. *Российский биотерапевтический журнал*, 2013, № 12(3), с. 3-10.

[Kondratova V.N., Botezatu I.V., Shelepov V.P., Likhtenshteyn A.V. Extracellular nucleic acids as markers of tumor growth. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*, 2013, vol. 12(3), pp. 3-10. (In Russ.)]

19. Garcia V., Garcia J.M., Pena C., Silva J., Domínguez G., Lorenzo Y., Diaz R., Espinosa P., de Sola J.G., Cantos B., Bonilla F. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. *Cancer Lett.*, 2008, vol. 263, pp. 312-320, DOI: 10.1016/j.canlet.2008.01.008.

20. Miura N., Nakamura H., Sato R., Tsukamoto T., Harada T., Takahashi S., Adachi Y., Shomori K., Sano A., Kishimoto Y., Ito H., Hasegawa J., Shiota G. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci.*, 2006, vol. 97, pp. 1366-1373, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00342.x.

21. Stroun M., Maurice P., Vasioukhin V., Lyautey J., Lederrey C., Lefort F., Rossier A., Chen X.Q., Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, vol. 906, pp. 161-168.

22. Schwarzenbach H., Alix-Panabieres C., Muller I., Letang N., Vendrell J.P., Rebillard X., Pantel K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2009, vol. 15, pp. 1032-1038, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1910.

23. Jian G., Songwen Z., Ling Z., Qinfang D., Jie Z., Liang T., Caicun Z. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2010, vol. 136, pp. 1341-1346, DOI: 10.1007/s00432-010-0785-z.

24. Dovbeshko G.I., Chegel V.I., Gridina N.Y., Repnytska O.P., Shirshov Y.M., Tryndiak V.P., Todor I.M., Solyanik G.I. Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study. *Biopolymers*, 2002, vol. 67(6), pp. 470-486.

25. Argov S., Sahu R.K., Bernshtain E., Salam A., Shohat G., Zelig U., Mordechai S. Inflammatory bowel diseases as an intermediate stage between normal and cancer: a FTIR-microspectroscopy approach. *Biopolymers*, 2004, vol. 75(5), pp. 384-392.

26. Yang Y., Sule-Suso J., Sockalingum G.D., Kegelaer G., Manfait M., El Haj A.J. Study of tumor cell invasion by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*, 2005, vol. 78(6), pp. 311-317.

27. Li Q.B., Sun X.J., Xu Y.Z., Yang L.M., Zhang Y.F., Weng S.F., Shi J.S. Diagnosis of gastric inflammation and malignancy in endoscopic biopsies based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Clin. Chem.*, 2005, vol. 51(2), pp. 346-350.

28. Ganim Z., Chung H.S., Smith A.W., Deflores L.P., Jones K.C., Tokmakoff A. Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. *Acc. Chem. Res.*, 2008, vol. 41(3), pp. 432-441, DOI: 10.1021/ar700188n.

29. Schultz C.P. The Potential Role of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Imaging in Cancer Diagnosis Incorporating Complex Mathematical Methods. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2002, vol. 1(2), pp. 95-104.

30. Petibois C., Deleris G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends Biotechnol.*, 2006, vol. 24(10), pp. 455-462, DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.08.005.

31. Sheng D., Xu F., Yu Q., Fang T., Xia J., Li S., Wang X. A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 2015, vol. 1099, pp. 18-23.

32. Zhou S., Xu Z., Ling X.F., Li Q.B., Xu Y.Z., Zhang L., Zhao H.M., Wang L.X., Hou K.Y., Zhou X.S., Wu J.G. FTIR spectroscopic characterization of freshly removed breast cancer tissues. *Chin. J. Oncol.*, 2006, vol. 28(7), pp. 512-514.

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF SALIVA FTIR-SPECTROSCOPY FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER

Bel'skaya L.V., Sarf E.A.

Omsk State Pedagogical University

Naberezhnaya Tukhachevskogo str., 14, Omsk, 644043, Russia; e-mail: Ludab2005@mail.ru

Abstract. The basic possibility of diagnosing lung and breast cancer using the method of IR Fourier spectroscopy is shown. Statistically significant differences for infrared spectra of saliva in patients with lung cancer are observed in the spectral range of 1070-1240 cm⁻¹ and can be attributed to nucleic acids. For the group of patients with breast cancer, the differences in the spectra are significantly larger: absorption bands of phosphodiester groups, nucleic acids and phospholipids (1300 and 800 cm⁻¹), methyl and methylene groups of protein molecules, lipids, and carboxyl groups of fatty acids and amino acids (1500 -1300 cm⁻¹), DNA and RNA (1700-1580 cm⁻¹), as well as methyl and methylene groups of saturated and unsaturated alkyl chains (3050-2800 cm⁻¹) differ in intensity. Coefficients revealed I1398/1454 and I1240/1310, whose change against the background of oncological pathology is statistically significant.

Key words: saliva, infrared spectroscopy, diagnosis, lung cancer, breast cancer.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ И ОБЩАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ И АЛЮМИНИЯ В ВОЛОСАХ МАТЕРИ И РЕБЕНКА МЕТОДАМИ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Зажогин А.П.¹, Минько А.А.¹, Патапович М.П.², Павлюковец С.А.²

¹Белорусский государственный университет

пр. Независимости, д. 4, г. Минск, 220030, Беларусь; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Белорусская государственная академия связи

ул. Ф. Скорины, д. 8/2, г. Минск, 220114, Беларусь

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Разработана методика ретроспективной оценки метаболизма ЖНЭ и алюминия в организме человека по количественному определению их содержания в волосах методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии при возбуждении спектров электрической дугой и сдвоенными лазерными импульсами. Сокращены временные и материальные затраты на пробоподготовку, повышены пределы чувствительности метода, что улучшает количественные оценки и ускоряет процесс анализа, приближая его к экспрессным. Показана возможность проведения ретроспективной оценки метаболизма жизненно необходимых элементов по анализу волос детей с выраженными нарушениями поведения и задержкой развития и их матерей. Метод позволяет оперативно оценивать изменения содержания элементов, характеризовать динамику процесса лечения, своевременно вводить коррективы. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологические образцы; волосы; электрическая дуга переменного тока; атомно-эмиссионная многоканальная спектроскопия; ретроспективный анализ метаболизма; жизненно необходимые элементы.

В последнее время все больший интерес представляют комплексные исследования волос матери и больного ребенка для выявления состояния обмена макро- и микроэлементов в организме и оценки психологического воздействия на такой обмен. Аутизм – это патология развития ребенка, при которой до трехлетнего возраста возникают проблемы с общением, речью, развивается стереотипное поведение. Эти признаки относятся к необходимым для диагноза, но зачастую есть и иные нарушения: проблемы эмоционального плана, фобии, агрессивность и аутоагрессивность, различные расстройства сна. Есть и другие заболевания, которые сейчас часто рассматривают как расстройства аутичного спектра, при этом границы между ними не всегда однозначны. Чем позже проявляются симптомы, тем меньше патология интеллекта. При некоторых видах таких расстройств умственное развитие нередко бывает даже выше среднего [1].

Детский организм в силу существующих анатомо-физиологических особенностей, в большей мере подвержен риску дисбаланса минералов. Дети более чувствительны к воздействию неблагоприятных экзо- и эндогенных факторов, поэтому, элементный дисбаланс может вызвать значительные изменения в состоянии здоровья детей. Как правило, дисбаланс химических элементов в организме детей одновременно включает избыточное накопление ряда токсичных металлов (Al, Be) и недостаточное содержание эссенциальных микроэлементов и макроэлементов (Zn, Fe, Ca, Mg, и др.). Что касается алюминия, то его физиологическая роль в организме человека изучена недостаточно. Однако можно говорить о том, что алюминий действует на нервную систему: накапливается в нервной ткани, приводя к тяжелым расстройствам центральной нервной системы. Данный химический элемент является генотоксичным, т.к., вследствие высокого аффинитета к фосфатным группам ДНК, легко с ней связывается. Следовательно, нарушается процесс митоза. Алюминий дестабилизирует различные метаболические процессы в нейронах, обеспечивающие поддержание эндогенного пула антиоксидантов (потенцирует глутамат-индуцированное накопление внутриклеточного кальция в нейронах). В результате накопления алюминия в организме, в частности, в нервных клетках, у пациентов возрастает степень окислительного повреждения тканей с развитием нейродегенеративной патологии мозга. Поэтому, коррекцию нарушений элементного статуса необходимо проводить с использованием постоянного контроля поступления и накопления элементов [2].

Интерес к таким исследованиям вызван тем, что, не смотря на предпринимаемые усилия по остановке роста численности детей аутистов их количество возросло более чем на 1000 % за последние 20 лет. В настоящее время аутизм рассматривается как эпидемия – только за последние 6 лет частота патологии в США возросла с 1:150 до 1:50 детей [3]. Частота заболеваний различается в различных странах, например, в Японии – она еще выше, а в Южной Корее по итогам 2012 г. она составляет 1:38 человек. Причем, как подчеркивает автор доклада, эти цифры получены не вследствие улучшения диагностики этого заболевания, она стала более эффективной в среднем всего на 30 %. Следует учитывать, что изменение генетических факторов вследствие естественных мутаций может дать прирост частоты всего лишь 1 % за 100 лет. Собственно, всё остальное происходит за счет факторов внешней среды.

Несмотря на обширные исследования, до полного понимания истоков биохимических сбоев еще далеко. Возможно, своевременно проведенная оценка количественных изменений содержания жизненно необходимых элементов за длительный промежуток времени поможет наметить пути коррекции основных направлений в лечении ребенка.

Для оценки динамики накопления металлов в организме необходима достоверная информация об их поступлении не только в настоящем, но и в прошлом, то есть необходим ретроспективный анализ изменения содержания элементов [4].

Точные причины возникновения аутизма не ясны, однако считается, что речь идет о генетических факторах. Однако, огромный рост случаев аутизма не может быть полностью объяснен только генетическими причинами. Несомненно, должен существовать фактор окружающей среды, влияние которого делает уязвимых детей аутичными. Во многих индивидуальных случаях обусловленные окружением факторы выступают как спусковой крючок, вызывающий развитие болезни [5, 6].

С целью прояснения выявления влияния окружающей среды на причины возникновения аутизма специалисты из King's College London (Великобритания), Karolinska Institutet (Швеция) и Школы медицины при больнице Mount Sinai (Нью-Йорк, США) [3] провели анализ массива данных о более, чем двух миллионах детей, появившихся на свет в Швеции с 1982 по 2006 год. У 14 516 из них были диагностированы различные типы расстройств, в том числе 5 689 случая аутизма. Ими установлено, что факторы окружающей среды играют значительно более важную роль в каждом отдельном случае аутизма, чем об этом было принято думать до сих пор – их вклад составляет примерно половину общей суммы риска развития расстройства. Остальная часть приходится на наследственную предрасположенность. Поскольку аутизм сильно коррелирует с пороками развития во время критической стадии, особенно на этапе развития эмбриона, ученые обнаружили, что некоторые самые сильные предикторы аутизма связаны с окружающей средой. На всех стадиях беременности плод чрезвычайно уязвим перед любыми токсинами, которые влияют на мать: к примеру лекарства, которые отпускаются по рецепту, или же пестициды в окружающей среде.

Элементы можно определять в биологических жидкостях: крови, сыворотке, моче, спинно-мозговой жидкости, а также в тканях. Необходимо, однако, заметить, что определение содержания элементов в сыворотке или в крови может не отражать содержания этих элементов в организме в данный момент, поскольку действуют механизмы, выравнивающие уровень элементов в крови за счет резервов в тканях, так что, несмотря на кажущуюся нормальную концентрацию в сыворотке, содержание элементов в организме может быть недостаточным. Непосредственное влияние на концентрацию элементов в крови оказывает, например, применяемая в данный момент диета [7].

Наилучшим методом определения количества и содержания элементов в организме является определение их концентрации в волосах. Волосы представляют собой ткань, состоящую из очень устойчивого белка - кератина, который образует слой волоса, устойчивый к действию: внешних факторов, предупреждающий проникновение внешних загрязнений внутрь волоса, а также предотвращает потерю внутренних компонентов. Это обеспечивает постоянство химического состава. Очень легко удаляются с волоса внешние загрязнения, благодаря чему можно получить очень хорошую повторяемость аналитических результатов. По мнению многочисленных авторов, анализ концентраций элементов незначительного содержания в волосах является наилучшим методом оценки минерального состояния организма [7].

Одновременное определение микроконцентраций нескольких элементов может быть выполнено с помощью различных экспрессных инструментальных методов анализа, отличающихся простотой, не требующих большого количества исследуемого материала и обеспечивающих требуемую относительную точность. К таким методам в первую очередь относится атомно-эмиссионный спектральный анализ, который в современном исполнении регистрации спектров (фотодиодные и ПЗС линейки и матрицы) дает возможность одновременного определения до 35 элементов с достаточной чувствительностью и точностью. Эмиссионная спектроскопия, использующая электрическую дугу, электрический искровой разряд, лазерную искру, - мощное средство, позволяющее обнаружить до 70 элементов при кратковременном возбуждении нескольких микрограммов анализируемого образца [4, 6].

К методам, позволяющим проводить одновременное определение микроконцентраций нескольких элементов, в первую очередь относится атомно-эмиссионный спектральный анализ. Метод является одним из экспрессных инструментальных методов анализа, отличающихся простотой, не требующих большого количества исследуемого материала и обеспечивающих необходимую относительную точность [3 - 6].

При проведении исследований были проанализированы образцы волос 4 семейных пар – матерей и их малолетних детей.

Для интегрального показателя минерального обмена элементов исследованы минерализованные образцы волос. Минерализацию проб волос проводили методом мокрого озоления. Многоэлементный состав образцов определяли методом атомно-эмиссионной многоканальной спектрометрии с использованием многоканального атомно-эмиссионного спектрометра ЭМАС-200 Д. Возбуждение спектров проводили электрической дугой переменного тока. Количественные результаты определения общего содержания ЭЭ в анализируемых образцах приведены в таблице 1. Внизу таблицы приведены референтные значения [3, 4, 7].

Таблица 1. Содержание элементов в волосах детей и их матерей, мкг/100 г

№	Fe	Al	Mg	Ca	Cu	Zn
1 р	2398	1595	1206	84094	31,2	9344
2 м	2075	808	1246	26925	52,6	9267
3 р	1698	1122	4891	296726	19,5	18772
4 м	783	807	2239	51262	24,3	4380
5 р	598	564	2833	69719	41,2	7725
6 м	1262	1156	3195	81385	28,3	8954
7 р	3162	2123	6520	44254	37,5	7665
8 м	2919	902	733	149168	28,5	4465
Референтные значения						
нижнее	1500	200	2500	20000	650	12500
верхнее	5000	4000	12000	150000	1500	25000

Анализ полученных данных показывает, что практически во всех исследованных пробах наблюдается существенный недостаток меди и цинка. По всей вероятности, в первую очередь, это обусловлено спецификой питания.

Особое внимание следует уделить кальцию и магнию. Они являются важнейшими макроэлементами. Кальций необходим для нормального сокращения мышц, проведения нервного импульса, выброса гормонов и свертывания крови. Он также способствует регуляции многих ферментов. Избыток кальция чаще всего препятствует усвоению магния. Повышенное содержание кальция влечет понижение концентрации магния, что видно из таблицы.

Также ясно, что во многих случаях мы наблюдаем значительное превышение концентрации кальция по сравнению с нормой. Такие показатели характерны для матерей. Исключение составляет ребенок № 3 (ребенок 3-х лет).

Для оценки процессов поступления ЭЭ в организм на примере кальция нами изучена динамика изменения его концентрации во времени. Проведен количественный ретроспективный анализ изменения его содержания по длине волос, что позволяет восстановить историю поступления элементов в организм за длительный промежуток времени, при необходимости за несколько лет.

В работе использовали лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Источником возбуждения плазмы является двухимпульсный неодимовый лазер с регулируемой энергией и интервалом между импульсами (модель LS2131 DM). Лазер обладает широкими возможностями как для регулировки энергии импульсов (от 10 до 80 мДж), так и временного интервала между импульсами (от 0 до 100 мкс). Лазер может работать с частотой повторения импульсов до 10 Гц и максимальной энергией излучения каждого из двоек импульсов до 80 мДж на длине волны 1064 нм. Длительность импульсов ≈ 15 нс. Все эксперименты проводятся в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении.

При проведении исследований анализировали суммарные результаты действия 30 последовательных лазерных импульсов (энергия 36 мДж, межимпульсный интервал 8 мкс) на точку образца волос через 0,5 см, что примерно соответствует интервалу роста волос за половину месяца. В случае необходимости каждый участок может быть разбит на точки размером $\approx 0,3$ мм.

В качестве примера на рисунке 1 приведены результаты изменения концентрации кальция в образцах волос по их длине двух пар - у детей (1 и 3) и их матерей (2 и 4).

Концентрации кальция в последовательных точках по длине для образцов волос ребенка и матери (образцы 1 и 2 из таблицы 1) представлены на рисунке 1а. Видно, что концентрация кальция в течение последней половины года у матери повысилась, и стала чуть выше нижнего значения. В тоже время у ребенка наблюдается существенное понижение уровня кальция. Последнее, говорит, о каком-то стрессовом состоянии у ребенка.

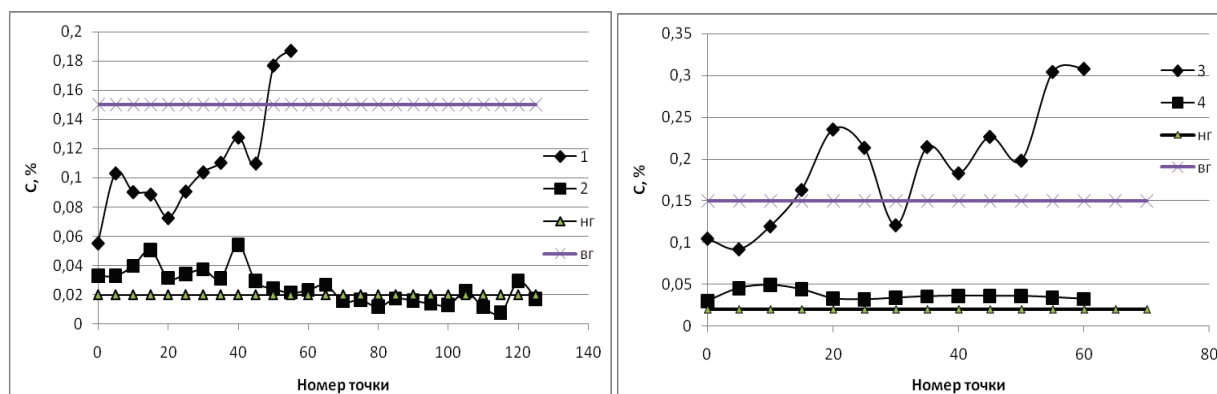


Рисунок 1. Концентрация кальция в последовательных точках по длине волос

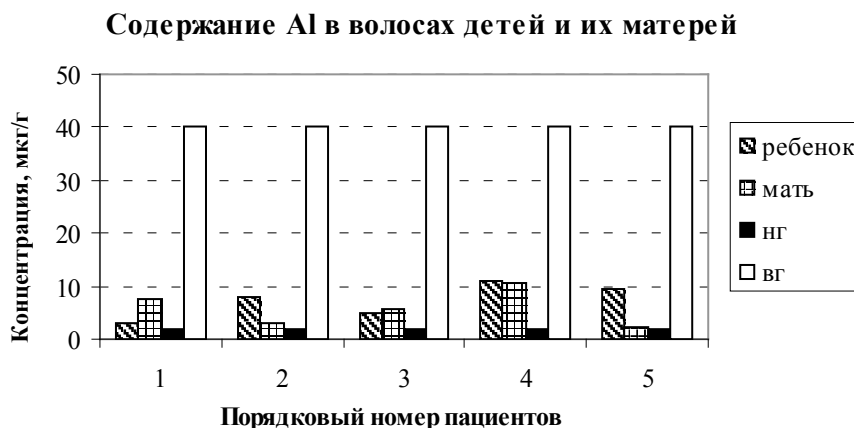


Рисунок 2. Содержание элементов в волосах детей и их матерей (нг – нижняя граница, вг – верхняя граница)

Аналогичное, наблюдается и у ребенка 3 (рис. 1б) и у матери, но на фоне существенного избытка кальция у ребенка. Анализ волос открывает новые перспективы для решения проблем со здоровьем, потому что выявляет нашу биохимическую индивидуальность. Такой неинвазивный способ получения биоматериала, не связанный с взятием проб крови и травматизацией детей абсолютно безопасен.

Существует множество исследований, которые определяли опасность ингредиентов вакцин. К примеру, алюминий, который также используется в вакцинах, может быть причиной большого количества нейродегенеративных расстройств, одним из которых является аутизм. На рисунке 2 приведено распределение алюминия у нескольких исследуемых пациентов. Как видно в этих случаях существенного завышения концентрации алюминия как у детей, так и их матерей.

Анализ волос открывает новые перспективы для решения проблем со здоровьем, потому что выявляет нашу биохимическую индивидуальность. Такой неинвазивный способ получения биоматериала, не связанный с взятием проб крови и травматизацией детей абсолютно безопасен.

Определив содержание в организме основных микроэлементов, а также таких важных макроэлементов, как калий, кальций, магний, можно искать причину существующего дисбаланса, целенаправленно подбирать биологически активные добавки или препараты, корректировать питание. Важно еще и то, что эффективность проведенной коррекции может быть проконтролирована повторными анализами в реальном масштабе времени (вплоть до нескольких десятков минут).

Если удастся точнее определить механизм обмена веществ с участием алюминия, то появится возможность разработки лекарственных препаратов, уменьшающих проявления симптомов аутизма, а диагноз можно будет ставить в самом раннем возрасте – еще младенцам.

Список литературы / References:

1. Atladóttir H.Ó., Henriksen T.B., Schendel D.E., Parner E.T. Autism after infection, febrile episodes, and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study. *Pediatrics*. 2012, vol. 130, no. 5, pp. 1447-1454.
2. Курец Н.И. Роль дисбаланса химических элементов в формировании хронической патологии у детей. *Ж. медицинские новости*, 2006, № 2, с. 7-17. [Kurec N.I. Chemical elements disbalance role in chronic pathology forming in children. *J. med. news*, 2006, no. 2, pp. 7-17. (In Russ.)]
3. Sandin S., Lichtenstein P., Kuja-Halkola R., Larsson H., Hultman C.M., Reichenberg A. The Familial Risk of Autism. *The Journal of the American Medical Association*, 2014, vol. 311, no. 17, pp. 1770-1777.
4. Патапович М.П., Пашковская И.Д., Ань Л.Т.К., Нечипуренко Н.И., Зажогин А.П. Разработка методик определения содержания тяжелых металлов в волосах методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. *Материалы междунар. науч. конф. «Фундаментальные науки — медицине: материалы»*, Минск, 17 мая 2013 г., 2 ч., с. 119-123. [Patapovich M.P., Pashkovskaya I.D., Anh L.T.K., Nechipurenko N.I., Zajogin A.P. Development of the methods to estimate the content of heavy metals in hair by the laser atomic-emission spectrometry method. *Fundamental Sciences for Medicine: materials of the Inter. Scient. Conf.*, Minsk, May 17, 2013, part 2, pp. 119-123. (In Russ.)]
5. Нестерова Д.В. *Ваш домашний доктор. Расшифровка анализов без консультации врача*. М.: РИПОЛ классик, 2011, 200 с. [Nesterova, D.V. Your domestic doctor. Interpretation of analyses without doctor consultations. M.: RIPOЛ Classic, 2011, 200 p. (In Russ.)]
6. Зажогин А.П. *Атомный спектральный анализ: курс лекций*. Минск: Изд-во БГУ, 2005. 163 с. [Zajogin A.P. *Atomic spectral analysis: Lecture course*. Minsk: BSU Pub., 2005, 163 p. (In Russ.)]
7. Скальный А.В. *Микроэлементозы человека (диагностика и лечение)*. Изд-во Москва, 1999, 180 с. [Skalny A.V. *Human microelementoses (diagnostics and treatment)*. Moscow publ. house, 1999, 180 p. (In Russ.)]

RETROSPECTIVE AND GENERAL ESTIMATION OF THE ESSENTIAL ELEMENTS AND
ALUMINUM CONTENT IN THE HAIR OF MOTHER AND CHILD BY THE ATOMIC-EMISSION
SPECTROMETRY METHODS

Zajogin A.P.¹, Minko A.A.¹, Patapovich M.P.², Pavlucovec S.A.²

¹Belorussian State University

Nezalieznasci av., 4, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Belorussian State Academy of Communication

F. Skoryny str., 8/2, 220114, Minsk, Belarus

Abstract. The methods of retrospective estimation of the essential elements and aluminum metabolism in a human organism by quantitative evaluation of their content in the hair of mother and child has been developed with the use of multichannel atomic-emission spectrometry when spectra are excited by the electric arc or double laser pulses. The required time and material expenditures for sample preparation have been lowered, whereas the sensitivity limits have been improved, that contributes to fast quantitative estimates and analysis approaching the express methods. The possibility to have retrospective estimates of metabolism of the essential elements by analysis of the hair of children with marked behavioral disturbances and mental retardation and of their mothers has been shown. The method allows for operative estimation of variations in the essential elements content and for timely corrections of the treatment course. The obtained experimental data may be used as a basis for the development of early diagnostic methods detecting disturbances in the functional resources of a human organism and for the selection of adequate rehabilitation measures.

Key words: *biological samples; hair; alternating current (a. c.) arc; multichannel atomic-emission spectrometry; retrospective analysis of metabolism; essential elements.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРФОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА
Зажогин А.П.¹, Маслова Г.Т.¹, Булойчик Ж.И.¹, Мавричев А.С.², Державец Л.А.², Трубецкая А.С.¹, Титова А.В.¹

¹Белорусский государственный университет

пр. Независимости, д. 4, г. Минск, 220030, Беларусь; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии

им. Н.Н. Александровна

Агродорок Лесной, Минский р-н, 223040, Беларусь

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Изучена морфология образцов высохшей плазмы крови больных с онкопатологией головного мозга. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом опухоли мозга различной степени. Показана возможность уточнения диагноза по отнесению опухоли к различным типам. Получены полуколичественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли биологических жидкостей и в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологическая жидкость; морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; сдвоенные лазерные импульсы; пространственное распределение, послыйный анализ, кальций.

В последние годы обозначился заметный рост заболеваний центральной нервной системы, в том числе опухолей головного мозга (ОГМ). Становится очевидным, насколько особенно важна ранняя диагностика заболеваний такого рода. Первичные опухоли центральной нервной системы (ЦНС) составляют 1,4 % от всех злокачественных опухолей и 2,4 % от онкологической летальности. Высокая летальность и инвалидизация больных, значительный социальный, экономический и моральный ущерб, который эта патология наносит обществу, вызывают вполне обоснованный интерес исследователей к организации медицинской помощи данным больным, к вопросам их реабилитации и социальной адаптации [1-3].

Опухоли головного мозга — гетерогенная группа различных внутричерепных новообразований, доброкачественных или злокачественных, а также возникающих вследствие метастазирования первичной опухоли, находящейся в другом органе. Тип опухоли определяется клетками, её формирующими. В зависимости от локализации и гистологического варианта формируется симптоматика заболевания. Течение заболевания при опухолях мозга зависит не столько от гистологического типа опухоли, сколько от того, в какой области опухоль развилась и какие участки мозга сдавливает.

Опухоли головного мозга встречаются практически в любом возрасте. Наибольшая доля заболевших приходится на возраст от 40 до 69 лет. Если средняя выживаемость больных с анапластическими астроцитомами составляет около 24 мес., то ситуация у пациентов с глиобластомами значительно хуже. Так, по оценкам разных авторов средняя продолжительность жизни больных этой группы редко превышает 12 мес. [1-3].

Лечение больных злокачественными опухолями центральной нервной системы — одна из сложных проблем нейроонкологии, что продиктовано, прежде всего, неоднородностью тканевого генеза и структурно-биологических свойств новообразований. Только хирургическое лечение является единственным жизненноспасающим и увеличивающим выживаемость нейроонкологических больных методом [1-3].

В механизме патогенеза раковых новообразований главнейшим звеном следует считать нарушение порядка самоорганизации белка на клеточном уровне. В клинической практике используют около двух десятков онкомаркеров (ОМ), обладающих достаточной диагностической значимостью, в то же время неизвестно ни одного ОМ, соответствующего идеальным параметрам. Для получения однозначного результата требуется тщательное сравнение многочисленных показателей. Поэтому поиски всестороннего подхода к диагностике ОГМ продолжаются.

Известно, что биологическая жидкость (БЖ) играет роль функционального системообразующего фактора, связывая пространственно-временные структуры внутренней среды организма. Внутренняя среда организма реагирует на изменение пространственного порядка своих химических связей. Любое изменение физико-

химического состояния внутренней среды организма находит свое отражение в специфическом изменении формообразования ее структур.

Механизм и моделям дегидратационной самоорганизации БЖ посвящено большое количество работ [4]. Морфология твердой фаз используется как метод диагностики в медицине [5]. Подробно изучаются физические основы структурной эволюции высыхающей капли БЖ и факторы, влияющие на ее морфогенез [6].

Анализ формы образующихся структур используют для определения патологических отклонений в системе и устойчивости физиологических процессов организма, поскольку структура БЖ дает сжатую информацию о состоянии организма. Особенности состояния организма сказываются на процессе кристаллизации веществ, содержащихся в БЖ, и проявляются в появлении на изображении фации (высохшая капля) характерных структур. В отличие от здорового человека, который обладает компенсаторно-адаптационными возможностями и сбалансированностью метаболических реакций в организме, для пациентов с патологией характерен иррадиальный тип структуропостроения.

Тем не менее остается ряд проблем в практическом применении морфологии твердой фазы БЖ [7]. В первую очередь это касается перевода данных методов из теории науки в практическую деятельность медицины. Ведь, за исключением отдельных запатентованных способов диагностики заболеваний по особенностям структуризации БЖ, большая часть исследований находится на стадии феноменологического описания вследствие трудности количественного анализа получаемых паттернов, что в свою очередь, затрудняет применение статистических методов анализа. Высокая степень субъективизма в оценке результатов также не способствует решению данной проблемы.

Весомым минусом приведенных методов является недостаточная обоснованность механизмов дегидратационной самоорганизации БЖ, а ведь в данном случае особо ценным является не феноменологическое описание типа «вид патологии – наблюдаемые структуры», а анализ обменных процессов, обуславливающих особенности механизмов формирования структуры твердой фазы БЖ. В конечном счете обилие авторских методик, зачастую не имеющих принципиальных различий, но предлагающих собственные алгоритмы анализа результатов, отнюдь не способствует применению морфологии твердой фазы БЖ в медицине. Тем не менее, очевидны перспективы использования структуризации твердой фазы БЖ в самых разнообразных областях медицины [7].

В ряде работ на основе тщательного анализа высохшей капли БЖ пациентов различной патологии показаны особенности системной организации БЖ, выделены характерные структуры, которые могут служить маркерами не только уже проявившегося заболевания, но и свидетельствовать о самой начальной форме заболевания, когда симптомы заболевания еще практически отсутствуют. В последнее время разрабатываются алгоритмы распознавания конкретных видов маркеров, соответствующих физиологическому (нормальному) и патологическому состоянию организма, исследуется их эффективность [7, 8].

Поскольку при патологических процессах происходит изменение фазового состояния белка, выявлены достаточно четкие зависимости типа «вид наблюдаемых структур - патологический процесс». И хотя в последнее время появилось множество работ, показывающих, что развитие самых разнообразных патологических процессов в организме сопровождается изменением распределения коллоидных частиц и солей БЖ, что сказывается на изменении морфоструктур высохших капель, до сих пор практически отсутствуют количественные оценки образующихся структур. На сегодняшний день нет модели, которая бы одновременно учитывала оба фактора.

В работах [9, 10] авторами проведен сравнительный анализ уровня нейроспецифических белков и показана возможность их использования в качестве дополнительного биохимического критерия поражения ГМ. Уделяется внимание особым изменениям в морфологической структуре фаций сыворотки крови больных с метастазами, что дополняет число маркеров патологических процессов различного типа [11, 12].

Нами ранее было показано, что изучение динамики структурирования БЖ и пространственного распределения жизненно необходимых элементов в высохшей капле плазмы крови дает возможность уточнять диагноз, оценивать результаты лечения пациентов с онкопатологией [13]. С этой же целью нами продолжены исследования структурирования высохших капель плазмы крови пациентов с ОГМ. Проведена также количественная оценка локального пространственного распределения кальция в высохшей капле.

Для изучения морфологии и пространственного распределения кальция в высохшей капле плазму крови (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку из оргстекла, высушивали при комнатной температуре в открытой системе в течение 90 - 100 минут. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм.

Снимки высохших капель плазмы крови регистрировали, используя оптический микроскоп Webbers, совмещенный с цифровой камерой (отраженный свет), и микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой. Оба микроскопа имеют видеонасадки, работающие с компьютером по USB-2 порту.

Изучена морфология высохших капель плазмы крови более 40 пациентов с опухолью головного мозга различной степени и характером патологии. В качестве примера на рисунке 1 приведена морфология центральной части высохшей через 90 минут капли плазмы крови некоторых пациентов с ОГМ, а также с онкологией других органов и метастазами (Мтс) в ГМ (увеличение 120 раз).

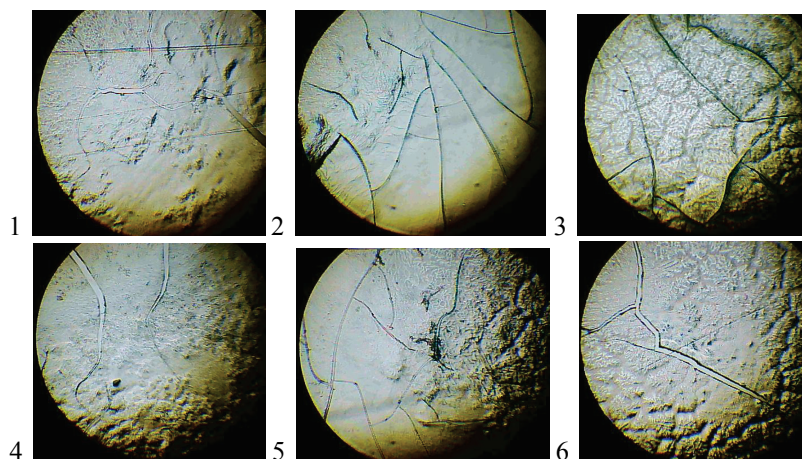


Рисунок 1. Центральная часть высохших капель плазмы крови. Диагноз пациентов 1 и 2 – диффузная астроцитома ГМ, степень патологии – G II. У пациенток 3 и 4 – метастазы ГМ вследствие онкологии других органов, у 3 – рак молочной железы, 4 – карцинома яичников. Степень патологии пациентов 5, 6 – G IV. Диагноз пациентов: 5 – пинеобластома ГМ, 6 – глиобластома ГМ.

Видно, что при патологических состояниях организма характерны существенные изменения морфологической структуры фации. Проявляются нарушения в виде потери симметрии расположения основных элементов фации (конкреций, отдельностей, морщин, трещин и т. д.) [6-8]. Идентифицируются различные типы фаций, кроме радиального нормотипа.

Объемной структурной деформации наименее всего подвержены высохшие капли плазмы крови пациентов 1 и 2, поверхность которых относительно гладкая, но с аномальным расположением трещин. Согласно имеющейся классификации, для этих больных характерен частично-радиальный и иррадиальный тип фации [12]. Присутствуют трехлучевые трещины (маркер застойных явлений в организме), небольшие жгуты (признак гипоксии ГМ) и бляшки (интоксикация организма) [12].

Структура остальных приведенных высохших капель во многом схожа. Исключительно у больных с глубокой патологией (пациенты 5 и 6 с онкологией 4-ой степени) обильно присутствуют в фации морщины (складчатость), хаотично разбросанные широкие жгутовые трещины, множество бляшек.

Морфотип фации пациентов 3 и 4 с метастазами в ГМ также характеризуется наличием стойких патологических структур, в частности «языков Арнольда» и «ковров Серпинского», которые встречаются в группе больных с метастазами и считаются маркерами воспалительных процессов [11]. Присутствуют «токсические бляшки» и «морщины».

Для конкретизации патологии обследованных больных дополнительная информация получена при определении кальция с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии (ЛАЭМС). Количественную оценку локального пространственного распределения кальция по поверхности и объему всей высохшей капли проводили с помощью лазерного многоканального атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 104 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Аблиция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

Полученные данные интенсивности линий кальция в спектрах анализируемых высушенных капель плазмы крови приведены на рисунке 2.

Для здорового человека (Зд) характерно уже хорошо изученное равномерное распределение кальция по поверхности высохшей капли с максимальной концентрацией в краевом белковом валике благодаря равномерной диффузии раствора к краям в процессе испарения. При патологии изменение связывающей способности альбумина приводит к аномальной коагуляции белка и увеличению концентрации кальция в более глубоких слоях.

Локальное пространственное распределение кальция имеет минимальное отклонение от нормы у первых двух пациентов. Основное содержание кальция приходится на два верхних слоя с максимальной концентрацией в краевом белковом валике, что характеризует наименьшую степень патологии.

Больные 3 и 4 поступили с онкологией других органов и метастазами ГМ. У пациентки 3 обнаружены одиночные метастазы ГМ. У пациентки 4 метастазами поражены оба полушария ГМ. Пространственное распределение кальция в высохших каплях плазмы крови бессистемно, при этом у пациентки 4 найдено повышенное содержание кальция уже во втором слое.

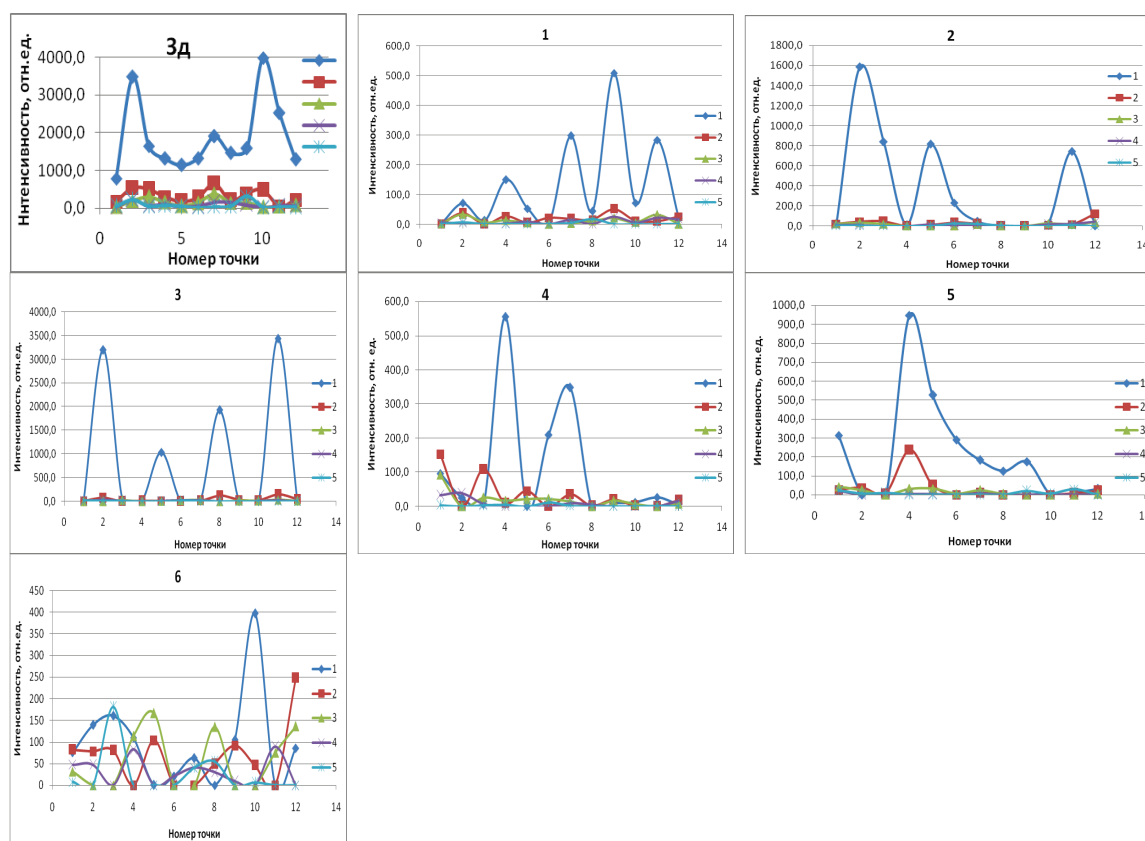


Рисунок 2. Интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в атомно-эмиссионных спектрах фаций плазмы крови пациентов

Присутствие кальция в более глубоких слоях высохшей капли характерно и для анализируемых капель пациентов 5 и 6 (G IV). Аномальная коагуляция белка в 4-ом и 5-ом слоях и связанная с этим повышенная концентрация кальция в глубоких слоях вызывает опасения [13]. Полученные результаты хорошо согласуются с найденными новыми маркерами ОГМ, чувствительность которых определяется именно повышенным содержанием кальция связывающих нейроспецифических белков S-100 в сыворотке крови больных с опухолями головного мозга [9].

В частности, в работе [9] проведен сравнительный анализ уровней нейроспецифических белков S-100 в сыворотке крови у больных с первичными и метастатическими опухолями головного мозга, а также у пациентов с неврологическими заболеваниями неопухолевой этиологии и практически здоровых людей. Наиболее выраженные изменения для данного белка отмечены в группе больных с первичными злокачественными опухолями головного мозга, где средний уровень S-100 в 3 раза превышал значение контроля. При этом наиболее высокие уровни белка были характерны для глиобластом с высокой степенью (III-IV) злокачественности.

Подводя итоги, можно отметить некоторые общие закономерности, полученные при изучении фации больных с ОГМ. Иррадиальный морфотип фации характерен для всех больных. Что касается пациентов, находящихся в критическом состоянии, то структурирование высохшей капли плазмы крови этих пациентов, в первую очередь, характеризуется такой особенностью, как ярко выраженная морщинистость поверхности фации, наличие обильного числа бляшек и широких жгутовых трещин. Во-вторых, общее содержание кальция в фации таких больных низкое, а относительная концентрация его более высокая в глубоких слоях.

Отметим, что после операции биохимический анализ крови, как правило, улучшается только у пациентов с легкой степенью патологии, у пациентов (G IV) изменения биохимии крайне редки.

Таким образом, выполненные исследования предлагают доступные оперативные методики оценки структурирования и полуколичественного определения эссенциальных элементов в высохшей капле. Морфологическая картина, определение метаболитов в плазме крови путем оценки локального пространственного распределения кальция в фации являются дополнительным качественным материалом для установления взаимосвязей компонентов анализируемой БЖ и показывают возможность проведения постоянного мониторинга процессов, происходящих в организме. Полученная оперативная информация позволяет уточнить диагноз и скорректировать лечение. Всесторонняя аналитическая информация при обсуждении диагноза будет способствовать более глубокому пониманию характера протекания патологических процессов и более успешному лечению опухолей головного мозга.

Список литературы / References:

1. Коновалов А.Н., Потапов А.А., Лошаков В.А., Олюшин В.Е., Корниенко В.Н. [и др.] *Стандарты, рекомендации и опции в лечении глиальных опухолей головного мозга*. М., 2005, 35 с. [Konovalov A.N., Potapov A.A., Loshchakov V.A., Olyushin V.E., Kornienko V.N. [et al.] *The standards, recommendations, and options in treatment of glial tumors of the brain*. M., 2005, 35 p. (In Russ.)]
2. Коновалов А.Н. Современное состояние проблемы лечения опухолей мозга. *Комбинированное лечение опухолей головного мозга*, Екатеринбург, 2004, с. 56-58. [Konovalov A.N. State-of-the-art in the problematic of the brain tumor treatment. *Combined treatment of the brain tumors*, Ekaterinburg, 2004, pp. 56-58. (In Russ.)]
3. Короткова Л.И., Жабина Р.М., Маслюкова Е.А., Мешечкин А.В. Комбинированное лечение опухолей головного мозга различного генеза. *Паллиативная медицина и реабилитация*, 2010, № 4, с. 49-54. [Korytova L.I., Zhabina R.M., Maslyukova E.A., Meshechkin A.V. Combined treatment of the different-genesis brain tumors. *Palliative medicine and rehabilitation*, 2010, no. 4, pp. 49-54. (In Russ.)]
4. Тарасевич Ю.Ю. Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей. *УФН*, 2004, т. 174, № 7, с. 779-790. [Tarasevich Yu.Yu. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids. *Physics-Uspekhi*, 2004, vol. 47, no. 7, pp. 771-790. (In Russ.)]
5. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maksimov S.A. Morphology of the solid phase of biological liquids as method of diagnostics in medicine. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*, 2007, vol. 6(4), pp. 80-85. (In Russ.)]
6. Яхно Т.А., Яхно В.Г. Основы структурной эволюции высыхающих капель биологических жидкостей. *Журнал технической физики*, 2009, т. 79, вып.8, с. 133-141. [Yakhno T.A., Yakhno V.G. Theory of the structural evolution of drying biological fluid drops. *J. of Applied Physics*, 2009, vol. 79, iss. 8, pp. 133-141. (In Russ.)]
7. Крашенинников В.Р., Трубникова Л.И., Албутова М.Л., Копылова А.С., Тарасова А.В. Обнаружение и распознавание маркеров на изображениях фаций биологических жидкостей при ранней медицинской диагностике. *Наукоемкие технологии*, 2013, т. 14, № 5, с. 36-41. [Krashenninnikov V.R., Trubnikova L.I., Albutova M.L., Kopylova A.S., Tarasova A.V. Detection and recognition of the markers in images of the facies of biological fluids for early medicinal diagnosis. *Science-Intensive Technologies*, 2013, vol. 14, no. 5, pp. 36-41. (In Russ.)]
8. Крашенинников В.Р., Трубникова Л.И., Копылова А.С., Албутова М.Л., Тарасова А.В. Сегментация фрагмента изображения фации биологической жидкости. *Ульяновский медико-биологический журнал*, 2014, № 2, с. 62-66. [Krashenninnikov V.R., Trubnikov L.I., Kopylova A.S., Albutova M.L., Tarasova A.V. Segmentation of the image fragment for facies of a biological fluid. *Ulyanovsk Medical-Biological Journal*, 2014, no. 2, pp. 62-66. (In Russ.)]
9. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Кушлинский Н.Е. Нейроспецифические белки в сыворотке крови у больных с опухолями головного мозга и неврологическими заболеваниями неопухоловой этиологии. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*, 2016, № 3, с. 90-95. [Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Kushlinsky N.E. Neurospecific proteins in blood serum of the patients with brain tumors and with neurological diseases of nonneoplastic etiology. *Medical-Biological, Social, and Psychological Problems of Safety in the Case of Emergencies*, 2016, no. 3, pp. 90-95. (In Russ.)]
10. Дербенева О.А. Клиническая значимость протеина S -100 как маркера острого церебрального повреждения. *Journal of Siberian Medical Sciences. Медицинские и фармацевтические науки*, 2013. № 2, с. 23-29. [Derbeneva O.A. Clinical significance of S-100 protein as a marker of acute brain damages. *Journal of Siberian Medical Sciences. Medicinal and Pharmaceutical Sciences*, 2013, no. 2, pp. 23-29. (In Russ.)]
11. Шихлярова А.И., Непомнящая Е.М., Машурова С.А., Протасова Т.П., Куркина Т.А. Морфологические особенности твердотельных пленок сыворотки крови у больных с метастазами сарком мягких тканей. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2013, № 7, с. 62-65. [Shikhlyarova A.I., Nepomnyashchaya E.M., Mashurova S.A., Protasova T.P., Kurkina T.A. Morphological features of solid blood serum film of the patients with metastatic tumors of soft-tissue sarcoma. *International Journal of the Applied and Fundamental Research*, 2013, no. 7, pp. 62-65. (In Russ.)]
12. Машурова С.А., Кечеджиева С.М., Салатов Р.Н., Шихлярова А.И., Аушева Т.В. Некоторые особенности системной самоорганизации сыворотки крови у больных с опухолями мягких тканей и молочной железы с отдаленными метастазами. *Известия ВУЗОВ. Северо-кавказский регион. Естественные науки*, 2011, № 4, с. 117-121. [Mashurova S.A., Kechedzieva S.M., Salatov R.N., Shikhlyarova A.I., Ausheva T.V. Some features of the systemic blood serum self-organization for the patients suffering from soft-tissue and mammary gland tumors with distant metastases. *Proceedings of Higher Schools. Northern Caucasian region. Natural sciences*, 2011, no. 4, pp. 117-121. (In Russ.)]
13. Савков А.В., Сергей А.М., Булойчик Ж.И., Маслова Г.Т., Мавричев А.С., Державец Л.А. Использование морфоструктурного анализа и лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии высохших капель плазмы крови для диагностики рака простаты. *Вестник БГУ*, 2016, сер. 1, № 3, с. 51-62. [Savkov A.V., Sergei A.M., Bulovichik J.I., Maslova G.T., Mavrichiev A.S., Derzhavets L.A. The use of morphostructural analysis and laser atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops for diagnosis of prostate carcinoma. *J. of BSU*, 2016, ser. 1, no. 3, pp. 51-62. (In Russ.)]

USING OF THE MORPHOSTRUCTURAL ANALYSIS AND LASER ATOMIC-EMISSION
SPECTROMETRY OF DRIED BLOOD PLASMA DROPS IN DIAGNOSIS
OF THE BRAIN TUMORS

Zajogin A.P.¹, Maslova G.T.¹, Bulovich J.I.¹, Mavrichiev A.S.², Derzhavets L.A.²,
Trubetskaya A.S.¹, Titova A.V.¹

¹Belorussian State University

Nezalieznasci av., 4, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Republican Research-Practical Center of Oncology and Medical Radiology name N.N. Alexandrov
Lesnoy, Minsk district, 223040, Belarus

Abstract. Morphology of the samples of dried plasma drops from the patients with oncopathology of the brain has been studied. The structural features of the dried blood plasma drops of the patients with the diagnosed brain tumors of different grades have been revealed. The possibility to improve diagnosis by attributing tumors to various types has been demonstrated. Semiquantitative results for the spatial distribution of calcium over the surface and within the layers of the dried drops of biological fluids have been obtained using the methods of laser atomic-emission spectrometry. It is shown that laser atomic-emission spectrometry allows for quantitative estimation of the variations in protein centers and is a fast and highly sensitive instrument in diagnosis of various diseases. The obtained experimental data may form the basis for further development of the diagnostic methods aimed at early detection of disturbances in the functional resources of a human organism and for the adequate selection of the needed system of rehabilitation measures.

Key words: *biological fluid; drop morphology; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; spatial distribution; layer-by-layer analysis; calcium.*

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДАМИ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Зажогин А.П.¹, Булойчик Ж.И.¹, Нечипуренко Н.И.², Патапович М.П.³,
Пашковская И.Д.²

¹Белорусский государственный университет

пр. Независимости, д. 4, г. Минск, 220030, Беларусь; e-mail: zalogin_an@mail.ru

²Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии

ул. Ф. Скорины, д. 24, г. Минск, 220114, Беларусь

³Белорусская государственная академия связи

ул. Ф. Скорины, д. 8/2, г. Минск, 220114, Беларусь

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии проведен анализ образцов плазмы крови пациентов с аневризмами мозга. Дана интегральная оценка метаболизма жизненно необходимых элементов (ЖНЭ). Обнаружено значительное повышенное содержание алюминия, железа, кальция, цинка и пониженное по магнию у всех пациентов как до операции, так и после. Выявленные микроэлементозы могут влиять на особенности клинического течения заболевания и обосновывают целесообразность дополнения терапии медикаментозными комплексами для коррекции минерального обмена. Исследована морфология высохшей капли плазмы крови. Выявлены структурные особенности высохших капель. Получены количественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохших капель этих биологических жидкостей, а также в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и выработки системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: атомно-эмиссионный спектральный анализ, плазма крови, биологическая жидкость, морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия, пространственное распределение кальция, послойный анализ.

Цереброваскулярные заболевания, включающие различные формы острых и хронических расстройств мозгового кровообращения, нередко приводящие к серьезным негативным последствиям, продолжают требовать поиска новых подходов к их профилактике и лечению.

Одной из наиболее тяжелых форм цереброваскулярных заболеваний является инсульт. Наиболее распространенным типом инсульта (до 87 % случаев) является инфаркт мозга. В связи с этим большое количество современных научных работ посвящено изучению патогенеза церебральной ишемии и инфаркта мозга. Ишемия головного мозга является одним из результатов снижения мозгового кровотока и ограничения поступления кислорода к его тканям. Аневризмы сосудов головного мозга (АСГМ) можно рассматривать как медленно текущее ишемическое повреждение мозга, что непременно требует нейрохирургического вмешательства. Церебральная ишемия является основополагающим процессом патогенеза инфаркта мозга.

По этиологии принято дифференцировать кровоизлияния в мозг на первичные (спонтанные), когда точная причина не установлена, и вторичные (симптоматические), при которых установлен конкретный источник, причина кровоизлияния (разрыв аневризмы, артериовенозная мальформация, опухоль). Ведущим фактором возникновения первичных кровоизлияний является повреждение сосудистой стенки у пациентов с артериальной гипертензией. Наиболее частой причиной вторичных внутричерепных кровоизлияний является разрыв аневризмы или артериовенозной мальформации, а также сосудистый спазм [1].

Субарахноидальное кровоизлияние (САК) – одна из ведущих причин развития инсульта молодого возраста. Наиболее частой причиной развития САК являются мешотчатые аневризмы (80-85 %). Аневризмы сосудов мозга бывают врожденными, но гораздо чаще развитие аневризм, в том числе мешотчатых, происходит в течение жизни.

В настоящее время не вызывает сомнения значительная роль микроэлементов в многообразных функциях организма и каждой клетки в отдельности, их участия в метаболизме при сосудистых поражениях, их роли в патогенезе цереброваскулярных заболеваний. В неповрежденном мозге уровень кровотока зависит от уровня метаболических потребностей ткани, в условиях мозговой катастрофы взаимосвязанный баланс уровня и ауторегуляции мозгового кровотока нарушается. Роль микроэлементов в этих процессах изучена еще недостаточно.

При поражениях головного мозга разворачивается каскад внутри- и внеклеточных механизмов, происходят изменения нейронов с последующей их гибелью, что приводит к смерти клетки – «апоптозу». Вначале

«апоптоз» считали генетически запрограммированным универсальным механизмом клеточной гибели, началом фрагментации ДНК, т.е. разрушением ядра клетки. К настоящему времени получены доказательства, что апоптоз клеток является причиной отсроченной гибели нейронов, т.е. на ранних стадиях развития апоптоза нейрона наряду с фрагментацией ДНК сохраняется и возможность репарации. Многие факторы могут выступать в качестве ингибиторов и активаторов апоптоза, в том числе и микроэлементы. В зависимости от концентрации микроэлементы способны ингибировать или активировать процесс апоптоза клеток в разных органах и тканях [2].

Целью данной работы является изучение мониторинга и динамики изменения концентрации эссенциальных элементов (ЭЭ) в образцах плазмы крови пациентов с аневризмой сосудов головного мозга для оценки характера протекания процесса и выработки своевременной стратегии лечебных и профилактических мероприятий. Для этого было определено общее содержание ряда ЭЭ в плазме крови таких больных, изучена морфология высохшей капли, проведена полуколичественное определение локального пространственного распределения кальция по поверхности и слоям высохшей капли.

Общее содержание ЭЭ в плазме крови определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии на приборе ЭМАС 200Д. Использовали угольные электроды диаметром 6 мм марки ОСЧ-7-3 с цилиндрическим углублением диаметром 4 мм на торце. Анализируемые растворы (20 мкл) наносили в углубление электрода и высушивали под излучением ИК-лампы в течение 30-40 мин. Подготовленные пробы сжигали в дуге переменного тока. Сила тока 6 А.

Первый этап исследований – определение общего содержания эссенциальных элементов в плазме крови. Объектами исследований являлись пациенты с АСГМ различного типа: артерио-венозная мальформация (АВМ), неразорвавшаяся (НАА) и разорвавшаяся артериальная аневризма (РАА), субарахноидальное кровоизлияние (САК).

Анализировали образцы плазмы крови пациентов (25 человек) до операции, в течение 10 дней после операции. В таблице 1 приведены типичные результаты определения общего содержания микроэлементов в образцах плазмы крови нескольких пациентов. Содержание элементов установлено для доверительной вероятности 0,95. Внизу таблицы приведены референтные значения концентрации каждого элемента.

Анализ полученных данных количественного определения общего содержания микроэлементов в плазме крови пациентов свидетельствуют о серьезных нарушениях минерального обмена. Самые заметные отклонения от нормы наблюдается в концентрации кальция и магния - микроэлементов, играющих самую значимую роль в развитии заболеваний головного мозга. Общим является то, что у всех пациентов независимо от типа кровоизлияния понижено содержание магния, значительно завышены концентрации алюминия, железа, кальция, только концентрация меди близка к норме.

Из-за нарушения баланса у клеток поврежденной области мозга недостаточно энергии для нормального функционирования, замедляется энергетический обмен в клетках с дисфункцией митохондрий и усилением процессов свободнорадикального окисления. Это подтверждается ролью каждого микроэлемента в развитии заболеваний головного мозга [3, 4].

Магний – обязательный участник синтеза всех нейропептидов в головном мозге. Крупные статистические исследования подтвердили значение предшествующей инсульту гипомagneзии [5]. Первыми при дефиците магния трансформируются сосуды сердца и мозга. Ионы магния – естественный антагонист кальция. Они модулируют его внутриклеточную активность. В гипомagneиевых участках эпителия создаются условия для избыточной кальцификации на фоне нормального и даже пониженного поступления кальция в организм. Дефицит магния не только потенцирует процессы склерозирования и усиление кальцификации атеросклеротической бляшки, но и создает условия для повторных инсультов [5, 6]. При нарушении баланса магний-кальций происходит гибель нейронов за счет повышенной проницаемости мембраны клетки для ионов кальция.

Таблица 1. Концентрация элементов в плазме крови пациентов, мкг/100 г

Пациент	Al	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn
1 РАА САК до	117	1360	17300	266	115	180
1 РАА САК после	121	1850	25300	223	136	260
2 АВМ до	33	1490	24800	49	72	190
2 АВМ после	78	1510	18400	121	59	130
3 РАА САК до	73	1460	28800	277	38	250
3 РАА САК после	86	1420	22400	240	161	120
Референтные значения концентраций						
Нижнее	0	1600	8800	36	69	90
Верхнее	6	2500	10400	144	142	120

Сказанное выше подчеркивает существенную роль, которую играет кальций в развитии атеросклероза и ишемических изменений в головном мозге. Повышенное высвобождение кальция способствует ишемическому повреждению нейронов и инициации каскада апоптоза. Избыток кальция в клетках усиливает продукцию кислородных радикалов в митохондриях, активирует ряд клеточных ферментов и вызывает деградацию белковых и липидных структур [5, 6].

Из эссенциальных элементов обмен железа занимает особое место. Хотя железо принимает активное участие в транспорте кислорода гемоглобином, оксидоредукции многочисленных митохондриальных ферментов, однако этот биоэлемент обладает таким отрицательным свойством, как способность генерировать свободные радикалы и инициировать перекисное окисление липидов. Повышенный уровень сывороточного железа способствует повышенному риску ишемического инсульта. В его фармакотерапии могут быть перспективными хелаторы железа.

Отклонения от нормы меди и цинка несут соответствующую неврологическую симптоматику, указывают на сдвиги в антиоксидантной системе. Медь вызывает оксидативную модификацию липопротеидов низкой плотности, что приводит к апоптозу клеток. Цинк, хотя обладает способностью защищать эндотелий сосудов при атеросклерозе и сосудистой ишемии, но, вместе с тем, в определенных концентрациях сам также является стимулятором апоптоза [3].

Резюмируя полученные данные по общему содержанию ЭЭ, следует отметить, что концентрации элементов, определяемые в плазме крови пациентов до и после операции не претерпели принципиальных изменений и остались сопоставимыми. Этот фактор, по-видимому, является доминирующим для медикаментозной терапии при дальнейшей реабилитации больного.

Для изучения морфологии и пространственного распределения кальция в высохшей капле плазмы крови (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку оргстекла, высушивали при комнатной температуре в открытой системе в течение 90 - 100 минут. Диаметр высохшей капли равен примерно 6 мм.

Снимки высохших капель плазмы крови регистрировали, используя микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой, работающей с компьютером по USB-2 порту.

При протекании патологических процессов патология проявляется в появлении различных структурных конфигураций, например, трехлучевых трещин, характеризующих застойные явления, «языков Арнольда и ковров Серпинского» при воспалительных процессах, структур «жгута» при гипоксии [7-9].

На рисунке 1 приведены снимки высохших на твердой поверхности после 90 минут сушки капель плазмы крови нескольких пациентов до и после операции.

В высохших каплях плазмы крови всех пациентов были обнаружены довольно схожие структуры (жгуты, трехлучевые трещины и пр.). После проведенных пациентам операций картины структурирования высохшей капли меняется незначительно. Структуры, характерные для здорового человека (краевой белковый валик, радиальное растрескивание), практически отсутствуют в морфологии капель пациентов как до, так и после операции.

Для установления взаимосвязи полученных морфологических картин высохших капель с динамикой протекания патологического процесса нами проведено аналитическое определение локального пространственного распределения кальция в высохших каплях по поверхности и слоям высохшей капли. Акцент сделан на определение кальция, поскольку он «спектроскопически доступен», является одним из самых необходимых элементов в организме, наиболее активным коацерватом в белковой среде, легко образует связи с amino- и карбоксильными группами белковых молекул, что определяет картину структурирования БЖ.

Локальное пространственное распределение кальция по поверхности и слоям высохшей капли оценивали, используя лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 104 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных двоек лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между двоек импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

Результаты полуколичественного определения пространственного распределения кальция в высохших каплях плазмы крови пациентов до (д) и после (п) операции приведены на рисунке 2. Приведены интенсивности линии кальция Са II (393,366 нм) по диаметру (горизонталь) на поверхности высохшей капли, а также при послойном определении (5 слоев) в каждой анализируемой точке.

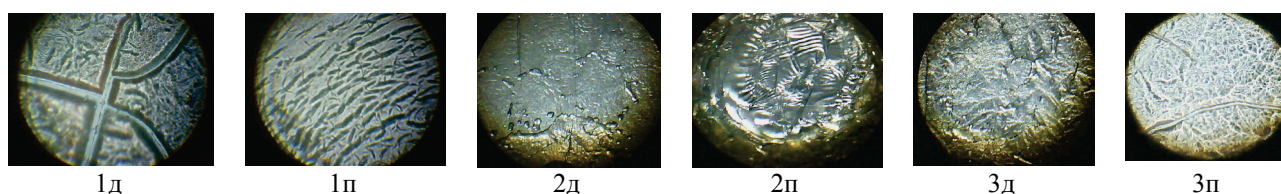


Рисунок 1. Высохшие капли плазмы крови пациентов до и после операции

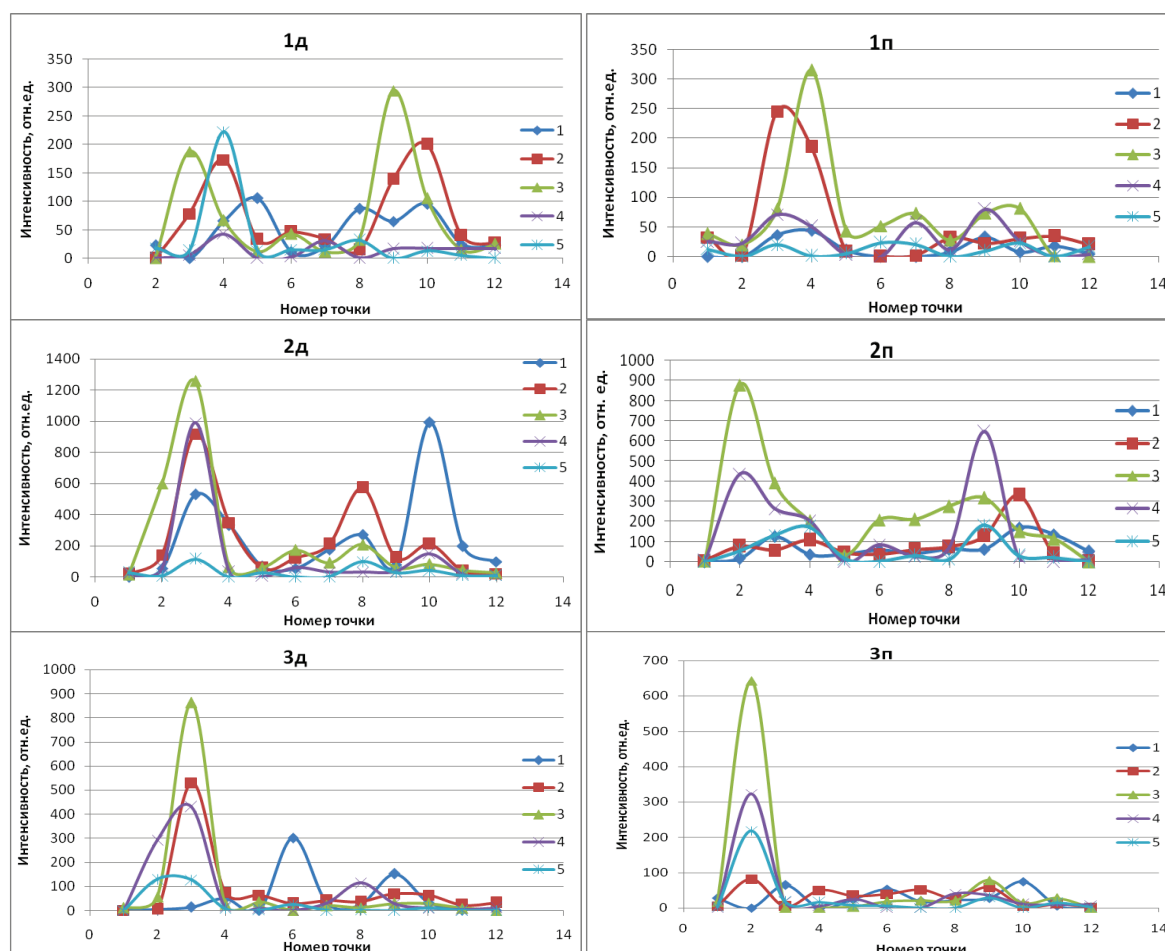


Рисунок 2. Интенсивность линии Ca II (393,366 нм) в атомно-эмиссионных спектрах высохших капель плазмы крови пациентов

Приведенные рисунки не позволяют четко и системно дифференцировать изменения, произошедшие после хирургического и терапевтического лечения. Обнаруживается достаточно хаотичный разброс концентрации кальция как по поверхности высохшей капли, так и по слоям у пациентов как до, так и после операции. Во всех случаях общим является то, что его максимальное содержание приходится в основном на три верхних слоя. В нижнем четвертом и пятом слое кальций практически не обнаружен.

Ранее нами было показано, что в случае онкологических заболеваний при наличии опухоли головного мозга кальций определяется именно в самых глубоких слоях высохшей капли [10-12], что свидетельствует о сущностной аномальной коагуляции белковых молекул и является своего рода онкомаркером. При этой патологии происходит серьезная утрата системообразующих свойств БЖ, что и проявляется в резком изменении морфоструктуры. После хирургического удаления опухоли морфология высохшей капли и локальное распределение кальция существенно меняются, заметно приближаясь к значениям кальция у здорового человека [10-12].

В случае АСГМ после проведения операции хотя и прослеживается некоторая упорядоченность структуры высохшей капли, но вместе с тем не исчезла хаотичность в распределении кальция, нет системных изменений его содержания как сразу после операции, так и через длительный срок. Наблюдаемые изменения концентрации элементов, морфоструктуры высохшей капли, пространственного распределения кальция могут быть фармакологическим ответом на воздействие назначаемых в процессе лечения препаратов и определять эффективность терапевтического лечения после нейрохирургического вмешательства. Это, по-видимому, свидетельствует о медленно прогрессирующем ишемическом поражении головного мозга.

Таким образом, анализ содержания химических элементов в плазме крови у пациентов с аневризмой сосудов головного мозга позволил выявить особенности микроэлементных изменений в организме, что влечет за собой нарушения протекания многих биохимических и физиологических реакций при гипоксическом повреждении головного мозга. Установлено достаточно значимое снижение суммарного уровня магния в плазме крови. Показано достоверное превышение нормальных значений суммарного содержания алюминия, кальция и железа.

Установление характера и степени нарушения клеточного гомеостаза эссенциальных элементов, отслеживание временных изменений их концентраций позволяет характеризовать скорость протекания хронической ишемии и оценивать потенциальные возможности организма.

Используемые в настоящее время в клиниках терапевтические мероприятия направлены, в основном, на предотвращение ишемического коагуляционного некроза за счет сосудорасширяющего эффекта и не учитывают возможность гибели нейронов вследствие апоптоза. Дополнение лечения препаратами, уменьшающими риск развития апоптоза, возможно откроет новые возможности в предотвращении или уменьшении последствий заболеваний головного мозга.

Список литературы / References:

1. Румянцева С.А., Афанасьев В.В., Силина Е.В., Елисеев Е.В.. Методы рациональной фармакокоррекции и профилактики вторичной ишемии и вазоспазма у больных с нарушениями мозгового кровообращения различного характера. *Трудный пациент*, 2010, № 6, с. 19-25. [Rumyantseva S.A., Afanasiev V.V., Silina E.V., Eliseev E.V. The methods of rational pharmacocorrection and prophylaxis of the secondary ischemia and vasospasm of the patients suffering from disturbances in cerebral circulation of different character. *Difficult patients*, 2010, no. 6, pp. 19-25. (In Russ.)]
2. Угольник Т.С., Чубукова Т.Н. Механизмы апоптоза при ишемии головного мозга. *Проблемы здоровья и экологии*, 2009, № 3(21), с. 94-99. [Ugolnik T.S., Chubukova T.N. The apoptosis mechanisms on cerebral ischemia. *Problems of health and ecology*, 2009, no. 3(21), pp. 94-99. (In Russ.)]
3. Новикова Л.Б., Громова О.А., Курамшина Д.Б. Роль микроэлементов при ишемическом инсульте. *Медицинский Вестник Башкортостана*, 2010, т. 5, № 4, с. 156-160. [Novikova L.B., Gromova O.A., Kuramshina D.B.. The role of microelements in ischemic stroke. *Bashkortostan medical journal*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 156-160. (In Russ.)]
4. Кудрин А.В., Громова О.А. *Микроэлементы в неврологии*, М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006, 304 с. [Kudrin A.V., Gromova O.A.. *Microelements in neurology*, M.: GEOTAR-media, 2006, 304 p. (In Russ.)]
5. Suter P.M. The effects of potassium, magnesium, calcium and fiber on risk of stroke. *Nutr. Rev.*, 1999, vol. 57, no. 3, pp. 84-88.
6. Gelmerts H. J. Effect of calcium antagonists on cerebral circulation. *Amer. J. Cardiol*, 1987, vol. 59, pp. 173-176.
7. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maksimov S.A. Morphology of the solid phase of biological fluids as a diagnostic method in medicine. *Siberian Medical Bulletin*, 2004, no. 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
8. Краевой С.А., Колтовой Н.А. *Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей. В 4 кн.* М., 2013. Книга 1. Открытая капля, с. 67-71. [Kraevoy S.A., Koltovoy N.A. *Diagnosis on the basis of one blood drop. Crystallization of biological fluids. In 4 books.* M., 2013. Book 1. Open drop. pp. 67-71. (In Russ.)]
9. Сидоренко Ю.С., Шихлярова А.И., Сергостьянц Г.З. Региональные особенности морфологии крови больных раком легкого: процессы самоорганизации в динамике хирургического лечения и аутогемотрансфузии. *Вестник южного научного центра РАН*, 2005, т. 1, № 4, с. 64-71. [Sidorenko Yu.S., Shikhlyarova A.I., Segostjantz G.Z. Regional features in blood morphology of the patients with cancer of lung: the self-organization processes in dynamics of surgery and autohemotransfusion. *J. of the Southern Research Center of RAS*, vol. 1, no. 4, 2005, pp. 64-71. (In Russ.)]
10. Булойчик Ж.И., Веремчук А.Н., Русско Т.А., Маслова Г.Т., Мавричев А.С. Морфологическое и спектрометрическое изучение образцов высохших капель крови онкологических больных. *Вестник БГУ. Серия 1*, 2015, № 2, с. 24-30. [Buloichik J.I., Veremchuk A.N., Russko T.A., Maslova G.T., Mavrichev A.S. Morphological and spectrometric studies of the dried blood-drop samples of oncological patients. *J. of BSU. Ser. 1*, 2015, no. 2, pp. 24-30. (In Russ.)]
11. Савков А.В., Сергей М.А., Булойчик Ж.И., Маслова Г.Т., Мавричев А.С., Державец Л.А. Использование морфоструктурного анализа и лазерной атомно-эмиссионной спектрометрии высохших капель плазмы крови для диагностики рака простаты. *Вестник БГУ. Серия 1*, 2016, № 3, с. 51-62. [Savkov A.V., Sergei M.A., Buloichik J.I., Maslova G.T., Mavrichev A.S. The use of morphostructural analysis and laser atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops for diagnosis of prostate carcinoma. *Vestnik BGU. Ser. 1*, 2016, no. 3, pp. 51-62. (In Russ.)]
12. Ж.И. Булойчик, Г.Т. Маслова, В.В. Корзюк, М.А. Сергей, А.С. Мавричев, Л.А. Державец. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии высохших капель плазмы крови в диагностике и лечении опухолей мозга. *Ж. Белгосуниверситета, физика*, 2017, № 2, с. 17-26. [Buloichik J.I., Maslova G.T., Sergey M.A., Korzuk V.V., Mavrichev A.S., Derzhavets L.A. Using of atomic-emission spectrometry of the dried blood plasma drops in diagnosis and treatment of brain tumors. *J. of BSU. Physics*, 2017, no. 2, pp. 17-26. (In Russ.)]

ESTIMATION OF THE ESSENTIAL ELEMENTS CONTENT IN BLOOD OF THE PATIENTS WITH DISEASES OF THE BRAIN USING THE ATOMIC-EMISSION SPECTROMETRY METHODS**Zajogin A.P.¹, Buloichik J.I.¹, Nechipurenko N.I.², Patapovich M.P.³, Pashkovskaya I.D.²**¹Belorussian State University

Nezalieznasci Av., 4, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: zajogin_an@mail.ru

²Republican Research-Practical Center of Neurology and Neurosurgery

F. Skoryny str., 24, Minsk, 220114, Belarus

³Belorussian State Academy of Communication

F. Skoryny str., 8/2, 220114, Minsk, Belarus

Abstract. With the use of atomic-emission spectrometry, the blood plasma samples from the patients with brain aneurysms have been analyzed. The integrated estimate for metabolism of the essential elements has been given. The enhanced content of aluminum, iron, calcium, zinc and the lowered content of magnesium has been revealed for all the patients both before and after the operation. The revealed microelementoses can affect particular features of the clinical disease course, pointing to the advisability of using complexes for correction of the mineral metabolism in addition to the adopted therapy. The morphology of the dried blood plasma drops has been studied and the structural peculiarities of the drops have been exhibited. For the spatial calcium distribution over the surface and within the layers of the dried blood plasma drops the quantitative results have been obtained. Besides, it has been demonstrated that the use of laser atomic-emission spectrometry enables one to have quantitative estimates of variations in protein centers. This method has shown itself as an effective highly sensitive diagnostic instrument. The obtained experimental data may form the basis for further development of the methods for early detection of disturbances in the functional resources of a human organism enabling selection of timely and adequate rehabilitation measures.

Key words: *atomic-emission spectral analysis, blood plasma, biological fluids, drop morphology, laser atomic-emission spectrometry, spatial distribution of calcium, layer-by-layer analysis.*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИЦИНА И ПАПАИНА, СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

Королева В.А., Холявка М.Г., Панкова С.М., Ольшанникова С.С.,
Ермолаева В.В., Сакибаев Ф.А., Шеломенцева Т.Н., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет

Университетская пл., д. 1, Воронеж, 394018, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Исследованы физико-химические и кинетические свойства цистеиновых протеиназ – фицина и папаина. Выявлено, что фицин высоко активен в диапазоне температур от 37 до 60 °С. При 70 °С свободный фицин полностью инактивирован, сорбированный на хитозане энзим сохраняет порядка 50 % активности. Диапазон рабочих температур растворимого и иммобилизованного папаина находится между 50 и 70 °С. При 80 °С нативный фермент больше подвержен термической инактивации, чем энзим, сорбированный на хитозане. Показано, что иммобилизация фицина и папаина на матрицах хитозана способствует расширению их оптимума pH в щелочную область. Максимальная скорость ферментативной реакции нативных и иммобилизованных цистеиновых протеаз наблюдается при концентрации субстрата, равной 0,04 мМ. Сорбция биокатализаторов привела к снижению скорости ферментативного катализа, а также к изменению степени сродства энзимов к субстрату.

Ключевые слова: фицин, папаин, иммобилизация, физико-химические свойства ферментов, хитозан.

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический фермент, присутствует в латексе фиговых деревьев, относится к цистеиновым протеазам, содержит остаток цистеина в активном центре. До настоящего времени большая часть работ была проведена на ферменте, полученном из латекса *Ficus glabrata*, меньшее количество исследований – на фицине, выделенном из латекса видов *Ficus carica*. Известно, что фицин из обоих этих видов встречается в нескольких формах, что подтверждается методами ионообменной хроматографии. Englund [et al.] в 1968 г. изучили фицин среди нескольких активных компонентов латекса *F. glabrata* и показали, что он представляет собой белок с единственной полипептидной цепью [1].

Папаин (КФ 3.4.4.10) – растительная цистеиновая протеаза, осуществляющая гидролиз белков до аминокислот. В значительных количествах содержится в дынном дереве – папайе (*Carica papaya*) [2].

Фицин и папаин обладают широкой субстратной специфичностью, катализируют реакции гидролиза эфиров и тиоэфиров, амидов и пептидов. Эти цистеиновые протеиназы растений могут быть использованы как альтернативные или взаимодополняющие препараты при лечении глюкокортикоидами, нестероидными противовоспалительными средствами и иммуномодулирующими агентами. Низкая токсичность протеолитических энзимов обеспечивает их безопасное использование в качестве средств для лечения воспалительных заболеваний [3].

После иммобилизации на нерастворимых носителях ферменты приобретают ряд преимуществ: увеличивается время их полужизни, повышается стабильность к агрессивным факторам окружающей среды [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны фицин и папаин фирмы «Sigma». Носителями для иммобилизации биокатализаторов являлись кислоторастворимые высокомолекулярный (M_r = 350 кДа, степень деацетилирования – 94,85 %) и среднемолекулярный (M_r = 200 кДа, СД = 82 %) хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс».

Для адсорбционной иммобилизации фицина на высокомолекулярном и среднемолекулярном хитозанах использовали 0,05 М глициновый буфер со значением pH 8,6 и 10,0 соответственно, для сорбции папаина – 0,05 М глициновый буфер (pH 9,0). Концентрацию белка в системе энзим-носитель определяли методом Лоури. Каталитическую активность ферментов измеряли спектрофотометрически по количеству окрашенного продукта реакции в результате расщепления азоказеина фирмы «Sigma» [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важными характеристиками энзимов, определяющими их каталитическую активность, являются оптимальные диапазоны температуры, pH и концентрации субстрата.

Каталитическая активность свободного и иммобилизованного на матрицах хитозана фицина в зависимости от температуры представлена на рисунке 1. Из литературных данных известно, что температурный оптимум нативного фицина – от 40 до 60 °С [1]. В ходе наших экспериментов было установлено, что для фицина, растворимого и иммобилизованного, оптимальный диапазон рабочих температур находится между 37 и 60 °С.

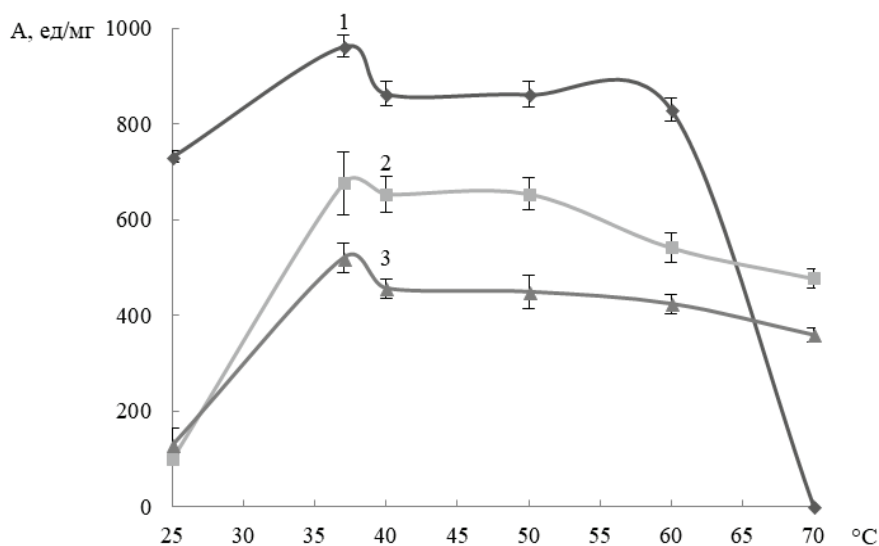


Рисунок 1. Зависимость каталитической активности (А) фицина от температуры: 1 – нативный фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

При 70 °С свободный фермент инактивирован полностью, в то время как сорбированный на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах фермент сохраняет порядка 50 % активности. Ввиду сказанного выше, можно сделать вывод о том, что иммобилизация фицина на матрицах хитозана не привела к сдвигу оптимального диапазона температур, но увеличила его термостабильность. (рис. 1).

Свободный фицин активен при значениях рН от 6,5 до 9,0 [1]. Результаты наших исследований показывают, что колоколообразные кривые зависимости удельной активности фермента от значения рН среды совпадают по форме и значению: максимум активности нативного и сорбированного фермента наблюдается при значении рН, равном 7,5 (рис. 2). Выявлена тенденция к некоторому расширению оптимального диапазона рН в щелочную среду: при рН = 9,0 нативный фицин практически полностью теряет свою каталитическую способность, что нельзя сказать об ферменте, сорбированном на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов. Изменение оптимального значения рН при иммобилизации фицина на матрице кислоторастворимого хитозана можно объяснить различием между локальными значениями рН микроокружения активного центра в иммобилизованном состоянии и в растворе фермента.

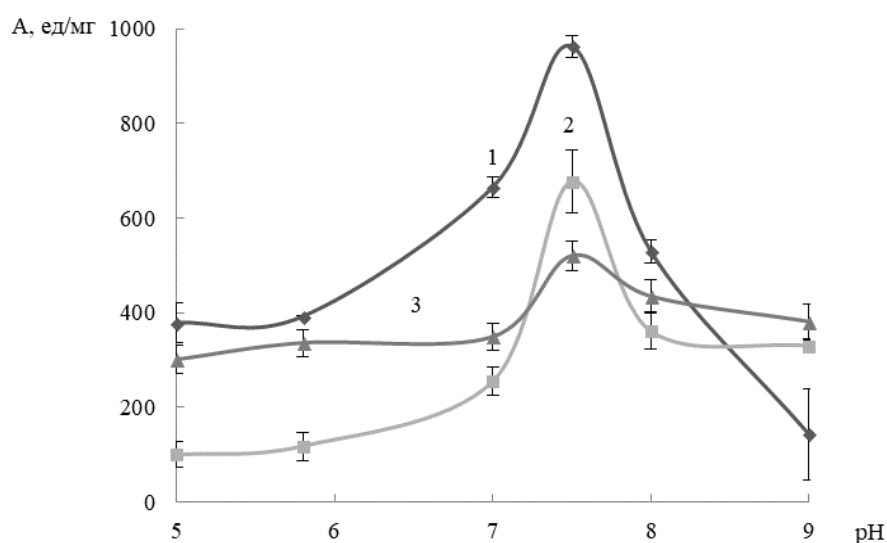


Рисунок 2. Зависимость каталитической активности (А) фицина от рН среды: 1 – нативный фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

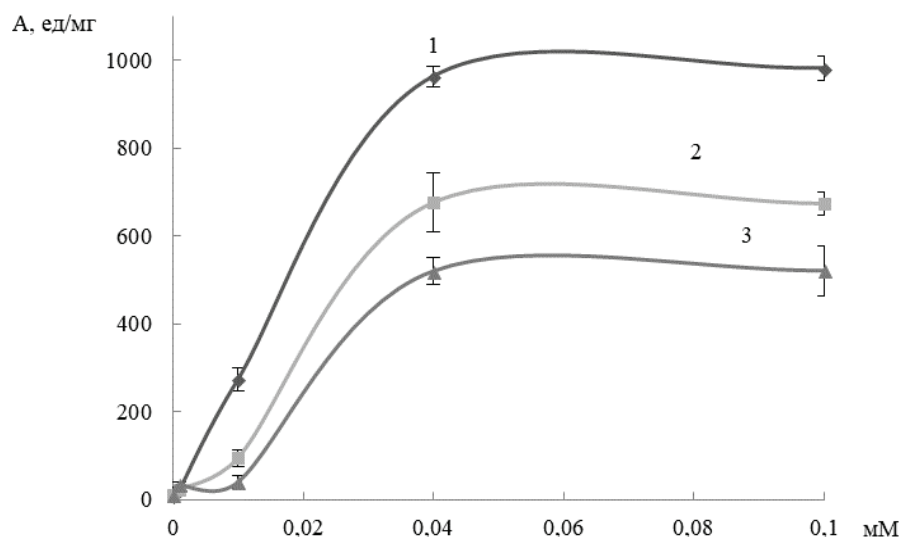


Рисунок 3. Зависимость каталитической активности (А) фицина от концентрации субстрата: 1 – нативный фицин, 2 – фицин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – фицин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

Эксперименты по определению оптимальной концентрации субстрата проводились в диапазоне его концентрации от 0,0001 до 0,1 мМ. Результаты измерения зависимости каталитической активности свободного и сорбированного на матрицах хитозана фицина представлены на рисунке 3. Максимальная скорость ферментативной реакции нативного и иммобилизованных препаратов наблюдается при концентрации субстрата, равной 0,04 мМ, при дальнейшем увеличении концентрации азоказеина до 0,1 мМ не происходит статистически достоверных изменений в скорости ферментативного катализа.

Иммобилизация энзима на нерастворимых носителях, как правило, способствует изменению кинетических параметров ферментативного катализа. Нами были определены константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции, величина которых представлены в таблице 1. Иммобилизация фицина на хитозане приводит к снижению значения V_{max} и некоторому уменьшению степени сродства фермента к субстрату.

В следующей серии экспериментов мы исследовали физико-химические и кинетические свойства папаина. Ферментативная способность папаина, нативного и адсорбированного на матрице хитозана, в зависимости от температуры представлена на рисунке 4. Установлено, что для растворимого и иммобилизованного папаина диапазон рабочих температур находится между 50 и 70 °С. При 80 °С свободный энзим термически инактивирован на 32 %, в то время как сорбированный на среднемолекулярном хитозане фермент сохраняет порядка 80 % активности от максимального значения. Комплексный препарат папаина и высокомолекулярного хитозана проявляет активность независимо от температуры инкубации в диапазоне температур 50-80 °С. Таким образом, иммобилизация папаина на матрице хитозана не приводит к сдвигу температурного оптимума, но при этом увеличивает термостабильность фермента. Можно сделать предположение о том, что матрица хитозана предотвращает преждевременную денатурацию белка.

По литературным данным, рабочий диапазон pH для папаина находится в пределах от 5,0 до 9,0 [6]. В ходе наших экспериментов показано, что максимумы активности нативного и сорбированного на среднемолекулярном хитозане фермента наблюдаются при значении pH, равном 7,5. Для энзима, иммобилизованного на высокомолекулярном хитозане, выявлена тенденция к сглаживанию пика в области pH 7,5 (рис. 5).

Максимальная скорость реакции растворимого и иммобилизованного папаина наблюдается при концентрации азоказеина, равной 0,04 мМ, при увеличении концентрации субстрата до 0,1 мМ не выявляется возрастания скорости ферментативного катализа (рис. 6).

Таблица 1. Кинетические свойства нативного и иммобилизованного фицина

Препарат	V_{max} , мкМ/(мг*мин)	K_m , мМ
Нативный фицин	104.17±0.99	0.025±0.003
Фицин+ высокомолекулярный хитозан	90.90±1.46	0.028±0.005
Фицин+ среднемолекулярный хитозан	83.33±1.02	0.031±0.009

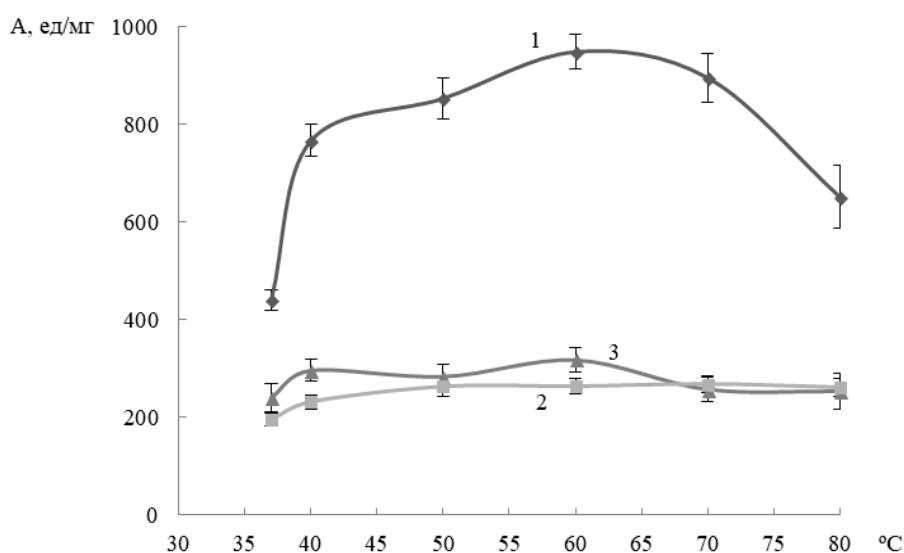


Рисунок 4. Зависимость каталитической активности (А) папаина от температуры инкубации: 1 – нативный папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

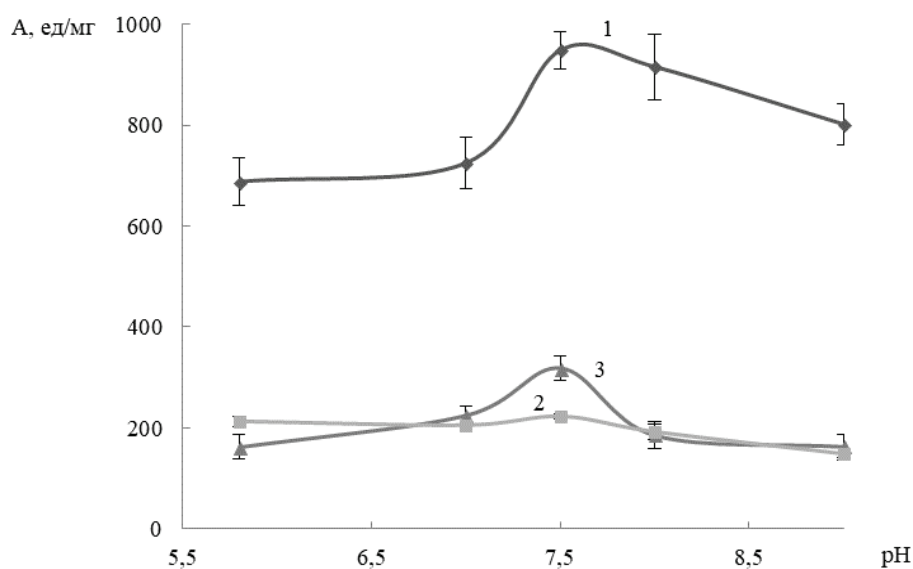


Рисунок 5. Зависимость каталитической активности (А) папаина от pH среды: 1 – нативный папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

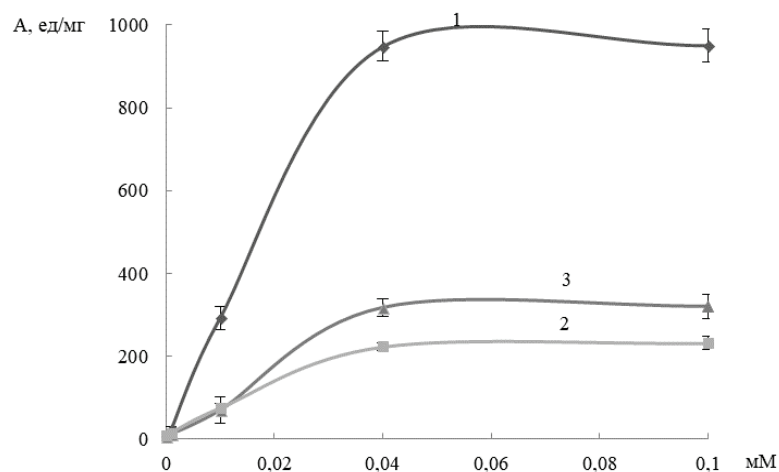


Рисунок 6. Зависимость каталитической активности (А) папаина от концентрации субстрата: 1 – нативный папаин, 2 – папаин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане, 3 – папаин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане

Таблица 2. Кинетические свойства нативного и иммобилизованного папаина

Препарат	V _{max} , мкМ/(мг*мин)	K _m , мМ
Нативный папаин	1250±38	0,038±0,007
Папаин+ высокомолекулярный хитозан	263±9	0,013±0,001
Папаин+ среднемолекулярный хитозан	417±20	0,025±0,006

В таблице 2 представлены значения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции гидролиза азоказеина свободным и сорбированным на хитозане папаином. Иммобилизация папаина на нерастворимом носителе приводит к снижению V_{max} и увеличению степени сродства фермента к субстрату, которое, вероятно, связано с концентрированием молекул азоказеина в матрице хитозана и субстратным ингибированием папаина.

Следует отметить, что рабочий оптимальный диапазон температур для фицина находится между 37 и 60 °С, для папаина – 50-70 °С. Фицин высоко активен в диапазоне pH от 5,0 до 8,0, каталитическая способность папаина проявляется в зоне pH 5,8-9,0. Иммобилизация фицина на хитозане приводит к незначительному снижению скорости реакции, что нельзя сказать о папаине: после его иммобилизации на матрицах высокомолекулярного и среднемолекулярного хитозанов скорость ферментативного катализа уменьшилась в 4,7 и 3,0 раз соответственно. У сорбированного фицина увеличивается значения K_m по сравнению с его растворимой формой, у иммобилизованного папаина наблюдается снижение этого показателя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе наших исследований было установлено, что иммобилизация фицина и папаина на матрицах кислоторастворимого хитозана не приводит к сдвигу оптимальных значений pH и температуры (при расширении рабочих диапазонов в зону щелочной среды и повышенных температур). Сорбция биокатализаторов способствует снижению скорости ферментативного катализа, а также к изменению степени сродства энзимов к субстрату.

Список литературы / References:

1. Devaraj K.B., Kumar P.R., Prakash V. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 11417-11423.
2. Mohr T., Desser L. Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, vol. 13, pp. 231-239.
3. Nor M.Z.M., Ramchandran L., Duke M., Vasiljevic T. Characteristic properties of crude pineapple waste extract for bromelain purification by membrane processing. *J Food Sci Technol.*, 2015. vol. 52, pp. 7103-7112.
4. Холявка М.Г., Беленова А.С., Макарова Е.Л., Ковалева Т.А., Артюхов В.Г. Иммобилизация гидролаз как один из путей регулирования и стабилизации их активности. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 2013, № 7, с. 29-36. [Holeyavka M.G., Belenova A.S., Makarova E.L., Kovaleva T.A., Artyukhov V.G. Immobilization of hydrolases as one of the ways to regulate and stabilize their activity. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*, 2013, no. 7, pp. 29-36. (In Russ.)]
5. Королева В.А., Холявка М.Г., Сазыкина С.М., Олышанникова С.С., Артюхов В.Г. Исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину. *Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация»*, 2015, № 4, с. 85-89. [Koroleva V.A., Holeyavka M.G., Sazykina S.M., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G. Study of the sorption capacity of acid-soluble chitosans toward bovine serum albumin. *Vestnik VGU. Seriya «Himiya. Biologiya. Farmaciya»*, 2015, no. 4, pp. 85-89. (In Russ.)]
6. Homaei A.A., Sajedi R.H., Sariri R., Seyfzadeh S., Stevanato R. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids*, 2010, vol. 38, pp. 937-942.

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF FREE AND IMMOBILIZED ON THE CHITOSANE MATRIX FICIN AND PAPAIN

Koroleva V.A., Holyavka M.G., Pankova S.M., Olshannikova S.S., Ermolaeva V.V., Sakibaev F.A., Shelometseva T.N., Artukhov V.G.

Voronezh State University

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Abstract. The physical, chemical and kinetic properties of cysteine proteinases – ficin and papain were studied. It was found that ficin is high active in the temperature range from 37 to 60 °C. The free ficin is completely inactivated at 70 °C, the enzyme sorbed on the chitosan retains about 50 % of the activity. The operating temperature range of soluble and immobilized papain is between 50 and 70 °C. The native enzyme is more incur to thermal inactivation than the enzyme sorbed on chitosan at 80 °C. It is shown that the immobilization of ficin and papain on chitosan matrices promotes the expansion of their pH optimum to the alkaline region. The maximum rate of enzymatic reaction of native and immobilized cysteine proteases is observed at a substrate concentration of 0,04 mM. Sorption of biocatalysts led to a decrease in the rate of enzymatic catalysis, as well as to a change in the degree of affinity of the enzymes to the substrate.

Key words: *ficin, papain, immobilization, physical and chemical properties of enzymes, chitosan.*

СОПОСТАВЛЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ ЗАТУХАНИЯ УЛЬТРАЗВУКА В ГУБЧАТЫХ КОСТЯХ С РЕЗУЛЬТАТАМИ ТЕОРИЙ GS+F И Biot+GS

Лисиутин В.А., Ластовенко О.Р., Лучин В.Л.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Развитие метода количественного ультразвукового исследования характеристик губчатых костей требует разработки акусто-медицинской теории, связывающей акустические характеристики волн с физическими характеристиками среды, а затем с биологическими и медицинскими характеристиками объекта исследования. В работе делается попытка применить теорию GS+F для инверсии качественных параметров состояния губчатой кости по измерениям скорости звука и затухания в широкой полосе частот.

Ключевые слова: дисперсия фазовой скорости, коэффициент затухания, губчатая кость.

ВВЕДЕНИЕ

Остеопороз – системное заболевание скелета, характеризующееся потерей костной массы, ухудшением микроархитектуры костной ткани, с последующим увеличением хрупкости и восприимчивости костей к разрушению. Стандартом для диагностики остеопороза является метод рентгеновской абсорбциометрии, измеряющий минеральную плотность костей. Существенным недостатком абсорбциометрии является повышенная радиационная нагрузка на пациента и дороговизна и сложность оборудования в эксплуатации. Хотя потеря костной массы связана с увеличением риска переломов, такие характеристики как микроархитектура или свойства материала, играющие важную роль в прочности костей не могут быть оценены с помощью этого метода. Ультразвук способен выйти за рамки этого ограничения, поскольку акустические характеристики распространяющихся упругих волн будут чувствительным и к структурным и к материальным свойствам кости. Ультразвуковые исследования показали потенциальную способность определять не только плотность кости, но прочность. Методы количественного ультразвукового исследования костей (QUS) с 1990-х годов играют постепенно возрастающую роль в оценке степени остеопороза и прогнозировании риска переломов [1,2].

В настоящее время QUS измеряет два основных параметра – скорость продольной волны (скорость звука, SOS) и наклон частотной зависимости затухания (широкополосное ультразвуковое затухание, BUA). Развитие QUS по-прежнему ограничено, поскольку интерпретация потенциально доступной информации, требует разработки акусто-медицинской теории, связывающей акустические характеристики волн с физическими характеристиками среды, а затем с биологическими и медицинскими характеристиками объекта исследования. Взаимодействие между ультразвуком и костью остаются плохо понятными из-за сложного характера кортикальной кости, которая имеет вязкоупругую пористую микроструктуру, охватывающую масштабы в несколько длин волн [1, 2].

Губчатая кость (Cancellous bone) (рис. 1) высокопористая, анизотропная среда, состоящая из клеточной сети кальцинированных нитей или пластин, называемых трабекулами, заполненных жировым костным мозгом. Измерения показали, что частотная зависимость коэффициента затухания α , дБ/м = $8,69 \times \alpha$, Нп/м (BUA) линейно зависит от частоты, $\alpha \sim \omega^\varepsilon$, $\varepsilon \approx 1$, в широкой полосе – от 200 кГц до 2 МГц [3]. Заметим, что такая же частотная зависимость затухания характерна для сухих гранулированных сред, горных пород, почв и неконсолидированных морских осадков с низкой гидравлической проницаемостью – мелкого песка, ила, глины. При насыщении пористой среды вязким флюидом, способным двигаться относительно скелета, должны возникать отклонения от закона $\alpha \sim \omega^1$, что и наблюдается в водонасыщенных гранулированных средах – морских осадках.

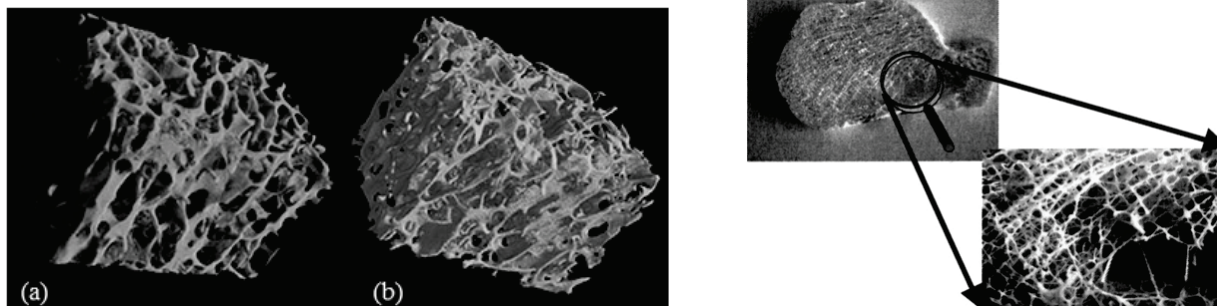


Рисунок 1. Образец структуры трабекул в губчатых костях [3]

Широкий диапазон прямой пропорциональности затухания в сухих, и отклонения в водонасыщенных средах предполагают два физических механизма потерь. Основной механизм, присущий как сухим, так и флюидонасыщенным средам получил феноменологическое название “внутреннее трение”. Физическая природа внутреннего трения в морских осадках является дискуссионным вопросом. Второй механизм затухания – вязкая диссипация при движении поровой жидкости относительно гранул. Пропорциональность затухания и частоты, в силу соотношений Крамерса-Кронига, однозначно связывающих вещественную и мнимую части волнового числа, должна соответствовать совершенно определенному закону дисперсии фазовой скорости (SOS) – второму информационному параметру QUS. Однако, в отличие от мягких тканей, где фазовая скорость является возрастающей функцией частоты (что правильно), в костях, неожиданно обнаружилась как положительная, так и отрицательная, аномальная дисперсия. Дисперсия не коррелировала с наклоном коэффициента затухания. Причем у одного пациента – положительная, у другого – наоборот, но $\alpha \sim \omega^1$ у обоих. Отрицательная дисперсия в гетерогенных материалах предсказывается теориями многократного рассеяния, но тогда и должно быть и $\alpha \sim \omega^\varepsilon$, $\varepsilon > 2$. Остается неясным, в какой степени влияют на поглощение свойства насыщающей жидкости и (или) условия рассеяния.

В настоящее время отсутствует надежная теоретическая модели, которая описывает, как влияет ослабление по свойствам кости. Подход BUA, подразумевающий простую линейную зависимость между затуханием и частотой, не полагаются на какую-либо физическую основу. Хотя это применимо в ограниченных диапазонах частот, это предположение о простой линейной соотношении между затуханием и частотой не может быть повсеместно, и может привести к потере соответствующей информации.

Теория Био. Неудивительно, что для описания распространения упругих волн в губчатых костях первоначально была применена теория Био [4]. По своей значимости в поромеханике теория Био сопоставима с работами Вуда или Ламе. В теории Био рассматривается двухфазная среда, в которой зерна минералов консолидированы упругим скелетом и насыщены поровой жидкостью, способной двигаться относительно скелета. Затухание в среде объясняется вязкостью порового флюида. В этом случае затухание будет зависеть пропорционально ω^2 ниже переходной частоты, когда в порах паузейлевское течение и доминируют вязкие силы, и пропорционально $\omega^{1/2}$ выше переходной частоты, когда доминируют инерционные силы. В окрестности переходной частоты будет возникать и наибольшая дисперсия скоростей упругих волн.

Частотные зависимости затухания и фазовой скорости, даваемые теорией Био ($\alpha \sim \omega^2$ или $\sim \omega^{1/2}$) не соответствует измерениям в губчатых костях. Для введения в теорию Био «отрицательной дисперсии» были разработаны «нелокальный» вариант теории Био и вариант с динамической пористостью – функцией частоты. Поправляя дисперсию, получить из теории Био правильную частотную зависимость затухания, $\alpha \sim \omega^\varepsilon$, $\varepsilon \approx 1$, не удалось.

Следует отметить, что в рамках своих исходных положений теория Био совершенна и неоспорима. Однако, в оригинальной теории Био рассматривается только вязкое затухание. Чтобы учесть внутреннее трение, Р.Д. Столл приписывает к вещественным упругим константам Био (в частотной области) малые **постоянные** мнимые части и подбирает соотношения между действительной и мнимой частями так, чтобы удовлетворить экспериментальным данным. При этом на одной частоте (спот-частоте) это соотношение оказывается верным, а на других – нарушенным, и результирующая частотная зависимость затухания не соответствует эксперименту. Кроме того, постоянная мнимая добавка нарушает условия причинности (для нее нет оригинала во временной области).

Для учета потерь иной, невязкой физической природы, М. Био был развит “принцип соответствия”, согласно которому уравнения, описывающие механику пористых сред, будут формально такими же, как и для упругих или вязкоупругих систем, при условии, что упругие коэффициенты заменены соответствующими интегро-дифференциальными операторами.

GS теория М. Букингема для распространения волн в морских осадках. В конце прошлого века М. Букингемом разработана GS теория, объясняющая как распространение, так и затухание упругих волн в морских осадках трением между контактно взаимодействующими частицами [5]. В GS теории неконсолидированные осадки рассматриваются как эквивалентная однофазная среда, состоящая из двух компонент – минеральных частиц и воды. Возможностью относительного движения жидкости пренебрегается. Слово “трение” употребляется условно, для обозначения специфичного вида взаимодействия между гранулами, принципиально отличного как от Кулоновского трения, так и от вязкого взаимодействия. Фундаментальность межгранулярного трения заключается в том, что оно связывает фазовые скорости и затухание в консервативно-диссипативную пару, т.е. трение придает материалу продольную и поперечную жесткость, и в тоже время является причиной, вызывающей потери энергии. В GS теории осадки рассматриваются как эквивалентная однофазная среда, и вязкие потери **не учитываются**. Частотная зависимость коэффициента затухания оказывается $\sim \omega^1$, что соответствует экспериментальным данным о распространении акустических волн в губчатых костях.

Теория GS+F и Biot+GS. Для случая распространения упругих волн в неконсолидированных морских осадках одним из авторов были разработаны две теории - Biot+GS и GS+F.

Теория Biot+GS основана на теории Био [6]. Отличие в двух важных деталях. 1) Согласно теории Био модуль упругости скелета K_b , Па не зависит от частоты. Согласно Biot+GS теории, модуль упругости скелета зависит от частоты по закону $\gamma(i\omega)^n$, где γ , Па – низкочастотный эквивалент K_b . Дисперсионный член $D = (i\omega)^n$ здесь заимствован из GS теории. 2) В теории Био предполагается, что весь флюид колеблется отдельно от

скелета. В теории Biot+GS сделано предположение о том, что отдельно колеблется только часть флюида, соответствующая перколяционной, а не статической пористости среды. Оставшаяся часть флюида связана со скелетом и колеблется вместе с ним. Второе предположение позволило существенно преобразовать и упростить уравнения движения Био и дало возможность сделать дисперсионные кривые управляемыми за счет свободного параметра ϕ - перколяционной пористости. Вместе с тем, параметр ϕ включил в себя остальные, неизмеримые физическими способами микропараметры модельной среды Био. Кроме того, этот параметр учитывает так же и отличия реального течения флюида от «глобального течения Био» по порам цилиндрического сечения.

Волновые числа и комплексные фазовые скорости продольной волны $\tilde{c}_p^2 = \frac{\omega^2}{k_p^2}$ согласно Biot+GS теории

вычисляются как корни уравнения:

$$\tilde{c}_p^2 = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}, \quad (1)$$

где

$$a = \rho_m - \frac{\phi \rho_f}{\xi} F_C(w), \quad (2)$$

$$b = - \left\{ K_m \left[1 + \frac{\phi}{\xi} \left(\frac{\rho_m}{\rho_f} - 2 \left(1 - \frac{\gamma_p D}{K_g - 2K_m} \right) \right) F_C \right] + \gamma D \right\}, \quad (3)$$

$$c = \frac{\phi K_m}{\xi \rho_f} \left(\gamma + \frac{2\gamma_p K_m}{K_g - 2K_m} \right) D F_C. \quad (4)$$

В (2)-(4) K_m – объемный модуль упругости среды; $\frac{1}{K_{m(ean)}} = \frac{P}{K_f} + \frac{1-P}{K_g}$, $\rho_{f,g}$, $K_{f,g} = \rho_{f,g} c_{f,g}^2$ – плотности и

модули упругости флюида и твердой фазы соответственно; $\rho_m = P\rho_f + (1-P)\rho_g$ – аддитивная плотность среды; γ , Па – аддитивный модуль межгранулярной жесткости; $\gamma = \gamma_p + 4/3\gamma_s$, Па; γ_p , γ_s , – модули продольной и сдвиговой межгранулярной жесткости; n – показатель стресс-релаксации, связан с показателем ϵ в степенном законе затухания $\epsilon = 1 + n$; $\phi = \frac{s\xi\kappa}{\chi a^2}$ – перколяционная пористость; ξ – извилистость пор; η – динамическая

вязкость флюида, Па·с; κ – проницаемость среды, м²; a – радиус цилиндрической поры; s – структурный коэффициент, зависящий от геометрии порового пространства; $\chi = \exp(\sigma^2)$, σ – среднее квадратичное

отклонение размера пор в случае нормального закона распределения; $F_C(w) = 1 - \frac{2J_1(i^{3/2}w)}{i^{3/2}wJ_0(i^{3/2}w)}$ – функция

частотной коррекции, отражающая отличия характера течений в порах от течения Пуазейля; $w = \sqrt{\frac{a^2 \rho_f}{\eta}} \omega$,

$J_{0,1}$ – функции Бесселя.

Вещественные фазовые скорости $c_{p,s}$ и коэффициенты затухания $\alpha_{p,s}$ могут быть получены из комплексных фазовых скоростей как $c_{p,s} = \text{Re}(\tilde{c}_{p,s}^{-1})$, $\alpha_{p,s} = -\omega \text{Im}(\tilde{c}_{p,s}^{-1})$, Нп/м.

Теория GS+F основана на однофазной GS теории М. Букингема [7]. Для преобразования теории в двухфазную однофазное уравнение состояния заменено на двухфазное. Комплексные фазовые скорости согласно GS+F теории вычисляются как корни (1), где:

$$a = \rho_m, \quad (5)$$

$$b = -(K_m(1 + S_v \phi \rho_m A F_C) + \gamma D), \quad (6)$$

$$c = S_v \phi K_m \gamma D A F_C, \quad (7)$$

где $D = (i\omega)^n$ – дисперсионный член; $A = \frac{(\rho_g - \rho_f)}{\rho_g \rho_f}$.

Теории GS+F и Biot+GS применительно к губчатой кости. Эти две теории дают одинаковые дисперсионные кривые, однако имеют одно принципиальное различие. В общем случае, комплексную фазовую скорость звука в двухфазной среде можно представить в виде:

$$\tilde{c}_p(f) = \sqrt{\frac{K(f)}{\rho(f)}} = \sqrt{\frac{K_{real}(f) + iK_{im}(f)}{\rho_{real}(f) + i\rho_{im}(f)}}. \quad (8)$$

Вещественная часть этого выражения отражает дисперсию фазовой скорости, мнимая – частотную зависимость затухания. Как видно из (8), может меняться числитель, может знаменатель, а может и числитель и знаменатель. Согласно GS+F теории, с увеличением частоты меняется числитель – вязкоупругость среды растет за счет более трудного вытеснения флюида из пор. Здесь флюид изначально предполагался вязким. Знаменатель не меняется, поскольку изначально предполагалось отсутствие инерционного взаимодействия фаз. Эту ситуацию нетрудно поправить, записав уравнение движения в виде, аналогичном теории Био, тогда

получится что $a = \rho_{eff} = \rho_m - \frac{\phi \rho_f}{\xi} F_C(\omega)$. Однако, похоже, что в морских осадках инерционное взаимодействие не подтверждается, будем думать, что и в губчатых костях так же.

Согласно Biot+GS теории изменяется в основном знаменатель – эффективная плотность среды при увеличении частоты уменьшается.

Тогда, на высоких частотах сопоставление GS+F и Biot+GS теории приводит к прямо противоположным выводам – согласно GS+F твердая и жидкая фаза колеблются вместе, согласно Biot+GS твердая и жидкая фаза колеблются раздельно, проскальзывают друг относительно друга. Изучение дисперсионно-диссипативных характеристик сдвиговой волны показывает, что в морских осадках на высоких частотах $a = \rho_m$ – обе фазы колеблются вместе.

Рассмотрим (8) с другой точки зрения. Ослабим пока условие причинности и допустим, что действительная и мнимая части числителя и знаменателя могут меняться произвольно. Тогда, может получиться так, что затухание окажется $\alpha \sim \omega^\epsilon$, $\epsilon \approx 1$, а c_p может оказаться как возрастающей, так и убывающей функцией частоты. Биологическое объяснение может быть таково: губчатые кости, костный мозг и окружающие ткани составляют единое целое.

Сопоставление теории с экспериментом. Рассмотрим данные, приведенные в [8]. На рисунке 2 показаны экспериментальные и теоретические дисперсионные кривые и частотные зависимости коэффициента затухания для трех образцов губчатой кости, различающихся пористостью: $P = 81,9\%$ – синие звездочки; $P = 78,9\%$ – зеленые кружки; $P = 74,4\%$ – красные квадраты. Остальные входные параметры следующие: $\rho_g = 1960$ кг/м³; $K_g = 2 \cdot 10^{10}$ Па; $\rho_f = 1000$ кг/м³; $K_f = 2,23 \cdot 10^9$ Па; $\eta = 2 \cdot 10^{-3}$ Па·с; $\kappa = 10 \cdot 10^{-10}$ м²; $\xi = 1,4$. Результаты инверсии следующие. GS+F параметры:

- 1) $P = 74,4\%$, $\gamma = 253$ Па, $n = 0,92$, $s = 15$, $\chi = 1$, $\phi = 0,50$;
- 2) $P = 78,9\%$, $\gamma = 93$ Па, $n = 0,97$, $s = 9,2$, $\chi = 1$, $\phi = 0,30$;
- 3) $P = 81,9\%$, $\gamma = 1,4 \cdot 10^3$ Па, $n = 0,78$, $s = 2,85$, $\chi = 1$, $\phi = 0,26$.

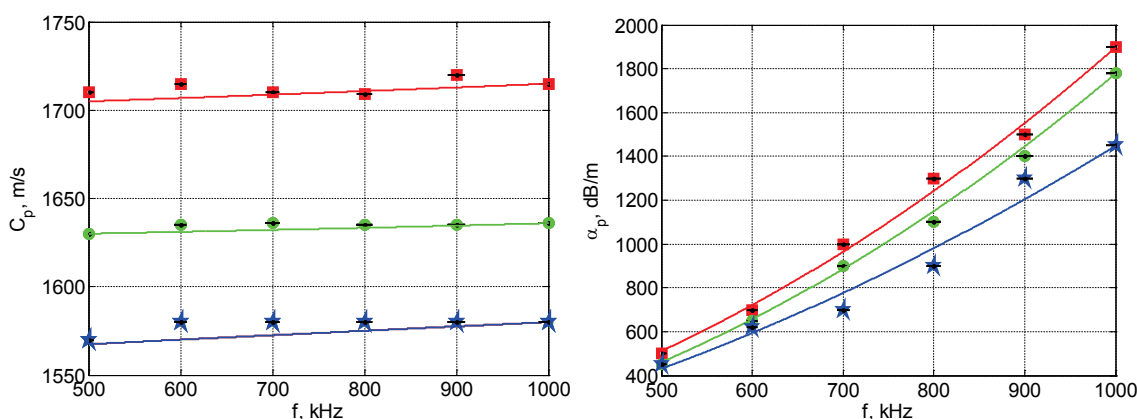


Рисунок 2. Частотные зависимости скорости звука (SOS) и коэффициента затухания (BUA) для двух фантомов губчатой кости

На самом деле, графики на рисунке 2 удивительны. Для морских осадков типа песка большей скорости (SOS) соответствует меньшее затухание (BUA), здесь – все наоборот!? Из результатов инверсии видно, насколько чутко модель реагирует на изменение SOS и BUA. Твердость 93 Па и 253 Па – это очень мало, полный остеопороз, тысячи Па – мало, но уже лучше. Приближение показателя затухания $\varepsilon = 1 + n$ (не путать с показателем стресс-релаксации n) к «2» тоже свидетельствует об отклонении от нормы.

Рассмотрим результаты измерений BUA, взятые из [8]. Здесь измерялось только затухание у трех различных пациентов, скорости (SOS) были домыслены авторами, чтобы исследовать, как изменяются инвертированные значения жесткости γ и показателя стресс-релаксации n . Как видно из рисунка 3, «красная» прямая – хорошая – высокая скорость, «твердая» кость, показатель в степени затухания $\varepsilon = 1,14$ – почти линейное затухание. Зеленая линия – хуже, но еще ничего, по сравнению с рисунком 2. Самое плачевное состояние показывает синяя кривая – показатель затухания значительно отклоняется от единицы, скорость низкая. Следует отметить, что попытки увеличить скорость на синей линии безуспешны – алгоритм инверсии «не сходится», программа сообщает об ошибке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный математический эксперимент показал высокую чувствительность и избирательность теории GS+F для инверсии входных параметров QUS по измеренным SOS и BUA.

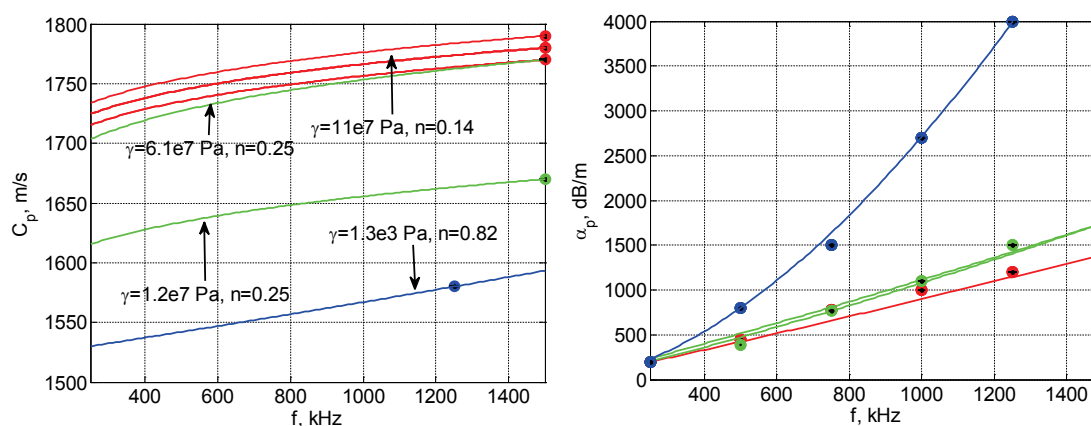


Рисунок 3. Частотные коэффициента затухания (BUA) губчатой кости, измеренные у трех пациентов и результаты инверсии параметров QUS при различных величинах SOS

Список литературы / References:

1. Lee K., Roh H-S., Yoon S. Correlations between acoustic properties and bone density in bovine cancellous bone from 0.5 to 2 MHz. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2003, vol. 113, no. 5, pp. 2933-2938.
2. Bossy E., Laugier P., Peyrin F., Padilla F. Attenuation in trabecular bone: A comparison between numerical simulation and experimental results in human femur. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2007, vol. 122, no. 4, pp. 2470-2475.
3. Chaffai S., Padilla F., Berger G., Laugier P. In vitro measurement of the frequency-dependent attenuation in cancellous bone between 0.2 and 2 MHz. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2000, vol. 108, no. 3, pp. 1281-1289.
4. Biot M.A. Mechanics of deformation and acoustic propagation in porous media. *J. Appl. Phys.*, 1962, vol. 33, no 4, pp. 1482-1498.
5. Buckingham M.J. Wave propagation, stress relaxation, and grain-to-grain shearing in saturated, unconsolidated marine sediments. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2000, vol. 108, no. 6, pp. 2796-2815.
6. Лисютин В.А. Ластовенко О.Р. Ярошенко А.А. Решение обобщенного уравнения Навье-Стокса для микронееднородной двухфазной среды. *Прикладные задачи математики: материалы XXV междунар. научн.-техн. конф., Севастополь, 18-22 сентября 2017 г.*, Севастоп. гос. ун-т., Севастополь, 2017, 222 с. [Lisyutin V.A. Lastovenko O.R. Yaroshenko A.A. Solution of the generalized Navier-Stokes equation for a micro-inhomogeneous two-phase medium. *Applied Mathematical Problems: Materials of XXV International Scientific and technological Conference. Sevastopol, September 18-22, 2017*, Sevastopol State University, Sevastopol, 2017, 222 p. (In Russ.)]
7. Лисютин В.А. Акустика морских осадков. Подключение межгранулярного трения к теории Био-Столла. *Доклады IXX школы-семинара им. акад. Л.М. Бреховских*. М: ГЕОС, 2018, с. 229-232. [Lisyutin V.A. Acoustics of marine sediments. Connection of intergranular friction to the theory of Bio-Stoll. *Reports of the IXX School-Seminar named after acad. L.M. Brekhovskikh*, M: GEOS, 2018, pp. 229-232 (In Russ.)]
8. Lee K., Roh H-S., Yoon S. Acoustic wave propagation in bovine cancellous bone: Application of the Modified Biot-Attenborough model. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2003, vol. 114, no. 4, pp. 2284-2293.

COMPARISON OF ULTRASOUND ATTENUATION MEASUREMENTS IN CANCELLOUS BONES WITH THE RESULTS OF GS + F THEORY**Lisyutin V.A., Lastovenko O.R., Luchin V.L.**

Sevastopol State University

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

Abstract. The development of the quantitative ultrasound investigative method of cancellous bones characteristics requires acousto-medical theory development that relates acoustic characteristics of waves to the physical characteristics of the medium, and then to the biological and medical characteristics of the research object. An attempt to apply the theory of GS + F to inverse the qualitative parameters of cancellous bone state from sound velocity measurements and attenuation in a wide frequency band is made in this paper.

Key words: *phase-velocity dispersion, attenuation coefficient, cancellous bone.*

БИОФИЗИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Мартинovich Г.Г.¹, Мартинovich И.В.¹, Вчерашняя А.В.¹, Зенков Н.К.²,
Меньщикова Е.Б.², Черенкевич С.Н.¹

¹Белорусский государственный университет

пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, РБ; e-mail: martinovichgg@bsu.by

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,

ул. Тимакова, 2, г. Новосибирск, 630117, РФ; e-mail: lemen@centercem.ru

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. В работе представлены собственные и литературные данные о биофизических и молекулярных механизмах регуляции химиорезистентности опухолевых клеток, протекающих с участием активных форм кислорода и антиоксидантов. Рассматриваются также механизмы редокс-сигнализации и регуляции редокс-гомеостаза в нормальных и опухолевых клетках. Особое внимание уделено новым стратегиям снижения лекарственной устойчивости опухолевых клеток, базирующимся на редокс-регуляции клеточных процессов.

Ключевые слова: химиорезистентность, антиоксиданты, активные формы кислорода, опухолевые клетки, редокс-регуляция, редокс-сигнализация.

Формирование устойчивости опухолевых клеток к действию химиотерапевтических агентов является одной из причин недостаточной эффективности современной противоопухолевой терапии. Изучение механизмов адаптации опухолевых клеток к стрессу и разработка способов снижения их резистентности к действию физических, химических и биологических повреждающих факторов является актуальной задачей современной медицинской биофизики.

В настоящее время широко обсуждаются и исследуются факторы (фармакокинетические, метаболические, генетические, клеточные и др.), определяющие первичную резистентность, колебания индивидуальной чувствительности опухолей или снижение их чувствительности к цитостатикам в процессе лечения при повторных курсах или циклах химиотерапии. Новые представления о роли окислительно-восстановительных процессов в регуляции клеточных процессов, появившиеся в последние годы, позволили выделить в качестве ключевой характеристики трансформированных тканей измененный клеточный и тканевый редокс-гомеостаз [1, 2]. Однако роль редокс-механизмов в формировании химиорезистентности до сих пор не обоснована и требует дальнейших исследований.

Редокс-регуляция, или регуляция процессов жизнедеятельности на основе механизмов межмолекулярного переноса электронов, является одним из активно изучаемых в последние годы типов управления функционированием живых систем [3]. Многочисленные исследования, посвященные изучению направленных потоков электронов в живых системах и их распределения в норме и при патологии, привели к формированию новой области биологии – редокс-биологии [4, 5]. Редокс-технологии, или технологии управления функциональными свойствами живых систем на основе регуляции клеточных электрон-транспортных процессов, представляют собой новую группу биотехнологий, ориентированных на решение проблем старения, лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний [1, 6]. Научную основу для биомедицинского применения редокс-технологий формируют достижения в области редокс-медицины [6-8]. Установление закономерностей фармакологической и физико-химической регуляции клеточных редокс-процессов является необходимым этапом развития таких технологий.

Развитие представлений о редокс-регуляции в биологических системах началось с обнаружения регуляторных свойств таких высокореакционных соединений как активные формы кислорода (АФК). В начале XXI в. появились серии работ, свидетельствующих, что образование АФК происходит не только при патологии, но и при действии ряда гормонов и факторов роста стимулируется внутриклеточная продукция АФК [9, 10]. Вышеупомянутые данные позволили предположить участие АФК в процессах трансдукции сигналов в клетках и привели к формированию концепции «редокс-сигнализации».

Концепция «редокс-сигнализации» объединяет внутриклеточные процессы трансдукции сигнала, в которых интегративным элементом выступает серия электрон-транспортных реакций с участием редокс-активных соединений (включая АФК и антиоксиданты) [11, 12]. Молекулярным механизмом регуляции функционирования белков в редокс-сигнальных каскадах является неферментативное окисление тиоловых групп цистеиновых остатков в молекулах белков-мишеней, приводящее к изменению их каталитических или сигнальных функций. Данный механизм не является специфическим для ряда редокс-активных соединений и запускается как эндогенными, так и экзогенными акцепторами электронов. Важно отметить, что редокс-регуляция белков осуществляется не только с участием окислителей и восстановителей, но и при действии различных модуляторов (химических, физических) активности систем, генерирующих и утилизирующих АФК.

В процессах редокс-сигнализации с участием редокс-активных соединений происходит передача информации между внутриклеточными компонентами. В процессах редокс-регуляции осуществляется модулирование функционирования белков путем изменения окислительно-восстановительного состояния

тиоловых групп, то есть в процессах редокс-регуляции происходит взаимодействие редокс-активных соединений и белков. Следует отметить, что редокс-активные соединения взаимодействуют не только с белком-мишенью, но и между собой, формируя определенное редокс-состояние клетки. В результате трансдукция сигнала с участием редокс-активных соединений определяется также теми редокс-условиями, которые формируются в биологических системах.

В настоящее время для количественной характеристики стационарного состояния группы функционально взаимосвязанных редокс-активных соединений, определяющего редокс-состояние клетки, используется ряд подходов [14], одним из которых является применение введенных нами параметров – эффективного редокс-потенциала ($E^{\text{эфф}}$) и редокс-буферной емкости (r). Эффективный редокс-потенциал характеризует «суммарную» способность многокомпонентной внутриклеточной среды отдавать электроны [15]. Редокс-буферная емкость используется для количественной характеристики способности клеток противодействовать изменению величины $E^{\text{эфф}}$ внутриклеточной среды при изменении концентрации окислителей или восстановителей [16]. В отличие от других подходов описания редокс-состояния, введение параметров $E^{\text{эфф}}$ и r обосновывается на основе фундаментальных физических закономерностей. Показано, что новые параметры могут быть применены не только для описания редокс-процессов, но и для характеристики функционального состояния клеток и тканей в целом [17, 18].

Важным элементом нормального функционирования редокс-сигнальных процессов является поддержание определенного редокс-гомеостаза. Поддержание редокс-гомеостаза является основой нормальной жизнедеятельности клеток и осуществляется в результате сопряженного функционирования систем генерации АФК и антиокислительной защиты, а также систем трансмембранного транспорта редокс-активных молекул [19]. Действие определенных химических и физических факторов может запускать ряд патологических процессов и ответных реакций клеток, ведущих к нарушениям редокс-гомеостаза. Изменения редокс-свойств клеток влияют на процессы редокс-сигнализации, результатом могут быть изменения метаболизма и функциональных свойств клеток. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что параметры внутриклеточного редокс-состояния ($E^{\text{эфф}}$, r) являются одними из основных факторов, определяющих специфичность отклика опухолевых клеток на действие редокс-активных соединений [20].

Другим важным фактором, определяющим биологический эффект действия АФК в клетках, является внутриклеточная локализация структур, их продуцирующих [21]. Ранее нами было показано, что механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca^{2+} -сигнализации клеток включает усиление локальной продукции АФК за счет участия специфических оксидоредуктаз – НАДН:убихинон оксидоредуктазы (Е.С. 1.6.5.3) и убихинол:цитохром *c* оксидоредуктазы (Е.С. 1.10.2.2) [22]. Согласно предложенному механизму, кроме редокс-активных соединений и их мишеней в редокс-регуляторных процессах участвуют также белки-ферменты – оксидоредуктазы, локализация которых вблизи белков-мишеней определяет специфический отклик клеток. То есть, ключевым аспектом активации специфических редокс-сигнальных путей является колокализация оксидоредуктаз, вовлеченных в образование АФК, и мишеней действия АФК, участвующих в реализации биологического ответа. Нами показано, что тимохинон, инициирующий более низкий выход АФК в сравнении с 1,4-бензохиноном, более токсичен в отношении опухолевых клеток [23]. Высокая в сравнении с 1,4-бензохиноном токсичность тимохинона обусловлена активацией редокс-сигнального механизма запуска апоптоза, ключевым элементом которого является колокализация митохондриальных оксидоредуктаз, участвующих в продукции окислителей, и соответствующего редокс-сенсора – АДФ/АТФ-транслоказы, функциональное состояние которого регулируется путем окисления/восстановления сульфгидрильных групп [24]. Таким образом, методы направленной индукции АФК в клетках с использованием редокс-активных соединений и регуляторов активности АФК-продуцирующих ферментов могут быть использованы для регуляции ряда клеточных функций, включая программы клеточной гибели.

С другой стороны, нами показано, что повышение уровня АФК вблизи плазматической мембраны вызывает ответ систем регуляции редокс-гомеостаза, направленный на его снижение путем увеличения концентрации восстановителей («редокс-адаптация») [25]. Изменение редокс-свойств клеток, ведущее к увеличению концентрации восстановителей, вызывает ослабление индукции апоптоза и усиливает резистентность опухолевых клеток к действию ряда лекарственных соединений, включая доксорубин [26, 27].

В последние годы выяснено, что экспрессия генов ферментов и белковых факторов, участвующих в антиокислительной защите клеток млекопитающих, регулируется с участием редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE [28]. Ключевым элементом системы является фактор транскрипции Nrf2 (nuclear E2-related factor 2), контролирующей экспрессию генов, в промоторных областях которых содержится регуляторная последовательность ARE (antioxidant responsive element) [29]. Показано, что активация сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE посредством усиления синтеза ABCC1 (Mrp1), ключевого белка АТФ-зависимого экспорта ксенобиотиков из клеток, способствует развитию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток [30]. Под контролем системы Keap1/Nrf2/ARE находятся также ключевые белки метаболизма глутатиона, увеличение концентрации которого способствует выживанию клеток в стрессовых условиях [31].

Вместе с тем при превышении определенного порога активации Nrf2 запускается экспрессия генов, продукты которых способствуют развитию окислительного стресса. При высокой транскрипционной активности Nrf2 повышается содержание фактора транскрипции Klf9 (Kruppel-подобный фактор 9) [32]. В свою

очередь, взаимодействие Klf9 с сайтами связывания ДНК изменяет экспрессию ряда белков, участвующих в регуляции метаболизма АФК, включая НАДФН-оксидазу (Е.С. 1.6.3.1) [32]. Таким образом, фактор транскрипции Nrf2 является важным регулятором редокс-гомеостаза клеток, способным усиливать как восстановительные, так и окислительные процессы в клетках.

Активация Nrf2 осуществляется при действии ряда редокс-активных соединений, включая природные и синтетические фенольные антиоксиданты [33, 34]. В неактивном состоянии фактор транскрипции Nrf2 нековалентно связан со специфическим редокс-зависимым белком Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Модификация SH-групп «ключевых» остатков цистеина в Keap1 за счет их окисления или электрофильного присоединения приводит к нарушению убиквитинирования и стабилизации Nrf2, его транспорту в клеточное ядро и связыванию с ARE [29]. Мутации Keap1, ведущие к нарушению его функционирования, обнаружены в карциномах различных органов [35]. В результате во многих опухолевых тканях и клеточных линиях опухолей наблюдается конститутивная активация Nrf2 [36], что во многом обуславливает изменения эффектов действия экзогенных регуляторов сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE. Основываясь на точке зрения об аутопротекторной сверхэкспрессии Nrf2 в опухолевых клетках, можно предположить, что «слабые» индукторы его активности повышают резистентность опухолевых клеток (и приводят к увеличению пролиферативной активности), а «сильные» – снижают резистентность и индуцируют апоптоз.

Нами обнаружено, что водорастворимые серосодержащие фенольные антиоксиданты 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13) и 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиоэтанат калия (БЭК-11-К) вызывают противоположно направленные изменения редокс-свойств и химиорезистентности опухолевых клеток [26, 27]. Установлено, что БЭК-11-К увеличивает редокс-буферную емкость и резистентность опухолевых клеток к доксорубину. При действии ТС-13 наблюдается уменьшение редокс-буферной емкости, что приводит к снижению химиорезистентности опухолевых клеток. Нами построена биофизическая модель редокс-зависимого механизма активации апоптоза и установлена зависимость величины изменения редокс-состояния белкового сенсора от величин концентрации окислителя и редокс-буферной емкости клеток [27]. Полученные результаты позволяют предположить, что одним из ключевых механизмов, ответственных за формирование устойчивости опухолевых клеток к действию противоопухолевых соединений, является ослабление апоптоза вследствие повышения редокс-буферной емкости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных данных нами предлагаются две стратегии снижения химиорезистентности опухолевых клеток – путем регуляции электрон-транспортных процессов митохондрий и путем направленной коррекции редокс-свойств опухолевых клеток. Показано, что усиление действия доксорубина происходит при снижении редокс-буферной емкости клеток и при увеличении продукции АФК в митохондриях. Впервые обнаружен эффект снижения лекарственной устойчивости опухолевых клеток при применении антиоксидантных препаратов и установлен его биофизический механизм, основанный на запуске программы клеточной гибели в результате регуляции редокс-гомеостаза. Полученные результаты формируют научные основы для разработки новых нетоксических типов химиосенсибилизаторов, важным преимуществом которых являются протекторные свойства этих соединений, проявляемые по отношению к нетрансформированным клеткам в условиях патологии и стресса.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № M16P-022) и РФФИ (грант № 16-54-00050 Бел_а).

Список литературы / References:

1. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Голубева Е.Н., Черенкевич С.Н., Демидчик Ю.Е., Гаин Ю.М., Владимирская Т.Э., Луцкич М.Л. Редокс-биотехнологии как основа для новой стратегии в противоопухолевой терапии. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*, 2012, № 2, с. 85-104. [Martynovich G.G., Martynovich I.V., Golubeva E.N., Cherenkevich S.N., Demidchik Y.D., Gain Y.M., Vladimirskaia T.E., Lushchik M.L. Redox biotechnologies as basis for new strategy in anticancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, medical series*, 2012, no. 2, pp. 85-104. (In Russ.)]
2. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009, vol. 8, pp. 579-591.
3. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. *Окислительно-восстановительные процессы в клетках*. Минск: БГУ, 2008, 159 с. [Martynovich G.G., Cherenkevich S.N. *Redox processes in cells*. Minsk, BSU, 2008. 159 p. (In Russ.)]
4. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 2006, vol. 141, № 2, pp. 312-322.
5. Herrmann J.M., Dick T.P. Redox biology on the rise. *Biol. Chem.*, 2012, vol. 393, pp. 999-1004.
6. Sanjuan-Alberte P., Alexander M.R., Hague R.J.M. [et al.] Electrochemically stimulating developments in bioelectronic medicine. *Bioelectronic Medicine*, 2018, vol. 4, p. 1.
7. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox biology*, 2015, vol. 4, pp. 180-183.
8. Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative stress, *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, vol. 86, pp. 715-748.
9. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry*, 2001, vol. 11, № 4, pp. 173-186.

10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002, vol. 82, № 1, pp. 47-95.
11. Jones D.P. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling, *J. Intern. Med.*, 2010, vol. 268, pp. 432-448.
12. Черенкевич С.Н., Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Горудко И.В., Шамова Е.В. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*, 2013, № 1, с. 92-108. [Cherenkevich S.N., Martinovich G.G., Martinovich I.V., Gorudko I.V., Shamova E.V. Redox regulation of cellular activity: concepts and mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2013, no. 1, pp. 92-108. (In Russ.)]
13. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N. Redox regulation of cellular processes: a biophysical model and experiment. *Biophysics*, 2011, vol. 56, pp. 444-451.
14. Pillay C.S., Hofmeyr J.H., Mashamaite L.N., Rohwer J.M. From top-down to bottom-up: computational modeling approaches for cellular redoxin networks, *Antiox. Redox Signal.*, 2013, vol. 18, pp. 2075-2086.
15. Martinovich G.G., Cherenkevich S.N., Sauer H. Intracellular redox state: towards quantitative description. *Eur. Biophys. J.*, 2005, vol. 34, pp. 937-942.
16. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N., Sauer H. Redox buffer capacity of the cell: theoretical and experimental approach. *Cell Biochem. Biophys.*, 2010, vol. 58, pp. 75-83.
17. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Черенкевич С.Н. Количественная характеристика редокс-состояния эритроцитов. *Биофизика*, 2008, т. 53, с. 618-623. [Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N. Quantitative characteristic of the redox state of erythrocytes. *Biofizika*, 2008, vol. 53, pp. 618-623. (In Russ.)]
18. Rosales-Corral S., Reiter R.J., Tan D.X., Ortiz G.G., Lopez-Armas G. Functional Aspects of Redox Control During Neuroinflammation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010, vol. 13, pp. 193-247.
19. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. Редокс-гомеостаз клеток. *Успехи физиологических наук*, 2008, т. 39, № 3, с. 29-44.
20. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Черенкевич С.Н. Редокс-свойства опухолевых клеток и их пролиферативная активность при действии фенольных антиоксидантов. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*, 2015, т. 59, № 3, с. 82-87. [Martinovich G.G., Martinovich I.V., Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Cherenkevich S.N. Redox properties of tumor cells and their proliferative activity under the action of phenolic antioxidants. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 3, pp. 82-87. (In Russ.)]
21. Terada L.S. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. *J. of cell biology*, 2006, vol. 174, № 5, pp. 615-623.
22. Martinovich G.G., Golubeva E.N., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N. Redox regulation of calcium signaling in cancer cells by ascorbic acid involving the mitochondrial electron transport chain. *J. of Biophysics*, 2012, vol. 2012, pp. 921653.
23. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В., Шадыро О.И., Черенкевич С.Н. Дифференциальная регуляция продукции активных форм кислорода и механизмов гибели опухолевых клеток пара-бензохинонами. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*, 2016, т. 60, № 5, с. 96-100. [Martinovich G.G., Martinovich I.V., Vcherashniaya A.V., Shadyro O.I., Cherenkevich S.N. Differential regulation of reactive oxygen species production and tumor cell death mechanisms by para-benzoquinones. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 5, pp. 96-100. (In Russ.)]
24. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Vcherashniaya A.V., Shadyro O.I., Cherenkevich S.N. Thymoquinone, a biologically active component of *Nigella sativa*, induces mitochondrial production of reactive oxygen species and programmed death of tumor cells. *Biophysics*, 2016, vol. 61, pp. 963-970.
25. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В., Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Черенкевич С.Н. Регуляция пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток аскорбатом натрия. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*, 2018, т. 62, № 1, с. 93-100.
26. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В., Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Черенкевич С.Н. Регуляция химиорезистентности опухолевых клеток фенольными антиоксидантами. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, № 1, с. 411-415.
27. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Vcherashniaya A.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Cherenkevich S.N. Mechanisms of redox regulation of chemoresistance in tumor cells by phenolic antioxidants. *Biophysics*. 2017, vol. 62, no. 6, pp. 942-949.
28. Kensler T.W., Wakabayashi N., Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2007, vol. 47, pp. 89-116.
29. Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Tkachev V.O. Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, vol. 78, pp.19-36.
30. Wang X.J., Sun Z., Villeneuve N.F., Zhang S. et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 2008, vol. 29, pp. 1235-1243.
31. Sun E., Erb H., Murphy T.H. Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Bioch. Biophys. Res. Com.*, 2005, vol. 326, pp. 371-377.
32. Zucker S.N., Fink E.E., Bagati A., Mannava S. et al. Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9. *Mol. Cell.*, 2014, vol. 53, pp. 916-928.

33. Dinkova-Kostova A.T., Fahey J.W., Talalay P. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinine oxidoreductase 1 (NQO1). *Meth. Enzymol.*, 2004. vol. 382, pp. 423-448.
34. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Cherenkevich S.N. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway. *Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 94-100.
35. Solis L.M., Behrens C., Dong W., Suraokar M. et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin. Cancer Res.*, 2010, vol. 16, pp. 3743-3753.
36. Sporn M.B., Liby K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer*. 2012, vol. 12, pp. 564-571.

BIOPHYSICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF REDOX REGULATION OF TUMOR CELLS CHEMORESISTANCE

Martinovich G.G.¹, Martinovich I.V.¹, Vcherashniaya A.V.¹, Zenkov N.K.², Menshchikova E.B.²,
Cherenkevich S.N.¹

¹Belarusian State University

Nezavisimosti ave., 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus; e-mail: martinovichgg@bsu.by

²Federal Research Centre fundamental and translational medicine

Timakova str., 2, Novosibirsk, 630117, Russia; e-mail: lemen@centercem.ru

Abstract. The work provides own and literature data about molecular and biophysical mechanisms of regulation of tumor cells chemoresistance that occur with the participation of reactive oxygen species and antioxidants. The mechanisms of redox signaling and redox homeostasis regulation in normal and tumor cells are considered. Special attention is given to the new strategies for reduction of drug resistance in tumor cells based on redox regulation of cellular processes.

Key words: chemoresistance, antioxidants, reactive oxygen species, tumor cells, redox regulation, redox signaling.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОГО МАТРИКСА И ТЕМПЕРАТУРЫ НА РЕКОНСТРУКЦИЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ OMPF ПОРИНА ИЗ *YERSINIA RUCKERI*

Набережных Г.А., Чистюлин Д.К., Хоменко В.А., Сидорин Е.В.,
Портнягина О.Ю., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, д. 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: novolga_05@mail.ru
Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. С помощью липосомальной модели установлена прямая зависимость между изменениями в молекулярной структуре неспецифических поринов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, происходящими под действием температуры, и функциональной активностью этих белков. В работе были использованы: OmpF порин из *Y. ruckeri*, бактерии патогенной для рыб и в качестве белка сравнения классический OmpF порин из *E. coli*. Установлено, что в отличие от порина из *E. coli*, OmpF порин из *Y. ruckeri* более устойчив к действию температуры. Для обоих белков показано, что стабильное освобождение флуорометки наблюдается до температуры, не превышающей критическую температуру диссоциации тримеров белков на мономеры, при более высокой температуре наблюдается резкое снижение каналообразующей активности поринов. Высказано предположение о том, что необратимые конформационные изменения в мономерах поринов, происходящие в результате термоденатурации, «не позволяют» им образовывать проводящий тримерный канал даже в липидном окружении.

Ключевые слова: порин, нанопоры, липосомальная модель, функциональная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Движение ионов или молекул через биологические мембраны регулируется с большой точностью при помощи каналов различной специфичности, образованных белками особого класса. В природе эти нанопоры осуществляют разнообразные и важные функции, от поддержания гомеостаза клетки и участия в клеточной сигнализации до активации или уничтожения клеток. Сочетание наноразмерных размеров и сложной, но регулируемой функциональности, делают эти биологические поры особенно привлекательными для различных областей нанобиотехнологии, бурно развивающейся в настоящее время [1]. Область применения биологических пор простирается от сверхчувствительных биосенсоров до целенаправленного уничтожения злокачественных клеток [2].

Одними из таких биологических нанопор являются каналы неспецифических поринов наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий. Порины принадлежат к бета-баррельным интегральным мембранным белкам, образующим в нативной мембране олигомерные структуры (чаще всего тримеры). Они состоят из антипараллельных амфифильных бета-стрендов (тяжей), гидрофобные остатки аминокислот которых экспонированы в липидный бислой, а гидрофильные - во внутреннюю часть (интерьер) барреля [3]. По своим физико-химическим свойствам порины представляют собой слабокислые белки, имеющие необычайно большое для интегральных белков количество полярных аминокислотных остатков. В стабилизации пространственной структуры поринов как в НМ, так и в изолированном состоянии помимо гидрофобных взаимодействий существенную роль играют водородные и ионные связи [4]. Именно этим обусловлена необычайная устойчивость этих белков к протеазам, повышенной температуре и другим денатурирующим факторам.

Амфифильная природа молекул этих белков и сохранение пространственной структуры их молекул в изолированном состоянии в растворах детергентов позволяет им легко встраиваться в липидный бислой с образованием ион-проводящей структуры. Как было показано нами ранее, существенное значение для реконструкции порина в липидный бислой и проявления его функциональных свойств имеет пространственная структура молекулы порина [5]. Кроме того, в предыдущих исследованиях используя порин из *Y. pseudotuberculosis* в качестве модельного белка, мы выбрали оптимальные условия встраивания порина в липосомальную мембрану [6].

Целью данной работы явилось изучение стабильности функционально активной молекулярной структуры OmpF порина из НМ *Y. ruckeri* в зависимости от температуры с помощью липосомальной модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование бактерий. В работе использовали штамм KMM 821 *Y. ruckeri*. Культивирование микроорганизмов проводили при 4 °С на питательном бульоне (Махачкала, Россия) в колбах (1 л) с интенсивной аэрацией в течение 5 суток.

Выделение. Электрофоретически гомогенные образцы OmpF поринов из *Y. ruckeri* и *E. coli* были получены по методикам, описанным в работах [7] и [8] соответственно.

Получение моноламельных липосом, меченных карбоксифлуоресцеином (КФ). Для получения отрицательно заряженных липосом смесь, состоящую из 30 мг лецитина, 12,5 мг холестерина, 1,8 мг дицетилфосфата (ДЦФ), растворяли в 0,3 мл хлороформа упаривали и высушивали в вакууме в течение 3 ч. Остаток растворяли в 0,3 мл сухого эфира, добавляли 50 мкл воды и 50 мкл 0,2 М раствора карбоксифлуоресцеина (КФ) в 0,1 М Na_2CO_3 . Смесь встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой бане (Elma, Latvia) в течение 10 мин при 5 °С и упаривали в вакууме до полного удаления эфира. Остаток суспендировали в 4 мл Трис-НСl буфера, содержащего 0,15 М NaCl, pH 7,5 (TNBS). Суспензию липосом отмывали TNBS, осаждая липосомы центрифугированием при 25000g, затем осадок липосом суспендировали в 4 мл TNBS. После отмывания липосом от несвязавшегося КФ, липосомы обрабатывали в ультразвуковой бане (Elma, Latvia) в течение 10 мин при 5 °С и 10 раз пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 200 нм (Nucleopore, США). Контроль за размерами липосом осуществляли методом динамического светорассеяния с использованием прибора ZetaSizerNano ZS («Malvern», Великобритания) при температуре 25 °С, при фиксированном угле рассеяния 173 ° и длине волны лазера 633 нм.

Регистрация изменения проницаемости липосомальной мембраны. Для определения порообразующей активности исследуемых белков при различной температуре регистрировали изменение проницаемости липосомальной мембраны. Вначале определяли фоновую флуоресценцию, добавляя к 50 мкл суспензии липосом 120 мкл TNBS. Затем к суспензии липосом добавляли 20 мкл раствора порина, выдержанного при различных температурах, и фиксировали изменение флуоресценции в течение 30 мин. Для определения максимальной флуоресценции при полном лизисе к суспензии липосом добавляли 100 мкл раствора 10 % раствора SDS. Процент специфического освобождения маркера (COM) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ COM} = \frac{F_{\text{эксп}} - F_{\text{фон}}}{F_{\text{макс}} - F_{\text{фон}}} \times 100 \%,$$

где $F_{\text{эксп}}$ – флуоресценция после добавления белка, $F_{\text{макс}}$ – флуоресценция после полного лизиса липосом, $F_{\text{фон}}$ – флуоресценция без добавления белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В нативной мембране грамотрицательных бактерий неспецифические порины существуют преимущественно в виде гомотримеров, именно эта молекулярная форма белков является функционально активной единицей. В изолированном состоянии в растворах детергентов молекулярная структура поринов может изменяться под действием температуры. По достижении некоторой температуры, называемой критической, тримеры белков диссоциируют на мономеры, и этот процесс сопровождается потерей функциональной активности поринов.

В нашу задачу входило установление корреляции между точкой термоперехода и каналобразующей активностью поринов с помощью липосомальной модели. В работе были использованы: OmpF порин из *Y. ruckeri*, бактерии патогенной для рыб, прежде всего, из семейства лососевых и классический OmpF порин из *E. coli* (в качестве белка сравнения). Как было показано нами ранее [7], порин из *Y. ruckeri* значительно более устойчив к тепловой денатурации по сравнению с порином из *E. coli*. Согласно данным калориметрии и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS [7], диссоциация порина из *Y. ruckeri* происходит в интервале температур 85-90 °С, тогда как тример порина из *E. coli* полностью диссоциирует на мономеры при 70 °С [8].

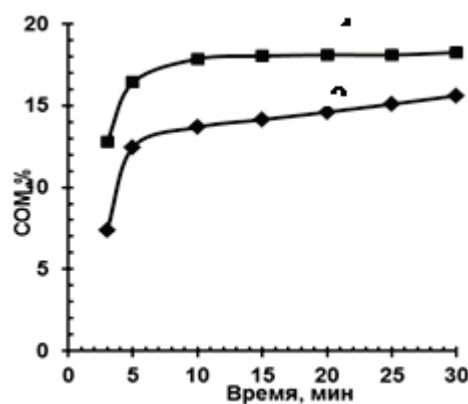


Рисунок 1. Кинетика освобождения КФ из липосом, 1 – OmpF из *E. coli*, 2 – OmpF из *Y. ruckeri*.

Порины были выдержаны с суспензией липосом при 25 °С. Ось ординат: COM, % – процент специфического освобождения КФ

Для контроля за изменением молекулярной структуры OmpF порина из *Y. ruckeri*, связанным с действием температуры, был использован метод вытекания флуоресцентной метки из отрицательно заряженных липосом, состоящих из лецитина, ДЦФ и холестерина. Концентрация флуорофора КФ внутри липосом в исходной суспензии превышала концентрацию его самотушения. Образование пор в липосомальной мембране при добавлении образца порина сопровождалось вытеканием флуорофора во внешний раствор и, соответственно, заметным увеличением интенсивности его флуоресценции. По изменению величины СОМ при включении белка в липосомы можно было судить, насколько меняется функциональная активность порина в зависимости от температуры предварительной обработки белка.

Наши эксперименты показали, что состав липидного матрикса весьма важен для стабильности липосом. Оказалось, что липосомы без холестерина нестабильны даже при комнатной температуре и, соответственно, малопригодны для исследований температурной зависимости структуры и функции исследуемых белков в составе липосом. В связи с этим, даже принимая во внимание, что в состав бактериальной мембраны холестерин не входит, для повышения стабильности липосом было решено ввести в их состав этот компонент.

На рисунке 1 приведены кинетические графики выхода КФ из липосом при включении обоих белков. Они свидетельствуют об эффективном встраивании поринов в липосомы и достижении точки насыщения в течение первых 10 мин, на что указывает дальнейшее стабильное освобождение флуорофора за весь период наблюдения (30 мин).

Следует отметить, что размеры липосом, определенные методом динамического светорассеяния, составили 200 нм. После добавления поринов их размеры увеличивались до 400 нм, что также может свидетельствовать о связывании поринов с липосомами.

На втором этапе исследования порины, прогретые при разных температурах и охлажденные с помощью ледяной бани, добавляли к суспензии липосом, а собственно реконструкцию белков в липосомальную мембрану проводили при комнатной температуре. Таким образом, мы смогли установить корреляцию между изменениями в конформации молекулы белка, произошедшие под действием температуры, и функциональной активностью порина, выявляемую при встраивании его в липосомальный бислой. Как следует из данных рисунка 2, резкое уменьшение выхода флуорофора соответствует температуре диссоциации тримеров белков на мономеры, значения которой для исследуемых белков приведены выше.

Таким образом, с помощью липосомальной модели получены экспериментальные доказательства того, что в искусственной липосомальной мембране тримерная молекулярная форма изолированных поринов сохраняет способность образовывать функционально активную проводящую структуру. Конформационные изменения, происходящие при температуре, не превышающей критическую температуру диссоциации тримеров белка на мономеры, не влияют на количество освобождаемого флуорофора. Однако диссоциация тримеров сопровождается резким падением величины СОМ. Это свидетельствует о том, что функциональная активность поринов напрямую зависит от молекулярной структуры этих белков. Можно предположить, что причиной наблюдаемого явления, являются необратимые конформационные изменения в субъединицах (мономерах) белков, которые «не позволяют» им образовать проводящий тримерный канал даже в липидном окружении.

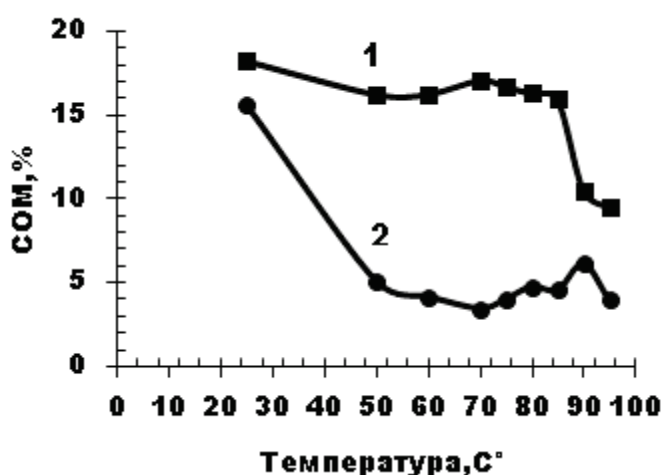


Рисунок 2. Зависимость функциональной активности исследуемых поринов от температуры предварительной обработки образцов: 1 – OmpF из *Y. ruckeri*, 2 – OmpF из *E. coli*. Перед реконструкцией в липосомы белки были предварительно выдержаны при температур 25-95 °C. Ось ординат: СОМ, % - процент специфического освобождения КФ

Список литературы / References:

1. Majd S., Yusko E.C., Billeh Y.N., Macrae M.X., Yang J., Mayer M. Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics. *Curr Opin Biotechnol.*, 2010, vol. 21, pp. 439-476.
2. Pradeep H., Rajanikant G.K. Nanochannels: biological channel analogues. *IET Nanobiotechnol.*, 2012, vol. 6, no. 2, pp. 63-70.
3. Schulz G.E. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1565, pp. 308-317.
4. Koebnick R., Locher K.P., Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.*, 2000, vol. 37, pp. 239-253.
5. Набережных Г.А., Карпенко А.А., Горбач В. И., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Кульчин Ю.Н. Исследование морфологии надмолекулярных структур белка-порины из *Yersinia pseudotuberculosis* в липидном бислое методом атомно-силовой микроскопии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2016*, 2016, т. 2, с. 32-36. [Naberezhnykh G. A., Karpenko A.A., Gorbach V. I., Khomenko V.A., Novikova O.D., Kulchin Yu.N. Morphology of supramolecular structures of pore-forming protein from *Yersinia pseudotuberculosis* in lipid bilayer by atomic force microscopy. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 2, pp. 32-36. (In Russ.)]
6. Новикова О.Д., Ким Н.Ю., Лукьянов П.А., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Влияние pH на структуру и функциональную активность порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (иерсинина) Сообщение 2. pH-Индукционные конформационные интермедиаты порина из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*. *Биол. мембраны*, 2007, т. 24, № 2, с. 159-168. [Novikova O. D., Kim N. Yu., Luk'yanov P. A., Likhatskaya G. N., Emel'yanenko V. I., Solov'eva T. F. Effects of pH on Structural and Functional Properties of Porin from the Outer Membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. II. Characterization of pH-Induced Conformational Intermediates of *Yersinin*. *Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 2, pp. 154-162. (In Russ.)]
7. Novikova O.D., Chistyulin D.K., Khomenko V.A., Sidorin E.V., Kim N.Yu., Sanina N.M., Portnyagina O.Yu., Solov'eva T.F., Uversky V.N., Shnyrov V.L. Peculiarities of thermal denaturation of OmpF porin from *Yersinia ruckeri*. *Molecular BioSystems*, 2017, vol. 13, pp. 1854-1862.
8. Rosenbusch J.P. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, no. 24, pp. 8019-8029.

EFFECT OF THE LIPID MATRIX COMPOSITION ON RECONSTITUTION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF OMPF PORIN FROM *YERSINIA RUCKERI*

Naberezhnykh G.A., Chistyulin D.K., Khomenko V.A., Sidorin E.V., Portnyagina O.Yu., Novikova O.D.

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the RAS
 prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: novolga_05@mail.ru

Abstract. Using liposome model, a direct relationship between changes in the molecular structure of the nonspecific porins of the outer membrane of Gram-negative bacteria that occur under the influence of temperature and the functional activity of these proteins has been established. OmpF porin from *Y. ruckeri*, bacteria pathogenic for fish and classical OmpF porin from *E. coli* as a comparison protein were used in the study. It was found that unlike porin from *E. coli*, OmpF porin from *Y. ruckeri* is more resistant to temperature. For both proteins, stable release of the fluorophore was observed up to a temperature not exceeding the critical temperature of the dissociation of trimers of the proteins into monomers, at a higher temperature a sharp decrease in the channel-forming activity of the porins was found. It is suggested that irreversible conformational changes in the porin monomers that occur as a result of thermal denaturation "do not allow" them to form a conducting trimeric channel even in a lipid environment.

Key words: porin, nanopores, liposomal model, functional activity.

ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-НИТРОЗИЛЬНОГО СТРЕССА В КРОВИ И ПЕРИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ ИБС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЯМУЮ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЮ МИОКАРДА

Внуков В.В.¹, Сидоров Р.В.², Милютин Н.П.¹, Гвалдин Д.Ю.¹,
Ананян А.А.¹, Поспелов Д.Ю.²

¹Южный федеральный университет

ул. Б. Садовая, д. 105/42, Ростов-на-Дону, 344006, РФ; e-mail: vvvnukov@sfsu.ru

²Ростовский государственный медицинский университет

пер. Нахичеванский, д. 29, Ростов-на-Дону, 344022, РФ

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Исследовали роль окислительного стресса в механизмах развития постперикардиотомного синдрома (ПКТС) у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), перенесших прямую реваскуляризацию миокарда. Обследовали 76 пациентов с ИБС в возрасте 46-70 лет, которым по показаниям проводили операцию аортокоронарного шунтирования. Пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 66 пациентов без ПКТС, вторую – 10 пациентов с ПКТС. Клинико-биохимическое обследование проводили до операции и на 1, 3, 5, 7, 10 сутки после операции аортокоронарного шунтирования. В качестве контроля использовали кровь 10 здоровых людей обоего пола аналогичного возраста. В крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование, определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, Шиффовы основания), стабильных метаболитов оксида азота, ассиметричного диметиларгинина (АДМА), активность аргиназы, антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы), оксидазную активность церулоплазмينا и уровень восстановленного глутатиона. В крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование, показаны интенсификация свободнорадикального окисления и накопление продуктов перекисного окисления липидов; повышение содержания метаболитов оксида азота, АДМА и активация аргиназы; отмечается дисбаланс в функционировании супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах, напряженность в работе глутатион-зависимых ферментов, ингибирование оксидазной активности церулоплазмينا. Описываемые изменения характерны для первых 5 послеоперационных суток у пациентов с ПКТС. Таким образом, у больных ИБС проведение прямой реваскуляризации миокарда (аортокоронарного шунтирования) сопровождается развитием оксидативной и нитрозильной составляющих окислительного стресса.

Ключевые слова: реваскуляризация миокарда, аортокоронарное шунтирование, окислительный стресс, постперикардиотомный синдром, антиоксидантные ферменты.

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения во всем мире. Особое внимание уделяют ишемической болезни сердца (ИБС), на долю которой приходится 85-90 % случаев.

В настоящее время возросло число кардиохирургических вмешательств. Одним из наиболее эффективных методов коррекции последствий развития ИБС является хирургическая реваскуляризация миокарда или аортокоронарное шунтирование, поскольку значительно снижает летальность и повышает качество жизни пациента [1].

Наряду с положительным эффектом восстановления коронарного кровотока в ишемизированном миокарде может оказывать и негативное действие. Одним из наиболее частых послеоперационных осложнений, которое встречается по данным различных клиник от 23-50 % случаев, является постперикардиотомный синдром (ПКТС). Исследованию роли окислительного стресса в механизмах развития постперикардиотомного синдрома у больных ИБС, перенесших прямую реваскуляризацию миокарда, посвящена данная работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 76 пациентов с ИБС в возрасте 46-70 лет, которым по показаниям проводили операцию аортокоронарного шунтирования. Критериями включения в группу больных ИБС, которым проводили АКШ, явились стенокардия напряжения III и IV классов; стеноз ствола левой коронарной артерии более 75 % и выраженный стеноз ближних отделов магистральных артерий; множественное поражение коронарных сосудов, подтвержденные коронарографическим исследованием. Клинико-биохимическое обследование проводили до операции и на 1, 3, 5, 7, 10 сутки после операции аортокоронарного шунтирования. В качестве контроля использовали кровь 10 здоровых людей обоего пола аналогичного возраста. Уровень NO оценивали по содержанию стабильных метаболитов оксида азота (NOx) нитритов/нитратов [2]. Получение хлороформного экстракта для определения молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) осуществляли

методом Bligh E.G. и Dyer W.J. [3]. Диеновые конъюгаты (ДК) определяли спектрофотометрическим методом [4]. Содержание Шиффовых оснований (ШО) определяли флуоресцентным методом [5]. Уровень малонового альдегида (МДА) оценивали колориметрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой [6]. Активность супероксиддисмутазы/супероксидустраняющую активность (СОД/СУА) определяли спектрофотометрическим методом [7]. Активность каталазы/скорость утилизации гидропероксида ($V_{H_2O_2}$) определяли по методу Королюка М.А. [8]. Оксидазную активность церулоплазмينا оценивали спектрофотометрическим методом [9]. Для определения содержания восстановленного глутатиона (GSH) использовался метод Ellman Q.L. [10]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли спектрофотометрическим методом [11]. Об активности аргиназы судили по приросту мочевины – продукта катализируемой реакции, содержание которой оценивали спектрофотометрически по реакции с диацетилмонооксисом [9]. Концентрацию ADMA определяли с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа фирмы Immundiagnostik AG (Германия). Детекцию проб осуществляли на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (США) при длинах волн 450 нм и 630 нм.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA10.0 и SPSS Statistics 17.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Свободнорадикальное окисление и продукты ПОЛ в крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование

Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня продуктов ПОЛ в плазме крови больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование (АКШ). Содержание ДК в плазме крови в течение всего периода наблюдения повышалось на 209-646 % у больных без ПКТС, на 176-1248 % у больных с синдромом. Уровень ДК во 2-й группе на 3-и послеоперационные сутки выше на 337 %, чем в 1-й группе.

Уровень МДА возрастал в плазме крови обеих групп больных. В плазме крови больных без ПКТС в течение всего периода наблюдения содержание МДА повышалось на 79-139 %, в плазме крови больных с синдромом прирост МДА составлял 73-145 % по сравнению с донорами.

В момент операции установлено повышение уровня МДА на 38 % в перикардиальной жидкости пациентов с ПКТС по сравнению с контрольной группой. Содержание МДА во 2-й группе пациентов выше на 61 %, чем в 1-й. Уровень МДА в эритроцитах обеих групп больных увеличивался после АКШ. В эритроцитах пациентов без ПКТС повышение содержания МДА составляло 16-23 % на 3-10-е послеоперационные сутки, у пациентов с синдромом - 24-28 % на 5-10-е сутки относительно доноров.

Наблюдается повышение уровня конечных продуктов ПОЛ в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. Содержание ШО в плазме крови пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения увеличивалось на 48-164 %, тогда как прирост уровня ШО в эти же сроки после операции в группе пациентов с синдромом составлял 492-626 % по сравнению с донорами. Во 2-й группе пациентов уровень ШО выше на 148-303 %, чем в 1-й группе на 1-10-е послеоперационные сутки.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об интенсификации свободнорадикального окисления и накоплении продуктов ПОЛ в эритроцитах, плазме и перикардиальной жидкости пациентов, перенесших АКШ. Следует отметить, что для пациентов с ПКТС характерна более высокая интенсивность перекисного окисления в отличие от пациентов без диагностированного синдрома, у которых концентрация первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ значительно ниже.

Активность антиоксидантных ферментов и содержание низкомолекулярных антиоксидантов в крови и перикардиальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование. Активность СОД/СУА в эритроцитах и плазме крови обеих групп больных после АКШ существенно возрастала. Активность СОД в эритроцитах повышалась на 99-328 % у пациентов без ПКТС и на 85-302 % у пациентов с синдромом в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой.

Установлено повышение СУА в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. В плазме крови пациентов без ПКТС уровень СУА возрастал на 84-157 % в течение семи послеоперационных суток, в плазме пациентов с ПКТС прирост СУА составил 132-428 % в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. Максимальный прирост показателя в обеих группах наблюдался на 3-е послеоперационные сутки. На 1-е, 3-е, 7-е и 10-е послеоперационные сутки СУА была выше во 2-й группе на 109 %, 105 %, 147 % и 549 %, соответственно, чем в 1-й группе.

Активность каталазы снижалась в эритроцитах пациентов обеих исследованных групп в течение всего периода наблюдения. Активность фермента снижалась на 17-38 % в эритроцитах больных без ПКТС и на 9-35 % в эритроцитах пациентов с синдромом. Активность каталазы во 2-й группе пациентов на 10-е послеоперационные сутки была на 16 % выше, чем в 1-й группе.

Установлено повышение скорости утилизации гидропероксида ($V_{H_2O_2}$) в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ. В плазме пациентов без ПКТС $V_{H_2O_2}$ повышалась на 59-103 %, в плазме пациентов с синдромом - на 46-93 % в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. $V_{H_2O_2}$ в момент операции во 2-й группе на 51 % ниже, чем в 1-й.

Таким образом, в эритроцитах обеих групп больных обнаружен дисбаланс в работе антиоксидантных ферментов. Однонаправленный рост активности СОД/СУА и $V_{H_2O_2}$ в плазме сопровождается снижением

активности каталазы в эритроцитах крови пациентов, перенесших АКШ.

Оксидазная активность церулоплазмينا (ЦП) уменьшалась в плазме крови обеих групп больных после АКШ. Активность ЦП снижалась на 27-40 % и на 21-54 % в плазме крови пациентов без ПКТС и в группе больных с синдромом, соответственно, в течение всего периода наблюдения по сравнению с донорами. Во второй группе больных активность ЦП в момент операции и 5-е послеоперационные сутки ниже на 33 % и 21 %, чем в первой группе.

В момент операции установлено снижение активности ЦП в перикардиальной жидкости пациентов без ПКТС и пациентов с синдромом на 42 % и 50 %, соответственно, по сравнению с контрольной группой. Имеются противоречивые данные о динамике ЦП в крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В ряде работ показано повышение концентрации ЦП в плазме крови при атеросклерозе, стенокардии, аневризме аорты [12,13]. Другими авторами установлено снижение уровня ЦП в плазме крови после АКШ [14]. В данном исследовании доказано снижение оксидазной активности ЦП в плазме крови пациентов с ИБС обеих обследованных групп после реваскуляризации миокарда. Одной из возможных причин инактивации ЦП может быть агрегация ЦП перекисью водорода [15].

Наблюдалась напряженность в функционировании компонентов глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) повышалось на 30-50 % в эритроцитах пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Значительный прирост концентрации GSH (на 33-64 %) отмечен в эритроцитах пациентов с синдромом. Содержание GSH во 2-й группе больных в момент операции на 18 % выше, чем в 1-й группе.

Установлено снижение активности глутатионпероксидазы (ГПО) на 20-29 % в эритроцитах пациентов без ПКТС по сравнению с контрольной группой течение всего периода наблюдения. Активность ГПО в эритроцитах пациентов с синдромом снижалась на 17 %, 28 % и 34 % в момент операции, на 1-е и 5-е послеоперационные сутки, соответственно.

Изменения активности ГПО в плазме крови больных ИБС, перенесших АКШ, отличаются положительной направленностью. Активность фермента в плазме крови пациентов без ПКТС повышалась на 20-24% в 1-е, 5-е, 7-е и 10-е послеоперационные сутки по сравнению с донорами. В плазме крови пациентов с синдромом активность ГПО повышалась на 21-63 % в момент операции, на 1-е, 5-е и 7-е послеоперационные сутки относительно доноров. Активность ГПО во 2-й группе больных в момент операции и на 1-е сутки послеоперационного периода была выше на 40 % и 31 %, чем в 1-й группе.

Снижение активности ГПО на фоне повышенного содержания глутатиона возможно объясняется ингибированием фермента перекисью водорода, значительный прирост которой в эритроцитах пациентов обусловлен, показанной в данном исследовании резкой активацией эритроцитарной СОД на фоне снижения активности каталазы.

Известно, что высокая концентрация H_2O_2 может приводить к ингибированию фермента {16}. Обнаружена обратная корреляционная зависимость между активностями ГПО и СОД ($R = -0,6$, $p < 0,05$) в эритроцитах пациентов без ПКТС.

В плазме крови источником ГПО являются клетки крови и других тканей, одной из изоформ является ГПО-3, характерная для тромбоцитов. При низкой активности ГПО-3 в плазме крови наблюдается повышение продукции тромбоцитами тромбосана и, как следствие, развитие тромбоза. В эксперименте на животных показано, что дефицит ГПО в плазме крови повышает смертность от тромбоза {17}.

Содержание метаболитов оксида азота, асимметричного диметиларгинина и активность аргиназы в эритроцитах и плазме крови больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование. Содержание метаболитов оксида азота (нитритов/нитратов, NOx), асимметричного диметиларгинина (ADMA) и активность аргиназы возрастали в плазме и эритроцитах крови обеих групп больных. Уровень NOx повышался на 73-83 % в плазме крови пациентов без ПКТС в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. Содержание NOx возросло на 67-104 % в плазме крови пациентов с синдромом. Максимальных значений исследуемый показатель достигал в момент операции в обеих группах больных.

Наблюдалось повышение на 48-174 % активности аргиназы в эритроцитах пациентов без ПКТС в течение 10-ти послеоперационных суток по сравнению с контролем. В эритроцитах пациентов с синдромом активность аргиназы возрастала на 70-220 % в течение всего периода наблюдения. Максимальных значений исследуемый показатель достигал в 1-й группе больных на 7-е послеоперационные сутки, во 2-й группе – в 1-е сутки послеоперационного периода. Во 2-й группе больных активность аргиназы была выше в момент операции на 27 %, в 1-е послеоперационные сутки на 71 %, на 3-и сутки на 25 %, чем в 1-й группе.

Установлено повышение уровня ADMA в плазме крови пациентов без ПКТС в 1-е, 3-и и 5-е послеоперационные сутки на 24 %, 27 % и 67 % по сравнению с контрольной группой. Содержание ADMA заметно возросло в плазме крови пациентов с синдромом в момент операции, 3-и и 5-е послеоперационные сутки (на 54 %, 39 % и 76 %) по сравнению с контролем.

В норме NO• в небольших количествах синтезируется эндотелиальной NO-синтазой. Недостатку NO• в эндотелии и снижению его биодоступности, с одной стороны, способствует избыточная продукция цитокинов, с другой стороны - повышение активности аргиназы, которая конкурирует с eNOS за общий субстрат, L-аргинин. Кроме того, асимметричный диметиларгинин может непосредственно ингибировать эндотелиальную NO-синтазу и вызывать относительный дефицит NO• [18]. Несмотря на высокую активность аргиназы и чрезмерный уровень ADMA у больных ИБС, перенесших АКШ, в настоящем исследовании наблюдался прирост

содержания нитритов/нитратов в плазме крови в течение всего периода наблюдения. Известно, что аргиназа конкурирует с NOS за L-аргинин и таким образом способна регулировать продукции NO•.

Активация аргиназы сопряжена с механизмом развития ишемии/реперфузии. В работе С. Jung и сотрудников показано повышение экспрессии аргиназы-1 в ишемизированном миокарде [19]. Развитие окислительного стресса, который возникает в ответ на хирургическую травму, введение протамина и анестезия, АКШ, с момента операции по 7-е сутки приводят к повышению концентрации ADMA [20,21]. Доказано, что высокий уровень ADMA может служить предиктором послеоперационных осложнений [21].

Проведение аортокоронарного шунтирования сопряжено с накоплением продуктов ПОЛ и дисрегуляцией антиоксидантной системы, способствует развитию окислительного стресса, гибели кардиомиоцитов и увеличению объема перикардального экссудата.

В крови и перикардальной жидкости больных ИБС, перенесших аортокоронарное шунтирование, показана интенсификация процессов свободнорадикального окисления, включающая: накопление продуктов перекисного окисления липидов; повышение содержания метаболитов оксида азота, АДМА и активация аргиназы; отмечается дисбаланс в функционировании супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах, напряженность в работе глутатион-зависимых ферментов, ингибирование оксидазной активности церулоплазмينا. Описываемые изменения характерны для первых 5 послеоперационных суток у пациентов с ПКТС.

Таким образом, у больных ИБС проведение прямой реваскуляризации миокарда (аортокоронарного шунтирования) сопровождается развитием оксидативной и нитрозильной составляющих окислительного стресса.

Список литературы / References:

1. Гелис Л.Г., Медведева Е.А., Островский Ю.П. Фармакологическая защита миокарда при коронарном шунтировании у больных с постинфарктной стенокардией. *Главный врач юга России*, 2007, № 4, с. 11-17. [Helis L.G., Medvedeva E.A., Ostrovskiy Y.P. Pharmacological myocardial protection during coronary bypass patients with post-infarction angina. *Glavniy vrach yuga Rossii*, 2007, no. 4, pp. 11-17. (In Russ.)]
2. Голиков П.П. Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NOx) в сыворотке крови. *Вопросы биомедицинской химии*, 2004, № 1, с. 79-83. [Golikov P.P., Nikolaeva N.Y. Determination method of nitrite/nitrate (NOx) in the serum. *Voprosy biomeditsinskoi khimii*. 2004, no.1, pp. 79-83. (In Russ.)]
3. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*, 1959, vol. 37, pp. 911-917.
4. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот. *Современные методы в биохимии*, М.: Медицина, 1977, с. 63-64. [Stalnaya I.D. A method of determining the dienovoj conjugation of unsaturated fatty acids. *Sovremennii metodi v biochimii*, M.: Meditsina, 1977, pp. 63-64. (In Russ.)]
5. Bidlack W.R., Tappel A.L. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids*, 1973, vol. 8, no. 4, pp. 203-207.
6. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 1977, с. 66-68. [Stalnaya I.D., Garishvili G.G. Method for determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. *Sovremennii metodi v biochimii*, M.: Meditsina, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]
7. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и его использование для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии*. 1999, № 3, с. 263-272. [Sirota T.V. A new approach to the study of the process of autooxidation of adrenaline and using it to measure the activity of superoxide dismutase. *Voprosy meditsinskoi khimii* *Вопросы медицинской химии*, 1999, no. 3, pp. 263-272. (In Russ.)]
8. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, 1988, № 1, с.16-19. [Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. A method of determining the activity of catalase. *Laboratornoe delo*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
9. Камышников В.С. *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник. В 2 томах.* Издательство: Мн: Интерпрессервис, 2003, 958 с. [Kamishnikov V.S. *Kliniko-biochemical laboratory diagnostics. Reference. In 2 volumes.* Publisher: Minsk: Interpresservis, 2003, 958 p. (In Russ.)]
10. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem*, 1959, vol. 82, pp.70-77.
11. Мойн В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*, 1986, № 12, с. 724-727. [Moin V.M. Simple and specific method of determining activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Laboratornoe delo*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
12. Panichi V., Taccolla D., Rizza G.M. et al. Ceruloplasmin and acute phase protein levels are associated with cardiovascular disease in chronic dialysis patients. *J Nephrol*, 2004, vol. 17, no. 5, pp. 715-20.
13. Ziakas A., S. Gavriliadis, E. Souliou et al. Ceruloplasmin is a better predictor of the long-term prognosis compared with fibrinogen, CRP, and IL-6 in patients with severe unstable angina. *Angiology*, 2009, vol. 60, no. 1, pp. 50-59.
14. Meng Q.H., Zhu S., Sohn N. [et al.] Release of cardiac biochemical and inflammatory markers in patients on cardiopulmonary bypass undergoing coronary artery bypass grafting. *J Card Surg.*, 2008, vol. 23, no. 6, pp. 681-687.
15. Aouffen M., Paquin J., Furtos A. [et al.] Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide

is prevented by pyruvate. *Free Radic Res.*, 2004, vol. 38, no. 1, pp. 19-26.

16. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2013, vol. 1830, no. 5, pp. 3217-3266.

17. Buijsse B., Lee D.-H., Steffen L. et al. Low Serum Glutathione Peroxidase Activity Is Associated with Increased Cardiovascular Mortality in Individuals with Low HDLc's. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6, pp. 1-6.

18. Sibal L., Agarwal S.C., Home P.D. et al. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev*, 2010, vol. 6, no. 2, pp. 82-90.

19. Jung C., Gonon A.T., Sjöquist P.O., Lundberg J.O., Pernow J. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*, 2010, vol. 85, no. 1, pp. 147-154.

20. Sydow K., Böger R. H. Reloaded: ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inaemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovascular Research*, 2012, vol. 96, pp. 167-171.

21. Plicner D., Mazura P., Sadowski J. et al. Asymmetric dimethylarginine and oxidative stress following coronary artery bypass grafting: associations with postoperative outcome. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014, vol. 45, pp. 1-6.

PARAMETERS OF OXIDATIVE-NITROSYL STRESS IN BLOOD AND PERICARDIAL FLUID IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE UNDERGOING DIRECT MYOCARDIAL REVASCULARIZATION

Vnukov V.V.¹, Sidorov R.V.², Milutina N.P.¹, Gvaldin D.Y.¹, Ananyan A.A.¹, Pospelov D.Y.²

¹Southern Federal University

B. Sadovaya str., 105/42, Rostov-on-Don, 344006, Russia; e-mail: vvnukov@sfedu.ru

²Rostov state medical University

Nakhichevan lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Abstract. We investigated the role of oxidative stress in postpericardiotomic syndrome (PPCS) development mechanism in patients with coronary heart disease (CHD) who underwent direct myocardial revascularization. The study included 76 patients with coronary heart disease aged 46-70 years who performed on the testimony of coronary artery bypass surgery. Patients were divided into two groups. The first group consisted of 66 patients without PPCS, a second – 10 patients with PPCS. Clinical and biochemical examination was performed before and at 1, 3, 5, 7, 10 days after coronary artery bypass surgery were used as controls blood of 10 healthy individuals of both sexes of similar age. The blood and pericardial fluid CHD patients undergoing coronary artery bypass, determined the content of products of lipid peroxidation (diene conjugates, malonic dialdehyde, Schiff bases), the stable metabolite of nitric oxide, asymmetric dimethylarginine (ADMA), arginase activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione), ceruloplasmin oxidase activity and the level of reduced glutathione. The blood and pericardial fluid CHD patients undergoing coronary artery bypass showing intensification of free radical oxidation and the accumulation of lipid peroxidation products; elevated levels of nitric oxide metabolites and activation of arginase ADMA; marked imbalance in the function of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes, the tension in the glutathione-dependent enzymes, the inhibition of ceruloplasmin oxidase activity. The described changes are characteristic for the first 5 postoperative days in patients with the PPCS. Thus, in patients with CHD holding direct myocardial revascularization (coronary artery bypass grafting) is accompanied by the development of oxidative and nitrosyl components of oxidative stress.

Key words: myocardial revascularization, coronary artery bypass grafting, oxidative stress, postpericardiotomic syndrome, antioxidant enzymes.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ШЕРСТИ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА БИОФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Комарова С.А., Олешкевич А.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина
ул. Академика Скрябина, 23, г. Москва, 109472, РФ; e-mail: kaffizmgavmib@mail.ru

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Рассмотрены возможности биофизических методов – спектрофотометрии и редоксометрии (измерение окислительно-восстановительного потенциала) – для идентификации источника волос в случае близкородственных видов, а также определения видовой принадлежности шерсти животных в экспертизе. Основное внимание в работе уделено рассмотрению различий в спектрах поглощения щелочных гидролизатов волос мелкого рогатого скота, а также различию редокс-потенциалов. Были сделаны предварительные выводы, что данные методы можно использовать для видовой идентификации.

Ключевые слова: волосы, щелочные гидролизаты, спектрофотометрия, редокс-метрия.

В основу данной работы положены результаты исследования волос экспериментальными методами в целях создания методики решения задач экспертизы.

В экспертные лаборатории очень часто, кроме волос животных, подвергшихся окрашиванию или иной обработке, попадают нативные волосы. В ходе экспертизы определяют принадлежность таких волос определенному животному или соответствие виду, заявленному в конкретном меховом изделии.

В большинстве случаев исследование волос в экспертизе проводится только органолептически при помощи светового микроскопа. Видовая принадлежность волоса конкретному виду животных определяется по особенностям структуры сердцевинки и коры волоса, что является субъективной оценкой. Клеточная структура волос родственных видов может быть визуально схожей, что может негативно сказываться на результатах экспертизы.

Объектами исследования служили нативные волосы животных. Часть образцов волос была получена в лаборатории судебно-биологической экспертизы при Министерстве Юстиции РФ, часть волос (козы) была получена от живых животных на одной ферме в Ногинском районе Подмосковья.

Исследованию подвергались одновременно остевые и пуховые волосы, срезанные ножницами на уровне кожной ткани, что обеспечило наличие в объекте всех частей волоса.

В задачи исследования входило: разработка способа химического тестирования единичных нативных волос животных с целью определения их видовой принадлежности.

Приготовление щелочных гидролизатов волос: для приготовления щелочных гидролизатов брали по 10 мг исследуемого образца волос, вносили в пробирку. Затем с помощью микродозатора фирмы «Ленпипет» вносили 4 мл 10 %-го раствора едкого натра. Нагревание вели на водяной бане с температурой 100 °С в течение 3 часов. Контроль гидролиза осуществлялся визуально с помощью поляризационно-интерференционного микроскопа «BIOLAR» с одной двупреломляющей призмой: объектив – х 20, А = 0,4, Т = 160.

Спектрофотометрия проводилась на спектрофотометре СФ-56. Изучение спектров проводили во всех областях спектра с целью выявления различий в положении минимумов и максимумов и, соответственно, различий в оптической плотности щелочных гидролизатов различных видов млекопитающих, что давало бы основание предполагать различие в строении и составе кератинов, а также других составляющих волоса. В качестве образца сравнения использовался 10 %-ный раствор NaOH.

В ходе исследования были выявлены различия в спектрах поглощения у образцов из разных половозрастных групп. Поглощение света шерстью от взрослых самок и самцов начинается на длинах волн 245-275 нм. При этом в спектре присутствовали две полосы поглощения: в диапазоне 410-510 нм и 550-650 нм. Гидролизаты волос окотных коз не поглощали при длинах волн 300–370 нм, а новорожденных – в двух диапазонах: 275-285 нм и 300-350 нм.

Также в ходе работы провели сравнение спектров поглощения гидролизатов волос мелкого рогатого скота с другими представителями копытных.

Сравнение графиков зависимости оптической плотности от длины волны на примере щелочных гидролизатов шерсти овцы и северного оленя.

На представленных графиках видно имеющие различия в спектрах поглощения гидролизатов шерсти овцы и северного оленя. В спектре поглощения гидролизата шерсти овцы имеются максимумы поглощения на длинах волн 230-250 нм, 250-260 нм, а также 270-290 нм. Спектр поглощения гидролизата шерсти не имеет ярко выраженных минимумов или максимумов поглощения, представляет собой зависимость ближе к экспоненциальной.

На основании анализа графиков можно говорить о возможности определения видовой принадлежности шерсти животных.

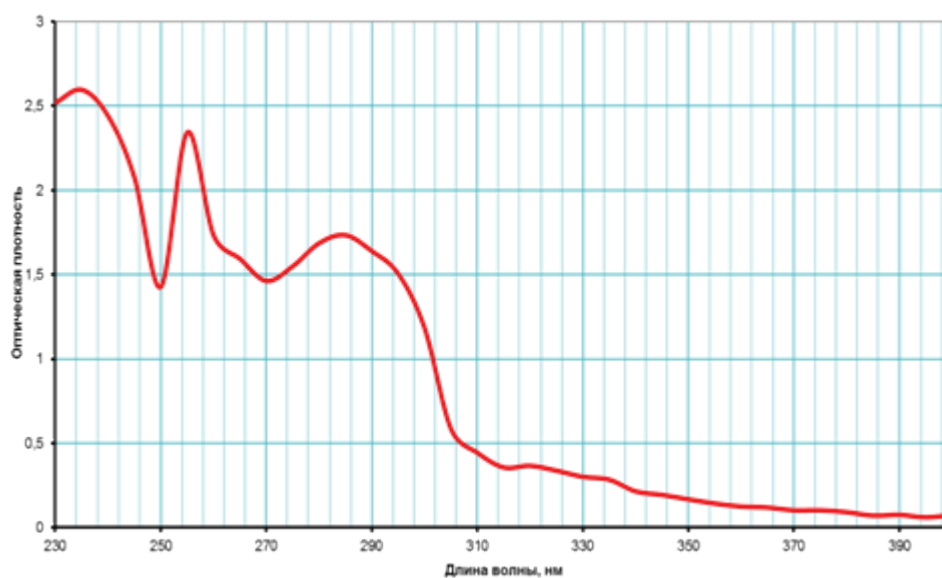


Рисунок 1. Зависимость оптической плотности щелочного гидролизата шерсти овцы от длины волны

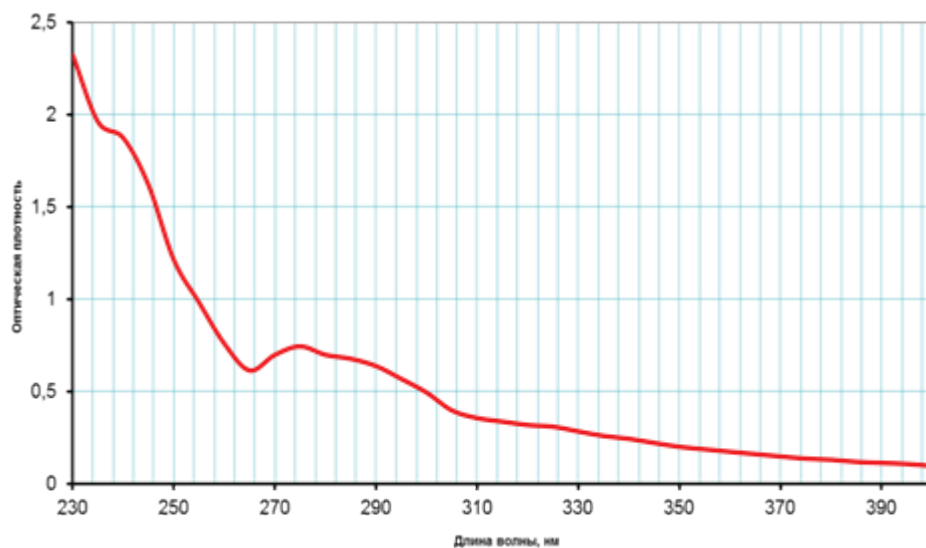


Рисунок 2. Зависимость оптической плотности щелочного гидролизата северного оленя от длины волны

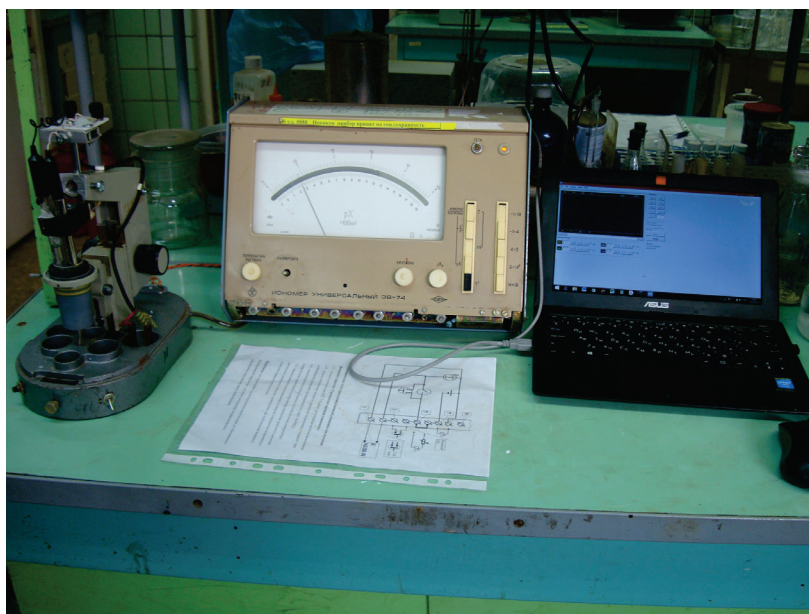


Рисунок 3. Фото установки для проведения редоксометрии

Редокс-метрия. Данный метод исследования был выбран на основании известных из литературы свойств щелочных гидролизатов кератинов изменять значение редокс-потенциала под действием видимого света, что связано наличием в их составе сульфгидрильных (SH) и дисульфидных (SS) групп.

При проведении калибровки прибора была установлена зависимость между изменением потенциала и окисленностью среды. Было установлено, чем выше потенциал, тем больше степень окисленности среды (раствора).

Измерение редокс-потенциалов щелочных растворов кератинов в темноте показало различия между ними, которые сохранялись и под действием света. Некоторые из образцов давали значительное отклонение потенциала при освещении, у части из них потенциал изменялся незначительно. У животных одного вида различий в значении редокс-потенциала не зарегистрировано.

Список литературы:

1. Чернова О.Ф. Архитектоника и диагностическое значение коры и сердцевины волос. *Известия РАН*, 2004, № 1, с. 73-83. [Chernova, O. Architectonics and diagnostic significance of the bark and core of hair. *Izvestiya RAN*, 2004, no. 1, pp. 73-83. (In Russ.)]
2. Булыга Л.П. *Исследование животных близких видов в практике судебной экспертизы*. М., 1980, 123 с. [Bulyga L.P. Study of animals of close species in the practice of forensic examination. М., 1980, 123 p. (In Russ.)]
3. Коренман И.М. *Фотометрический анализ*. М.:Химия, 1970, 343 с. [Korenman I.M. Photometric analysis. М.: Chemistry, 1970, 343 p. (In Russ.)]

DETERMINATION OF INDIVIDUAL CHARACTERISTICS OF WOOL OF SMALL CATTLE BY BIOPHYSICAL METHODS

Komarova S.A., Oleshkevich A.A.

K.I. Scriabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology
Academician Scriabin str., 23, Moscow, 109472, Russia; e-mail: kaffizmgavmib@mail.ru

Abstract. The possibility of using biophysical methods in the examination of animal hair was considered. The method of spectrophotometry and redoxometry were used. The differences in the spectra of alkaline hair hydrolysates were determined. Also, redox-potential's differences of alkaline hair hydrolysates were studied. We can conclude preliminary that these methods can be used to identify the type of animal.

Key words: hair, alkaline hydrolysates, spectrophotometry, redox-metry.

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Ананян А.А.¹, Черникова И.В.², Милютин Н.П.¹, Хаджиева Х.И.², Ящук С.В.¹

¹Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.Ивановского
ул. Стачки, д. 194/1, Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: npmilutina@srfedu.ru

²Ростовский государственный медицинский университет
Нахичеванский пер., д. 29, Ростов-на-Дону, 344022, РФ

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Цель работы - исследование роли системы прооксиданты↔антиоксиданты и апоптоза лимфоцитов периферической крови в оценке тяжести нейродегенеративного процесса при болезни Паркинсона (БП). Установлены глубокие нарушения редокс-баланса и развитие окислительного стресса в лимфоцитах больных БП на всех стадиях заболевания. Нарушения редокс-баланса в лимфоцитах характеризуются чрезмерной активацией антиоксидантных ферментов – СОД, глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы на фоне ингибирования каталазы и глутатионпероксидазы, а также существенной стимуляцией прооксидантных ферментов – НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы. Активность глутатион-S-трансферазы лимфоцитов может рассматриваться как чувствительный и информативный тест для оценки тяжести патологического процесса при БП. Важнейшим следствием сдвига редокс-баланса является апоптоз лимфоцитов, который может отражать уровень клеточной гибели клеток ЦНС вследствие единых механизмов обмена дофамина и сходства компонентов рецепторного аппарата клеток иммунной и нервной системы.

Ключевые слова: редокс-статус, антиоксидантные ферменты, прооксиданты, апоптоз, лимфоциты, болезнь Паркинсона.

Высокая чувствительность головного мозга к повреждающему действию кислорода обуславливает заболевания, при которых окислительный стресс (ОС) является одной из главных причин гибели нервных клеток при нейродегенеративных патологиях. Болезнь Паркинсона (БП) - широко распространенное нейродегенеративное заболевание с нарастающей симптоматикой (тремор, ригидность, брадикинезия), которая коррелирует с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга. В патогенез болезни Паркинсона вовлечены такие факторы, как агрегация белка α -синуклеина, окислительный стресс, дисфункция митохондрий, нейровоспаление, активация апоптоза, ЭПР-стресс [1]. С учетом увеличения доли пожилых людей, а также улучшения медицинской помощи больным БП, в ближайшие 20 - 30 лет следует ожидать роста распространенности заболевания [2]. Болезнь Паркинсона – полигенное системное заболевание, связанное с развитием окислительного стресса не только в ЦНС, но и за ее пределами, в связи с чем оценка нарушения редокс-баланса в крови может представлять интерес для диагностики БП.

Цель работы - исследование роли системы прооксиданты↔антиоксиданты и апоптоза лимфоцитов периферической крови в оценке тяжести нейродегенеративного процесса при болезни Паркинсона (БП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа больных была сформирована из 28 человек (7 мужчин / 21 женщина) от 52 до 72 лет (средний возраст $59,1 \pm 1,1$), поступивших в неврологическое отделение ГУЗ “Ростовская областная клиническая больница” с диагнозом болезнь Паркинсона. Стадии заболевания оценивались по критериям международной классификации по шкале Хен-Яра [3] и соответствовали I - III стадиям заболевания. Больные были разделены на 3 группы: 1- пациенты с 1 стадией болезни, 2 - пациенты со 2 стадией, 3 - пациенты с 3-й стадией заболевания. Возраст больных колебался от 52 до 72 лет (средний возраст $59,1 \pm 1,1$). В качестве контрольной была использована кровь 15 практически здоровых людей доноров, женщин и мужчин, в возрасте от 35 до 52 лет (средний возраст $46,2 \pm 0,7$). Лимфоциты выделяли из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина [4]. Апоптоз лимфоцитов оценивали лазерной проточной цитофлуориметрией на приборе FACS Canto, Becton Dickinson (США) с использованием набора «Annexin V-FITC apoptosis detection kit 1», BD Pharmingen (США). Исследовали редокс-статус плазмы и лимфоцитов периферической крови. Состояние прооксидантной системы оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) [5] в плазме крови, активности NADPH-оксидазы [6] и миелопероксидазы (МПО) [7] в лимфоцитах. Содержание в плазме крови нитрит- и нитрат-ионов определяли по цветной реакции нитритов с реактивом Грисса [8]. В плазме крови и моонуклеарной фракции определяли активность антиоксидантных ферментов. Активность супероксиддисмутазы (СОД) и супероксидустраняющую активность плазмы крови (СУА) оценивали по ингибированию восстановления нитросинего тетразолия супероксидом, генерируемым при аутоокислении адреналина) [9]. Активность каталазы и скорость утилизации перекиси водорода ($V_{H_2O_2}$) определяли по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония [10]. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с 1,2-динитро-хлор-бензолом [11]. Содержание GSH определяли по реакции с дитио-бис-нитробензойной кислотой [12].

Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли с гидроперекисью трет-бутила [13]. Об активности глутатионредуктазы (ГР) судили по скорости окисления НАДФН [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью MS Excel 2007 и Statistica 6.0. Для каждой серии рассчитывали средние арифметические значения показателей и их стандартные ошибки ($M \pm m$). Для оценки статистически значимых различий между сравниваемыми группами использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента. При $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми, при $0,05 < p \leq 0,1$ предполагали тенденцию к статистической значимости различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Свободнорадикальное окисление и глубокие нарушения динамического равновесия в системе ПОЛ $\leftrightarrow$ АО играют ведущую роль в патогенезе БП. При нейродегенеративном процессе, развивающемся при БП, наблюдается как локальный (тканевой), так и системный окислительный стресс, развивающийся в крови. Изучение роли активированных кислородных метаболитов (АКМ) в гибели нейронов (локальный ОС) нигростриатной системы показано многими авторами на животных моделях [15] [16]. Первичные триггеры, включая воздействие экологических нейротоксинов, черепно-мозговую травму или инфекцию и генетические изменения, могут взаимодействовать и индуцировать дофаминергическую дегенерацию нейронов.

Важно отметить, что к причинам повышенной чувствительности нейронов черной субстанции к окислительному стрессу относят присутствие эндогенного дофамина (ДА), восстановленного железа (Fe^{2+}) и нейромеланина [17]. При этом в данной структуре мозга отмечается более низкий уровень глутатиона и активности фермента его синтеза - глутамилцистеинил-лигазы [18]. С другой стороны, избыточная продукция ДА дофаминергическими нейронами может приводить к его аутоокислению с образованием хинона и в качестве побочных продуктов - супероксида и гидропероксида, повреждающих клетки [18]. Гидропероксид, в свою очередь, в присутствии Fe^{2+} через механизм реакции Фентона образует наиболее токсичный гидроксильный радикал, который еще более усиливает повреждение нейронов черной субстанции и клеток близлежащих структур мозга.

В итоге под воздействием экзогенных или эндогенных факторов происходит блокирование переноса электронов через комплекс I электрон-транспортной цепи митохондрий нейронов черной субстанции. Это приводит к угнетению дыхания, снижению синтеза АТФ и, самое важное – к увеличению образования митохондриями супероксидного анион-радикала и других АФК, что, в свою очередь, способствует усилению ПОЛ. Интенсификация СРО в митохондриях при БП с неизбежностью запускает митохондриальный путь апоптоза клеток ЦНС, а гибель нейронов проявляется позднее в нарушении двигательной функции организма.

Полученные нами результаты и анализ данных литературы позволяют прийти к заключению, что локальный ОС, являясь инициирующим и ведущим механизмом нейродегенеративного процесса при БП, неразрывно связан с системным ОС, который развивается в крови, что показано в нашей работе. Установлено, что в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона обнаружена активация процессов перекисного окисления липидов, что подтверждается накоплением МДА и возрастанием его уровня на 78 % в первой группе больных, на 124 % во второй группе и на 45 % в третьей группе пациентов. В плазме крови обследованных больных обнаружено существенное увеличение содержания метаболитов оксида азота (NO_x) по сравнению с контрольной группой, что указывает на возможную роль оксида азота в нейропатохимических механизмах БП.

Полученные результаты свидетельствуют о глубоких нарушениях редокс-статуса в крови при БП. Уровень супероксид-устраняющей активности (СУА) в плазме крови возрастает во всех трех группах обследованных, что на 126-198 % выше, чем в контрольной группе. Активность СОД в лимфоцитах больных БП увеличивается в трех обследованных группах на 247-368 % относительно контроля, что свидетельствует о напряженности функционирования фермента. При этом скорость утилизации перекиси водорода ($V_{H_2O_2}$) в плазме крови при БП снижается на 37-44 % во второй и третьей группах пациентов. В лимфоцитах активность каталазы возрастает на 76 % на первой стадии болезни, а на 2-й и 3-й стадиях снижается на 47 % и 63 %, соответственно.

Известно, что СУА и $V_{H_2O_2}$ являются интегральными показателями, характеризующими регуляцию свободнорадикального окисления на стадии активации молекулярного кислорода и запуска цепного процесса ПОЛ. СУА характеризует элиминацию супероксида в биологических жидкостях различными путями: с участием СОД 3 (экстрацеллюлярной изоформы СОД), церулоплазмينا, низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, мочевой кислоты, урата и др.). Скорость утилизации перекиси водорода в биологических жидкостях зависит от расщепления гидропероксида различными компонентами – каталазой, глутатионпероксидазой, пероксиредоксином, глутаредоксином, селен-содержащими белками, а также показывает использование перекиси водорода как субстрата миелопероксидазой и эозинпероксидазой в образовании гипогалогенитов [19].

Как следует из полученных результатов, в крови пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается выраженная дисфункция и напряженность функционирования ферментов глутатион-зависимой антиоксидантной системы. В плазме крови и лимфоцитах активность глутатионпероксидазы снижается на 90-94 % и на 24-36 %, соответственно, во всех трех клинических группах по сравнению с нормой. Установлено, что на всех стадиях заболевания содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах больных БП снижается на 49-64 % относительно контроля, что согласуется с ингибированием глутатионредуктазы.

Полученные нами данные в определенной степени согласуются с результатами других авторов, согласно которым уровень окисленного глутатиона и содержание ТБК-положительных продуктов типа МДА в крови пациентов с БП значительно превышали контроль [20]. При этом активность ГР в лимфоцитах при БП возрастает на 161-290 % на всех стадиях заболевания.

Следует подчеркнуть, что наиболее существенные изменения при БП обнаружены в активности глутатион-S-трансферазы. В лимфоцитах при БП активность GST резко возрастает: на 1-ой стадии увеличение составляет 394 %, на 2-ой – 548 % и на 3-й стадии заболевания – 570 %. Активность глутатион-S-трансферазы лимфоцитов может рассматриваться как чувствительный и информативный тест для оценки тяжести патологического процесса при БП.

Таким образом, в крови пациентов с БП наблюдается выраженная дисфункция компонентов антиоксидантной системы, приводящая к повышению интенсивности ПОЛ в плазме крови. Проведенное исследование выявило увеличение активности ключевых ферментов прооксидантной системы крови – миелопероксидазы и НАДФН-оксидазы. При БП в лимфоцитах периферической крови наблюдается значительная стимуляция активности прооксидантных ферментов. Активность НАДФН-оксидазы возрастает на 190-217 % в трех группах пациентов с БП. Активность МПО увеличивается на 31-44 % во всех трех клинических группах относительно контроля.

Глубокие нарушения редокс-баланса в лимфоцитах и, в целом, в крови, приводят к повышению интенсивности программируемой клеточной гибели мононуклеаров. Представленные данные, касающиеся нарушения редокс-равновесия в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с БП, подтверждаются результатами оценки уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови методом проточной лазерной цитофлуориметрии. Согласно полученным результатам, процент лимфоцитов на стадии раннего апоптоза от общего их числа у здоровых лиц на 42 % выше нормы ($p < 0,05$). Это свидетельствует о значительной интенсификации апоптоза лимфоцитов у пациентов с БП на 2-3-ей стадиях заболевания.

Известно, что важнейшими инициаторами апоптоза являются активные формы кислорода (АФК) и состояние окислительного стресса [21], который развивается при нейродегенеративном процессе при болезни Паркинсона. С другой стороны, известно, что лимфоциты имеют рецепторные структуры, сходные с нейрональными, а, следовательно, могут быть чувствительны к тем же сигнальным молекулам, которые управляют активностью нервных клеток [22].

Выявленный повышенный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП может, в определенной мере, отражать повышенную индукцию апоптоза в нейронах мозга и вносить вклад в патогенез заболевания. Следует отметить, что в исследованиях других авторов в лимфоцитах периферической крови пациентов с БП обнаружены увеличение количества апоптотического рецептора Fas, усиление активности каспаз 3 и 9 и снижение экспрессии антиапоптотического гена *Bcl-2* [23].

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует, что в молекулярных механизмах болезни Паркинсона важнейшая роль принадлежит системному окислительному стрессу, который развивается в крови и самым тесным образом связан с локальным стрессом, который является первичным и протекает в клетках центральной нервной системы (черной субстанции мозга). Согласно полученным результатам, наибольший дисбаланс, нарушение синергизма функционирования компонентов антиоксидантной системы на фоне усиления прооксидантного потенциала наблюдается в мононуклеарах периферической крови у пациентов с БП. Сдвиг редокс-баланса мононуклеаров наблюдается, начиная с ранних стадий дегенеративного процесса в ЦНС, и может рассматриваться как информативный показатель развития патологического процесса у больных БП. Причем, из всех изученных показателей ОС наибольшие изменения наблюдаются в активности глутатион-S-трансферазы лимфоцитов, активность которой увеличивается в 4,9 раз на 1-ой стадии заболевания, в 6,5 раз – на 2-ой стадии и в 6,7 раз – на 3-й стадии заболевания. Активность глутатион-S-трансферазы лимфоцитов может рассматриваться как чувствительный и информативный тест для оценки тяжести патологического процесса при БП.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП "Высокие технологии" ЮФУ в рамках базовой части госзадания МОН, проект № 6.6762.2017/БЧ.

Список литературы / References:

1. Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Goetz C.G., Marin C., Kordower J.H., Rodriguez M., Hirsch E.C., Farrer M., Schapira A.H., Halliday G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.*, 2010, vol. 6, pp. 653-661
2. Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 2007, vol. 5, pp. 384-386.
3. Hoehn M.M., Yahr M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 1967, vol. 17, pp. 427-442.
4. Böyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 1968, vol. 97, pp. 31-50.
5. Орехович В.Н. *Современные методы в биохимии*. М: Медицина, 1977, 392 с. [Orekhovich V.N. *Modern methods in biochemistry*. Moscow: Meditsyna, 1977, 392 p. (In Russ.)]

6. Длужевская Т.С., Погорелова Т.Н., Афонин А.А. Активность НАДФН-оксидазы в оценке состояния новорожденных детей. *Педиатрия*, 1989, № 3, с. 44-47. [Dluzhevskaja T.S., Pogorelova T.N., Afonin A.A. NADPH oxidase activity in evaluating the status of newborn infants. *Pediatrriia*, 1989, no. 3, pp. 44-47. (In Russ.)]
7. Саидов М.З. Пинегин Б.В. Спектрофотометрический метод определения миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках. *Лаб. дело.*, 1991, № 3, с. 56-59. [Saidov M.Z., Pinegin B.V. A spectrophotometric method of determining the myeloperoxidase activity in phagocytic cells. *Lab Delo*. 1991, no. 3, pp. 56-60. (In Russ.)]
8. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М: Медпрактика, 2004, 179 с. [Golikov P.P. *Nitric oxide in clinics of urgent diseases*. Moscow: Medpraktika, 2004, 179 p. (In Russ.)]
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопр. мед.химии*, 1999, № 3, с. 14-15. [Sirota T.V. Novel approach to the study of adrenaline auto-oxidation and its use for the measurements of superoxide dismutase activity. *Vopr. Med. Khim.*, 1999, no. 3, pp. 14-15. (In Russ.)]
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, № 1, с.16-19. [Koroliuk M.A., Ivanova L.I., Maïorova I.G., Tokarev V.E. A method of determining catalase activity. *Lab Delo.*, 1988, no. 1, pp.16-19. (In Russ.)]
11. Habig W.H., Pabst M.J., Iacoby W.B. Glutathion-S-transpherase: the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, pp. 7130-7139.
12. Ellman Q.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.*, 1959, vol. 82, pp 70-77.
13. 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 glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab Delo*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
14. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов. *Лаб. Дело*, 1989, № 4, с. 19-21. [Iusupova L.B. Increasing the accuracy of determining the glutathione reductase activity of erythrocyte. *Lab Delo*, 1989, no. 4, pp. 19-21. (In Russ.)]
15. Taylor J.M., Main B.S., Crack P.P.J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem. Internat.*, 2013, vol. 62, pp. 803-819.
16. Cobb C.A., Cole M.P.P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol. Disease.*, 2015, vol. 84, pp. 4-21.
17. Chaudhry Z.L., Ahmed B.Y. The Role of Caspases in Parkinson's Disease Pathogenesis: A Brief Look at the Mitochondrial Pathway. *Austin Alzheimers J. Parkinsons Dis.*, 2014, vol. 1, pp. 1-5.
18. Smeyne M., Smeyne R.J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, vol. 62, pp. 13-25.
19. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006, 556 с. [Menshikova E.B., Lankin V.Z., Bondar I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A., *Oxidative Stress. Prooxidants and Antioxidants*. Moscow: Slovo, 2006, 556 p. (In Russ.)]
20. Younes-Mhenni S., Frih-Ayed M., Kerkeni A., Bost M., Chazot G. Peripheral Blood Markers of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Eur. Neurol.*, 2007, vol. 58, pp.78-83.
21. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A.. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.*, 2016, vol. 12, pp. 2977-2992.
22. Болдырев А.А. Нейрональные рецепторы в клетках иммунной системы. Природа: *Естественно-научный журнал РАН*, М.: Наука, 2005, № 7, с. 3-8. [Boldyrev A.A. Neuronal receptors in immune system cells. *Pryroda*, 2005, no. 7, pp. 3-8. (In Russ.)]
23. Усенко Т.С., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф., Боганькова Н.А., Вавилова Т.В., Шварцман А.Л., Пчелина С.Н. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной формой болезни Паркинсона. *Цитология*, 2012. № 54, с.44-48. [Usenko T.S., Emel'ianov A.K., Iakimovskii A.F., Bogan'kova N.A., Vavilova T.V., Shvartsman A.L., Pchelina S.N. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with LRRK2-associated Parkinson's disease. *Tsitologiya*, 2012, no. 54, pp. 44-48 (In Russ.)]

THE ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES AND APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES
IN BLOOD WITH PARKINSON'S DISEASES

Ananyan A.A.¹, Chernikova I.V.², Milyutina N.P.¹, Hadzieva H.I.², Yaschuk S.V.¹

¹Southern Federal University, Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology,
Stachky str., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: npmilutina@sfsedu.ru

²Rostov State Medical University,
Nahichevansky lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Abstract. The aim of the work is to study the role of the peripheral blood lymphocyte antioxidant system and apoptosis in assessment the severity of neurodegenerative process in Parkinson's disease (PD). The deep disorders of redox balance and development of oxidative stress in lymphocytes of patients with PD at all stages of the disease have been established. Disorders of redox balance in lymphocytes are characterized by excessive activation of antioxidant enzymes – SOD, glutathione-S-transferase, glutathione reductase on the background of inhibition of catalase and glutathione peroxidase, as well as significant stimulation of prooxidant enzymes – NADPH-oxidase and myeloperoxidase. The activity of glutathione-S-transferase of lymphocytes can be considered as a sensitive and informative test to assess the severity of the pathological process in PD. The most important consequence of the redox balance shift is apoptosis of lymphocytes, which can reflect the CNS cell death level due to unified mechanisms of dopamine metabolism and the similarity of the receptor apparatus components of the immune and nervous system cells.

Key words: redox-status, antioxidant enzymes, prooxidants, apoptosis, lymphocytes, Parkinson's disease.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОСТОЯННОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Олешкевич А.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина
ул. Ак. Скрябина 23, г. Москва, 109472, РФ; e-mail: kompsotita@gmail.com

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Изучены эффекты постоянного электрического поля на функциональные особенности эритроцитов, проницаемость их мембран для глюкозы, динамику оксигенации гемоглобина, а также на изменение активности цитозольных ферментов. В зависимости от вида животных воздействие более 5 мин вызывало достоверное увеличение активности от 1,5 до 4 раз лактатдегидрогеназы КФ 1.1.1.27 и/или аспаратаминотрансферазы КФ 2.6.1.1 плазмы крови кошек, собак и лошадей. Регистрировали ряд физиологических деструктивных изменений форменных элементов крови: анизо- и пойкилоцитоз, увеличение площади тромбоцитов, агрегацию клеток, кариолизис, фрагментоз и др. Качественные и количественные изменения клеточных характеристик и параметров носили дозозависимый характер. Показано наличие видовых особенностей клеточного ответа.

Ключевые слова: электростатическое поле, биологические эффекты, клетки крови, ферменты.

За последние 20 лет проведено большое количество биофизических, физиологических и цитологических экспериментов по оценке влияния факторов электромагнитной природы на млекопитающих и человека [1-6]. В частности, показано, что электромагнитные поля в дальней зоне 1,2 мВт/см² могут являться генотоксическим стрессором для клеток млекопитающих и повреждать ДНК. Прежде, чем начать анализ возможных механизмов биологических эффектов физических полей, необходимо отметить, что волны (электромагнитные (ЭМИ) и акустические) в зависимости от частоты имеют различную глубину проникновения и коэффициенты поглощения на уровне целого организма. Так, для ЭМИ на частоте 3 ГГц (СВЧ-диапазон) в мышечной ткани и коже глубина проникновения составляет 15 см, а на частоте 37,4 ГГц (миллиметровые волны) – 0,3 мм. В зависимости от типов излучателей распределение энергии как на срезе излучателей (ближняя зона), так и на различных расстояниях, может быть крайне неоднородным. Поэтому при интегральном воздействии на биосистему часть тканей и клеток попадёт в зону, например, тепловых воздействий, а часть – в зону нетепловых воздействий. Результирующий эффект такого интегрального воздействия может быть равным нулю. Кроме того, биологические системы, в том числе и клетки, являются динамическими системами: разные клетки могут находиться на разных стадиях функционирования, каждая из которых при этом может иметь разную чувствительность к фактору воздействия. Например, воздействие на осциллирующие эритроциты в различные фазы процесса осцилляции могло приводить как к увеличению числа осцилляций при сохранении уровня выброса калия из клеток, так и к сохранению числа осцилляций на фоне увеличения выброса ионов калия [7].

При этом в ветеринарной медицине всё больше диагностических и терапевтических методов используют в качестве фактора воздействия электромагнитное излучение и постоянное электрическое поле. В связи с чем была поставлена задача на первом этапе исследований изучить механизмы действия постоянного электрического и магнитного полей на клетки крови *in vitro*, выявить функциональные особенности, после чего перейти к определению биологических эффектов сочетанного воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из домашних животных сформировали группы в соответствии с полом, возрастом и состоянием здоровья по принципу физиологических и биохимических аналогов. Проведение работ соответствовало «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и другим ветеринарным и зоогигиеническим требованиям. При работе с биологическими объектами было выполнено не менее 12 повторов. Изучали влияние постоянного электрического поля на изменение функциональных особенностей эритроцитов, динамику оксигенации гемоглобина, проницаемость мембран клеток для глюкозы [8, 9], а также на изменение активности цитозольных эритроцитарных ферментов: лактатдегидрогеназы КФ 1.1.1.27 (ЛДГ) и аспаратаминотрансферазы КФ 2.6.1.1 (АсАТ). Активность ферментов определяли с помощью автоматического биохимического анализатора URIT – 8030. Получение эритроцитов и условия воздействия электростатическим полем проводили авторским методом [9]. Объём облучаемых образцов – 1,5-2,0 мл, время воздействия составляло от 1 до 30 мин, напряжённость постоянного электрического поля от 2,8 до 3,02 кВ/м. За изменением морфологии клеток в результате воздействия физического фактора наблюдали в световой микроскоп «ЛЮМО» (Россия). Мазки крови просматривали под иммерсией в проходящем свете микроскопа МИКМЕД-5 (объектив 100×/1.25, окуляр 10×/18), наблюдали изменения внешнего вида клеток (размер, форма, группировка, повреждение, лизис и тому подобное). С целью определения проницаемости цитоплазматических мембран (ЦПМ) использовали явление обращения

плазмолиза, которое регистрировали турбидиметрически. Для каждого анализируемого показателя определяли среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение, ошибку среднего. Для оценки влияния факторов проводили однофакторный дисперсионный анализ, регрессионный анализ. При анализе влияния изучаемых факторов проводили многофакторный дисперсионный анализ признаков сопряжённости с использованием главной линейной модели. Связь между показателями оценивали с помощью корреляционного анализа. Сравнение анализируемых показателей проводили с помощью критерия Стьюдента, непараметрического параметра Вилкоксона-Мана-Уитни [9]. Различия считали статистически значимыми при вероятности нулевой гипотезы $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические изменения эритроцитов определяли методом световой микроскопии. Примеры изменений клеток крови кошек и лошадей приведены на рисунках 1 и 2. Регистрировали анизо- и пойкилоцитоз, движение веретенообразных эритроцитов в электростатическом поле. Качественные и количественные изменения клеточных характеристик и параметров не всегда носили дозозависимый характер. Так, преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ отмечена только в эритроцитах кошек и лошадей, что показывает наличие видовых особенностей клеточного ответа. При этом изменение динамики оксигенации гемоглобина регистрировали в пробах крови всех животных. Из обработки полученных результатов получили значения константы проницаемости мембран эритроцитов для глюкозы, что являлось количественным критерием воздействия электрического поля на проницаемость мембран по глюкозе. Установлено, что при воздействии постоянным электростатическим полем 5 и 10 минут проницаемость мембран для глюкозы незначительно снижается относительно контроля, а при воздействии 15 минут возрастает в 4–5 раз [9].

Известно, что под действием непрерывных и импульсных электромагнитных полей (ЭМП) высоких и ультравысоких частот (1–100 МГц) суспендированные частицы угля, крахмала и молока, эритроциты и лейкоциты выстраиваются в цепочки, расположенные параллельно электрическим силовым линиям. Для каждого типа частиц имеется оптимальный диапазон частот, в пределах которого эффект возникает при минимальной напряжённости поля. Теоретические исследования показали, что формирование цепочек происходит в результате притяжения между частицами, в которых под действием ЭМП индуцируются дипольные заряды. В неполярной диэлектрической среде этот эффект возникает при низких частотах даже в электростатическом поле, но в воде и физиологическом растворе ионы и дипольные молекулы шунтируют поле низкой частоты и эффект возможен только при достаточно высоких частотах (выше десятков МГц). Постоянная времени формирования цепочек пропорциональна кубу радиуса частиц (она равна 1 с при радиусе в 1 мкм; размер эритроцитов кошек и собак составляет 5–9 мкм) и мало зависит от напряжённости E в слабых полях и обратно пропорциональна E^2 в сильных полях. В импульсных ЭМП эффект определяется средним значением E . Несимметричные частицы ориентируются либо параллельно, либо перпендикулярно направлению силовых линий. Для электрических параметров, близких к биологическим, это зависит от соотношения между удельной проводимостью частиц и окружающей их среды и от частоты ЭМП. В случае нашего эксперимента эритроциты (рис. 1, 2) выстраивались в длинные цепочки параллельно электрическим силовым линиям. Изменение формы и площади эритроцитов животных ранее мы регистрировали и в акустическом поле (рис. 3).

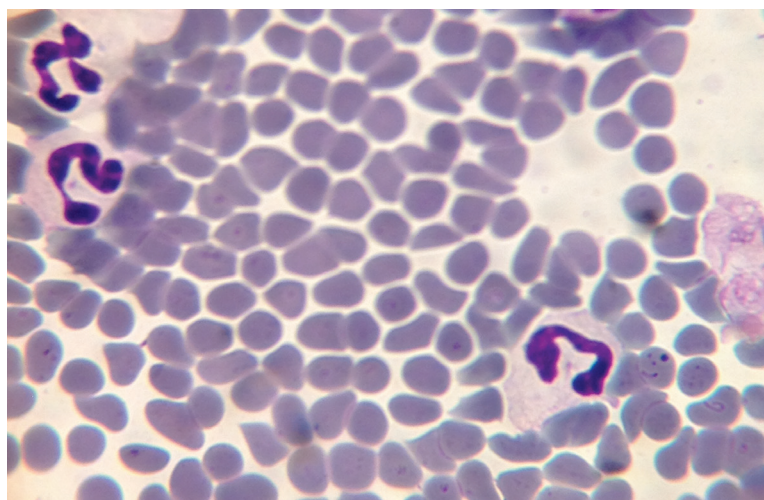


Рисунок 1. Фотография клеток крови кошки в электростатическом поле: $E = 3,02$ кВ/м, 10 мин. Изменение формы и площади эритроцитов. Агрегация тромбоцитов. Преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ эритроцитов. Деструктивные изменения и агрегация сегментоядерных нейтрофилов

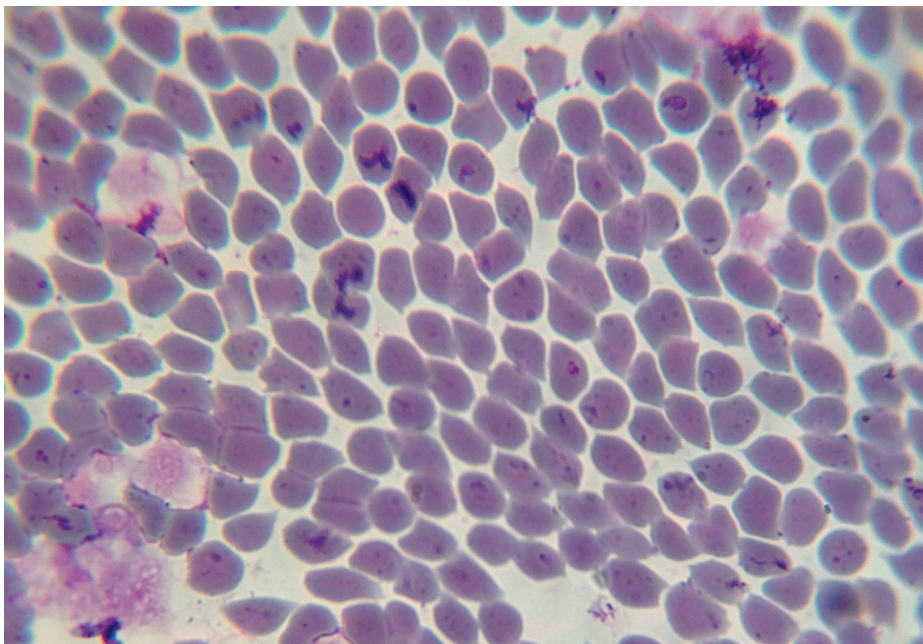


Рисунок 2. Фотография клеток крови кошки в электростатическом поле: $E = 2,857 \text{ кВ/м}$, 20 мин. Цепочки эритроцитов, расположенные параллельно электрическим силовым линиям. Анизоцитоз и пойкилоцитоз. Гиперагрегация тромбоцитов. Преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ эритроцитов

Анализ результатов влияния электрического поля на активность ферментов здоровых животных показал, что, в зависимости от видовых особенностей, воздействие более 5 мин вызывает достоверное ($p < 0,05$) двух–четырёхкратное увеличение активности ЛДГ плазмы крови *кошек*; АсАТ и ЛДГ – плазмы крови *собак* от 2 до 3,8 раз ; и активности АсАТ плазмы крови *лошадей* от 1,5 до 2,7 раз (табл. 1). Регистрировали морфологические изменения клеток: анизоцитоз и пойкилоцитоз, увеличение площади тромбоцитов, агрегацию клеток, кариолизис, фрагментоз и ряд других физиологических деструктивных изменений. Качественные и количественные изменения клеточных характеристик и параметров носили дозозависимый характер. Показано наличие видовых особенностей клеточного ответа: преципитация метгемоглобина на внутренней стороне ЦПМ отмечена только в эритроцитах кошек и лошадей (рис. 1, 2). Изменение динамики оксигенации гемоглобина регистрировали в пробах крови всех животных. Проведённый анализ результатов свидетельствует изменении проницаемости мембран клеток крови, интенсивности клеточного дыхания и процессов транспорта через ЦПМ.

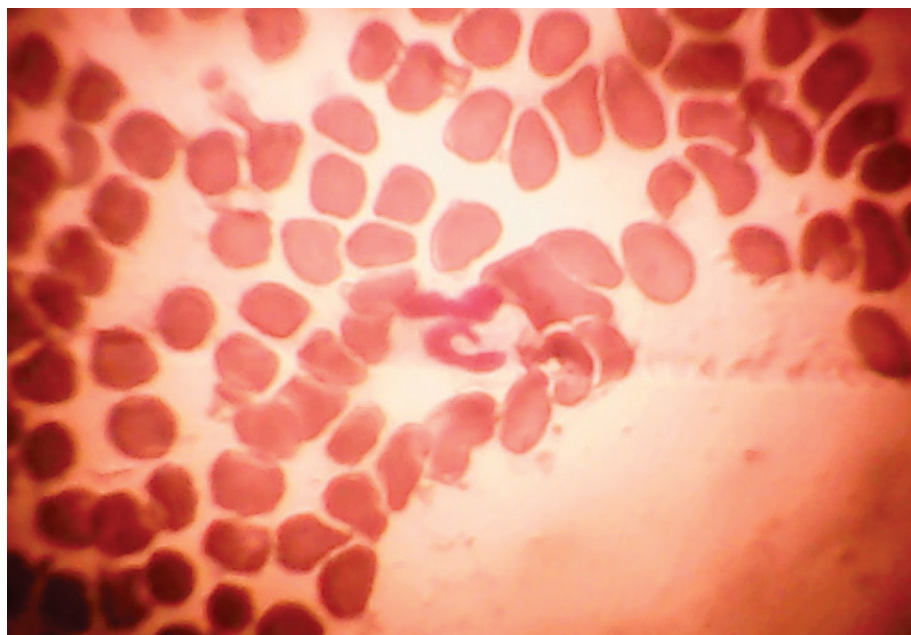


Рисунок 3. Фотография клеток крови лошади в модулированном ультразвуковом поле ($I = 0,7 \text{ Вт/см}^2$, частота модуляции 100 Гц, время обработки 20 с). Анизоцитоз и пойкилоцитоз

Таблица 1. Примеры изменения активности ферментов плазмы крови животных в электростатическом поле

Животные / Время обработки	АсАТ, МЕ/л	ЛДГ, МЕ/л
Кошки. Здоровые особи 3–7 лет		
Норма	4.8–45	55–164
Контроль, интактные клетки	27±3	60±4
1 мин	25±2	67±5
5 мин	30±4	70±6
10 мин	24±5	150±5*
15 мин	29±4	229±8*
Собаки. Здоровые особи 7–8 лет		
Норма	8–42	24–219
Контроль, интактные клетки	45±2	200±6
1 мин	41±2*	210±7*
5 мин	47±3*	217±10*
10 мин	99±7*	500±10*
15 мин	163±8*	723±11*
Лошади. Здоровые особи 6–12 лет		
Норма	115–287	125–381
Контроль, интактные клетки	175±5	199±4
1 мин	180±7	200±8
5 мин	183±7	221±13
10 мин	280±10*	231±9
15 мин	464±9*	206±5
20 мин	476±4*	210±7
25 мин	263±3*	320±6

Примечание. * $p < 0.05$

Список литературы / References:

1. Hardell L., Hallquist A. No association between the use of cellular or cordless telephones and salivary Glutathione S-transferase activity. *Occup. Environ. Med.*, 2004, vol. 61, pp. 675-679.
2. Maes A., Collier M.V.L. Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. *Bioelectromag.*, 2001, vol. 22, pp. 91-96.
3. McNamee J.P., Bellier P.V. DNA damage and micronucleus induction in human leukocytes after acute *in vitro* exposure to a 1.9 GHz continuous-wave radiofrequency field. *Radiation Research*, 2002, vol. 158, pp. 523-533.
4. Vijayalaxmi B.Z., Obe G. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation. *Radiation Research*, 2004, vol. 162, pp. 481-496.
5. Vijayalaxmi B.Z., Pickard W.F. Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Int. J. Rad. Biol.*, 2001, vol. 77, pp. 1109-1115.
6. Пряхин Е.А., Аклеев А.В. Влияние неионизирующих электромагнитных излучений на животных и человека. Монография. Челябинск: Полиграф-Мастер, 2006, 220 с. [Pryakhin E.A., Akleev A.V. Influence of non-ionizing electromagnetic radiation on animals and humans. Monograph. Chelyabinsk: Polygraph-Master, 2006, 220 p. (In Russ.)]
7. Kim Y.A., Fomenko B.S., Holmuhamedov E.L., Akoev I.G. Effects of microwave-radiation on inducible ion-transport of rat erythrocytes. *Charge and field effects in biosystems*, 1989, pp. 223-231.
8. Novikova, A.V. Change in acid erythrocyte of laboratory animals in constant electric and magnetic field. *Book of abstracts. 6th International Conference on radiation and applications in various fields of research, RAD 6*, Ohrid, Macedonia: Univ, 2018, URL: rad-conference.org/books.php.
9. Novikova A.V. Effect of constant electric field on the change of erythrocyte membrane permeability for glucose. *Book of abstracts. 6th International Conference on radiation and applications in various fields of research, RAD 6*, Ohrid, Macedonia: Univ, 2018, URL: rad-conference.org/books.php.
10. Hirsch R.P., Riegelman R.K. *Statistical operations: analysis of health research data*. Massachusetts: Blackwell Science, 1996, 490 p.

FUNCTIONAL CHANGES IN ANIMAL ERYTHROCYTES IN A CONSTANT ELECTRIC FIELD

Oleshkevich A.A.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology

Scriabin Str., 23, Moscow, 109472, Russian Federation; e-mail: kompsotita@gmail.com

Abstract. The effects of a constant electric field on the functional features of erythrocytes, the permeability of their membranes for glucose, the dynamics of hemoglobin oxygenation, and the change in the activity of erythrocyte cytosolic enzymes were studied. Depending on the type of an animal, 5-minute and longer exposure caused 1.5-4-fold increase of lactate dehydrogenase KF 1.1.1.27 and/or aspartate aminotransferase KF 2.6.1.1 activity in blood plasma of cats, dogs and horses. Several physiological destructive changes in blood cells were recorded: aniso- and poikilocytosis, an increase in platelet area, aggregation of cells, karyolysis, fragmentogenesis, etc. Qualitative and quantitative changes in cellular characteristics and parameters were dose-dependent. The presence of specific features of the cellular response is shown.

Key words: *electrostatic field, biological effects, blood cells, enzymes.*

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРИОПРОТЕКТОРА НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРИНА

Симоненко Е.Ю., Иванова А.А., Бурмистрова Е.В., Прядун В.В.,
Васильев А.Н., Яковенко С.А.

МГУ им. М.В. Ломоносова,
ГСП-1, Ленинские горы, д. 1/2, 119991, Москва, РФ; e-mail: ksimonenko@inbox.ru

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Развитие методов криоконсервации биоматериала расширяет возможности современной биологии (способствует сохранению вымирающих видов, создание криобанков микроорганизмов) и медицины (сохранение и пересадка органов, создание криобанков стволовых клеток и клеток крови). Для защиты клеток от повреждения используют криопротекторы. Эффективность криопротектора обычно оценивается по изменениям жизненно важных показателей клеток после заморозки. Так, успешность криоконсервации сперматозоидов оценивается по их подвижности, морфологии клеток, целостности мембраны и степени фрагментации ДНК. Для отдельных компонентов криопротекторов известны также такие физические параметры, как температура стеклования, вязкость, токсичность и минимальная концентрация, необходимая для витрификации. Однако невозможно найти какие-либо физико-химические характеристики сред для криоконсервации, состоящих из комбинаций проникающих и непроникающих в клетку компонент. В работе предложена адаптация метода адиабатической калориметрии для исследования жидких сред. Измерена зависимость теплоемкости от температуры и определены основные калориметрические характеристики (изменения энтропии ΔS и энтальпии ΔH) для глицерин-содержащего криопротектора, активно используемого при заморозке и хранении спермы.

Ключевые слова: криопротектор, глицерин, адиабатическая калориметрия, ВРТ.

Одним из важных направлений современной биологии является криоконсервация донорских клеток и тканей для хранения и последующего использования. Криоконсервация позволяет отделить во времени забор биологического материала и манипуляции с ним, детально изучить морфологию клеток, а также транспортировку биоматериала на большие расстояния. [1-3]. Однако начало нуклеации с последующим ростом кристаллов льда в растворах при понижении температуры приводит как к механическим повреждениям клеток, так и подвергает клетки холодовому и осмотическому шоку. Для защиты клеток при криоконсервации используют специальные вещества - криопротекторы: проникающие (глицерин, этиленгликоль, диметилсульфоксид (ДМСО), пропиленгликоль) и непроникающие (сахароза, трегалоза, высокомолекулярные соединения, белки, поливинил алкоголь и др.). Определяющую роль при выборе того или иного компонента играет набор таких параметров, как температура стеклования, вязкость, минимальная концентрация, необходимая для витрификации, а также токсическое действие на биологический материал [4]. Известно, что глицерин, наносит наименьшее повреждение клеткам, в сравнении с другими соединениями [5]. Поэтому многие коммерческие среды для заморозки биологического материала разработаны на основе глицерина. При наличии в среде глицерина при физиологических температурах он проникает внутрь клетки, где, благодаря способности связывать воду, предотвращает дегидратацию цитоплазмы, а также способствует образованию стеклообразной аморфной фазы [6]. В настоящее время поиск криопротектанта с хорошей способностью к образованию стеклоподобного состояния, низкой токсичностью и низкой вязкостью является одним из приоритетных направлений исследований. Одним из методов снижения токсичности криопротекторов является использование комбинаций проникающих в клетку и непроникающих соединений [7].

В то время как проникающие криопротектанты замедляют рост и образование кристаллов льда, блокаторы льда препятствуют образованию центров кристаллизации снаружи клетки. Также, при использовании блокаторов льда, непроникающих в клетку, уменьшается поток воды через мембрану, а следовательно и осмотический стресс. При этом внутриклеточное содержимое обезвоживается в степени, достаточной для того, чтобы внутриклеточная кристаллизация не вызывала летальных повреждений.



Рисунок 1. Вид контейнера

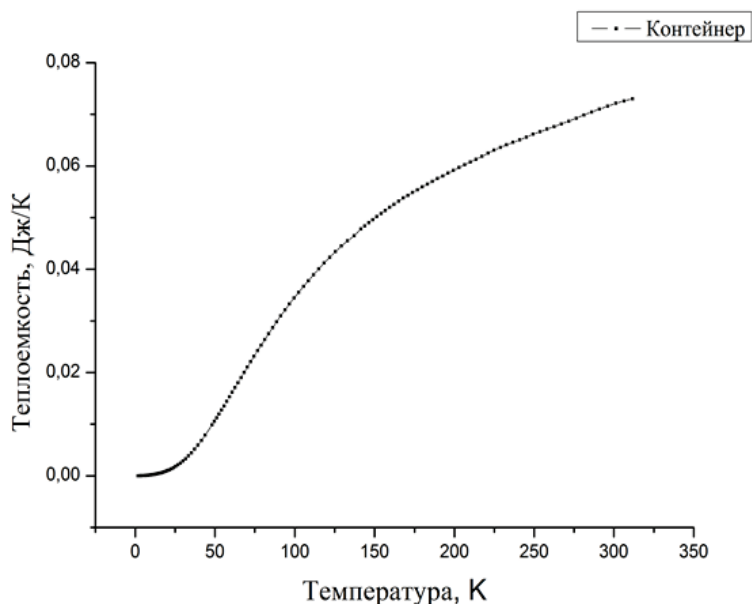


Рисунок 2. График зависимости теплоемкости контейнера от температуры

Об эффективности сред для криоконсервации биологического материала обычно судят по изменениям жизненно важных свойств клеток (морфология, целостность мембран, целостность ДНК, подвижность или пролиферативная активность). Однако, даже в присутствии современных коммерческих сред, клетки значительно повреждаются после процесса заморозки-разморозки. Так, подвижность и морфологические показатели сперматозоидов могут ухудшаться на 30-70 % после криоконсервации [8, 9].

В связи с этим, важно понимать физико-химические процессы, проходящие в многокомпонентных криопротекторах, используемых, например, для криохранения гамет человека, а также исследовать изменения фазовых и агрегатных состояний этих сред. В настоящее время невозможно найти физико-химические характеристики таких сред, нет описаний изменений их агрегатных состояний при добавлении того или иного компонента.

Метод квази-адиабатической калориметрии дает точные и абсолютный вид зависимости теплоемкости образца от температуры, однако экспериментальные установки разработаны для исследования твердых тел.

В настоящей работе был адаптирован метод адиабатической калориметрии для исследования жидких сред. В работе использовался калориметр PPMS (Physical Property Measurement System, Quantum Design, Inc., USA). Проводилось исследование для криопротектора, состав которого схож с коммерческим SpermFreeze (LifeGlobal), основанный на буфере Hepes и содержащий 15 % глицерина, альбумина (HSA) 3,95 мг/мл, 0,5 М сахарозы, а также различных солей в обычных для клеточных сред концентрациях. Молярная масса криопротектора составила 23,8 г/моль. Для исследования жидкого образца был разработан контейнер из дюралюминия объемом $V \sim 20-30$ мкл (рис. 1).

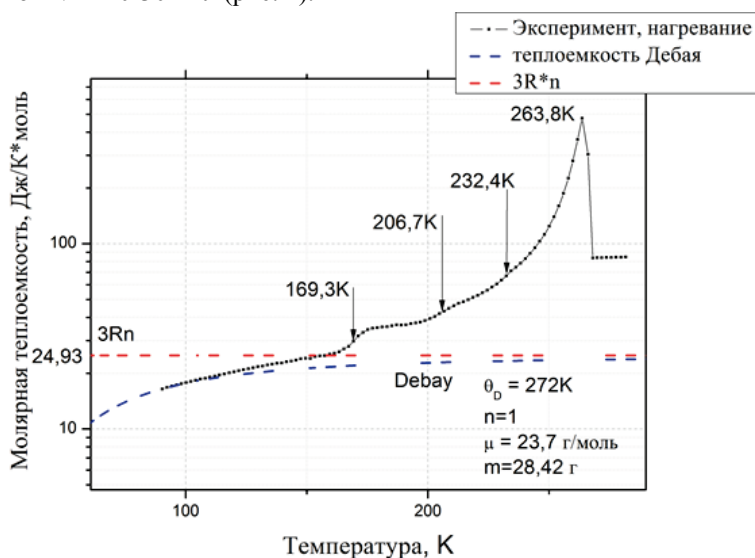


Рисунок 3. График зависимости молярной теплоемкости криопротектора от температуры

Первым этапом работы снималась зависимость теплоемкости от температуры для контейнера. Данная зависимость являлась монотонно возрастающей, отсутствие особенностей на графике (рис. 2). При последующей обработке результатов измерения для криопротектора данные для контейнера вычитались. Был разработан протокол заполнения контейнера исследуемой криопротекторной средой, запайки, создание вакуума и последующего измерения. Этап снятия экспериментальной зависимости теплоемкости контейнера с криопротектором от температуры занимал последовательно от 7 до 10 дней и включал следующие этапы: образец криопротектора массой $m = 28,42$ г был помещен в экспериментальный контейнер, запаян и охлажден в калориметре до $T = 77,4$ К со скоростью примерно 0.115 К/с, после чего методом квази-адиабатической калориметрии была получена зависимость теплоемкости от температуры при нагревании образца до $T = 300$ К с шагом $0,002$ К/с. После обработки экспериментальных данных была получена зависимость теплоемкости от температуры для исследуемого криопротектора (рис. 3).

Температуры фазового перехода и изменений агрегатных состояний определялись по производной теплоемкости от температуры. На графике определяется фазовый переход I рода при $T = 263,8$ К, соответствующий переходу из жидкого состояния системы в смесь фаз переохлажденных жидкостей и стеклообразного тела. Температура перехода из жидкости в твердое тело для чистого глицерина была экспериментально определена много раз, наиболее точное значение $T = 291,3$ К [6]. Таким образом в криопротекторе, по сравнению с глицерином, происходит сдвиг фазового перехода I-го рода в область более низких температур. В этой фазе также различимы еще два критических состояния, сопровождающихся скачками теплоемкости при температурах $T = 232,4$ К и $T = 206,7$ К. Данные переходы хорошо определяются при анализе графика dC/dT . Дополнительные переходы свидетельствуют о многофазности системы при данных температурах [10]. Сравнение профиля перехода при температуре $T = 169,3$ К с профилем схожего перехода для глицерина, полученным Гибсоном, позволяет сделать вывод о том, что данный переход соответствует переходу из стеклообразного состояния в кристаллическое.

Основные термодинамические характеристики определялись согласно квантовой теории теплоемкостей Дебая. Из полученной нами зависимости теплоемкости от температуры для исследуемой среды вычли молярную теплоемкость по модели Дебая.

$$C = C_{\infty} \frac{12 \cdot T^3}{\theta_D^3} \int_0^{\frac{\theta_D}{T}} \frac{\xi^3 d\xi}{e^{\xi} - 1} - \frac{3 \frac{\theta_D}{T}}{e^{\theta_D/T} - 1}. \quad (1)$$

Для определения молярной теплоемкости Дебая варьировали следующие параметры: температуру Дебая θ_D и число атомов в моле вещества при низких температурах. После чего были получены изменения основных термодинамических характеристик – энтропии ΔS и энтальпии ΔH (табл.1).

Таблица 1. Калориметрические характеристики исследуемых образцов

	Исследуемый криопротектор
ΔS , Дж/К*моль	$10,02 \pm 0,44$
ΔH , Дж/моль	$2103,56 \pm 14,54$
Температура плавления, °К	263,4
Температура стеклования, °К	169,3
Температура Дебая, °К	272

Таким образом в работе проведена модернизация калориметра, позволяющая измерять зависимость теплоемкости от температуры не только твердых тел, но и жидких сред; получена зависимость теплоемкости от температуры для многокомпонентной среды криопротектора; выявлено наличие 4-х особенностей, связанных со структурными перестройками среды при изменении температуры.

На образцах эякулята доноров и пациентов был проведен анализ активно подвижных сперматозоидов (тип a+b) после заморозки с исследуемым криопротектором, свидетельствующий о выживаемости гамет. В работе были исследованы 15 эякулятов доноров и пациентов с нормозооспермией (концентрация сперматозоидов >15 млн/мл, категорий активной подвижности $a+b \geq 32\%$, морфологически нормальных сперматозоидов по критериям Крюгера $N \geq 4\%$). Криоконсервация образцов проводилась по стандартному протоколу медленной заморозки с использованием коммерческого криопротектора, аналогичного по составу с исследуемой средой, в соотношении 1:0,7; быстрая разморозка при 37 °С. Для оценки параметров сперматозоидов применялись рутинные клинические методы: оценка концентрации и подвижности с помощью камеры Маклера; оценка морфологических характеристик с помощью предварительно окрашенных стекол (метиленовый синий и кризоловый фиолетовый) по критериям Крюгера. При статистической обработке данных приведены средние значения, стандартные отклонения для всех серий экспериментов; значимость различий определялась парным t-тестом; индексами a, b, c обозначены статистически достоверно различимые выборки ($p < 0.05$). Выборки с одинаковым буквенным индексом не имеют статистически достоверного различия. Было

показано, что число активно подвижных сперматозоидов (тип a+b) после заморозки с промышленным криопротектором уменьшается в среднем на 36 % (рис. 4). Для описания подвижности типов (a+b) вводился индекс подвижности I.

$$I = \frac{P_{\text{postthaw}}}{P_{\text{prefreeze}}} * 100\%, \quad (2)$$

где P_{postthaw} – процент сперматозоидов с нормальными категориями подвижности a и b после криоконсервации; $P_{\text{prefreeze}}$ – процент сперматозоидов с нормальными категориями подвижности a и b до криоконсервации.

Кроме значительного снижения подвижности после криоконсервации, наблюдалось увеличение доли сперматозоидов с дефектами шейной части клеток на 28 % и с дефектами хвостовой части до 63 %. Таким образом, несмотря на добавление проникающих и непроникающих в клетки компонент криопротекторов, в них присутствуют сложные переходы агрегатных состояний как при заморозке, так и при разморозке, приводящие к гибели клеток. Предлагаемый в работе метод позволит понять, как меняются термодинамические характеристики сред для криоконсервации биологического материала при добавлении в них тех или иных новых компонент, изучить фазовые переходы и изменения агрегатных состояний. Основываясь не только на показателях клеток, но и на физико-химических свойствах криопротекторов можно будет подобрать среды, способствующие лучшему выживанию клеток при криохранении.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00029)

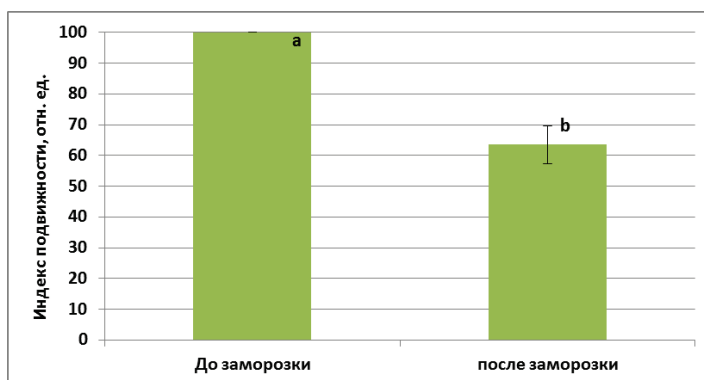


Рисунок 4. Оценка показателей подвижности сперматозоидов до и после заморозки нативных образцов с глицерин содержащим криопротектором. Буквами a, b - обозначены статистически достоверно различимые выборки ($p < 0.05$).

Список литературы / References:

1. Bunge R.G., Keettel W.C., Sherman J.K. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril*, 1954, vol. 5, pp. 520-9
2. Libo S.P., Picton H.M., Godson R.G. Cryopreservation of human spermatozoa. *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*. Geneva: World Health Organization, 2001, pp. 152-65.
3. Watson P.E. Artificial insemination and the preservation of semen. *Lamming G.E. Marshalls Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992, vol. 2, pp. 747-829.
4. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y., Crowe J.H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology*, 1990, vol. 27, pp. 401-415, DOI: 10.1016/0011-2240(90)90017-X.
5. Gilmore, J.A.; Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *HUMAN REPRODUCTION*, 1997, vol. 12(1), pp. 112-118.
6. *Physical properties of glycerine and its solutions*. Glycerine Producers Association, 1963, 28 p.
7. *Life in the frozen state*. Ed. B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson, CRC PRESS, 2004.
8. Grigoreva A.A., Garmaeva S.B., Yakovenko S.A., Simonenko E.Yu., Tverdislov V.A., Dolganova A.A., Apryshko V.P., Biophysical principles in human gametes cryopreservation: cryoprotectants modified by egg yolk. *BPPC-2016*, vol. 1, p. 70-73.
9. K. Elder, B. Dale *In-vitro fertilization*. Cambridge University Press, 3 ed., 2010.
10. Khod'ko A.T. Critical phenomena, phase transitions and physical states of water-glycerol solutions during cooling – warming, *Kharkov University Bulletin, Chemical Series*, 2012. no. 1026, iss. 21(44), pp. 177-184.

CALORIMETRIC CHARACTERISTICS OF GLYCEROL-BASED CRYOPROTECTANT

Simonenko E.Yu., Ivanova A.A., Burmistrova E.V., Pryadun V.V., Vasiliev A.N.,
Yakovenko S.A.

Lomonosov Moscow State University

GSP-1, Leninskie gori, 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: ksimonenko@inbox.ru

Abstract. The development of methods for cryopreservation of biomaterial advances the possibilities of modern biology (contributes to the preservation of endangered species, the creation of cryobanks of microorganisms) and medicine (preservation and transplantation of organs, creation of cryobanks of stem cells and blood cells). Cryoprotectors are used to protect cells from damage. Usually the efficiency of a cryoprotectant is assessed by changes in vital cell parameters after freezing. So, the success of cryopreservation of spermatozoa is estimated by their mobility, cell morphology, membrane integrity and DNA fragmentation. For individual components of cryoprotectants, physical parameters such as glass transition temperature, viscosity, toxicity and the minimum concentration necessary for vitrification are also known. However, it is impossible to find any physicochemical characteristics of cryopreservation media consisting of combinations of penetrating and non-penetrating components into the cell. An adaptation of the adiabatic calorimetry method for the study of liquid media is proposed. The dependence of heat capacity on temperature was measured and the main calorimetric characteristics (changes in entropy ΔS and enthalpy ΔH) for a glycerol-containing cryoprotectant that are actively used for the freezing and storage of semen were determined.

Key words: cryoprotectant, glycerin, adiabatic calorimetry, ART.

ПОИСК ОСНОВ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ SM-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Колесник В.В.¹, Леконцева Н.В.², Михайлина А.О.², Балобанов В.А.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ул. Ленинские горы, д. 1, г. Москва, 119991, РФ

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пуццо, 142290, РФ; e-mail: uralm62@rambler.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Семейство термостабильных Sm-подобных олигомерных белков является чрезвычайно привлекательным объектом для белковой инженерии. Ранее нами была показана возможность их использования как носителя для снижения агрегационной способности и повышения термостабильности амилоидогенных пептидов. Для дальнейшей работы нам необходимо найти структурные основы стабильности и специфичности олигомеризации этих белков. Для поиска основ специфичности мы предложили новый подход. Первый шаг состоит в поиске среди разнообразных Sm-подобных белков таких пар, которые могут образовывать гетероолигомеры. В данной работе описан подход, разработанный нами для достижения этой цели. Полученный экспериментальный результат позволит нам перейти ко второму шагу – теоретическому анализу структур белков и выявлению структурных особенностей, определяющих межсубъединичное взаимодействие в олигомере.

Ключевые слова: белковая инженерия, Sm-подобные белки, сворачивание белков, олигомеризация, специфичность взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ

Объектом нашего исследования являются белки, принадлежащие к семейству Sm-подобных (или Lsm) белков. Белки этого семейства являются мультифункциональными регуляторами трансляции, процессинга и деградации РНК, что, впрочем, не имеет значения в данной работе. [1]. Для нас более важно то, что многие Lsm белки являются термостабильными, а это делает их перспективными объектами для белковой инженерии.

Для белков данного семейства характерно сходство первичной и третичной структур, но четвертичная структура белков из различных доменов жизни отличается разным количеством мономеров. Для бактериальных белков характерны пространственные структуры гомогексамерного типа, для архейных белков – гомогептамерного типа [2, 3] (рис. 1). Сравнение аминокислотных последовательностей бактериальных Lsm белков показало наличие консервативного центрального участка, который состоит из 80 аминокислотных остатков [4].

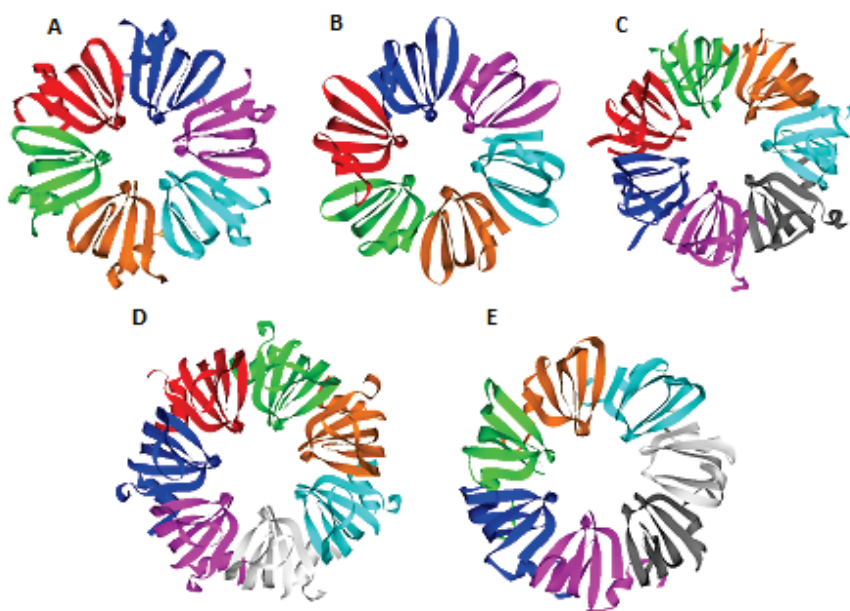


Рисунок 1. Пространственные структуры Sm-белков и Sm-подобных белков различной степени олигомеризации. А – гексамер белка Hfq *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1U1S), В – гексамер белка Mja SmAP *Methanococcus jannaschii* (PDB 4X9C), С – гептамер белка Sso SmAP *Sulfolobus solfataricus* (PDB 4XQ3), D – гептамер белка Sac SmAP *Sulfolobus acidocaldarius* (PDB 5MKL), Е – гептамер белка Mva SmAP из *Methanococcus Vannielii* (PDB 5MKN)

Общей структурной особенностью всех Lsm белков является наличие структурного Sm-фолда, который состоит из двух консервативных элементов - Sm1- и Sm2-мотивов, связанных между собой петлей различной длины. Первый мотив включает в себя β 1-, β 2-, β 3-тяжи, а второй – β 5- и β 4-тяжи [5]. С N-конца Sm1 мотива располагается α -спираль [6]. Четвертичная структура всех Sm-подобных белков представляет собой тороид. В образовании кольца участвуют β 4- и β 5-тяжи Sm2 мотива, которые взаимодействуют с O и N атомами главной цепи с образованием трех водородных связей между мономерами. Это взаимодействие дополнительно стабилизировано контактами между консервативными аминокислотными остатками [7, 8].

Несмотря на значительные усилия в изучении процесса самоорганизации Lsm белков пока не были выявлены ключевые особенности, определяющие их высокую стабильность. Несомненно, не последнюю роль в стабилизации структуры играют межсубъединичные контакты. Анализ первичных и известных пространственных структур Sm-подобных белков показал, что пять консервативных аминокислотных остатков - Gln8, Asn28, Asp40, Tyr55 и His57 (нумерация соответствует белку Hfq из *E.coli*) - образуют недоступные растворителю водородные связи между соседними мономерами. Остаток Asp40 инвариантен во всех Lsm белках, а остатки Gln8, Asn28, Tyr55 и His57 инвариантны в олигомерах гексамерного типа, но отличаются от соответствующих аминокислотных остатков в белках, образующих гептамеры.

В группе структурных исследований рибосомных белков Института белка РАН было изучено влияние замен консервативных аминокислотных остатков Gln8, Asn28, Asp40, Tyr55 и His57 на четвертичную структуру олигомера и его термостабильность. Полученные данные показали, что ни одна из произведенных замен не влияет на четвертичную структуру белка, но уменьшают его термостабильность. Наиболее сильный дестабилизирующий эффект произвели замены His57Ala и Tyr55Ala, как предполагается за счет увеличения экспонированности гидрофобных участков белка и открытия доступа молекулам растворителя к ранее закрытым водородным связям [9, 10].

Нами был предложен новый подход для определения структурных элементов, определяющих специфичность олигомеризации Lsm белков. В нашем распоряжении имеется коллекция бактериальных и архейных Lsm белков. На первом этапе мы определим возможность образовывать ими гетероолигомеры при совместной ренатурации (чему и посвящена данная работа). Далее анализ структур пар белков, которые взаимодействуют или не взаимодействуют, позволит выявить ключевые элементы структуры, определяющие стабильность взаимодействия между субъединицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка белков с 6xHis. Целевые белки были наработаны в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3). Для выделения и очистки белка клетки ресуспендировали на льду в буфере, содержащем 20 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 0,1 % Triton-X-100, 10mM имидазол, 1 M NaCl, 1mM ДТТ, 1mM ПМСФ. Клетки разрушались ультразвуковым дезинтегратором. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант прогревали при 82 °C в течение 20 минут. Денатурированные белки осаждали центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут.

Очистку белка производили на колонке для металл-хелатной хроматографии Ni-NTA агароза, уравновешенной стартовым буфером содержащим: 20mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl. Элюцию белка проводили буфером, содержащим 20 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 500mM имидазол. Фракции анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН.

Выделение и очистка белков, не имеющих 6xHis. Целевые белки были наработаны в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3). Клетки ресуспендировали на льду в буфере для разрушения, содержащем 50mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM MgCl_2 , 1 M NaCl, 5mM ЭДТА. Клетки разрушались ультразвуковым дезинтегратором. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант прогревали при 82 °C в течение 20 минут. Денатурированные белки осаждали центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут.

После прогрева в полученный супернатант добавляли сухой сульфат аммония до концентрации 1,5 M. Выделение и очистку белка производили на колонке для хроматографии гидрофобных взаимодействий с носителем Butyl-Sepharose, уравновешенной стартовым буфером содержащим: 50mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M NaCl. Элюцию белка проводили градиентом 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M NaCl до 200 mM NaCl в буфере 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Фракции анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН. Белок диализовали в буфере, содержащем 200 mM NaCl и 50 mM Tris-HCl pH 8,0.

Анализ взаимодействия белков. Отбирали аликвоты, содержащие по 0,5 мг белков с 6xHis и без 6xHis, смешивали, добавляли гуанидин гидрохлорид до 6M и инкубировали 15 минут. Полученную смесь белков разбавляли буфером 20mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300mM NaCl в 6 раз и наносили на колонку для металл-хелатной хроматографии с сорбентом Ni-NTA агароза, предварительно уравновешенную стартовым буфером. Элюцию белковой фракции осуществляли буфером, содержащим 20mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl, 500 mM имидазол. Собранные фракции анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН.

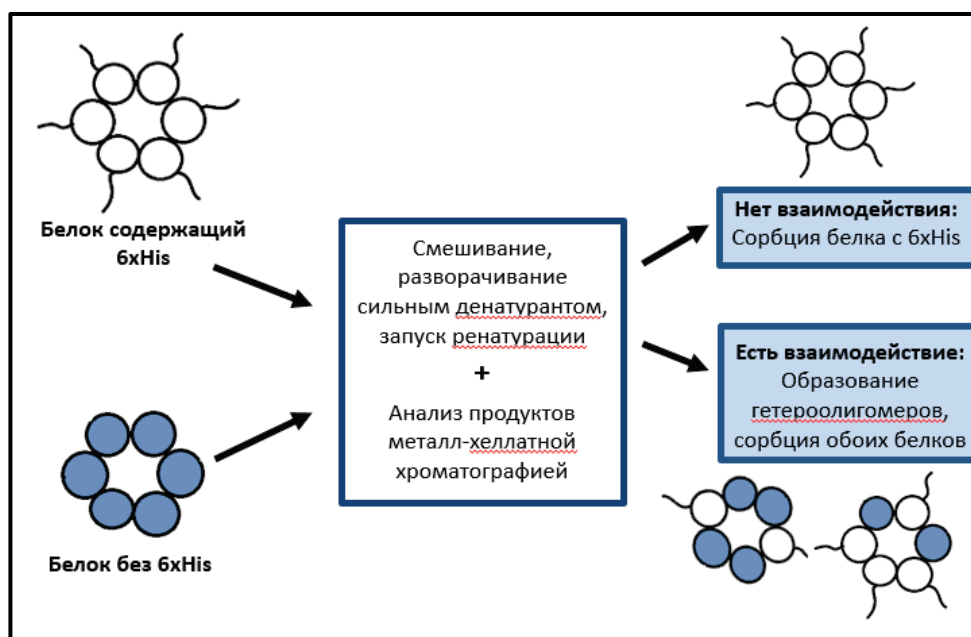


Рисунок 2. Схема метода анализа взаимодействия Lsm белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Планирование эксперимента. Для анализа взаимодействия белков нами был разработан метод, который позволяет оценить возможность взаимодействия бактериальных и архейных Lsm белков. Схема эксперимента представлена на рисунке 2. Суть метода заключается в том, что один из исследуемой пары белков имеет в своей последовательности 6xHis, а другой нет. Исследуемая пара белков смешивалась и производилось разрушение их третичной и четвертичной структуры сильным денатурантом. Затем при разбавлении образцов, концентрация денатуранта уменьшалась, что инициировало процесс ренатурации. Продукты ренатурации анализируются с помощью металл-хелатной хроматографии. Проводя совместную ренатурацию пары белков, один из которых имеет 6xHis, мы предполагаем, что если мономеры этих белков способны взаимодействовать друг с другом, то они образуют гетероолигомер, который специфически свяжется с носителем на колонке металл-хелатной хроматографии теми субъединицами, которые имеют 6xHis. О успешном взаимодействии можно судить если в результате на электрофореграмме мы увидим две полосы, соответствующие молекулярным весам обоих исследуемых белков.

При анализе планируемого эксперимента мы выявили критические моменты, которые, как мы предполагаем, в ходе эксперимента могут привести к ошибкам и артефактам. Например, если Lsm белок, не имеющий в своей последовательности 6xHis, будет неспецифично взаимодействовать с носителем металл-хелатной хроматографии. Поэтому прежде чем мы приступили к основному эксперименту, мы провели отрицательный контроль. Был взят белок Pae Hfq не содержащий 6xHis, образец наносили в присутствии 50мМ имидазола. В полученных после хроматографии фракциях искомым белком не наблюдался. Таким образом нами были выбраны условия исключающие появления ложноположительного результата.

Также, мы провели положительный контроль, была взята пара белков Mva SmAP-6xHis и Mva SmAP. Для них была проведена процедура, описанная выше. На колонку образец наносили в присутствии 50мМ имидазола. На электрофореграмме можно наблюдать две фракции, соответствующие обоим вариантам белка (рис. 3(4)). Так мы показали, что мономеры белка после денатурации взаимодействуют и способны к олигомеризации, а также что 6xHis и линкер, привязывающий его к белку, не препятствуют процессу ренатурации.

Результаты исследования взаимодействия различных Lsm белков. В качестве белков, содержащих 6xHis были взяты следующие белки: Sac SmAP из *Sulfolobus acidocaldarius*, Sso SmAP из *Sulfolobus solfataricus*, Mva SmAP из *Methanococcus Vannielii*. Также были выделены и очищены белки, не имеющие 6xHis: Pae Hfq из *Pseudomonas aeruginosa*, Mja SmAP из *Methanococcus jannaschii*, Mva SmAP из *Methanococcus Vannielii*.

Для пар этих белков в соответствии с нашей методикой была проведена денатурация и совместная ренатурация. Анализ продуктов ренатурации при помощи металл-хелатной хроматографии и геле-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН показал, какие из пар Lsm белков способны взаимодействовать (рис. 3).

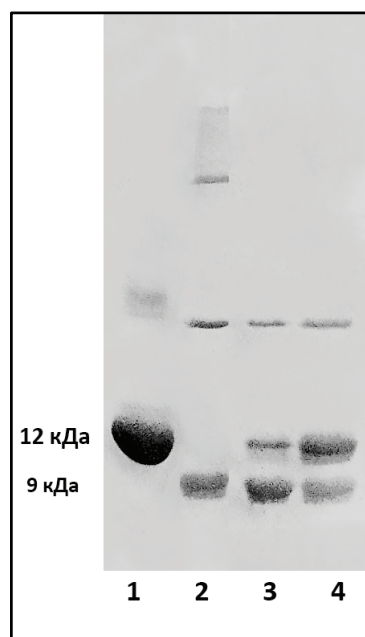


Рисунок 3. Электрофореграмма (15 % ПААГ в присутствии ДСН) исследуемой пары белков. 1 – очищенный препарат Sac SmAP-6xHis, 2 – очищенный препарат Pae Hfq, 3,4 – фракции Sac SmAP-6xHis и Pae Hfq

На основании полученных результатов мы сделали вывод, что белок Pae Hfq взаимодействует с Sac SmAP. На электрофореграмме видно, что полученная фракция содержит как белок с 6xHis, так и без него (рис. 3(3, 4)). На основании такого результата был сделан вывод, что эта пара белков способна к образованию гетероолигомера.

Остальные пары исследуемых белков как видно по результатам, представленным на рисунке 4, слабо взаимодействуют или же не взаимодействуют вовсе. Полученные результаты исследования взаимодействия Lsm белков сведены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе, с помощью предложенного нами метода мы показали возможность образовывать бактериальными и архейными Lsm белками смешанные гетероолигомеры. Для дальнейшего исследования на основе экспериментальных данных будут отобраны Lsm белки для выявления структурных элементов, отвечающих за стабильность и специфичность олигомеризации.

Работа поддержана грантом РФФ 14-24-00157.

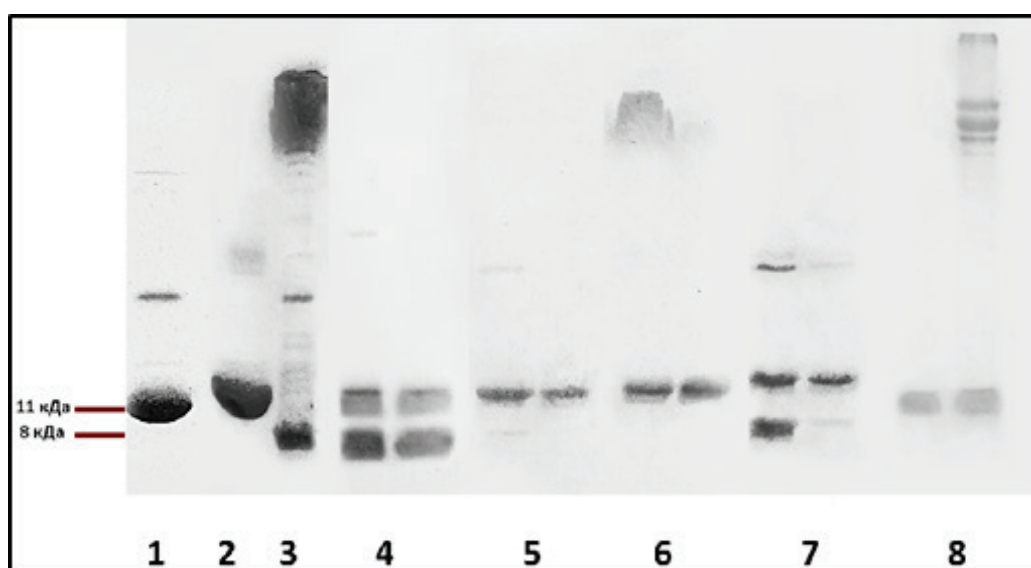


Рисунок 4. Электрофореграмма (15 % ПААГ в присутствии ДСН) исследуемых пар белков. 1 – очищенный препарат Sac SmAP-6xHis, 2 – очищенный препарат Mva SmAP-6xHis, 3 – очищенный препарат Mja SmAP, 4 – контроль Mva SmAP-6xHis и Mva SmAP, 5 – Sso SmAP-6xHis и Mja SmAP, 6 – Sac SmAP-6xHis и Mja SmAP, 7 – Sso SmAP-6xHis и Pae Hfq, 8 – Mva SmAP-6xHis и Mja SmAP

Таблица 1. Образование/необразование гетероолигомеров исследуемыми парами Lsm белков

Белок	Sso-His-6xHis	Sac-His-6xHis	Mva-His-6xHis
Mja 49 кДа	-	-	-
Mva 67 кДа			+
Rae 54 кДа	+	+	-

Список литературы / References:

1. Achsel T., Brahm H., Kastner B., Bachi A., Wilm M., Lührmann R. A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3' end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, pp. 5789-5802.
2. Мурина В.Н., Никулин А.Д. РНК-связывающие Sm-подобные белки бактерий и архей: сходство и различия структур и функций. *Успехи биологической химии*, 2011, т. 51, с. 133-164. [Murina V.N., Nikulin A.D. RNA-binding bacterial and archaeal Sm-like proteins, common and differs of structure and functions. *Bio. Chem. Soc.*, 2011, vol. 51, pp. 133-164. (In Russ.)]
3. Toro I., Basquin J., Teo-Dreher H., Suck D. Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 320, pp. 129-42.
4. Zhang A., Wassarman K.M., Ortega J., Steven A.C., Storz G. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Molecular cell.*, 2002, vol. 9, pp. 11-22.
5. Seraphin B. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, pp. 2089-2098.
6. Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennan R.G. Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyribadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, vol. 106, pp. 19292-19297.
7. Nikulin A., Stolboushkina E., Perederina A., Vassilieva I., Blaesi U., Moll I., Kachalova G., Yokoyama S., Vassilyev D., Garber M., Nikonov S. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2005, vol. 61, pp. 141-146.
8. Brennan R.G., Link T.M. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol.*, 2007, vol. 10, pp. 125-133.
9. Мурина В.Н., Мельник Б.С., Филимонов В.В., Улайн М., Вейс М.С., Мюллер У., Никулин А.Д. Влияние замен консервативных аминокислотных остатков на структуру и стабильность белка Hfq. *Биохимия*, 2014, т. 79, вып. 5, с. 595-604. [Murina V.N., Melnik B.S., Filimonov V.V., Ulane M., Vase M.S., Muller U., Nikulin A.D. Influence of conservative aminoacids changes on the structure and stability of Hfq protein. *Biochemistry*, 2014, vol. 79, iss. 5, pp. 595-604. (In Russ.)]
10. Moskaleva O., Melnik B., Gabdulkhakov A., Garber M., Nikonov S., Stolboushkina E., Nikulin A. The structures of mutant forms of Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization. *Structural Biology and Crystallization Communication*, 2010, vol. 66, pp. 760-764.

SEARCH FOR STRUCTURAL BASICS OF THE OLIGOMERIZATION SPECIFICITY OF LSM PROTEINS FROM VARIOUS ORGANISMS.

Kolesnik V.V.¹, Leontceva N.V.², Mikhailina A.O.², Balobanov V.A.²

¹Moscow State University

Leninskie gory str., 1, Moscow, 119991, Russia

²Institute of protein research RAS

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: uralm62@rambler.ru

Abstract. A family of thermal stable Sm-like oligomeric proteins is an extremely attractive object for protein engineering. Earlier, we demonstrated the possibility of using them as a carrier for reducing the aggregation ability and increasing the thermal stability of amyloidogenic peptides. For further work, we need to find the structural basis for the stability and specificity of oligomerization of these proteins. To find the basis for specificity, we proposed a new approach. The first step is to find such pairs of Sm-like proteins that can form hetero-oligomers. In this paper, we describe the approach we have developed to achieve this goal. The obtained experimental result will allow us to proceed to the second step - the theoretical analysis of protein structures and the identification of structural features that determine the intersubunit interaction in the oligomer.

Key words: protein engineering, Sm-like proteins, protein folding, oligomerization, interaction specificity.

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В МЕХАНИЗМАХ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Смаглий Л.В., Рыдченко В.С., Ярцева Ю.О., Бирулина Ю.Г., Ковалев И.В., Гусакова С.В., Носарев А. В., Петрова И.В.

ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

Московский тракт, д. 2, Томск, 634050, РФ; lud.smagly@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Исследовали роль сероводорода (H_2S) в действии агониста P_2X и P_2Y рецепторов АТФ на тонус сегментов аорты крысы с интактным эндотелием. АТФ (1-1000 мкМ) и агонист P_2X рецепторов α, β -MeATP (100 мкМ) расслабляли сегменты, предсокращенные активатором α_1 -адренорецепторов фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ). Агонист P_2Y рецепторов УТФ (1-100 мкМ) снижал, а УТФ (100-1000 мкМ) – увеличивал амплитуду ФЭ-индуцированного сокращения. Релаксирующее действие АТФ усиливалось донором сероводорода NaHS (500 мкМ), но снижалось в присутствии ингибитора цистотионин- γ -лиазы (CSE) DL-propargylglycine (10 мМ). DL-propargylglycine (10 мМ) увеличивал величину констрикторного действия УТФ (100-1000 мкМ), но снижал релаксирующее действие α, β -MeATP (100 мкМ). Таким образом, активация P_2X рецепторов снижает величину сокращения, индуцированного фенилэфрином, а активация P_2Y рецепторов – увеличивает. При этом релаксирующее действие АТФ на сегменты аорты крысы с интактным эндотелием обусловлено активацией цистотионин- γ -лиазы через P_2X рецепторы.

Ключевые слова: АТФ, сероводород, пуринаргические рецепторы, гладкомышечные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

В 1972 году Burnstock ввел понятие пуринаргической сигнализации [1], в которой в качестве внеклеточных сигнальных молекул выступали внеклеточные пурины (прежде всего аденозин 5'-трифосфат (АТФ), аденозин, и пиримидин). Эти соединения высвобождаются из клеток посредством диффузии через мембранные гемиканалы, активации мембранных транспортеров, везикулярного экзоцитоза [2-4], либо из гибнущих клеток, что также является ранним индикатором их повреждения [5, 6]. Среди пуринаргических рецепторов выделяют метаботропные P_1 рецепторы аденозина и нуклеотидные рецепторы P_2 , которые подразделяются на подклассы P_2Y (метаботропные) и P_2X (ионотропные) [2, 6-9]. Как P_2X , так и P_2Y рецепторы активируются действием АТФ. АТФ-зависимые механизмы трансдукции сигнала выявлены практически во всех типах клеток и тканях [10].

Известно, что пуринаргическая сигнальная система играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса. Механизмы такой регуляции варьируют в зависимости от типа кровеносного сосуда, его физиологической роли и вида животного организма [8, 11, 12].

Высвобождаясь из симпатических нервных окончаний в качестве ко-трансммиттера норадреналина, АТФ действует на P_2X_1 рецепторы мембран гладкомышечных клеток (ГМК) и активирует входящие натриевые и кальциевые токи, что приводит к развитию сокращения ГМК [3, 13]. С другой стороны, создаваемое кровотоком изменение напряжения сдвига, действующего на стенку сосуда, а также гипоксия стимулируют высвобождение АТФ из эндотелиальных клеток [14]. Действуя на P_2Y_1 и P_2Y_2 рецепторы мембран эндотелиальных клеток, АТФ стимулирует продукцию инозитолтрифосфата (IP_3) и высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума через активацию рецепторов к IP_3 , последующую активацию eNOS и усиление синтеза NO. Диффундируя в ГМК, NO вызывает расслабление этих клеток, а следовательно, снижение тонуса кровеносных сосудов [15, 16]. Следует отметить, что гипоксия также стимулирует высвобождение АТФ из эритроцитов. Аденозин, образующийся при распаде внеклеточного АТФ, вызывает вазодилатацию через P_1 рецепторы ГМК [2, 12].

Как отмечалось выше, одним из необходимых компонентов, участвующих в передаче пуринаргического сигнала, является NO. NO относится к группе газотрансммиттеров, которая так же включает сероводород (H_2S). И если NO-зависимые механизмы, запускаемые при активации пуринаргических рецепторов, изучены достаточно подробно, то данные о роли H_2S в механизмах пуринаргической сигнализации в настоящее время практически отсутствуют. В то же время, учитывая локализацию ферментов синтеза этого газотрансммиттера, его свойства, а также механизмы действия, схожие с таковыми для NO, можно предполагать их возможную роль в трансдукции сигнала от пуринаргического рецептора к конечному внутриклеточному эффектору.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования служили сегменты грудного отдела аорты нормотензивных крыс-самцов линии Wistar с интактным эндотелием.

Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялось в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крыс умерщвляли путем декапитации.

После выделения грудной отдел аорты крысы помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, с помощью хирургических ножниц отпрепаровывали жировую и соединительную ткань и выделяли сегменты шириной 2-3 мм. Сегменты с интактным эндотелием использовали немедленно, оставшуюся часть аорты сохраняли в холодильнике при 4 °С. В предварительных экспериментах было показано, что 24-часовое хранение аорты при 4 °С не влияет на сократительные свойства гладких мышц.

Методика исследования. Для исследования сократительной активности сосудистые гладкомышечные сегменты (СГМС) после предварительной нагрузки 500 мг фиксировали в рабочей камере объемом 10 мл, изготовленной из стекла. Камеру заполняли физиологическим раствором Кребса и термостатировали при 37 °С.

Измерение механического напряжения сосудистых гладкомышечных клеток проводилось с использованием четырехканальной механографической установки Myobath IV и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX- 4/16 (Германия).

Сегменты инкубировали в физиологическом растворе Кребса в течение 40-50 минут при pH=7,4 (37 °С), после чего вызывали сократительный ответ путем эквимольного замещения 30 мМ NaCl на KCl. Сокращение, вызванное гиперкалиевым раствором, прекращали после достижения стабильной величины их амплитуды. Далее в зависимости от целей эксперимента использовали физиологический раствор с добавлением тестируемых соединений. Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (эквимольное замещение 30 мМ NaCl на KCl), либо от амплитуды сокращения, индуцированного α_1 -адреномиметом фенилэфрином (10 мкМ), которые принимали за 100 %.

В качестве агонистов пуриnergических рецепторов использовали неселективный активатор P_2X рецепторов аденозин-5'-трифосфат (АТФ) (Sigma), активатор P_2Y рецепторов уридин-5'-трифосфат (УТФ) (Sigma), активатор P_2X рецепторов α,β -Methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt (α,β -MeATP) (Sigma). В качестве ингибитора цистотионин- γ -лиазы использовали DL-propargylglycine (Sigma). Донором сероводорода служил гидросульфид натрия (NaHS) (Sigma). Раствор NaHS готовили непосредственно перед использованием, pH раствора поддерживали в пределах 7,35-7,50.

Статистическая обработка. Анализ данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее $\pm$ ошибка среднего» ($X \pm m$). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова-Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован T-критерий Уилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Достоверными считали различия при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния агонистов пуриnergических рецепторов на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином

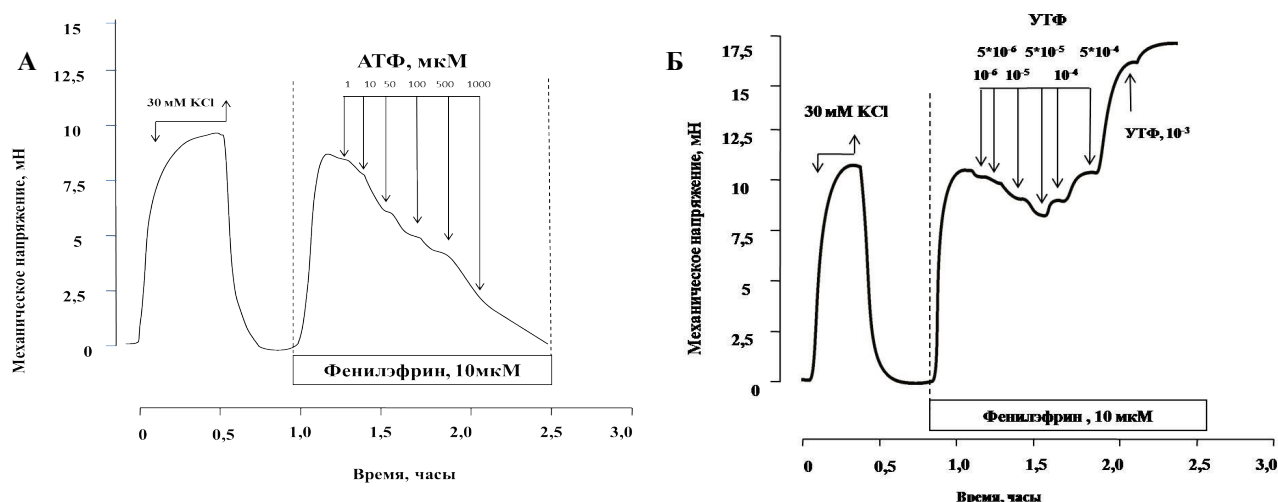


Рисунок 1. Влияние АТФ (1-1000 мкМ) (А) и УТФ (1-1000 мкМ) (Б) на механическое напряжение сегментов аорты крысы с интактным эндотелием, предсокращенных фенилэфрином (10 мкМ). По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (часы). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

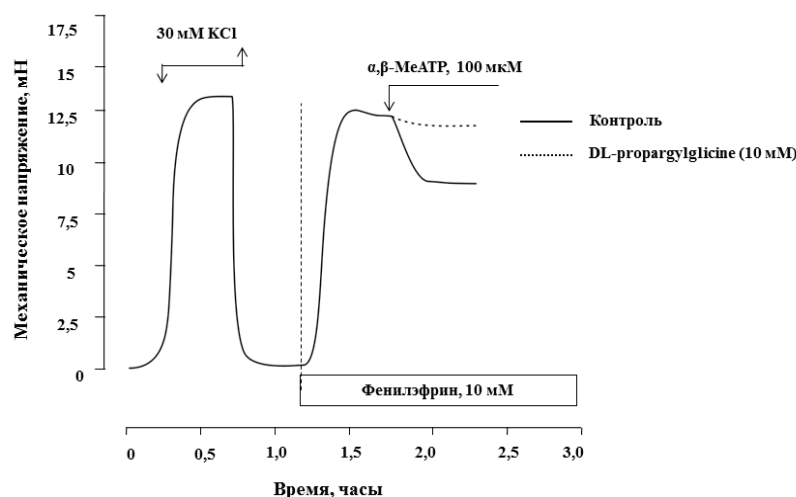


Рисунок 2. Влияние α,β -MeATP (100 мкМ) на механическое напряжение сегментов аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином (10 мкМ). Сплошная линия – действие α,β -MeATP в отсутствии DL-propargylglycine (10 мМ), пунктирная – действие α,β -MeATP на фоне DL-propargylglycine (10 мМ). По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (часы). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов

Важным источником АТФ в сосудах являются симпатические нервные окончания, которые высвобождают АТФ как котрансмиттер норадреналина [3, 13]. Активация α_1 -адренергических рецепторов ГМК норадреналином вызывает развитие сократительного ответа [17]. В качестве синтетического аналога норадреналина использовали фенилэфрин. Добавление 10 мкМ фенилэфрина (ФЭ) в раствор Кребса приводило к развитию сократительного ответа, сравнимого по амплитуде с ответом на действие 30 мМ KCl.

Добавление АТФ на фоне ФЭ-индуцированного сокращения гладкомышечных сегментов в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ и 1000 мкМ приводило к дозозависимому снижению МН сосудов до $88,9 \pm 3,4 \%$, $73,1 \pm 4,9 \%$, $70,4 \pm 5,0 \%$, $58,8 \pm 12,2 \%$, $32,6 \pm 4,4 \%$ и $17,3 \pm 4,2 \%$ ($n = 8$, $p < 0,05$), соответственно, относительно контрольного фенилэфрин-индуцированного сокращения (рис. 1А).

Известно, что АТФ неселективно действует и на P_2X , и на P_2Y рецепторы [3, 7-9]. Чтобы исследовать роль P_2Y рецепторов в сокращении ГМК аорты крысы, использовали активатор P_2Y -рецепторов УТФ (100 мкМ). Активация P_2Y рецепторов стимулирует продукцию инозитолтрифосфата (IP_3) и высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулаума через активацию рецепторов к IP_3 , что с одной стороны способствует развитию сокращения ГМК, а с другой – активирует eNOS, усиливая продукцию NO [15, 16]. При действии на сегменты, предсокращенные фенилэфрином (10 мкМ), УТФ в концентрациях 1, 5, 10, 50 и 100 мкМ снижал их механическое напряжение до $96,7 \pm 0,7 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$), $82,5 \pm 0,2 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$), $73,4 \pm 5,9 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$), $80,1 \pm 2,7 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$) и $94,8 \pm 2,9 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$), соответственно, от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения. УТФ в концентрациях 500 мкМ и 1000 мкМ увеличивал МН сосудов до $161,0 \pm 17,9 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$) и $171,6 \pm 18,6 \%$ ($n = 4$, $p < 0,05$), соответственно, от контрольного фенилэфрин-индуцированного сокращения (рис. 1Б).

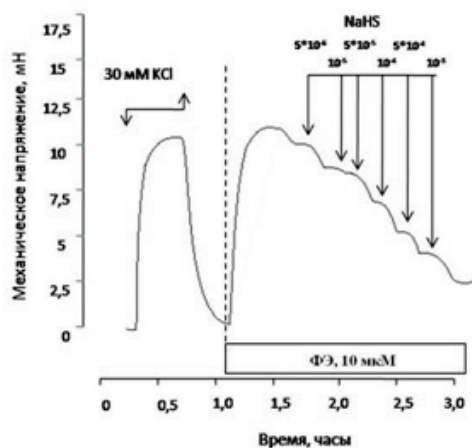


Рисунок 3. Влияние NaHS (5-1000 мкМ) на механическое напряжение гладких мышц аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином. По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (час). Стрелками показано добавление и удаление соответствующих растворов. * - $p < 0,05$

Чтобы исследовать роль P_2X рецепторов в сокращении ГМК аорты крысы, использовали активатор P_2X -рецепторов α, β -MeATP (100 мкМ). α, β -MeATP, связываясь с P_2X -рецепторами, активирует Ca^{2+} -зависимые пути регуляции сократительной активности ГМК [7]. Действуя на сегменты, предсокращенные фенилэфрином (10 мкМ), α, β -MeATP (100 мкМ) снижал их механическое напряжение до $73,2 \pm 3,1$ % ($n = 6$, $p < 0,05$) от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (рис. 2).

Исследование роли сероводорода в действии агонистов пуринаргических рецепторов

Для установления эффектов сочетанного действия сероводорода и активаторов пуринаргических рецепторов на сократительную активность СГМК в предварительных экспериментах исследовали влияние донора H_2S на тонус кольцевых сегментов аорты крысы, предсокращенных фенилэфрином.

Донор сероводорода NaHS в концентрациях 5 - 1000 мкМ не оказывал влияния на базальный тонус сегментов аорты крысы. На фоне сокращения, вызванного ФЭ (10 мкМ) добавление 5, 10, 50, 100, 500, 1000 мкМ NaHS вызывало дозозависимое расслабление сосудистых сегментов до $80,4 \pm 8,1$ %, $74,2 \pm 8,0$ %, $49,3 \pm 6,5$ %, $33,3 \pm 5,6$ %, $28,8 \pm 5,3$ % и $19,0 \pm 5,3$ % ($n = 6$, $p < 0,05$), соответственно, от контрольного ФЭ-индуцированного сокращения (Рис. 3). NaHS (500 мкМ) усиливал релаксирующее действие 500 мкМ АТФ. Величина механического напряжения при этом составила $13,2 \pm 5,6$ % ($n = 4$, $p < 0,05$) (в отсутствии АТФ – $28,8 \pm 5,3$ %). Синтез H_2S в ГМК сосудов осуществляет фермент цистотионин- γ -лиаза (CSE). В качестве ингибитора данного фермента используют DL-propargylglycine. Предобработка кольцевых сегментов аорты крысы DL-propargylglycine (10 мМ) в течение 30 мин достоверно снижала величину расслабления на действие 500 мкМ АТФ в сравнении с таковым в отсутствии ингибитора фермента. В присутствии ингибитора CSE АТФ расслаблял сегменты до $68,3 \pm 4,3$ % ($n = 4$, $p < 0,05$) от ФЭ-индуцированного сокращения в присутствии DL-propargylglycine, тогда как в отсутствии DL-propargylglycine МН составило $32,6 \pm 4,4$ % (рис. 4А). Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении CSE при активации пуринаргических рецепторов АТФ.

Чтобы уточнить, какая группа пуринаргических рецепторов активирует CSE, использовали активаторы P_2X и P_2Y рецепторов.

Предобработка сегментов аорты крысы NaHS (500 мкМ) не оказывала достоверного влияния на действие УТФ (100 мкМ) в сегментах с интактным эндотелием, но ослабляла констрикторное действие 500 мкМ УТФ (рис. 4В). Ингибитор CSE DL-propargylglycine (10 мМ, предобработка 30 мин) увеличивал релаксирующее действие УТФ (100 мкМ) ($75,8 \pm 7,4$ ($p < 0,05$, $n = 4$)) (рис. 4В) и усиливал констрикторное действие 500 мкМ УТФ ($179,9 \pm 5,1$ ($p < 0,05$, $n = 4$)) в кольцевых сегментах аорты крысы. Полученные данные указывают на то, что сероводород, образующийся в результате работы CSE, препятствует развитию констрикции, обусловленной активацией P_2Y рецепторов.

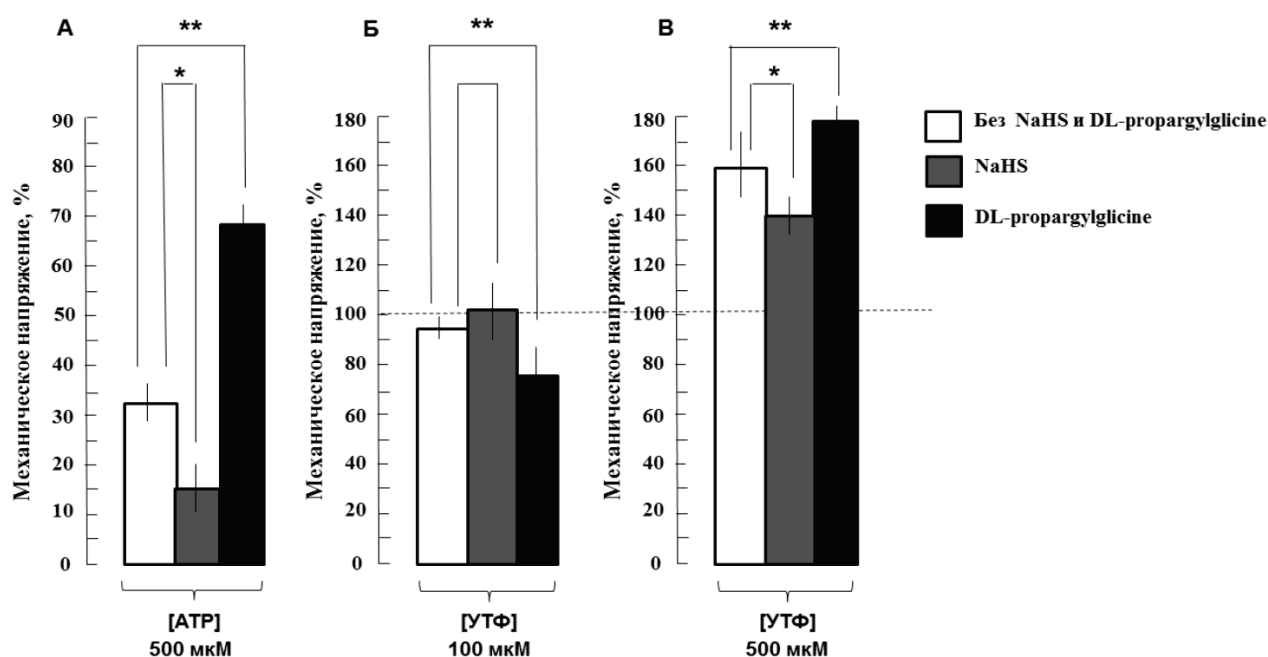


Рисунок 4. Влияние NaHS (500 мкМ) и DL-propargylglycine на величину релаксирующего действия АТФ (500 мкМ) (А), УТФ (100 мкМ) (Б) и констрикторного действия УТФ (500 мкМ) (В) в сегментах аорты крысы. По оси абсцисс – концентрация NaHS (мкМ), по оси ординат – механическое напряжение (%). *, ** – достоверные отличия ($p < 0,05$)

С другой стороны, DL-propargylglycine (100 мкМ, предобработка 30 мин) снижал величину расслабляющего действия активатора P_2X рецепторов α, β -MeATP (100 мкМ) до $86,5 \pm 9,1 \%$ ($n = 6$, $p < 0,05$) от величины сокращения в отсутствии DL-propargylglycine (рис. 2). Таким образом, сигнальный каскад, активируемый P_2X рецепторами вовлекает активацию CSE.

АТФ, действуя на фоне сокращения ГМК, вызванного активацией α_1 -адренорецепторов, способствует снижению механического напряжения сосудистых сегментов. Известно, что АТФ, действуя через P_2X рецепторы, активирует связанные с ними Ca^{2+} -каналы; а действуя через P_2Y -рецепторы – фосфолипазу С и продукцию IP_3 . Ca^{2+} в свою очередь дополнительно активирует входящие хлорные токи, которые усиливают деполяризацию мембраны и способствуют развитию сокращения. Одновременно, активация пуринаргических рецепторов P_2X и P_2Y активирует eNOS, в том числе, посредством увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Образующийся NO активирует цГМФ-зависимую сигнальную систему и калиевые каналы мембраны, что ведет к гиперполяризации мембраны и расслаблению СГМК. Данные о возможной роли сероводорода в пуринаргической регуляции кровеносных сосудов отсутствуют, хотя ферменты, синтезирующие H_2S , локализованы как в сосудистых ГМК, так и в эндотелиальных клетках и могут выступать в роли эффекторного звена, через которое реализуется действие пуринов на сократительную активность сосудистых ГМК. Исследование влияния донора сероводорода NaHS показало, что сероводород потенцирует релаксирующее действие АТФ, тогда как ингибитор цистотионин- γ -лиазы снижал его. Подавление релаксирующего действия α, β -MeATP ингибитором CSE свидетельствует о том, что релаксирующее действие АТФ, опосредованное увеличением синтеза сероводорода, обусловлено активацией рецепторов группы P_2X .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В то же время, усиление релаксирующего действия УТФ на фоне снижения внутриклеточного синтеза сероводорода, с одной стороны, позволяет предположить отсутствие связи между P_2Y рецепторами и ферментом CSE, с другой – на усиление релаксирующего эффекта других сигнальных систем, которые могут подавляться сероводородом. Так, например, NO может вступать в химические взаимодействия с H_2S , что нивелирует его расслабляющее действие. В условиях же сниженной продукции H_2S релаксирующее действие NO выражено сильнее. Снижение внутриклеточной концентрации H_2S и, следовательно, числа открытых калиевых каналов, также может способствовать усилению констрикции в ответ на УТФ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№16-34-00262, № 18-44-703008).

Список литературы / References:

1. Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacological reviews*, 1972, vol. 24(3), pp. 509-581.
2. Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L. [et al.] International Union of Pharmacology LVIII: update on the P_2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*, 2006, vol. 58(3), pp. 281-341.
3. Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews*, 2007, vol. 87(2), pp. 659-797.
4. Pankratov Y., Lalo U., Verkhratsky A., North R.A. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv.*, 2006, vol. 452(5), pp. 589-597.
5. Burnstock G. Unresolved issues and controversies in purinergic signaling. *The Journal of physiology*, 2008, vol. 586(14), pp. 3307-3312.
6. Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhratsky A., Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 2009, vol. 32(1), pp. 19-29.
7. *Pharmacology: The Vascular System*. 1985, vol. 16(5), pp. 433-440.
8. Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, vol. 64(12), pp. 1471-1483.
9. Burnstock G. Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology*, 1976, vol. 62(2), pp. 491-503.
10. Baroja-Mazo A., Barberà-Cremades M., Pelegrín P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, vol. 1828(1), pp. 79-93.
11. Burnstock G. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, 1990, vol. 8(7), pp. S95-106.
12. Burnstock G., Ralevic V. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacological reviews*, 2014, vol. 66(1), pp. 102-192.

13. Lohman A.W., Billaud M., Isakson B.E. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular research*, 2012, vol. 95(3), pp. 269-280.
14. Bodin P., Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 1996, vol. 27(6), pp. 872-5.
15. da Silva C.G., Specht A., Wegiel B., Ferran C., Kaczmarek E.. Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation*, 2009, vol. 119(6), pp. 871-879.
16. Raqeeb A., Sheng J., Ao N., Braun A. P. Purinergic P2Y2 receptors mediate rapid Ca²⁺ mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells. *Cell calcium*, 2011, vol. 49(4), pp. 240-248.
17. Testa R., Guarneri L., Poggesi E., Simonazzi I., Taddei C., Leonardi A. Mediation of noradrenaline-induced contractions of rat aorta by the alpha 1B-adrenoceptor subtype. *Br J Pharmacol.*, 1995, vol. 114(4), pp. 745-50.

THE ROLE OF GAS-TRANSMITTERS IN THE MECHANISMS OF PURINERGIC REGULATION OF THE CONTRACTIVE ACTIVITY OF VASCULAR GLADOMETER CELLS

Smaglyi L.V., Rydchenko V.S., Yartseva Yu.O., Birulina Yu.G., Kovalev I.V.,

Gusakova S.V., Nosarev A.V., Petrova I.V.

SibSMU of the Ministry of Health of Russia

Moscow tract, 2, Tomsk, 634050, Russia; lud.smagly@yandex.ru

Abstract. The role of hydrogen sulfide (H₂S) in ATP action on tone of rat aorta segments with intact endothelium was studied. ATP (1-1000 μM), a nonselective activator of P₂X and P₂Y receptors, relaxed vascular segments precontracted with agonist of α₁-adrenergic receptors phenylephrine (PE, 10 μM). Activator of P₂X receptors α,β-MeATP (100 μM) also relaxed segments precontracted with PE (10 μM). Activator of P₂Y receptors UTP (1-100 μM) decreased and UTP (100-1000 μM) increased the amplitude of PE-induced contraction. Relaxing action of ATP was augmented by the donor of hydrogen sulfide NaHS (500 μM), but decreased in the presence of cystothionine-γ-lyase (CSE) DL-propargylglycine (10 mM). DL-propargylglycine (10 mM) increased the amplitude of constrictive action of UTP (100-1000 μM), but decreased relaxing action of α,β-MeATP (100 μM). In conclusion, activation of P₂X receptors decreases the amplitude of PE-induced contraction and activation of P₂Y – increases it. Relaxing action of ATP in rat aorta segments with intact endothelium is mediated by CSE activation through P₂X receptors.

Key words: ATP, hydrogen sulfide, purinergic receptors, smooth muscle cells.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИНТЕРФЕЙСА

Черенков И.А., Раевских К.С., Сергеев В.Г., Кривилев М.Д.

Удмуртский государственный университет

ул. Университетская, д. 1, г. Ижевск, 426034, РФ; e-mail: ivch75@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Предложена биоэлектрохимическая модель для оценки протеазной активности, основанная на детекции токов восстановления электроактивного соединения (толуидинового синего), диффундирующего в среде желатинового геля. Электрохимическое поведение толуидинового синего в желатиновом геле характеризуется ростом пиковых значений силы тока во времени и сдвигом потенциалов пиковых значений силы тока относительно показателей, полученных в фосфатно-солевом буферном растворе. Внесение в ячейку трипсина в концентрации 0,08 % (масс.) привело к изменению характера зависимости «ток-время», отражающему снижение диффузионных ограничений. Показателями протеазного катализа в данной модели стали значения силы тока восстановления и скорость изменения силы тока. Наиболее существенные изменения вольтамперных кривых отмечены к 10-й минуте эксперимента. Развитием описанной модели может стать электрохимический сенсор протеазной активности для оценки ферментных препаратов и клеточных культур.

Ключевые слова: циклическая вольтамперометрия, трипсин, фенотиазиновые красители, гидрогели.

Электрохимические методы находят широкое применение в биологии и медицине [1, 2]. Одним из направлений биоэлектрохимии является создание молекулярных и клеточных биоэлектрохимических моделей [3], для которых важное значение имеет оценка протеазной активности [4, 5]. Субстраты и продукты протеолитических ферментов, как правило, не обладают выраженной электроактивностью, что затрудняет их прямое определение электрохимическими методами. Между тем, оценка и мониторинг протеазной активности важны для описания интенсивности воспаления в экспериментальных моделях и в клинических исследованиях [6-8]. Интерес представляют собственно электрохимические процессы в гелевых средах, поскольку гидрогели различного состава – обычный компонент многих биоэлектрохимических и тканеинженерных систем [9-11]. Активно развиваемые технологии биомедицины и тканевой инженерии ставят задачи оценки протеазной активности клеток *in situ*. Самостоятельной исследовательской задачей является изучение диффузионных свойств тканеинженерных скаффолдов в условиях разной интенсивности протеолиза для приближения их физико-химических параметров к межклеточному веществу [10-13]. Для решения этих задач применяются вольтамперометрические [4] и кондуктометрические [5] методы.

Целью настоящей работы стало исследование возможности детекции протеазной активности в модели электрохимического сенсора с использованием толуидинового синего в качестве электроактивной метки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основы для электрохимической модели использовали планарные электродные системы («Автоком», Москва, Россия), включающие рабочий и вспомогательный электроды – графитовые, электрод сравнения – хлорсеребряный. Перед измерениями электроды подвергали циклированию (+1000...–1000 мВ) в среде рабочего электролита для стабилизации характеристик. Затем на поверхность рабочего электрода наносили 2 мкл. раствора желатина (3 % масс.) и оставляли во влажной камере для формирования гидрогеля.

Электрохимические измерения производили в режиме циклической вольтамперометрии (ЦВА) на потенциостате-микроамперметре «Эколаб-2А» (ООО «Эковектор», Ижевск, Россия). Использовался диапазон потенциалов 0...+500 мВ при температуре 20-25 °С в условиях естественного насыщения электролита кислородом. Измерения проводились в течение 40-55 минут через каждые 5 минут. В качестве фонового электролита во всех измерениях использовали фосфатно-солевой буфер (рН = 7,3). Конечная концентрация толуидинового синего (ТС) в ячейке для всех экспериментов была постоянной (10^{-3} М). Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода. На графиках положительные токи соответствуют процессам восстановления, а отрицательные токи – процессам окисления. Данные электрохимических измерений обрабатывали с помощью программ *MS Excel 2010* и *Origin 6.1*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предметом исследований на первом этапе стало электрохимическое поведение толуидинового синего в среде фосфатно-солевого буферного раствора на графитовом электроде. На рисунке 1 представлена типичная вольтамперограмма ЦВА. В диапазоне –200...+600 мВ ТС формирует два отчетливых пика. В области потенциалов +200...+300 мВ – пик восстановления, а в области +300...+100 мВ – пик окисления.

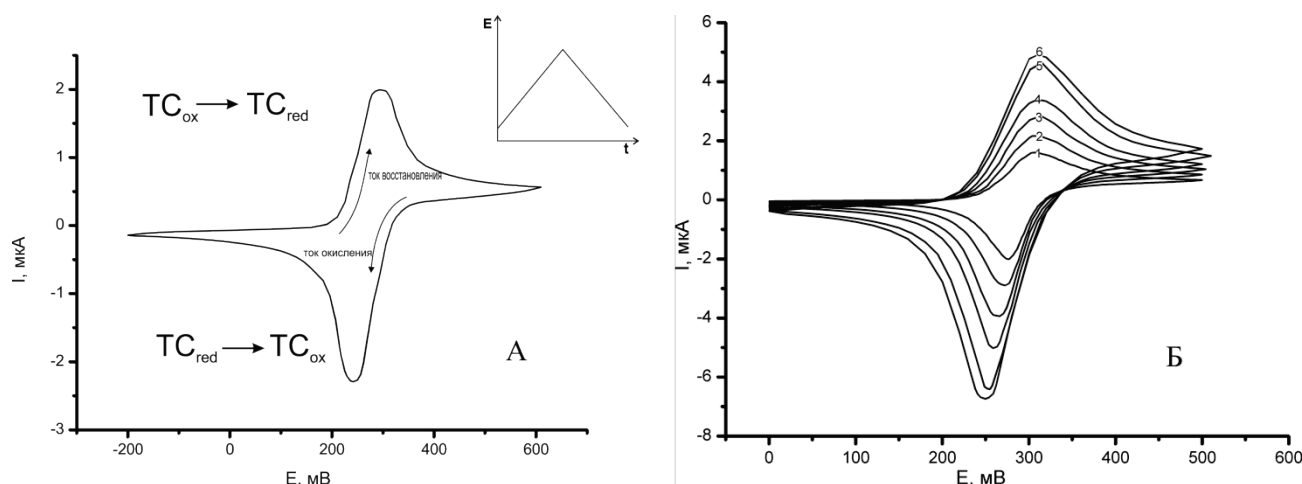


Рисунок 1. Вольтамперные кривые циклической вольтамперометрии, характеризующие электрохимическое поведение толуидинового синего в среде фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,3): А – типичная вольтамперная зависимость с характерными пиками окисления/восстановления и соответствующими редокс-переходами красителя (на врезке – изменения потенциала в ходе измерения); Б – вольтамперные кривые редокс-превращений толуидинового синего при различных скоростях сканирования потенциала: 1 – 10 мВ/с, 2 – 25 мВ/с, 3 – 45 мВ/с, 4 – 60 мВ/с, 5 – 95 мВ/с, 6 – 130 мВ/с

Формирование пиков обусловлено электрохимическими окислительно-восстановительными реакциями, происходящими на поверхности электрода. Фенотиазиновые красители характеризуются хорошей адсорбцией на углеродных материалах [14]. Адсорбированные молекулы, при достижении в ходе сканирования соответствующих потенциалов, отдают или принимают электроны, формируя характерные пики, регистрируемые в ходе измерения (рис. 1А).

По данным ЦВА, ТС характеризуется обратимым электрохимическим поведением, что подтверждается близкими по абсолютным значениям пиками окисления ($I_{p^{ox}} = 2,18$ мкА) и восстановления ($I_{p^{red}} = 1,79$ мкА), $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}} = 1,2$, а также близкими значениями потенциалов пиков ($E_{p^{ox}} = 235$ мВ; $E_{p^{red}} = 294,9$ мВ; $\Delta E = 59,9$ мВ). Определение зависимости пиковых значений силы тока от скорости сканирования потенциала показало близкий к линейному рост значений силы тока при повышении скорости сканирования (рис. 1Б). При этом отношение токов окисления к токам восстановления изменяется незначительно. Зависимость тока восстановления (I) от скорости развертки потенциала (v) аппроксимируется уравнением:

$$I = 0,46\sqrt{v} - 0,13,$$

с коэффициентом достоверности аппроксимации $R^2 = 0,99$, что позволяет связать рост показателей силы тока с диффузионными процессами.

Таким образом, для системы «толуидиновый синий-графитовый электрод» в условиях физиологических значений ионной силы и pH раствора характерно электрохимическое поведение, близкое к нернстовскому переносу заряда, при котором ток лимитируется диффузией электроактивного вещества и значением потенциала рабочего электрода, а не скоростью электрохимической реакции. Это позволяет использовать показатели силы тока для оценки диффузии красителя в белковом гидрогеле.

Процесс диффузии ТС в желатиновом геле описывается серией вольтамперограмм ЦВА, полученных с интервалом 5 минут после внесения красителя, и характеризуется ростом пиковых значений силы тока во времени при постоянной скорости сканирования потенциала (рис. 2, 3).

Желатиновый гель в используемой концентрации достаточно хорошо проницаем для электроактивной метки – практически сразу после внесения раствора красителя на вольтамперограммах отмечаются характерные пики окисления/восстановления (рис. 2А). Электрохимические превращения ТС в среде желатинового гидрогеля зависят от диффузионных ограничений. По сравнению с процессами, происходящими в отсутствие желатина, отмечается сдвиг значений потенциалов, соответствующих пикам окисления и восстановления, и увеличение разности между ними ($E_{p^{ox}} = 210$ мВ; $E_{p^{red}} = 255,2$ мВ; $\Delta E = 45,2$ мВ). При этом рост пиковых значений силы тока превышает показатели, полученные в среде фосфатно-солевого буферного раствора, достигая абсолютных значений $I_{p^{ox}} = 7,55$ мкА и $I_{p^{red}} = 4,45$ мкА. Изменяется соотношение пиковых токов в среде желатинового гидрогеля: $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}} = 1,7$. Сила тока растет во времени, отражая диффузию ТС к поверхности электрода (рис. 3А). К 10-й минуте эксперимента скорость изменений силы тока снижается (рис. 3Б). Отметим, что подобные свойства демонстрируют и другие фенотиазиновые красители – например, метиленовый синий в среде агарозного геля [9].

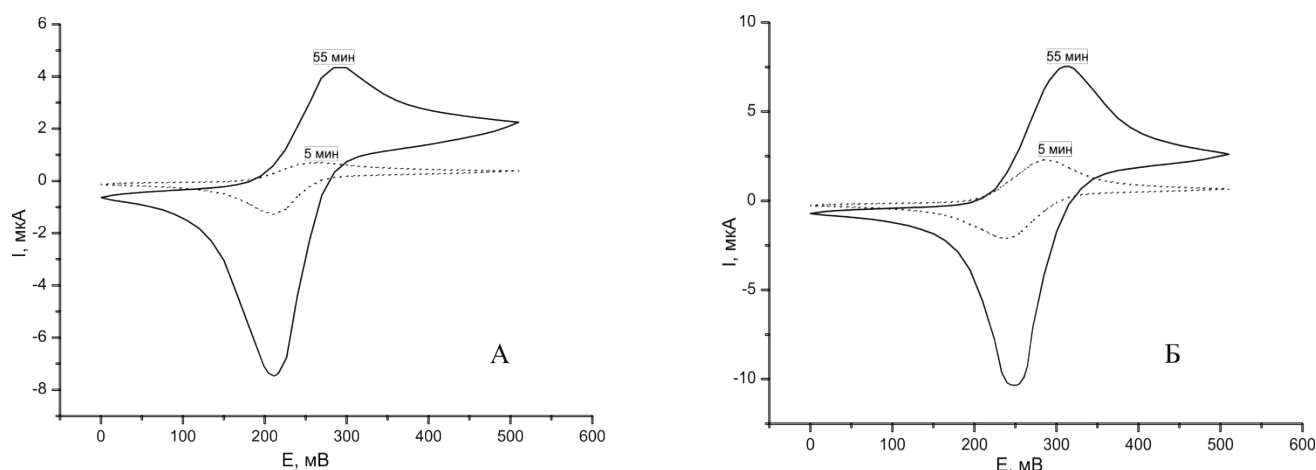


Рисунок 2. Вольтамперные кривые циклической вольтамперометрии, характеризующие электрохимическое поведение толуидинового синего в среде желатинового геля (3 % масс.) во времени. А – при отсутствии раствора трипсина; Б – при внесении раствора трипсина. Показаны первый (5 мин.) и последний (55 мин.) циклы

Внесение в ячейку раствора трипсина в концентрации 0,08 % (масс.) привело к изменению характера зависимости «ток-время» (рис. 2, 3). Очевидно, внесение трипсина существенно облегчает диффузию ТС в желатиновом геле, что отражается в характере вольтамперных кривых. Происходит сдвиг значений потенциалов ($E_{p^{ox}} = 239,9$ мВ; $E_{p^{red}} = 285,1$ мВ), при этом ΔE остается без изменений (45,2 мВ). Абсолютные значения силы тока через 5 минут после начала измерений превышают показатели, полученные в среде желатинового гидрогеля: $I_{p^{red}} = 2,44$ мкА (без трипсина 1,01 мкА); $I_{p^{ox}} = 2,39$ мкА (без трипсина 1,33), а соотношение $I_{p^{ox}}/I_{p^{red}}$ становится равным 0,97, что может служить показателем снижения диффузионных ограничений и приближения электрохимического процесса к условиям обратимости.

Показатели зависимости « $I_{p^{red}}$ – время» стабилизируются быстрее, чем в отсутствие фермента, однако скорость изменения силы тока в присутствии трипсина неравномерна (рис. 3).

Таким образом, модификация поверхности планарного графитового электрода белковым гидрогелем формирует диффузионный барьер для электроактивной метки (толуидинового синего), который нарушается в процессе протеолиза. Уменьшение диффузионных ограничений вследствие протеолиза способствует повышению значений силы тока восстановления электроактивной метки. При избранном режиме измерений протеазная активность наиболее существенно влияет на показатели силы тока восстановления в первые 10 минут измерения.

Развитием предложенной модели может стать электрохимический сенсор протеазной активности для оценки ферментных препаратов, изолированных клеток и органотипических культур. Изменяя состав гидрогеля, можно оценивать специфичность протеазного катализа в отношении определенных белков. Используя электроактивные метки с разными диффузионными и адсорбционными свойствами, можно оценивать физико-химические свойства гидрогелевых сред различного состава.

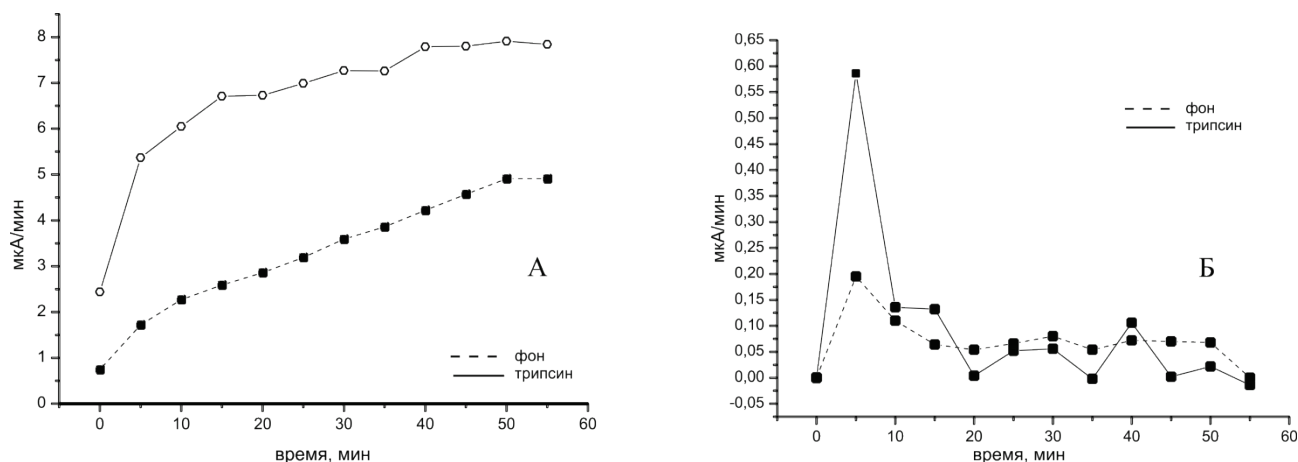


Рисунок 3. Изменение пиковых значений силы тока восстановления толуидинового синего в среде желатинового геля во время эксперимента и влияние на этот процесс трипсина. А – рост пиковых токов восстановления; Б – скорость изменения силы тока во время эксперимента

Список литературы / References:

1. Heiskanen A., Emnéus J. Monitoring of Cellular Dynamics with Electrochemical Detection Techniques. *Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine I*, ed. Eliaz N., 2011, vol. 52, no. 52, pp. 1-104.
2. Goldin M.M., Khubutia M.Sh., Evseev A.K., Goldin M.M., Pinchuk A.V., Pervakova, El.I., Tarabrin Y.A., Hall P. J. Noninvasive Diagnosis of Dysfunctions in Patients After Organ Transplantation by Monitoring the Redox Potential of Blood Serum. *Transplantation*, 2015, vol. 99, no. 6, pp. 1288-1292.
3. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А.В., Агафонова Л.Е., Арчаков А.И. Электрохимические методы в биомедицинских исследованиях. *Биомедицинская химия*, 2015, т. 61, № 2, с. 188-202. [Shumyanceva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Kuzikov A.V., Agafonova L.E., Archakov A.I. Electrochemical methods for biomedical investigations. *Biomeditsinskaya himiya*, 2015, vol. 61, no. 2, pp. 188-202. (In Russ.)]
4. Stoytcheva M., Zlatev R., Cosnier S., Arredondo M. Square wave voltammetric determination of trypsin activity. *Electrochim. Acta, Elsevier*, 2012, vol. 76, pp. 43-47.
5. Ionescu R.E., Fillit C., Jaffrezic-Renault N., Cosnier S. Urease-gelatin interdigitated microelectrodes for the conductometric determination of protease activity. *Biosens. Bioelectron. Elsevier*, 2008, vol. 24, no. 3, pp. 489-492.
6. Karpenko M.N., Abdurasulova I.N., Klimenko V.M. Calpain Activity in Spinal Cord Cells from Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis of Different Grades. *Neurosci. Behav. Physiol. Springer*, 2011, vol. 41, no. 3, pp. 252-258.
7. Ricci S.D.V., Oriente F., F.P., Di C.A. Substrate-zymography: A still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, vol. 54, no. 8, pp. 1281-1290.
8. Deshmukh A.A., Weist J.K., Leight L. Detection of proteolytic activity by covalent tethering of fluorogenic substrates in zymogram gels. *Biotechniques*, 2018, vol. 64, no. 5, pp. 203-210.
9. Черенков И.А. Кропачева Т.Н. Перевозчиков Е.А. Сергеев В.Г. Электрохимическая оценка метаболической активности клеток родококков, иммобилизованных на планарном графитовом электроде. *Технологии живых систем*, 2015, т. 12, № 2, с. 12-19. [Cherenkov I.A. Kropacheva T.N. Perevozchikov E.A. Sergeev V.G. Electrochemical assessment of metabolic activity of rhodococcal cells immobilized on planar graphite electrode. *Tekhnologii zhivyyh sistem*, 2015, vol. 12, no. 2, pp. 12-19. (In Russ.)]
10. Fonseca K.B., Bidarra S. J., Oliveira M. J., Granja P. L., Barrias C. C. Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2011, vol. 7, no. 4, pp. 1674-1682.
11. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Zimmermann H., Petrenko A.Y. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: Adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2014, vol. 25, no. 3, pp. 857-871.
12. Bahmanzadeh S., Ruzgas T., Sotres J. Proteolytic degradation of gelatin-tannic acid multilayers. *J. Colloid Interface Sci.*, 2018, vol. 526, pp. 244-252.
13. Sánchez P., Pedraz J.L., Orive G. Biologically active and biomimetic dual gelatin scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V.*, 2017, vol. 98, pp. 486-494.
14. Karyakin A.A., Karyakina, E.E., Schmidt H.-L. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers. *Electroanalysis*, 1999, vol. 11, no. 3, pp. 93-110.

MODELING PROTEASE ACTIVITY USING THE ELECTROCHEMICAL INTERFACE

Cherenkov I.A., Raevskih K.S., Sergeyev V.G., Krivilev M.D.

Udmurtia State University

Universitetskaya str., 1, Ijevsk, 426034, Russia; e-mail: ivch75@yandex.ru

Abstract. A bioelectrochemical model for assessment of protease activity which based on detection of reduction currents of electroactivity compounds (toluidine blue), diffusing through gelatin gel, was come up. The electrochemical behavior of toluidine blue in gelatin gel is characterized by increase in the peak values of current in time and shift in potential of peak values of the current relative to the parameters obtained in the phosphate buffered saline. Introduction of trypsin in the electrochemical cell in concentration of 0,08 % (wt.) led to a change in nature of current-time relationship, which reflects a decrease in diffusion limitation. An indicator of protease catalysis in this model were the values of the reduction current and the rate of change in the current. The most significant changes in the current-potential curve were observed by the 10th minute of experiment. The development of the described model can be an electrochemical sensor of protease activity for the evaluation of enzyme preparations and cell cultures.

Key words: cyclic voltammetry, trypsin, phenothiazine dyes, hydrogels.

СВЕТОДИОДНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ КРАСНОГО И ЗЕЛЕННОГО ДИАПАЗОНОВ УВЕЛИЧИВАЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И МОДУЛИРУЕТ РАБОТУ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАНИХ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ

Чернов А.С.¹, Ковалицкая Ю.А.², Василов Р.Г.¹

¹ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123098, Россия; e-mail: alexandrchernov1984@gmail.com

²Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии

им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

пр. Науки, д. 6, Пуццо, 142290, Россия

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Измерен уровень митохондриального потенциала у доимплантационных эмбрионов мыши на стадии зиготы, 2-х, 4-х и 8-ми бластомеров. Показано, что под воздействием светодиодного зеленого ($\lambda_{\max} = 520$ нм) и красного ($\lambda_{\max} = 635$ нм) света в 2-х клеточных эмбрионах происходят изменения, сопровождающиеся ростом экспрессии генов пролиферации, репарации ДНК и антиапоптотических маркеров. Зеленый свет увеличивает жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов и приводит к увеличению митохондриального потенциала.

Ключевые слова: доимплантационные эмбрионы, низкоинтенсивное световое излучение, биоэлектрические сигналы, митохондриальный потенциал, экспрессия генов.

ВВЕДЕНИЕ

В физиотерапии, относительно недавно, сформировалось новое направление фотохромотерапия - лечение светодиодным светом, принцип которого основан на использовании узкополосного низкоинтенсивного излучения различных диапазонов видимого спектра, при чем механизм действия и проявляющиеся эффекты, как, оказалось, были схожи с таковыми при облучении НИЛИ [1]. Большой потенциал и перспективность использования низкоинтенсивного светового излучения в регенеративной медицине были доказаны в программной работе Ф. Лин и соавт. [2]. В настоящее время, в большинстве работ воздействие света на живые объекты описано лишь феноменологически, и не показано за счет каких внутренних механизмов реализуется стимулирующее воздействие света. Пролиферативный эффект светового воздействия (красного и ИК-спектра) описан для разных типов клеток: фибробластов [3]; кератиноцитов [4]; остеобластов и остеобластоподобных клеток [5, 6]; лимфоцитов [7]; стволовых клеток мезенхимы и кардиомиоцитоподобных стволовых клеток [8]; Шванновских клеток [9]; гладкомышечных клеток аорты [10]; эндотелиальных клеток вен [11] и артерий [12]. Ранее нами было показано, что преобразованный красный свет с дополнительной оранжево-красной компонентой (620-750 нм) способен оказывать положительное действие на жизнеспособность и функциональное состояние ранних эмбрионов мыши [13]. При этом одним из возможных механизмов воздействия света рассматривалось формирование в среде сверхмалых доз АФК (перекиси водорода и гидроксил радикала) [14] и изменение работы генетического аппарата с увеличением экспрессии генов пролиферации [15].

Рядом авторов было установлено, что дыхательная цепь митохондрий в животных клетках может активироваться светом. Так, цитохром С-оксидаза поглощает свет в красной, инфракрасной и фиолетовой областях, НАДН-дегидрогеназа поглощает свет в синей области, а цитохромы b и c1 способны поглощать свет в зеленой области спектра [16-18]. Облучение светом с длинами волн 602 нм, 632,8 нм, 650 нм и 725 нм увеличивает синтез АТФ в изолированных митохондриях [19]. Освещение светом с длиной волны 633 нм увеличивает мембранный потенциал митохондрий и протонный градиент, вызывая изменение в оптических свойствах митохондрий, увеличивает скорость обмена АДФ/АТФ, повышает продукцию АФК и NO, а также инициирует работу внутриклеточных сигнальных каскадов, ответственных за клеточную пролиферацию и цитопротекцию [20-22].

В связи с вышеизложенным, ключом к пониманию наблюдаемых изменений жизнеспособности и пролиферативной активности клеток при облучении светом может быть изменение профиля экспрессии генов в ответ на световое воздействие [23, 24], которое в свою очередь обусловлено изменением функционального состояния митохондрий в клетке. Целью работы было исследовать воздействие светодиодного красного ($\lambda_{\max} = 635$ нм) и зеленого ($\lambda_{\max} = 520$ нм) излучения на изменение уровня митохондриального потенциала и экспрессию ряда специфических генов в 2-клеточных эмбрионах мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 2-клеточные эмбрионы, выделенные из мышей линии BALB/c SPF-категории, полученных из биоресурсной коллекции «Питомник лабораторных животных», ФИБХ РАН. Эмбрионы выделяли по стандартной методике [25]. После облучения красным (диапазон излучения 600-650 нм, $\lambda_{\max} = 635$ нм) или зеленым (диапазон излучения 500-550 нм, $\lambda_{\max} = 520$ нм) светом в течение 15 минут (доза

облучения 175,2 мДж/см²) эмбрионы переносили в среду M16 (Sigma) и культивировали в течение 24 часов в стандартных условиях. Эмбрионы контрольной группы облучению не подвергались. Регистрацию митохондриального потенциала проводили с использованием флуоресцентного красителя Mitotraker Red CMXRos (MtR) (Thermo Fisher Scientific) через 2, 4, 8 и 24 ч после облучения. Электронные микрофотографии обрабатывали в программе ImageJ. Для всех изображений измеряли интегрированную плотность D (общую флуоресценцию, испускаемую от митохондрий, окрашенных MtR, выраженную в условных единицах) по формуле (1):

$$D = \sum_i^m \frac{P_i}{k}, \quad (1)$$

где m – общее число пикселей на микрофотографии для одного эмбриона; P_i – интенсивность свечения пикселей по шкале серой градаций (от 0 до 255) за вычетом фона; k – коэффициент пересчета (1000) [26].

Определение уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР-РТ. мРНК из эмбрионов выделяли через 2, 4, 8 и 24 ч после облучения используя готовые наборы реагентов фирмы «Силекс» (Россия). Определяли уровень экспрессии генов пролиферации (SOX2 – маркер плюрипотентности; регуляторов клеточного цикла (CCND1 и CDK2), репарации ДНК (GADD45A – блокатор развития и маркер повреждения ДНК; RAD52 – репарация поврежденной ДНК; ZSCAN4 – регулятор стабильности генома) и апоптотических маркеров (BCL2 – ингибитор апоптоза, CASP2 – активатор апоптоза, FLASLG – индукция апоптоза через взаимодействие с TNF), характерных для доимплантационных эмбрионов. Уровень транскрипции генов нормировали по среднему уровню экспрессии хаус-кипинг-генов β -актина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Полученные данные по экспрессии генов анализировали с помощью программы «ExpressionSuite 1.1.». Учитывались лишь те результаты, для которых изменения уровня экспрессии генов наблюдали при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью SigmaPlot методом дисперсионного анализа ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Используя флуоресцентный краситель Mitotraker Red, были определены базовые значения интегрированной плотности MtR (митохондриального потенциала) для зигот 752 ± 24 ($N = 36$), для 2-клеточных 805 ± 19 ($N = 40$), для 4-клеточных 713 ± 31 ($N = 33$) и для 8-клеточных эмбрионов 840 ± 22 ($N = 35$). В результате первого деления-дробления и при переходе к многоклеточности происходит увеличение митохондриального потенциала. Учитывая тот факт, что в результате дроблений пул митохондрий в каждом бластомере уменьшается с каждым клеточным делением вдвое [27, 28], мы должны были наблюдать пропорциональное снижение и уровня общей флуоресценции, однако этого не происходило. Возможно, подобный эффект обусловлен значительным увеличением дыхательной активности имеющихся митохондрий в 2- и 8-клеточных эмбрионах.

После облучения 2-клеточных эмбрионов ($N = 40$) красным светом (рис. 1) значение уровня митохондриального потенциала оставалось неизменным на протяжении 24 часов (771 ± 30) и было сопоставимо со значениями в контрольной группе (711 ± 86). Облучение 2-клеточных эмбрионов ($N = 40$) зеленым светом (рис. 1) приводило к достоверному увеличению интегрированной плотности свечения флуоресцентного красителя (митохондриального потенциала). Спустя 24 часа после облучения уровень достиг 896 ± 59 , что было достоверно выше контрольных значений (711 ± 86) и значений в группе красного света (771 ± 30).

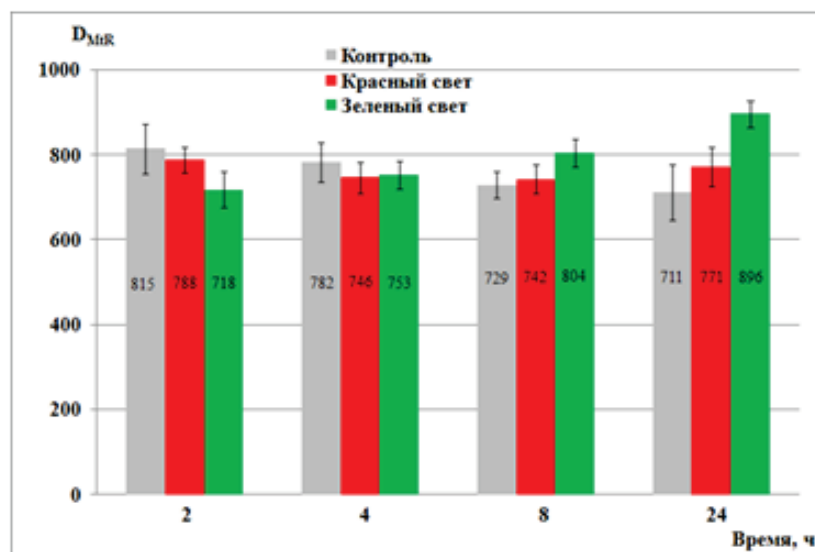


Рисунок 1. Изменение уровня митохондриального потенциала у 2-клеточных эмбрионов после облучения видимым светом

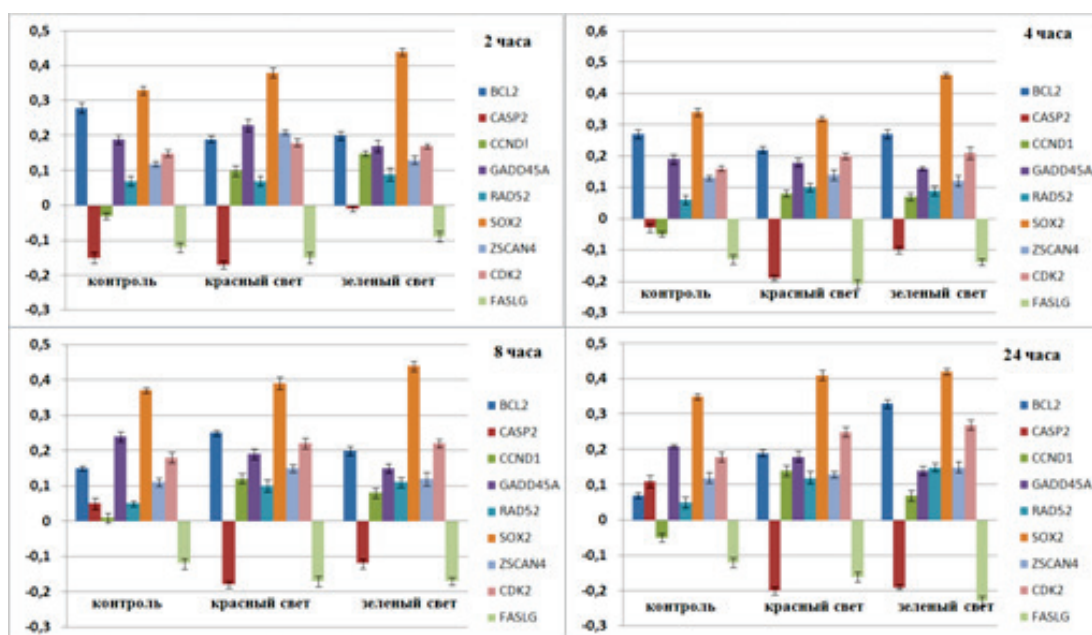


Рисунок 2. Уровень экспрессии генов в 2-клеточных эмбрионах мыши после облучения видимым светом

Анализ данных экспрессии основных генов показал, что по сравнению с эмбрионами контрольной группы, у эмбрионов, облученных красным и зеленым светом, через 8 часов (рис. 2) наблюдали рост экспрессии гена BCL2 (на 32 % для красного и на 65 % для зеленого), а у группы «Зеленый свет» рост продолжался вплоть до 24 часов (рис. 2). При этом в обеих опытных группах наблюдали снижение уровня экспрессии CASP2 (на 17 % для красного и на 90 % для зеленого). В контрольной группе наоборот, происходило значительное падение уровня экспрессии BCL2 и рост CASP2. BCL2 регулирует клеточную смерть путем контроля проницаемости митохондриальной мембраны. Ингибирует каспазы за счёт предотвращения выхода цитохрома C из митохондрий и/или за счёт связывания фактора, активирующего апоптоз. CASP2 кодирует белок, который активирует апоптоз и влияет на клеточный цикл. Из полученных результатов хорошо видно, что высокий процент гибели эмбрионов в контрольной группе связан с увеличением экспрессии CASP2 и подавлением экспрессии BCL2. При этом задействованные в механизме апоптоза митохондрии имеют тенденцию к снижению митохондриального потенциала (рис. 1), связанного с образованием на их мембране пор. Значение митохондриального потенциала может быть использовано, как прямой показатель жизнеспособности эмбриона при культивировании в условиях *in vitro*.

В течение 24 часов после облучения в опытных группах наблюдали также рост экспрессии RAD52 (на 90 % для красного и на 17 % для зеленого), отвечающей за репарацию поврежденной ДНК путем восстановления двунитевых разрывов ДНК за счет гомологичной рекомбинации. Как известно, повреждение ДНК может привести к возникновению мутаций, которые передадутся последующим поколениям клеток, и некоторые из таких мутаций могут обладать онкогенным потенциалом. Повреждение ДНК может также привести к запуску апоптозу [29]. В нашем случае, развивающиеся эмбрионы после облучения красным и зеленым светом меньше накапливают поврежденных ДНК, и имеют более высокий качественный генетический статус.

В результате воздействия на 2-клеточные эмбрионы зеленого света наблюдали падение экспрессии гена CCND1 на 46%, регулирующего клеточный цикл. В то время, как в группе контроля и красного света этот показатель оставался неизменным. Как показано [30], гиперэкспрессия белка и ген CCND1 рассматривают в качестве онкогена, приводящего к снятию ограничения по количеству делений у клеток и их перехода в онкогенную форму. Т.е. воздействие зеленого света на клетку способно предотвращать клеточное перерождение в онкогенные формы. Схожий эффект мы наблюдали при облучении зеленым светом раковых клеток MNNG, когда под действием света снижалась их туморогенность [15].

Еще одним основным отличием эмбрионов контрольной группы по сравнению с эмбрионами, подвергшимися облучению красным и зеленым светом, было увеличение уровня экспрессии гена SOX2, который характеризует плюрипотентное состояние эмбрионов. SOX2 управляет превращением стволовых клеток в самые разные клетки организма, от мышечных до нервных. Значимые изменения уровень экспрессии гена ZSCAN4 были обнаружены только для группы эмбрионов после воздействия красного света спустя 24 часа культивирования (рис. 2). ZSCAN4 является блокатором развития и маркером повреждения ДНК. Объяснить подобный эффект не удалось, поскольку по морфологическим показателям и значению митохондриального потенциала эмбрионы были хорошего качества. Уровень экспрессии GAD45A не изменялся во всех группах на протяжении всего времени эксперимента.

Подводя итог, можно говорить о том, что поглощение света различной длины волны, приводит к существенным изменениям в работе митохондрий. Это сопровождается каскадом вторичных реакции (рис. 3)

как в цитоплазме и ядре, так и в мембране [31], и в конечном итоге активирует транскрипционные факторы, которые приводят к росту пролиферативного потенциала клеток, увеличению подвижности и активности, синтезу ростовых факторов.

В заключении, можно говорить о том, что красный свет в диапазоне 600-650 нм и зеленый свет в диапазоне 500-550 нм способны регулировать развитие 2-клеточных эмбрионов мыши через активацию экспрессии основных генов развития, при чем зеленый свет дополнительно управляет развитием через митохондриальный потенциал, предположительно за счет активации работы комплекса III митохондрий [17].

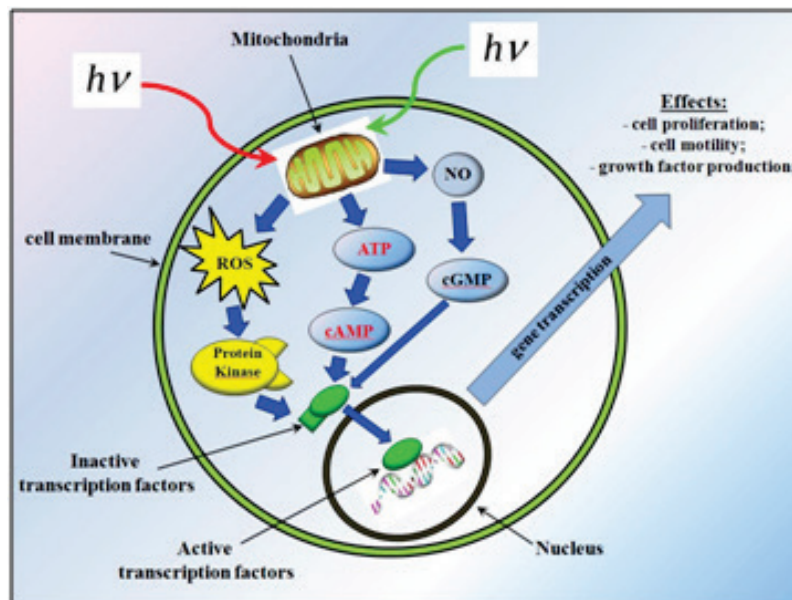


Рисунок 3. Механизм воздействия светодиодного излучения на функциональное состояние доимплантационного эмбриона мыши

Список литературы / References:

1. Karu T.I. Stimulation of Metabolic Processes by Low-Intensity Visible Light. *Laser Applications in Medicine, Biology, and Environmental Science*, 2003, vol. 5149, pp. 60-66.
2. Lin F., Josephs S.F., Alexandrescu D.T., Ramos F., Bogin V., Gammill V., Dasanu C.A., De Necochea-Campion R., Patel A.N., Carrier E., Koos D.R. Lasers, stem cells and COPD. *J. Translat. Med.*, 2010, vol. 8, pp. 16-25.
3. Sheiko E.A., Shikhlyarova A.I., Zlatnik E.Yu., Zakora G.I. Effect of monochromatic light of low intensity on L929 skin fibroblast culture. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, vol. 141, no. 6, pp. 738-740.
4. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*, 1998, vol. 22, no. 4, pp. 212-8.
5. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.*, 2005 vol. 2, pp. 161-166.
6. Fujihara N.A., Hiraki K.R., Marques M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.*, 2006, vol. 38, no. 4, pp. 332-6.
7. Stadler I., Evans R., Kolb B., Naim J.O., Narayan V., Buehner N., Lanzafame R.J. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med.*, 2000, vol. 27, no. 3, pp. 255-61.
8. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.*, 2007, vol. 39, no. 4, pp. 373-8.
9. Van Breugel HH, Bär PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. *J Neurocytol*, 1993, vol. 22, no. 3, pp. 185-90.
10. Gavish L., Perez L., Gertz S.D. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med.*, 2006, vol. 38, no. 8, pp. 779-86.
11. Schindl A., Merwald H., Schindl L., Kaun C., Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*, 2003, vol. 148, no. 2, pp. 334-6.
12. Mirsky N., Krispel Y., Shoshany Y., Maltz L., Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal*, 2002, vol. 4, no. 5, pp. 785-90.

13. Chernov A.S., Reshetnikov D.A., Fakhranyrova L.I., Manokhin A.A., Davydova G.A., Selezneva I.I., Khramov R.N. Stimulation of development of early mice embryos by the artificial sunlight supplemented with fluorescent orange-red component. *Medline.ru.*, 2013, vol.14, no. 2, pp. 295-312.
14. Chernov A.S., Reshetnikov D.A., Manokhin A.A., Gudkov S.V., Khramov R.N. Influence of the artificial transformed sunlight on the preimplantation mouse embryos development in vitro. *Vestnik biotekhnologii i phisiko-khimicheskoi biologii im. Yu.A. Ovchinnikova.*, 2017, vol. 13, no. 1, pp. 42-49.
15. Ermakov A.M., Chernov A.S., Selezneva I.I., Poltavtseva R.A. A study of the impacts of low-intensity light irradiation in the red ($\lambda_{\max} = 635$ nm) and green ($\lambda_{\max} = 520$ nm) ranges on the proliferative activity and gene expression profiles of MNNG/hos cells and human fetal fibroblasts. *Biophysics*, 2017, vol. 62. no. 1, pp. 63-67.
16. Karu T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem Photobiol B.*, 1999, vol. 49, no. 1, pp. 1-17.
17. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry. 5th edition. Section 18.5.* New York, 2002, 321 p.
18. Buravlev E.A., Zhidkova T.V., Vladimirov Y.A., Osipov A.N. *Lasers Med Sci.*, 2014, vol. 28, no. 3, pp. 785-790.
19. Passarella S., Casamassima F., Molinari S. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne-laser. *FEBS Lett.*, 1994, vol. 175, pp. 95-99.
20. Karu T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem. Photobiol.*, 2008, no. 84, pp. 1091-1099.
21. Lavi R., Shainberg A., Friedmann H. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 42, pp. 40917-40922.
22. Passarella S., Perlino E., Quagliariello E. Evidence of changes induced by He-Ne-laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1993, no. 10, pp. 185-198.
23. Chen A.CH., Hamblin M. [et al.] Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. *SPIE Newsroom*, 2009, no. 9, pp.1-3.
24. Houreld N.N. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. *ScientificWorldJournal*, 2014, vol. 2014: p398412, DOI: 10.1155/2014/398412.
25. Chernov A.S., Davidova G.A., Kovalitskaya Y.A. Investigation of beta-endorphin reception in preimplantation development of a mouse embryo in vitro. *Rus. J. of bioorganic chemistry*, 2012, vol. 38, no. 2, pp. 177-183.
26. Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kucia M., Uzarowska A. *Theriogenology*, 2017, no. 102, pp. 1-9.
27. Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., Griffin E.E., Fraser S.E., Chan D.C. *J. Cell Biol.*, 2003, no. 160, pp. 189-200.
28. Roos W.P., Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.*, 2006, vol. 12, no. 9, pp. 440-50.
29. Poot M., Gibson L.L., Singer V.L. Detection of Apoptosis in Live Cells by MitoTrackery Red CMXRos and SYTO Dye Flow Cytometry. *Cytometry*, 1997, no. 27, pp. 358-364.
30. Mazyrenko N.N. Gene Genetic features and markers of a melanoma of skin. *Yspechi molekylarnoi onkologii*, 2014, vol. 2, pp. 26-35.
31. Chernov A.S., Teplov I.U., Vasilov R.G. Role of the transmembrane potential in preimplantation mammalian embryos. *Actual'nye voprosy biologicheskoi phisiki i khimii*, 2017, vol.2, no. 1, pp. 96-99.

RED AND GREEN RANGE OF LED IRRADIATION OF INFLUENCE ON MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL AND WORK OF GENETIC APPARATUS IN EARLY MICE EMBRYOS**Chernov A.S.¹, Kovalitskaya Yu.A.², Vasilov R.G.¹**¹National Research Center «Kurchatov Institute»,*Ac. Kurchatov sq., 1, Moscow, 123098, Russia; e-mail: alexandrchernov1984@gmail.com*²Branch of Shemyakin and Ovchinnikov institute of bioorganic chemistry RAS*Nauki dis., 6, Pushchino, 142290, Russia*

Abstract. Level of mitochondrial potential for the preimplantation mice embryos at a zygote stage, the 2-cell, the 4-cell and 8-cell was established. Our data indicate that the green light increase viability of 2-cell embryos and contributed to increase of mitochondrial potential. Under the influence of green ($\lambda_{\max} = 520\text{nm}$) and red ($\lambda_{\max} = 635\text{nm}$) light from light-emitting diodes contributed to increase of an expression of genes of a proliferation, reparation of DNA and anti-apoptotic markers in 2-cell mice embryos.

Key words: *pre-implantation embryos, low-intensity light radiation, bioelectric signals, mitochondrial potential, gene expression.*

АКУСТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ УРОВНЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ДНА ВОДОЕМА

Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Петренко Н.В.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Наличие газовых пузырьков в дне мелководных морских и пресноводных водоемов существенно снижает скорость звука. Количество газа в дне зависит от микробиологической активности, и поэтому уровень загрязнения является индикатором экологического баланса. В работе предлагается контролировать уровень загрязнения дна методом измерения коэффициента отражения звука или измерения входного импеданса дна. Вычисляются частотно-угловые зависимости коэффициента отражения и частотные зависимости входного импеданса дна. Показывается, что принципиальным моментом верной интерпретации результатов является учет межгранулярного трения и дисперсии скорости звука в морских осадках.

Ключевые слова: морские осадки, дисперсия фазовой скорости, межгранулярное трение, газонасыщенные осадки, коэффициент затухания, коэффициент отражения, импеданс дна.

ВВЕДЕНИЕ

Акустические волны в области шельфа распространяются в естественном волноводе, образованном слоем воды, ограниченным сверху абсолютно отражающей свободной поверхностью, снизу – частично отражающим дном. Волноводные условия распространения звука, когда дно является главным фактором, определяющим пространственную и временную структуру звукового поля, получили название «условия мелкого моря», а раздел акустики океана, решающий задачи о распространении звука преимущественно волновыми методами – акустика мелкого моря. В объекты исследования акустики мелкого моря входит акустика морского дна и морских осадков; донная морфология – объемные неоднородности, шероховатость поверхности дна (рябь); слоистая структура дна; акустические характеристики морских осадков. От этих параметров зависят коэффициенты отражения, прямого и обратного рассеяния, времена реверберации, результирующее поглощение звука дном [1, 2].

Дно мелководной части Черного моря не только вмещает немалые природные и культурные ресурсы, но и является накопителем антропогенных биологических и иных видов загрязнений. Основной природный ресурс дна мелкого моря – песок, хищническая добыча которого наносит непоправимый вред пляжам Крыма, культурный – археологические артефакты, ожидающие своего обнаружения, а мониторинг экологического состояния дна перед началом курортного сезона должен быть так же обязателен, как и его водолазное обследование. Практически, дистанционный метод исследования ресурсов, структуры и состояния дна можно реализовать с помощью акустического профилирования и одновременного измерения частотных зависимостей коэффициента отражения [3, 4]. Необходимое условие адекватного истолкования результатов такого исследования – знание связи между акустическими и физическими характеристиками морских осадков.

Наибольший интерес представляет переходный слой дна толщиной несколько десятков метров, состоящий из неконсолидированных морских осадков типа песка, ила, глины, смеси разнообразных обломочных материалов. Неконсолидированные морские осадки состоят из частиц несферической формы, гранулометрический состав которых может изменяться в весьма широком диапазоне – от самых тонкодисперсных глин до крупнозернистых песков и гравия. Вследствие пористости, слой осадков является водонасыщенным, а в загрязненных органикой, заиленных грунтах еще и газонасыщенным. В переходном слое будут оседать и всевозможные загрязнения, и располагаться полезные либо вредные артефакты. Газонасыщенный слой обычно имеет толщину несколько метров, его природа связана с активностью метано и сероводородобразующих бактерий. Степень газонасыщенности может служить индикатором экологического баланса водоема. Экспериментально были отмечены скорости звука в дне Балтийского моря 70-90 м/с, в дне Ивановского водохранилища – 200-250 м/с [4]. Пузырьки газа в дне устойчивы благодаря покрывающим их пленкам и имеют средние размеры 0,01-0,1 мм.

В такой среде могут распространяться упругие волны двух типов: продольная (компрессионная) и поперечная (сдвиговая) [1, 2]. Акустическими характеристиками этих волн являются фазовые скорости, коэффициенты затухания и их частотные зависимости.

Используемый гидроакустическими системами профилирования дна частотный диапазон звуковых волн заключается в границах от десятков герц до 50 кГц с хорошим запасом. Внутри этого диапазона оказывается «переходная» область, в которой регистрируется наибольшая дисперсия скорости звука в осадках.

Простейшие модели морских осадков. Формула Вуда. В самой верхней части переходного слоя морские осадки представляют собой практически суспензию – самые верхние частицы прижаты к нижележащим только собственным весом. Волновое число и скорость звука в суспензии с пористостью P описывается формулой Вуда:

$$k_0^2 = \omega^2 \frac{\rho_m}{K_m}, \quad c_0 = \sqrt{\frac{K_m}{\rho_m}}, \quad (1)$$

где K_m – объемный модуль упругости среды (суспензии),

$$\frac{1}{K_{m(ean)}} = \frac{P}{K_f} + \frac{1-P}{K_g}, \quad (2)$$

$\rho_{f,g}$, $K_{f,g} = \rho_{f,g} c_{f,g}^2$ – плотности и модули упругости флюида и твердой фазы соответственно; $\rho_m = P\rho_f + (1-P)\rho_g$ – аддитивная плотность среды.

В случае присутствия пузырьков газа или иных примесей состав отложений можно описать многокомпонентной моделью среды. Скорость распространения продольных волн c_0 в многокомпонентной среде будет выражаться через равновесные по объему значения плотности ρ_m и сжимаемости K_m^{-1} в соответствии с (2), только плотность и сжимаемость следует вычислять суммированием соответствующих парциальных компонент среды:

$$\rho_m = \phi_1 \rho_1 + \phi_2 \rho_2 + \phi_3 \rho_3 + \dots, \quad \frac{1}{K_m} = \frac{\phi_1}{K_1} + \frac{\phi_2}{K_2} + \frac{\phi_3}{K_3} + \dots, \quad (3)$$

где $\phi_{1,2,3} = V_{1,2,3}/V$ – относительный объем составляющих, причем $\phi_1 + \phi_2 + \phi_3 = 1$; V – полный объем среды.

Таким образом, скорость звука в трехкомпонентной среде будет равна

$$c_0 = \left[\left((1-P)\rho_g + (P-\phi)\rho_f + \phi\rho_a \right) \left((1-P)K_g^{-1} + (P-\phi)K_f^{-1} + \phi K_a^{-1} \right) \right]^{-1/2}, \quad (4)$$

где обозначения такие, как и в (2), кроме ϕ , ρ_a , K_a – объемная доля, плотность и давление газа.

Если известны плотности и скорости звука для парциальных сред, то можно из (4) исключить сжимаемости и получить итоговое выражение для скорости в следующем виде:

$$c_0 = \left[\left((1-P)\rho_g + (P-\phi)\rho_f + \phi\rho_a \right) \left(\frac{1-P}{\rho_g c_g^2} + \frac{(P-\phi)}{\rho_f c_f^2} + \frac{\phi}{\rho_a c_a^2} \right) \right]^{-1/2}. \quad (5)$$

На рис.1 показаны графики зависимости скорости звука в трехкомпонентной воде и газо-содержащей среде от относительного содержания газа. Физические параметры среды, для которых выполнен расчет будут приведены ниже.

Приведенные результаты расчетов, которые подтверждаются также и опытными данными, показывают, что даже небольшое содержание газа в грунте приводит к существенному уменьшению скорости звука. Объемная плотность же при этом сохраняется соответствующей основной компоненте – среда в целом проявляет свойства газа необычайно высокой плотности.

Метод оценки уровня биологического загрязнения. Газонасыщенность дна метаном, сероводородом, свидетельствует либо о газоносности слоя, либо о его загрязнении продуктами распада органики. В случае газоносности слоя, он обычно «прикрыт» сверху осадочным слоем, эта ситуация рассматриваться не будет, в случае загрязненности – этот слой граничит с водным. Пузырьки газа могут быть и не видны невооруженным взглядом, однако достаточно выкопать песок детской лопаткой с глубины 10 – 20 см, например на пляже «Омега», и его понюхать – результат не оставляет сомнений. Тот же опыт можно проделать на пляже «Учкуевка» – там чисто. Нюхать и копать песок на значительной глубине затруднительно.

Дистанционный акустический метод оценки газонасыщенности дна можно реализовать при измерении частотных и угловых коэффициентов отражения [2-4].

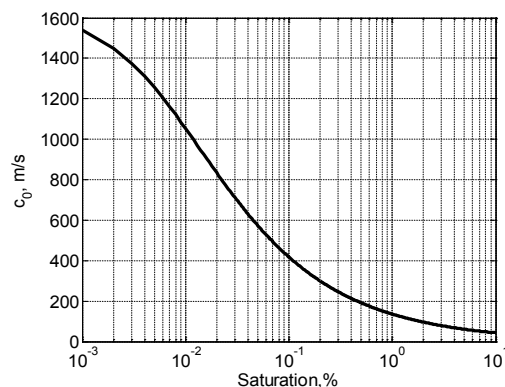


Рисунок 1. Зависимость скорости звука в среде вода+песок+газ от содержания газа

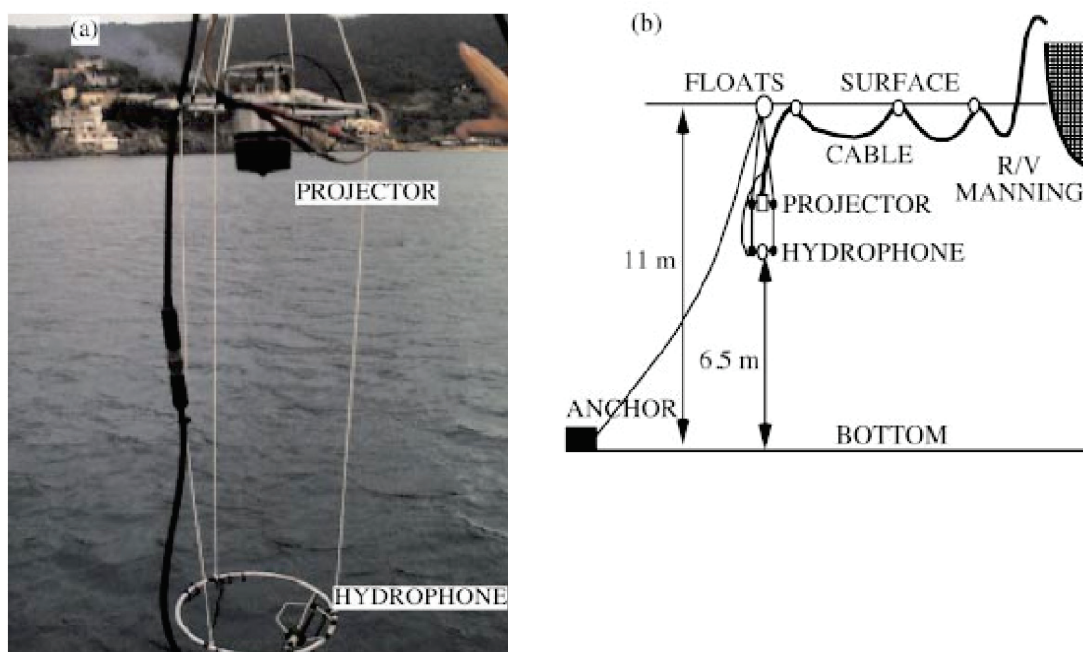


Рисунок 2. Внешний вид простейшего прибора для измерения коэффициента отражения (а) и схема его применения (b). Заимствовано из [5]

Наиболее подходящими гидроакустическими средствами для измерения коэффициентов отражения зарекомендовали себя узколучевые параметрические или ЛЧМ профилографы. Эти приборы используют вертикальное зондирование, что исключает эффект искривления звуковых лучей вследствие вертикальной изменчивости профиля скорости звука, а также обладают узкой (единицы градусов) диаграммой направленности [4]. Рабочие частоты этих приборов позволяют «озвучивать» площадки размером до десятка сантиметров. Кроме того, профилографы позволяют визуализировать внутреннюю структуру морского дна и расположенные в нем объекты культурного наследия [3]. А сгруппированные в линейку, могут и обеспечивать повышенную площадную производительность. На рис.2 показано, как может выглядеть простейший вариант кустарного прибора – измерителя коэффициента отражения [5].

Однако, чтобы количественно охарактеризовать или даже измерить уровень загрязнения дна, необходима адекватная **теория**, связывающая величину коэффициента отражения с акустическими и физическими характеристиками дна.

Акустическая модель морских осадков. Дно мелкого моря имеет сложную горизонтально-слоистую структуру, в которой переходный слой неконсолидированных газонасыщенных осадков располагается на слоях полуконсолидированных осадков и на фундаменте – упругом полупространстве [1]. В акустике мелкого моря, в первом приближении, сдвиговую волну считают не распространяющейся (жидкое дно), а скорость звука **не зависящей** от частоты, и представляют волновое число в каждом из слоев дна в виде

$$k_p = \frac{\omega}{c_p} - i\alpha_p = \frac{\omega}{c_p} (1 - i\beta_p), \quad (6)$$

где c_p – скорость звука; α_p – коэффициент затухания, Нп/м; β_p – тангенс угла потерь, $\beta_p = \frac{\alpha_p c_p}{\omega}$. Поскольку

вычисление коэффициентов отражения будет производиться в основном при условии «нормального» падения, возможность распространения сдвиговой волны здесь мы учитывать не будем. Однако, как показано в [6], и будет показано снова ниже, **принципиально важным** моментом в широкополосных расчетах, когда ставится задача инверсии акустических и физических характеристик дна, является правильное отображение частотных зависимостей фазовой скорости $c_p(f)$ и затухания $\alpha(f)$.

Для вычисления дисперсионно-диссипативных характеристик морских осадков здесь будет использоваться упрощенная модель «GS+F» теории [7,8], называемая «GS+ED» (Effective Density), в которой комплексная

фазовая скорость $\tilde{c}_p^2 = \frac{\omega^2}{k_p^2}$ или волновое число даются выражениями:

$$\tilde{c}_p = \sqrt{\frac{K_m + \gamma(i\omega)^n}{\rho_{eff}}}, \quad k_p^2 = \omega^2 \frac{\rho_{eff}}{K_m + \gamma(i\omega t_0)^n}, \quad \rho_{eff} = \rho_m - \frac{\phi \rho_f}{\xi} F_C(w), \quad (7)$$

где γ , Па – модуль межгранулярной жесткости; n – показатель стресс-релаксации; $\phi = \frac{s\xi\kappa}{\chi a^2}$ – перколяционная

пористость; ξ – извилистость; η – динамическая вязкость жидкости, Па·с; κ – проницаемость среды, м²; a – радиус цилиндрической поры; s – структурный коэффициент, зависящий от геометрии порового пространства; $\chi = \exp(\sigma^2)$, σ – среднеквадратичное отклонение размера пор в случае нормального закона распределения;

$F_C(w) = 1 - \frac{2J_1(i^{3/2}w)}{i^{3/2}wJ_0(i^{3/2}w)}$ – функция частотной коррекции, отражающая отличия характера течений в порах

от течения Пуазейля; $w = \sqrt{\frac{a^2 \rho_f}{\eta}} \omega$, $J_{0,1}$ – функции Бесселя.

Вещественные фазовые скорости $c_{p,s}$ и коэффициенты затухания $\alpha_{p,s}$ могут быть получены из комплексных фазовых скоростей как $c_{p,s} = \text{Re}(\tilde{c}_{p,s})$, $\alpha_{p,s} = -\omega \text{Im}(\tilde{c}_{p,s}^{-1})$, Нп/м.

Коэффициент отражения и «Bottom Loss». Комплексный коэффициент отражения определяется как $R = p_r / p_i$, где p_r , p_i – комплексные амплитуды давления в отраженной и падающей волне соответственно. Величина потерь при отражении от дна «Bottom Loss», BL, определяется как $BL = -20 \log_{10} R = 10 \log_{10} \langle |p_r|^2 \rangle / |p_i|^2$, где квадрат амплитуды отраженной волны осредняется по нескольким акустическим путям [2].

В рамках акустической модели пористого дна коэффициент отражения проще и эффективней всего вычислить через посредство нормальных импедансов как [9]

$$R = \frac{Z_{in} - Z_w}{Z_{in} + Z_w}, \quad (8)$$

где $Z_w = \rho_w / b_w$, $\rho_w = 1023$ кг/м³ – плотность воды, $b_w = k_w \sqrt{1 - (\sin \theta)^2}$ – вертикальное волновое число в воде, $k_w = \omega / c_w$, $\xi = k_w \sin(\theta)$ – горизонтальное волновое число, которое, как следует из граничных условий, везде одинаково, и в воде, и в донных слоях, $c_w = 1530$ м/с – скорость звука в водном слое, θ – угол падения плоской волны, Z_{in} – входной импеданс дна, зависящий от модели дна.

Модель дна и результаты инверсии физических характеристик. Для проведения расчетов принята модель дна в виде слоя газонасыщенного песка толщиной d , лежащего на полупространстве, состоящим из такого же, но чистого песка. Акустические и физические характеристики чистого песка принимались такими же, как и измеренные в ходе эксперимента SAX-99 (Sediment Acoustics eXperiment). Гранулометрические и физические параметры этого песка близки к соответствующим параметрам песка, собранного на пляже г. Феодосии (117 км). Согласно нашим представлениям, в этом случае должны совпадать и акустические характеристики. В ходе эксперимента SAX-99 были измерены различными системами и способами акустические характеристики среды – частотные зависимости фазовой скорости и затухания, что в рамках модели GS+ED позволило восстановить модуль межгранулярной жесткости, показатель стресс-релаксации и перколяционную пористость. Структурный коэффициент s был определен по сопоставлению пористости и проницаемости, параметр χ подбирался по наилучшему соответствию дисперсионной кривой с экспериментальными точками.

Входные параметры для инверсии следующие [10]: $d_0 = 0.379$ мм – диаметр гранул; $\rho_g = 2690$ кг/м³; $K_g = 3.2 \cdot 10^{10}$ Па; $\rho_f = 1023$ кг/м³; $K_f = 2.395 \cdot 10^9$ Па; $\eta = 1 \cdot 10^{-3}$ Па·с; $P = 0.385$; $\kappa = 2.5 \cdot 10^{-11}$ м²; $\xi = 1.35$; $a_0 = 2.65 \cdot 10^{-5}$ м. Дисперсионные кривые и экспериментальные точка показаны на рисунке 3.

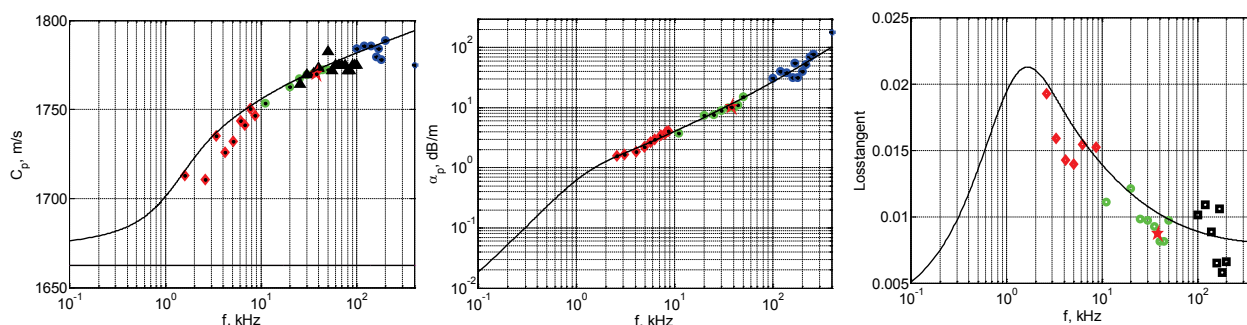


Рисунок 3. Результаты измерений эксперимента SAX-99 и дисперсионные кривые, восстановленные согласно модели GS+ED

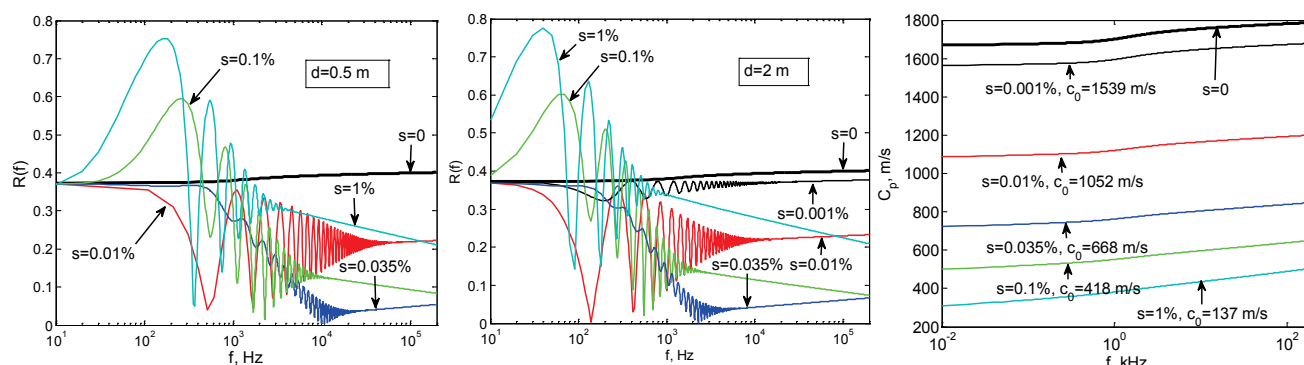


Рисунок 4. Частотные зависимости коэффициента отражения от дна и скорости звука в промежуточном слое при различных содержаниях газа

Результаты инверсии следующие: $a = 2,5 \cdot 10^{-5}$ м, $\gamma = 1,01 \cdot 10^8$ Па, $n = 0,104$, $s = 15$, $\chi = 3,3$, $\phi = 0,24$.

Для принятой здесь модели дна входной импеданс определялся по формуле [9]:

$$Z_{in} = \frac{Z_3 - iZ_2 \tan(-b_2 d)}{Z_2 - iZ_3 \tan(-b_2 d)} Z_2, \text{ где } Z_2 = \rho_m / b_2, \quad b_2 = \sqrt{k_{psat}^2 - \xi^2}, \quad Z_3 = \rho_m / b_3, \quad b_3 = \sqrt{k_p^2 - \xi^2}.$$

Здесь k_p и k_{psat} рассчитывались по (7.2), где K_m брались разные – в случае чистого песка – по (2), в случае газонасыщенного – по (3), (5).

Вычисление коэффициента отражения. Результаты расчетов. Коэффициент отражения вычислялся по формуле (8). Хотя волна, излучаемая источником – сферическая, диаграмма направленности приемника такова, что площадь отражающей озвученной поверхности составляет не более чем площадь первой зона Френеля.

Модель GS+ED учитывает два вида потерь: внутреннее (межгранулярное) и вязкое трение. При сатурации среды газом к перечисленным потерям добавляются специфические: $\beta_r = A \cdot \text{Re}(k_p)$ – потери на дипольное излучение при пульсации, A – сечение рассеяния; $\beta_h = B \cdot (\omega_0/\omega)^2$ – тепловые потери при совпадении частоты акустической волны с резонансной частотой пузыря; $\beta_s = 4 \sin(m\pi/2) / (\rho_m \omega^2 A^2)$ – сдвиговые потери в окружающей пузырек среде при его пульсации. Согласно [2] $\beta_r \approx 0,04$, $\beta_s = 0,07$, β_h возрастают с частотой, увеличиваясь в диапазоне от 10 Гц до 10 кГц от 0 до 0.03. По этой причине, учитывая аддитивность потерь, для восстановления k_p , в (1) должна быть сделана добавка специфических потерь. Однако, пока эти дополнительные потери не учитывались. Результирующие графики частотных зависимостей модуля коэффициента отражения и фазовой скорости звука в промежуточном трехкомпонентном слое показаны на рисунке 4.

Рассмотрим графики $c_p(f)$, вычисленные при различных уровнях сатурации слоя газом. Рядом с каждым графиком показаны соответствующие скорости, вычисленные в «бездисперсионном» приближении, по формуле (1.2), (4) или (5). Как видно, они **не совпадают**, даже на низких частотах. Это и понятно. Формулы (1.2), (4), (5), которыми обычно пользуются при аналогичных расчетах [4], дают скорость звука в суспензии, без внутреннего трения между частицами. Правильное выражение для $c_p(f)$ можно получить только из (7.1) с учетом межгранулярного трения. Нетрудно видеть, сравнивая графики $c_p(f)$ при различных уровнях насыщения слоя газом, что с ростом насыщения – т.е. при уменьшении K_m вклад межгранулярного трения возрастает (плотность то среды практически не меняется) и дисперсия скорости звука увеличивается. Этот первый важный сделанный здесь вывод показывает неадекватность расчетов коэффициента отражения от газонасыщенного дна [4] в рамках бездисперсионного приближения. Как следствие, и выполненные по какому бы то ни было алгоритму инверсии газонасыщенности возвратят неверный (заниженный) результат.

Рассмотрим теперь частотные зависимости коэффициента отражения (нормальное падение). Здесь можно выделить три частотные области: низкочастотная область, где нет осцилляций, область осцилляций и область затухания. В НЧ области длина волны в слое в сравнении с его толщиной велика, однако для каких-то измерений эта область непригодна по причине технической нереализуемости измерительной установки – излучатель должен иметь солидные размеры. Область осцилляций. Если набег фазы на толщине слоя равен целому числу полупериодов, т.е. $b_2 d = l\pi$, $l = 1, 2, \dots$, что при нормальном падении означает $d = l\lambda_2/2$, где $\lambda_2 = 2\pi/k_{psat}$ – длина звуковой волны в материале слоя, оказывается, что $Z_{in} = Z_3$. Следовательно, коэффициент отражения (8) равен $R = (Z_{in} - Z_w) / (Z_{in} + Z_w)$. Таким образом, полуволновой слой не оказывает никакого действия на падающую волну, коэффициент отражения такой же, как если бы его и не было. Если же $b_2 d = l\pi + \pi/2$, $l = 0, 1, 2, \dots$, то при нормальном падении и $l = 0$ это означает $d = l\lambda_2/4$, и $Z_{in} = Z_2^2 / Z_w$. Следовательно, коэффициент отражения (8) будет равен $R = (Z_2^2 - Z_3 Z_w) / (Z_2^2 + Z_3 Z_w)$. Полное прохождение ($R = 0$) будет при $Z_2 = (Z_3 Z_w)^{1/2}$ [9], и при $Z_{in} = Z_w$, чем и объясняется нетипичное поведение $R(f)$ при сатурации $s = 0,035\%$. Какие-либо измерения в этой области осцилляций невозможны.

С ростом частоты, длина волны, распространяющейся в промежуточном слое, уменьшается, акустическая длина пути растёт. Уменьшение амплитуды волны вследствие затухания приводит к тому, что

интерференционная картина вырождается. Промежуточный слой становится подобен полупространству. Здесь, вероятно, и стоит поискать возможности для измерений газонасыщенности.

Рассмотрим предварительно частотно-угловые зависимости коэффициента отражения при различных уровнях сатурации, показанные на рисунке 5. На верхней панели, слева – отсутствие газа в слое. Фазовая скорость изменяется в пределах от 1670 м/с до 1780 м/с (рис. 3), что дает изменение предельного угла падения θ в диапазоне частот «снизу-вверх» ($c_w = 1530$ м/с) от 67° до 59° . В этом диапазоне R резко возрастает от 0,4 (нормальное падение) до ~ 1 (скользящее падение). При сатурации газом зависимость $R(f)$ становится близкой к периодической с периодом $\Delta f \approx c_{psat}/2d$, что при $d = 0,5$ м дает $\Delta f \approx c_{psat}$, где c_{psat} (с, %) можно видеть на рисунке 4. Случай $s = 0,0018\%$ интересен следующим. При таком уровне насыщения слоя газом фазовая скорость c_{psat} на низких (до 2 кГц) частотах $c_{psat} < c_w$ – в этой ситуации не существует угла полного внутреннего отражения, на высоких частотах, наоборот, $c_{psat} > c_w$ – полное внутреннее отражение возможно. Следствием этой коллизии, возникающей за счет дисперсии скорости звука, является резкий «изгиб желобков», т.е. изменение частотного периода Δf осцилляций $R(f)$ при приближении угла падения к предельному. При остальных, больших уровнях насыщения газом, $c_{psat} < c_w$, и предельного угла падения не существует, частотный период осцилляций определяется только дисперсией, т.е. $c_{psat}(f)$ и все «желобки» прямые, «перпендикулярные» оси частот. Частота f_m , соответствующая m – минимуму модуля коэффициента отражения и равная [4]

$$f_m = \frac{mc_{psat}}{2d} / \sqrt{1 - \left(\frac{c_{psat}}{c_w} \sin \theta \right)^2}$$

практически не зависит от угла падения волны θ . Как и на рисунке 4, здесь

видно, что с ростом частоты осцилляции вырождаются, газонасыщенный слой становится подобен полупространству.

Обратимся теперь к области, где осцилляции $R(f)$ отсутствуют. На рисунке 6 показаны зависимости коэффициента отражения и входного импеданса дна от уровня насыщения осадков газом на фиксированных частотах.

Коэффициент отражения в зависимости от насыщения изменяется немонотонно, а имеет минимум при уровне сатурации $s \approx 0,035\%$, что, как видно из рис.6 объясняется равенством импеданса воды и дна, $Z_{in} = Z_w$. При других насыщениях разность $Z_{in} - Z_w$ увеличивается.

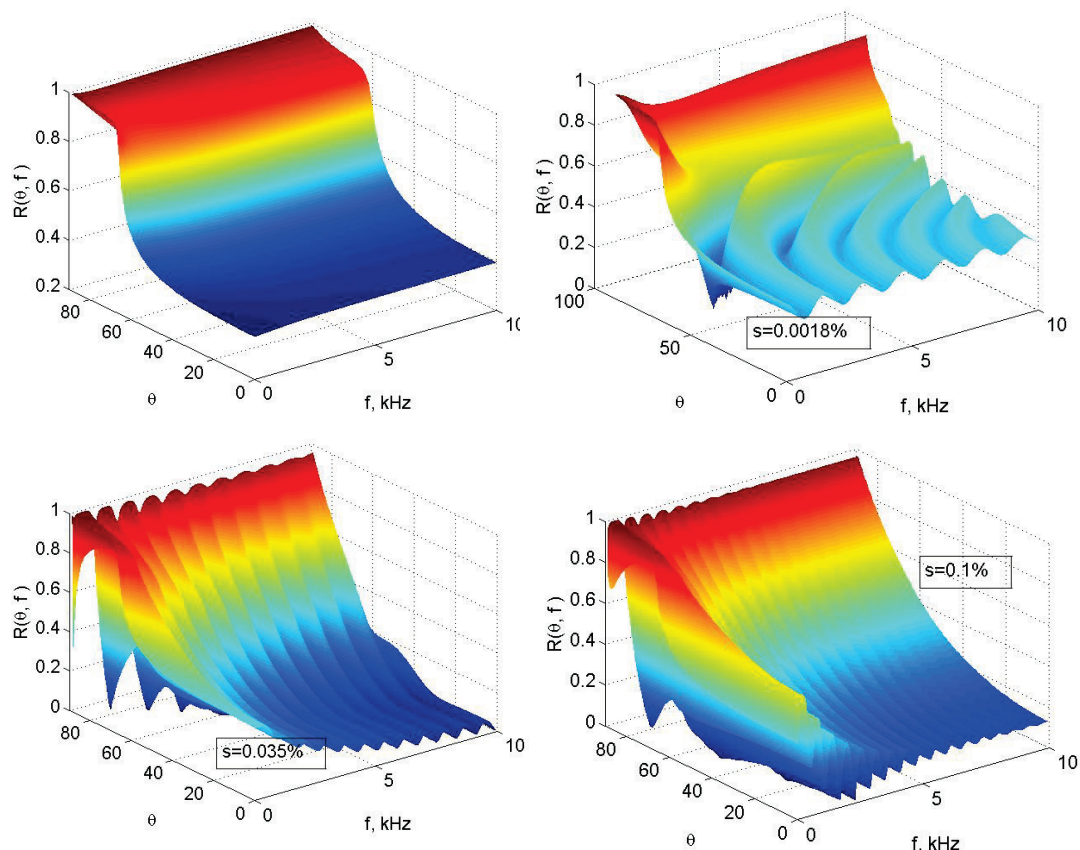


Рисунок 5. Частотно-угловые зависимости коэффициента отражения

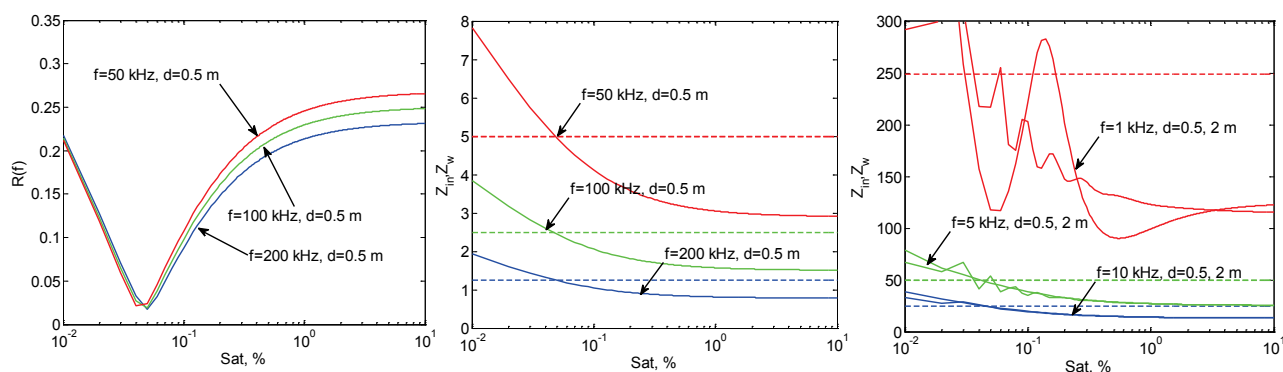


Рисунок 6. Зависимость модуля коэффициента отражения и входного импеданса дна от насыщения газом

Теоретически, с помощью двух трансиверов, работающих на двух частотах, например, 200 кГц и 50 кГц, по абсолютной величине и разности коэффициента отражения, возможно различить насыщение осадков, если $s > 0,035\%$. При $s < 0,035\%$ уловить различие, даже теоретически, маловероятно. Отметим, что кривые $R(s, \%)$ практически не зависят от толщины слоя газонасыщенных осадков – т.е. отражение на этих частотах происходит от достаточно тонкого слоя с толщиной порядка длины волны.

Альтернативой является регистрация не коэффициента отражения, а входного импеданса дна. Входной импеданс дна, по определению $Z_{in} = p / v_z$ – отношение акустического давления к вертикальной компоненте колебательной скорости. Колебательная скорость (КС) может быть измерена непосредственно. Датчик КС представляет собой соколеблющуюся с водой сферу с нейтральной плавучестью. Размер сферы, во избежание эффектов дифракции должен быть меньше длины волны, поэтому такие измерения можно выполнить только на низких частотах. На правой панели рис.6 – входной импеданс дна, но уже на низких, звуковых частотах. Видно, что, несмотря на осцилляции Z_{in} при малой толщине слоя, измерения на двух частотах могут дать необходимую для проведения инверсии информацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный математический эксперимент показал практическую необходимость учета межгранулярного трения и дисперсии фазовой скорости звука при проведении широкополосных акустических расчетов.

Список литературы / References:

1. Katsnelson B., Petnikov V., Lynch J. *Fundamentals of shallow water acoustics*. New York: Springer, 2012.
2. Jackson D.R., Richardson M.D. *High-Frequency Seafloor Acoustics*. New York: Springer, 2007.
3. Schock S.G. A Method for estimating the physical and acoustic properties of the sea bed using chirp sonar data. *IEEE J. of Ocean. Eng.*, 2004, vol. 29, no. 4, pp. 1200-1217.
4. Комиссарова Н.Н., Фурдуев А.В. Акустический метод измерения газосодержания в донных осадках. *Акуст. журн.*, 2004, т. 50, № 5, с. 666-670. [Komissarova N.N., Furduev A.V. Acoustic method of measuring the gas content in bottom sediments. *Acust. journal*, 2004, vol. 50, no. 5, pp. 666-670. (In Russ.)]
5. Chotiros N. P., Lyons A. P., Osler J., Pace N. G. Normal incidence reflection loss from a sandy sediment. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2002, vol. 112, no. 5, pp. 1831-1841.
6. Лисютин В.А., Ластовенко О.Р., Ярошенко А.А., Сравнение дисперсионно-диссипативных характеристик мод в волноводе Пекериса в случае жидкого и пористого дна. *Доклады IXX школы-семинара им. акад. Л.М. Бреховских*. М: ГЕОС, 2018, с. 120-124. [Lisyutin V.A., Lastovenko O.R., Yaroshenko A.A. Dispersion-dissipative characteristics comparison of modes in the Pekeris waveguide in the case of a liquid and porous bottom. *Reports of the IXX School Seminar. acad. L.M. Brekhovskiy*. М: GEOS, 2018, pp.120-124. (In Russ.)]
7. Лисютин В.А. Ластовенко О.Р. Ярошенко А.А. Решение обобщенного уравнения Навье-Стокса для микронееднородной двухфазной среды. *Прикладные задачи математики: материалы XXV междунар. научн.-техн. конф. Севастополь, 18-22 сентября 2017, г. Севастоп. гос. ун-т., Севастополь, 2017, с. 222*. [Lisyutin V.A., Lastovenko O.R., Yaroshenko A. A. Solution of the generalized Navier-Stokes equation for a micro-inhomogeneous two-phase medium. *Applied Mathematics Problems: Materials XXV International. scientific-techn. Conf. Sevastopol, September 18-22, 2017. Sevastopol state university. Sevastopol, 2017, p. 222. (In Russ.)]*
8. Лисютин В.А. О акустических характеристиках морских осадков. Подключение течений к GS теории межгранулярного трения. *Доклады IXX школы-семинара им. акад. Л.М. Бреховских*. М: ГЕОС., 2018, с. 156-160. [Lisyutin V.A. On the acoustic characteristics of marine sediments. Connection of flows to the GS theory of intergranular friction. *Reports of IXX School-Seminar named after acad. L.M. Brekhovskikh*, М: GEOS. 2018, pp. 156-160. (In Russ.)]
9. Бреховских Л.М. Годин О.А. *Акустика неоднородных сред. В 2 т. Т. 1. Основы теории отражения и распространения звука*, М.: Наука, 2007, 442 с. [Brekhovskikh L.M., Godin O.A. *Acoustics of inhomogeneous*

media. In 2 volumes. vol. 1. *Fundamentals of the theory of sound reflection and propagation*, Moscow: Nauka, 2007, 442 p. (In Russ.)]

10. Buckingham M.J. On pore-fluid viscosity and the wave properties of saturated granular materials including marine sediments. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2007, vol. 122, no. 3, pp. 1486-1501.

ACOUSTICAL METHOD FOR ESTIMATING WATER BED BIOLOGICAL CONTAMINATION LEVEL

Lisyutin V.A., Lastovenko O.R., Petrenko N.V.

“Sevastopol state university”

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: vlisiutin@mail.ru

Abstract. The presence of gas bubbles in the bottom of shallow marine and freshwater reservoirs significantly reduces the speed of sound. The amount of gas in the bottom depends on microbiological activity, and therefore pollution level is an indicator of the ecological balance. It is proposed to control the level of bottom contamination by measuring sound reflection coefficient or measuring the input bottom impedance. The frequency-angular reflection coefficient dependences and frequency dependences of the input bottom impedance are calculated. It is shown that the principal point of the results correct interpretation is the inclusion of intergranular friction and sound velocity dispersion in marine sediments.

Key words: *marine sediments, phase-velocity dispersion, intergranular friction, gas-saturated sediments, rate of decay, reflection coefficient, bottom impedance.*

ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ МАРКЕР ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА БАКТЕРИЙ

Ломакина Г.Ю., Корягина В.А., Угарова Н.Н.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119992, РФ; e-mail: lomakinagalina@yahoo.com

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Мы показали, что люцифераза светляка, продуцируемая клетками *E.coli*, является чувствительным маркером для изучения температурного воздействия на жизнеспособность живых клеток. Люцифераза экспрессируется в растворимой и активной форме, что позволяет непосредственно в клетках измерять ее ферментативную активность по свечению клеток без их разрушения. При этом интенсивность свечения высокая, свечение длительное - регистрация сигнала возможна в течение нескольких минут без существенного снижения интенсивности. Кинетические и термодинамические параметры термоинактивации люциферазы в клетках *E. coli* оказались сходными с аналогичными параметрами для очищенного фермента в буферной системе; в обоих случаях инактивация фермента подчиняется кинетике первого порядка независимо от микроокружения. Скорость термоинактивации внутриклеточной люциферазы практически такая же, что и скорость снижения жизнеспособности клеток (КОЕ/мл), определенная методом посевов. При этом при воздействии температуры энергетический статус клеток, оцениваемый по содержанию внутриклеточного АТФ меняется по более сложным законам. В частности, показано увеличение содержания АТФ в течение первых 20 мин нагревания клеточной суспензии.

Ключевые слова: люцифераза светлячков, биолюминесценция, термическая инактивация, *E.coli* BL21, жизнеспособность клеток, тепловое напряжение.

Функционирование живого организма – сложный многоступенчатый процесс взаимодействия внутриклеточных компонентов. На любое стрессовое воздействие живая клетка отвечает перераспределением биохимических реакций. Изучение поведения бактерий при повышенных температурах имеет большое научно-практическое значение, в частности, для обеспечения их микробиологической безопасности при оптимизации условий обработки продуктов питания [1]. Традиционные микробиологические методы контроля жизнеспособности микроорганизмов не всегда применимы. Поиск чувствительных, надежных, легко и быстро детектируемых эндогенных индикаторов на внешнее воздействие физической или химической природы на живую клетку представляет собой важную многоцелевую задачу. Считается, что основными механизмами термоинактивации микроорганизмов в жидкой среде являются денатурация внутриклеточных белков и повреждение клеточной мембраны [2]. Для изучения влияния температуры на жизнеспособность клеток в качестве индикаторного белка мы использовали эндогенную термостабильную люциферазу светляков *L.mingrelica* [3], синтезируемую клетками *E.coli* BL21. Люцифераза экспрессируется в растворимой и активной форме, что позволяет прямо в клетках измерять ее ферментативную активность. При этом свечение довольно длительное и позволяет регистрировать сигнал в течение нескольких минут без существенного снижения интенсивности.

Цель данной работы – изучение влияния температуры на активность эндогенной люциферазы светляков и содержание АТФ в клетках *E.coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

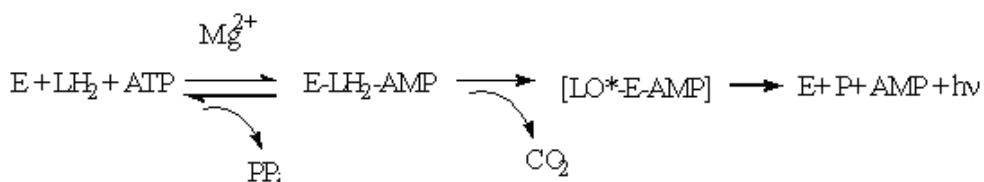
Термостабильную люциферазу светляков *L.mingrelica* экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus (Novagen, США). Штамм-продуцент получали трансформацией плазмидой pETL7, несущей ген люциферазы. Культивирование клеток проводили в среде LB с ампициллином (37 °C, 240 об/мин, 18 ч) до достижения 3,5-3,8 ОЕ ($\lambda = 590$ нм). Клетки осаждали на центрифуге ELMi CM-6M (5 мин, 1000 об/мин, 25 °C). Полученный осадок дважды ресуспендировали в физрастворе в том же объеме. Измеряли оптическую плотность суспензии при 590 нм. Принимали, что $A_{590} = 1$ ОЕ соответствует концентрации клеточной суспензии $5 \cdot 10^8$ кл/мл. Для измерения люциферазной активности в клетках использовали субстратную смесь, содержащую 0,5 мг/мл люциферина 0,15M NaCl, 20 mM MgSO₄ в 0,05 M цитрат-фосфатном буфере, pH 5,0. Содержание АТФ в клетках *E.coli* и общее содержание АТФ определяли биолюминесцентным методом с использованием набора для определения АТФ в клетках и тканях (Люмтек, Россия). Жизнеспособность клеток *E.coli* определяли методом посевов разведений с использованием агаризованной питательной среды LB. Подсчет колоний проводили через 24 ч после инкубации образцов при 37°C. Термоинактивацию клеток *E.coli* проводили следующим образом: в 10-15 пробирок отбирали по 300 мкл клеточной суспензии с концентрацией $\sim 10^6$ кл/мл, помещали в термостат при выбранной температуре и через определенные промежутки времени отбирали пробирку с клеточной суспензией на анализ люциферазной активности и АТФ. Отобранный образец охлаждали при комнатной температуре 5 мин. Для определения активности люциферазы 20 мкл образца помещали в кювету, добавляли 100 мкл

раствора люциферина и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для определения общего содержания АТФ к 20 мкл клеточной суспензии добавляли 180 мкл ДМСО, инкубировали 1 мин. Затем 20 мкл полученного экстракта вносили в микрокювету люминометра, добавляли 100 мкл АТФ-реагента и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для расчета точной концентрации АТФ в образце использовали метод контролей с использованием стандартного препарата АТФ ($0,75 \cdot 10^{-8} \text{ М}$) в физрастворе, пробоподготовку которого осуществляли аналогично измеряемым образцам. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Origin 6,0 и Excel 2007 (Microsoft Office).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *E.coli* BL21 является удобной и безопасной моделью для целей экологии, пищевой промышленности, клеточной биологии и геной инженерии, он не является патогенным [4]. Штамм BL21(DE3)CodonPlus использовали для экспрессии люциферазы светляков и изучения влияния температуры на активность эндогенной люциферазы, содержание АТФ и жизнеспособность клеток *E.coli*. Для этого ночную культуру клеток переводили в физраствор для остановки роста клеток и разбавляли физраствором до концентрации $(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$ кл/мл. В процессе эксперимента (2 ч, 25°C) численность микроорганизмов не изменялась и клетки практически не разрушались – общее содержание АТФ не изменялось и внеклеточный АТФ отсутствовал.

Люцифераза светляков катализирует окисление люциферина кислородом воздуха при pH 7,8. Эта реакция требует присутствия АТФ и ионов магния:



Для измерения активности эндогенного фермента необходимо обеспечить подходящее значение pH среды и присутствие всех необходимых компонентов реакции внутри клетки в достаточных для протекания реакции концентрациях. Значение pH цитоплазмы (7,1-7,5) подходит для протекания реакции. АТФ и ионы магния всегда присутствуют в живых клетках. В живых метаболически активных клетках *E.coli* содержание АТФ составляет $\sim 2 \cdot 10^{-18}$ моль/клетку. Принимая, что объем единичной клетки *E.coli* имеют около $0,88 \text{ мкм}^3$, средняя равновесная концентрация внутриклеточного АТФ составляет 1,5-2 мМ и может меняться в зависимости от возраста клеток, условий содержания и любых внешних воздействий физической и химической природы [5]. Для доставки люциферина внутрь клетки необходима диффузия субстрата через клеточную стенку. Значение рКа карбоксильной группы люциферина составляет 3,5, при нейтральных значениях pH молекулы люциферина приобретают отрицательный заряд и не могут пересечь мембрану [6]. Мы оптимизировали состав субстратной смеси на основе люциферина для переноса субстрата внутрь клетки, взяв за основу цитрат-фосфатный буфер pH 5,0 с добавлением хлорида натрия во избежание осмотического шока бактерий. Концентрации ионов магния и люциферина ($0,03\text{-}1 \text{ мг/мл}$) подбирали эмпирически. Эффективная константа Михаэлиса по люциферину для эндогенной люциферазы в цитоплазме живых клеток *E.coli* составила $K_m = (0,22 \pm 0,1) \text{ мМ}$ (рис.1). В дальнейших экспериментах использовали субстратную смесь состава 0,05 М цитрат-фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 2 мМ люциферина, 20 мМ MgCl_2 , pH 5,0 для получения стабильного и длительного биолюминесцентного сигнала.

Следует отметить, что это значение K_m соответствует концентрации экзогенного люциферина, K_m для субстрата внутри клетки должна сильно отличаться. Расчет концентрации незаряженной формы люциферина во внеклеточном пространстве, способной диффундировать через клеточную мембрану при pH 5,0 проводили по уравнению Хендерсона-Хассельбалха: $\text{pH} = \text{pKa} + \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}$, где α – доля незаряженной формы люциферина. При pH 7,8 только 0,005 % люциферина находится в незаряженной форме. При снижении pH до 5,0 значение α составило 97 %, следовательно, уже 3% люциферина находится в незаряженной форме, способной проникать в клетку. Кроме того, необходимо учитывать и скорость диффузии субстрата через клеточную мембрану внутрь клетки. Полученное значение K_m составило $(0,22 \pm 0,1) \text{ мМ}$, что почти в 100 раз превышает данные для фермента *in vitro* ($7,5 \pm 0,5$) мкМ. Однако, если учесть, что в клетку способно проникать только 3 % субстрата, то K_m будет равно $(6,6 \pm 0,4) \text{ мкМ}$, что согласуется с данными для *in vitro*.

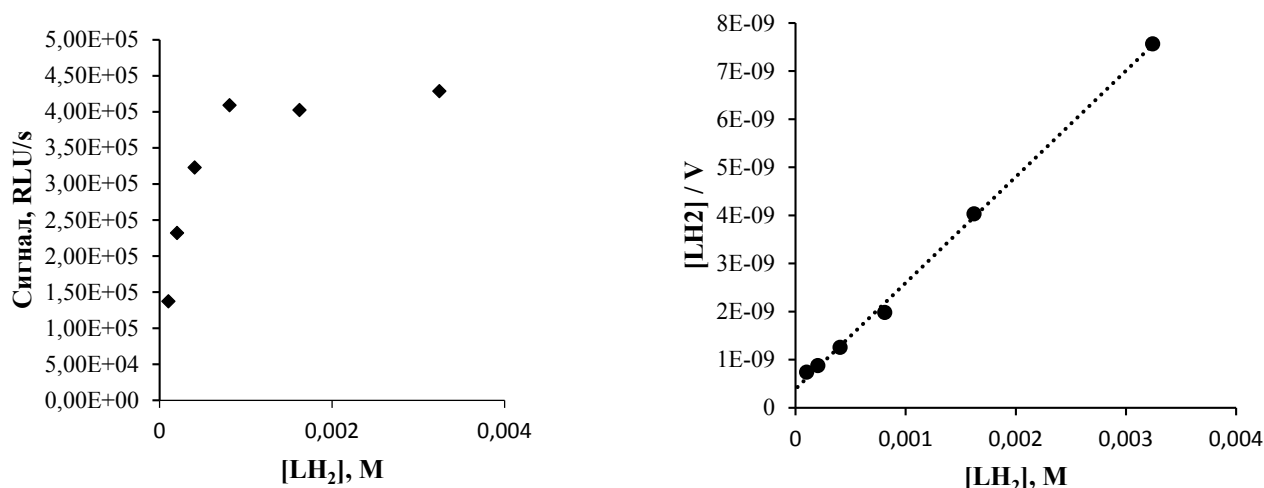


Рисунок 1. Зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации люциферина (слева) и линейная анаморфоза в координатах Вульфа-Хейнса (справа)

Бактериальные клетки при воздействии на них повышенных температур теряют способность к делению и в конечном итоге гибнут. Функциональное состояние клеток при воздействии высоких температур оценивали по следующим параметрам: жизнеспособность клеток определяли методом посевов (КОЕ/мл), метаболический статус клеток – по содержанию АТФ (внутриклеточного и внеклеточного), ферментативную активность эндогенной люциферазы по интенсивности биолюминесценции клеток после добавления субстратной смеси. Можно ожидать, что ферментативная активность эндогенной люциферазы в цитоплазме живых клеток будет являться чувствительным и быстрым маркером на изменение температуры в системе. Кинетические кривые инактивации эндогенной люциферазы были получены в диапазоне температур 45-60 °С. Как видно из рисунка 2, зависимости остаточной активности люциферазы от времени являются моноэкспоненциальными и спрямляются в полулогарифмических координатах. Отсутствие изломов на графике подтверждает, что термоинактивация протекает по первому порядку независимо от выбранной температуры.

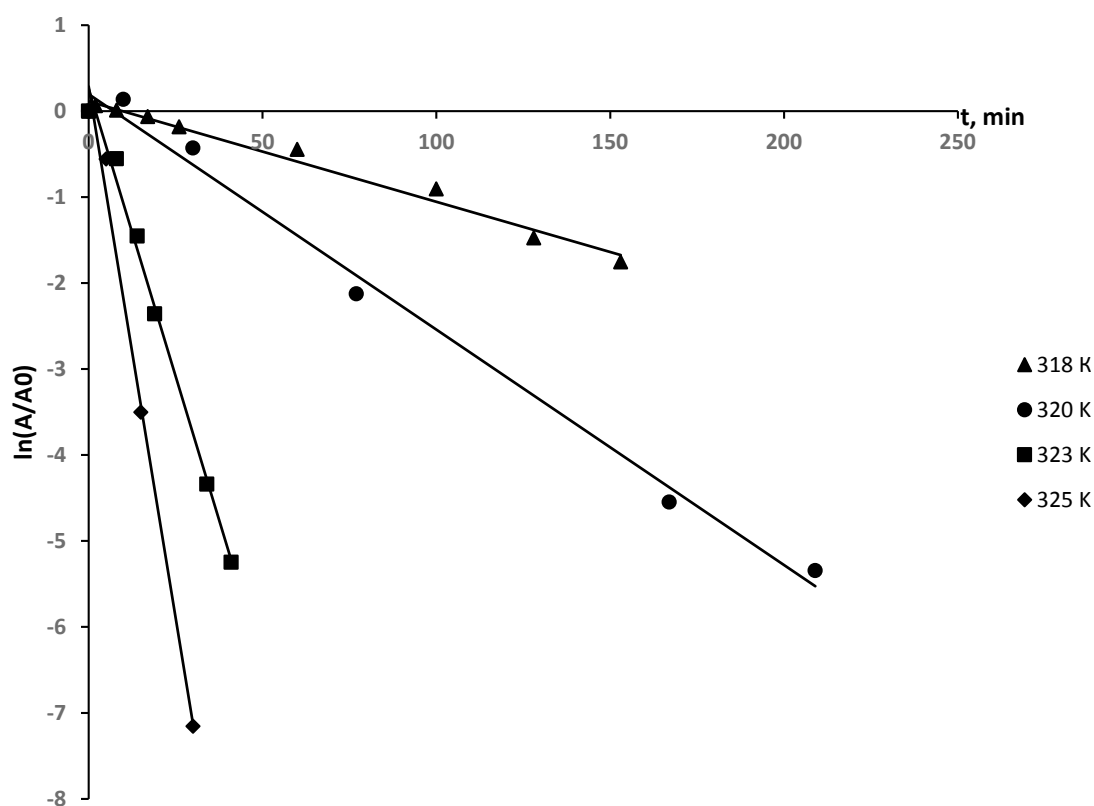


Рисунок 2. Кривые инактивации эндогенной люциферазы в интервале температур 45-52 °С в полулогарифмических координатах. Коэффициент корреляции $R > 0,978$

Таблица 1. Значения констант термоинактивации и периодов полупревращения термостабильной люциферазы светляков

в клетках <i>E.coli</i>			в буферном растворе	
t, °C	k _{in} , мин ⁻¹	τ _{1/2} , мин	k _{in} , мин ⁻¹	τ _{1/2} , мин
45	0,012±0,001	57,76	0,016±0,001	43,78
47	0,028±0,002	24,76	0,047±0,003	14,7
50	0,133±0,006	5,21	0,19±0,01	3,75
52	0,25±0,02	2,77	-	-
55	-	-	1,7±0,1	0,42

Значения k_{in} эндогенной люциферазы в живых клетках *E.coli* при различных температурах сравнили с данными для инактивации фермента, очищенного до гомогенного состояния (степень чистоты свыше 99 %) в буфере состава 0,05 мМ Трис-ацетат, 20 мМ MgSO₄, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БСА, pH 7,8 [7]. Значения констант термоинактивации люциферазы в клетках и в буферном растворе представлены в таблице 1.

Как видно, наблюдается незначительная стабилизация фермента в клетках *E.coli*. В состав цитоплазмы, входят, в основном, белки и соли. По-видимому, буферный раствор, используемый *in vitro*, близок по ионной силе и соотношению высоко- и низкомолекулярных компонентов к составу цитоплазмы. Значения pH цитоплазмы и буферного раствора также близки.

Расчет термодинамических параметров реакции термоинактивации фермента проводили в рамках теории активированного комплекса согласно уравнению $k_{in} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right)$ или $\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$, где k_{in} – константа инактивации, определяли ΔH и ΔS из зависимости $\ln\left(\frac{k}{T}\right) - \frac{1}{T}$, которая описывается уравнением вида $y = -ax + b$, где $a = \Delta H^\ddagger/R$, а $b = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$. Значения вычисленных значений активационных параметров представлены в таблице 2.

Из таблицы видно полное соответствие термодинамических параметров термоинактивации термостабильной люциферазы в клетках и в буферном растворе, следовательно, отклик фермента на температурное воздействие не зависит от наличия компонентов клетки различной природы и АТФ. Таким образом, эндогенная термостабильная мутантная люцифераза светляков, функционирующая в цитоплазме живых клеток *E.coli*, является чувствительным индикатором на внешнее воздействие, в данном случае температуры, и не зависит от микроокружения фермента.

Традиционно прямым тестом для изучения жизнеспособности клеток является метод посевов разведений на агаризованной питательной среде, который мы использовали в качестве контроля. Подсчет колоний осуществляли через 20-28 ч после инкубации при 37 °C. Параллельно изучали зависимости изменения жизнеспособности клеток методом посевов (КОЕ/мл) и по свечению (активностью эндогенной люциферазы, RLU/s) в процессе их инкубации при различных температурах и показали высокую корреляцию люциферазной активности с методом посевов, что демонстрирует преимущество использования люциферазы светляков как удобного и быстрого маркера для изучения температурного стресса бактерий. Так, константа инактивации k_{in} клеток *E.coli* при 50 °C равна (0,123±0,005) мин⁻¹, а константа инактивации эндогенной люциферазы равна (0,133±0,006) мин⁻¹.

АТФ является высокочувствительным индикатором метаболической активности живых клеток, поскольку отвечает за энергетическое обеспечение всех внутриклеточных процессов. На любые стрессовые воздействия живая клетка отвечает изменением содержания АТФ. Мы определили, что удельное содержание АТФ в свежеполученных метаболически активных клетках *E.coli* BL21 в расчете на клетку составило 2*10⁻¹⁸ моль. Концентрация общего и внутриклеточного АТФ была равной, что свидетельствует об отсутствии повреждения клеточной мембраны в процессе хранения.

Таблица 2. Сравнение значений термодинамических параметров термоинактивации термостабильной люциферазы светляков в клетках *E.coli* и в буферном растворе

	ΔH [‡] , кДж/моль	ΔS [‡] , Дж/моль·К	ΔG [‡] , кДж/моль
в клетках <i>E.coli</i>	380±23	914±140	108±68
в буферном растворе	397±24	968±143	108±67

Известно, что в результате гибели или разрушения клеток синтез АТФ прекращается, оставшийся АТФ гидролизуется внутриклеточными АТРазами, которые продолжают функционировать некоторое время. Действительно, как видно из рисунка 3, в результате температурного воздействия уровень АТФ закономерно снижается. Однако снижение уровня АТФ происходит в несколько раз медленнее, чем снижение уровня люциферазной активности и жизнеспособности. Это означает, что энергетический статус бактерий под воздействием при клеточном стрессе меняется по более сложным законам. Возможно, при нагревании происходит термоденатурация внутриклеточных белков, в том числе и АТРаз, необходимых для гидролиза АТФ после клеточной гибели. В любом случае, наблюдается дисбаланс между синтезом АТФ и его гидролизом.

Обнаружен интересный эффект увеличения уровня АТФ в первые 15 мин нагревания клеток - скорость синтеза АТФ значительно превосходит скорость его гидролиза. Через 10 мин его уровень возрастает в полтора раза и проходит через максимум и затем начинает снижаться.

Таким образом, мы показали, что удобным маркером для изучения температурного воздействия на живые клетки *E.coli* является эндогенная термостабильная люцифераза светлячков и скорость ее термоинактивации в клетках сопоставима со скоростью снижения жизнеспособности клеток. При этом метаболический статус клеток при воздействии температуры меняется по более сложным законам.

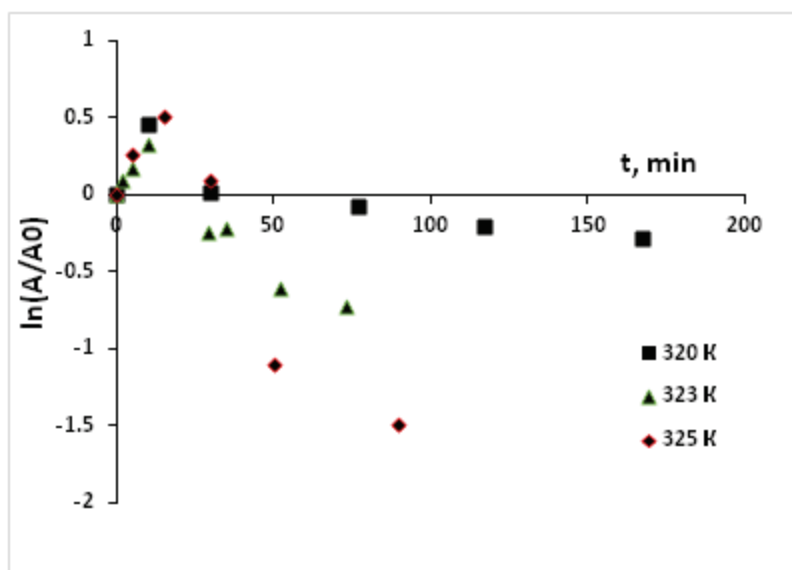


Рисунок 3. Изменение содержания АТФ в клетках *E.coli*, содержащих люциферазу светлячков, в процессе термоинактивации

Список литературы / References:

1. Smelt J. P. P. M., Brul S. Thermal Inactivation of Microorganisms. Critical Reviews. *Food Science and Nutrition*, 2014, vol. 54, pp. 1371–1385.
2. Li H., Gänzle M., Some Like It Hot: Heat Resistance of *Escherichia coli* in Food. *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, pp. 1763-1769.
3. Ugarova N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1989, vol. 4, pp. 406-418.
4. Chart H., Smith H.R., La Ragione R.M. and Woodward M.J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5a and EQ1. *J. Applied Microbiol.*, 2000, vol. 89, pp. 1048-1058.
5. Lomakina G.Yu, Modestova Yu.A., Ugarova N.N. Bioluminescence Assay for Cell Viability. *Biochemistry*, vol. 80, no. 6, pp. 701-713.
6. Dement'eva E.I., Ugarova N.N., Cobbold P.H., Assay of ATP in intact *Escherichia coli* expressing recombinant firefly luciferase. *Biochemistry*, vol. 61, pp. 915-920.
7. Koksharov M.I., Ugarova N.N., Thermostability enhancement of *Luciola mingrelica* firefly luciferase by in vivo directed evolution. *Luminescence*, 2010, vol.25, pp.135-136.

**FIREFLY LUCIFERASE AS INTRACELLULAR MARKER OF A TEMPERATURE
STRESS OF BACTERIA**

Lomakina G.Yu., Koriagina V.A., Ugarova N.N.

Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University

Leninskiye Gory, 1/3, Moscow, 119992, Russia; e-mail: lomakinagalina@yahoo.com

Abstract. We have shown that firefly luciferase expressed in *E.coli* cells is a sensitive marker for studying of influence of mild heat stress on viability of living cells. Luciferase is produced in cells as a soluble and active form that allows measuring the luminescence of cells for a long time without essential decrease in intensity. We have compared the mechanisms of thermal inactivation of the firefly luciferase in living cells and of purified enzyme in buffer system and found that luciferase inactivation follows the first order kinetics independently on microenvironment. Kinetic and activation parameters of this process for both systems were identical. It is important the rates of thermal inactivation of the enzyme in cells were comparable to the rates of viability decrease of *E.coli* (CFU/ml). At the same time the ATP content as indicator of metabolic status of living cells (ATP) changed under more difficult law – it was observed the increasing of intracellular ATP in *E.coli* within the first 20 min of heating of cellular suspension.

Key words: *firefly luciferase, bioluminescence, thermal inactivation, E.coli BL21, cell viability, heat stress.*

ELECTROCHEMICALLY REDUCED WATER REMOVES BIOFILM FORMED WITH LACTIC BACTERIA

Pogorelova M.A., Kuznetsov A.L., Suvorov O.A., Pogorelov A.G.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Received by editor: 30.06.2018

Abstract. This work aimed to study the structure of bacterial film grown on the inner tuber surface of the flow reactor. Applying scanning electron microscopy (SEM) approaches, the detailed biofilm relief was visualized. The action of electrochemically aqueous solution on the fine structure of biofilms generated by plankton forms of lacto bacteria and *E.coli* was investigated. Electrochemically aqueous solution treatments were able to destroy the biofilm organic polymer matrix and bacterial cells embedded in a matrix. It is shown that the working of a bacterial film with alkaline catholyte destroys the main components of the biofilm, has a significant purifying and disinfecting effect. One of the criteria for the effectiveness of biofilm purification is the morphological analysis of the presence of fragments of the matrix or cellular component on the specimen surface. By the SEM method, the presence of a residual organic mass on the surface of the substrate after treatment was observed. This is a factor that can provoke *de novo* formation of a population of microorganisms on the surface of the pipeline surface. Thus, the most important task of cleaning and disinfection of the pipeline is the removal of microbial cells and residual fragments of the biomatrix.

Key words: *biofilm, scanning electron microscopy, flow biofilm reactor, E.coli, lactate bacteria, electrochemically activated water.*

In many branches of industry biofilm leads to significant loss of resources and reduced efficiency that causes to search for ways of its removal [1]. The microbial film is formed on a solid surface in a moist medium in the form of a multicellular community immersed in a polymer matrix [2, 3]. In comparison with plankton form biofilm, forming its own homeostasis, provides microorganisms with protection from antibiotics, as well as from mechanical destruction by a liquid stream [4-6]. This situation requires a significant increase in the concentration of antimicrobial drugs, which exerts an additional burden of the environment. Therefore, it is important to develop fundamentally new ways of removing the biofilms that are economical, effective and environmentally safe. An alternative to conventional cleaning is surface treatment with electrochemically activated (ECA) aqueous solutions with a wide bactericidal range of action [7, 8]. This biophysical approach is based on the fact that the ECA aqueous solution in a metastable state characterized by a change in the oxidation-reduction potential (ORP), and after a short time restores the original properties. The purpose of this work was to investigate the effect the treatment of the bacterial film by ECA solutions on the cellular component and matrix.

MATERIALS AND METHODS

The work was performed on a bacterial film formed in a flow reactor under the conditions of a laboratory experiment [9-11]. A layer of microorganisms was formed on the inner surface of a porous polyvinylchloride (PVC) tube. The biofilm source was the plankton *E.coli* or/and lactic acid bacteria mixture. To remove the bacterial film, the inner cavity of the tube was treated with a stream of alkaline catholyte (pH 13.4÷13.5, ORP -35mV ÷ -50 mV). ECA solution was obtained with the electrochemical plant STEL-ANK-SUPER (LLC "Delfin Aqua", Russia).

A bacterial film washed with ordinary water (pH 7.3÷7.6, ORP 250mV ÷ 290mV) was used as a control. The change in the fine structure of the sample was studied by scanning electron microscopy (SEM). The basic principles of preparation for SEM were described earlier [12-13]. Briefly, a segment of the recirculation reactor tube was fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde at 4° C for 12 hours, then in a solution of 0.5 % OsO₄ at room temperature. After fixation, the sample was dehydrated in a battery of ethanol with increasing concentration: 50 %, 75 %, 80 %, 90 % and 98%. To remove alcohol, the samples were transferred to HMDS (hexamethyldisilazane), after which they were dried in the air. The finished preparation was attached to a microscope holder followed by platinum (10 nm) film coated on the sample surface in a JFC-1600 unit (JEOL, Japan). The fine structure of the surface relief was studied in a scanning electron microscope JSM-6390A (JEOL, Japan), using the secondary electron mode at an accelerating voltage of 10 kV.

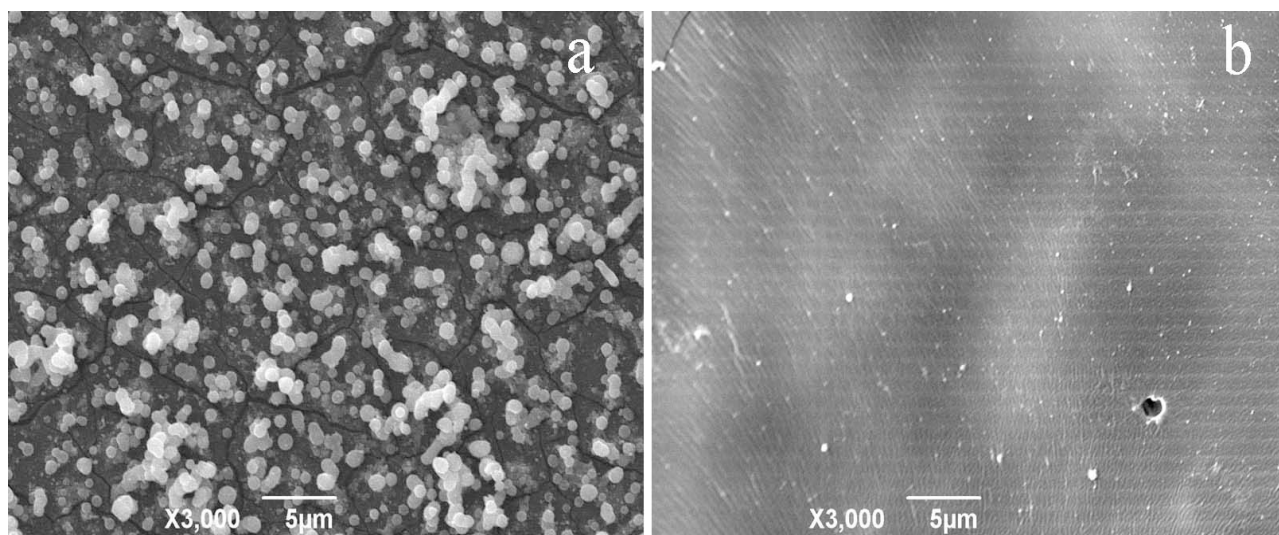


Figure 1. Micrographs of a bacterial film on the inner surface of a PVC tube The images were obtained by scanning electron microscopy in the secondary electron mode: (a) the film formed by the composition of lactic acid bacteria and washed with a flow of ordinary water; (b) the film formed by the composition of lactic acid bacteria and washed by the flow of the ECA aqueous solution, catholyte

RESULTS AND DISCUSSION

The figure 1 shows SEM micrographs of the lactic acid bacteria film. The biofilm is formed on the inner surface of a porous PVC tube in a recirculating reactor under different conditions of removal of the bacterial layer.

From the data analysis (Fig.1), it can be concluded that the laboratory reactor used is effective for the formation of a bacterial film. The proposed procedure allows one to specify the experimental parameters and to simulate the biofilm generation followed by cleaning with ECA aqueous solution. Comparison of the biofilm fine structure after washing with ordinary water or catholyte exhibits significant differences. On the microphotography of the control sample (Fig.1a), it is impossible to distinguish the types of lactic acid bacteria, but a compactness of cellular multilayer indicates the formation of a mature matrix. A different event is observed after washing the tube lumen with catholyte (Fig. 1b) where there is the complete removal of cellular composition. Thus, catholyte has a significant purifying and disinfecting effect, although the degraded matrix fragments remain on the tube surface.

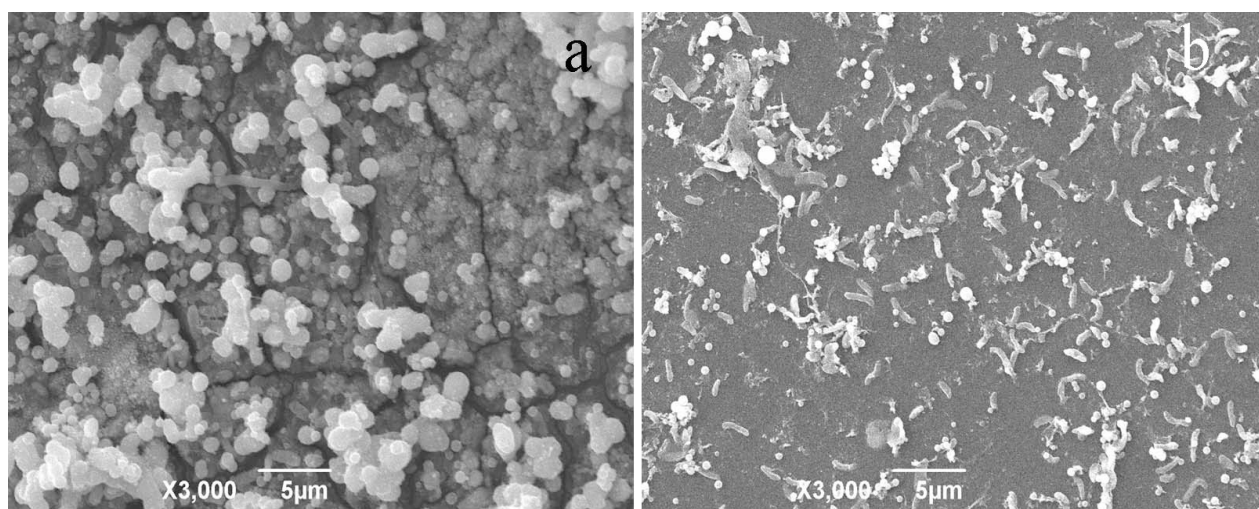


Figure 2. Micrographs of a bacterial film on the inner surface of a PVC tube The images were obtained by scanning electron microscopy in the secondary electron mode: (a) the film formed by the lactic acid bacteria and *E. coli* mixture and washed with a flow of ordinary water; (b) the film formed by the lactic acid bacteria and *E. coli* mixture and washed in succession with a flow of ECA aqueous solution, catholyte

These fragments are not visualized by optical microscopy and may cause the bacterial film rapid regeneration. It may be necessary to increase the treatment time and/or use the combined sequential action of the ECA fractions of the solution, characterized by an opposite in sign (high positive and negative) ORP value for more efficient removal of the matrix.

It is of interest to form and disintegrate a film of lactic acid bacteria formed in the presence of *E. coli*. This microorganism coexists in symbiosis with man and is easily spread in many spheres. Therefore, *E. coli* is a sanitary-indicative microorganism in food and agricultural industries. Its presence in the samples serves as a criterion for the unfavorable state of the enterprise. Comparative micrographs illustrating this experiment are shown in figure 2.

It can be seen (Fig. 2a) that the control sample is characterized by a structure in the form of cell colonies containing *E. coli*. As a result of processing the ECA succession with catholyte, the form of the film changes significantly (Fig. 2b). As in the case without *E. coli*, lactic acid bacteria are completely removed while matrix elements remain. The difference is that after the catholyte action, cellular fragments remained on the sample surface. The result of PCR-RT analysis (data not presented) showed that they belong to the *E. coli*. Perhaps this effect is explained by the fact that the adhesion of *E. coli* to the relatively soft surface of the PVC tube is due not only to adhesion, but also to mechanical fastening by means of a filamentous appendage. Taken together, we can draw the following conclusions. In laboratory conditions bacterial biofilms of lactic acid bacteria and *E. coli* were formed in the flow reactor on the inner surface of a porous tube made of polyvinylchloride. Treatment of a bacterial film by alkaline catholyte (pH 13.4÷13.5, ORP -35mV ÷ -50 mV) destroying the main components of the biofilm produces a significant purifying and disinfecting effect. One of the criteria for the effectiveness of biofilm purification is the morphological analysis of the presence of fragments of the matrix or cellular component on the specimen surface. By the SEM method, the presence of a residual organic mass on the surface of the substrate after treatment was observed. This is a factor that can provoke *de novo* formation of a population of microorganisms on the surface of the pipeline surface. Thus, the most important task of cleaning and disinfection of the pipeline is the maximum possible removal of microbial cells and residual fragments of the biomatrix.

This work was supported by the Russian Science Foundation grant (project №17-76-20014).

References:

1. Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 2008, vol. 18, pp. 1049-1056.
2. Shirliff M.E., Mader J.T., Camper A.K. Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.*, 2000. vol. 9, pp. 859-871.
3. Costerton J.W. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1999, vol. 11, pp. 217-221.
4. Bridier A., Briand R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 2011, vol. 27, pp. 1017-1032.
5. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B.E., Singh P.K. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 2011, vol. 334, pp. 982-986.
6. Drescher K., Shen Y., Bassler B.L., Stone H.A. Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *PNAS*, 2013, vol. 110, pp. 4345-4350.
7. D'Atanasio N., Capezone de Joannon A., Mangano G., Meloni M., Giarratana N., Milanese C., Tongiani S. A new acid-oxidizing solution: assessment of its role on methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) biofilm morphological changes. *Wounds*, 2015, vol. 27, pp. 265-273.
8. Cloete T.E., Thantsha M.S., Maluleke M.R., Kirkpatrick R. The antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 107, pp. 379-384.
9. Ludecke C., Jandt K.D., Siegmund D., Kujau M.J., Zang E., Rettenmayr M., Bossert J., Roth M. Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, pp. e84837-e84837.
10. Crusz S.A., Popat R., Rybtko M.T., Cámara M., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Diggle S.P., Williams P. Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology. *Biofouling*, 2012, vol. 28, pp. 835-842.
11. Rollet C., Gal L., Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, vol. 290, pp. 135-142.
12. Pogorelov A.G., Gavriluk V.B., Pogorelova V.N., Gavriluk B.K. Scanning Electron Microscopy of Biosynthetic Wound Dressings Biocol. *Bull Exp Biol Med.*, 2012, vol. 154, pp. 167-170.

13. Pogorelov A.G., Chebotar I.V., Pogorelova V.N. Scanning electron microscopy of biofilms adherent to the inner catheter surface. *Bull Exp Biol Med.*, 2014, vol. 157, pp. 711-714.

БИОСОРБЕНТ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК И МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Солопов М.В., Легенький Ю.А., Беспалова С.В.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283050, ДНР; e-mail: mxsolopov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Проблема возможности использования биосорбентов для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов является актуальным направлением исследований. Статья посвящена оценке магнитных и сорбционных свойств дрожжевых клеток, полученных путем маркирования наночастицами Fe_3O_4 . На основе вычисленных значений магнитной восприимчивости дрожжей была проведена компьютерная симуляция сепарации клеток в рассматриваемой модели сепаратора в зависимости от скорости потока жидкости и индукции магнитов. Результаты моделирования свидетельствуют о возможности высокоэффективной сепарации модифицированных клеток. Биосорбционные свойства клеток определялись при очистке модельных растворов от ионов меди, никеля и железа. Путем анализа кинетики сорбции ионов металлов из растворов была определена биосорбционная емкость нативных и модифицированных клеток. Было показано, что маркированные наночастицами клетки могут более эффективно аккумулировать ионы меди и никеля по сравнению с нативными дрожжами. Результаты могут быть использованы при реализации технологии очистки вод с помощью дрожжевых сорбентов.

Ключевые слова: дрожжевые клетки, биосорбент, ионы тяжелых металлов, магнитные наночастицы, магнитная сепарация.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых способов очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов представляется весьма актуальным. Помимо физико-химических способов удаления ионов металлов внимание привлекают биологические методы очистки, которые в большинстве своем подразумевают использование биомассы микроорганизмов в качестве сорбентов. Среди множества работ, посвященных изучению различных типов биосорбентов, особо выделяется большой пул исследований биосорбционных свойств дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Такой интерес вызван за счет изученности этого организма, простоты культивирования и работы с ним. Принимая во внимание то, что дрожжи широкомасштабно применяются в пищевой и алкогольной промышленности, отходы от этих производств могут быть реутилизированы, но уже в роли очистителя загрязненных вод.

При использовании дрожжевых клеток для сорбции ионов тяжелых металлов необходим быстрый и эффективный способ отделения биосорбента по завершении процесса очистки. Применение магнитных наночастиц оксидов железа (SPION) для маркировки клеток позволяет дрожжам приобретать свойство управляемости при наложении внешнего магнитного поля [2, 3]. На этом принципе основана технология магнитной сепарации клеток.

Цель данного исследования – определение сорбционных свойств и эффективности магнитной сепарации дрожжевых клеток, маркированных SPION.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Магнитные наночастицы Fe_3O_4 синтезировали по аналогии с методикой, описанной в работе [4], для стабилизации коллоидов использовали тетраметиламмоний гидроксид (ТМАН) и цитрат натрия (Cit). Магнитомаркированию подвергался коммерческий штамм сухих пекарских дрожжей («Саф-Левюр», Россия). На начальном этапе навеску сухих дрожжей суспендировали в 0,9 % NaCl при 4 °C и центрифугировали в течение 7 минут при 1000 об/мин. Затем, если для маркировки применялись наночастицы Fe_3O_4 -ТМАН, биомассу суспендировали в буфере глицин-NaOH (pH = 10,6), при использовании Fe_3O_4 -Cit клетки суспендировали в буфере глицин-HCl (pH = 2,2). После этого в суспензию добавляли коллоид наночастиц с расчетом 2 пг Fe/кл и инкубировали на протяжении 1 минуты. Затем биомассу магнитомаркированных дрожжей троекратно отмывали 0,9 % NaCl. В результате этой процедуры были получены два типа парамагнитных клеток: YFT- и YFC-клетки, покрытые наночастицами Fe_3O_4 -ТМАН и Fe_3O_4 -Cit соответственно. Магнитную восприимчивость модифицированных дрожжей ($\chi_{\text{кл}}$) вычисляли на основе определения

магнитофоретической скорости YFT- и YFC-клеток. Процедура проведения магнитофореза и определения значений $\chi_{\text{кл}}$ была описана нами в работе [5]. Рассчитанные значения $\chi_{\text{кл}}$ использовались для компьютерного моделирования сепарации дрожжей, маркированных SPION.

Для оценки возможности отделения магнитомаркированных дрожжей с помощью магнитного поля в производственных условиях предлагается модель сепаратора, входящего в установку для очистки сточных вод. Схема сепаратора приведена на рисунке 1А. Он представляет собой канал с расширением, в конструкцию которого входят два магнита и концентраторы поля в форме цилиндрических стержней из ферромагнитного материала. Теоретически, вода после процесса очистки, но еще содержащая дрожжевой биосорбент, поступает в сепаратор, где происходит отделение клеток путем удержания на магнитных полюсах стержней. При попадании в сепаратор клетки испытывают действие сил со стороны магнитного поля и вязкой среды. Они включают магнитофоретическую силу, силу сопротивления среды (силу Стокса), выталкивающую силу, гравитацию, инерциальные, и силы взаимодействия частиц с жидкостью. Последние два типа сил являются незначительными, поэтому в нашей модели они игнорировались. Так как геометрия модели рассматривалась в двумерной проекции, то выталкивающая сила и гравитация, также не учитывались. Поэтому, суть всей модели сводилась к решению следующего уравнения:

$$m_{\text{к}} \frac{d^2 r}{dt^2} = F_{\text{м}} + F_{\text{с}}, \quad (1)$$

где $m_{\text{к}}$ – масса клетки; r – пространственное расположение клетки; $F_{\text{м}}$ – магнитофоретическая сила; $F_{\text{с}}$ – сила Стокса.

Рассматриваемый магнитный сепаратор позволяет создавать заданное количество областей с высокими значениями силового фактора поля $(\mathbf{H} \cdot \nabla) \mathbf{B}$ ($\mathbf{H}$ и $\mathbf{B}$ – напряженность и индукция магнитного поля) на протяжении выходного канала за счет наличия системы ферромагнитных стержней. Присутствие зон с высокими значениями $(\mathbf{H} \cdot \nabla) \mathbf{B}$ является ключевым для эффективного протекания сепарации, так как магнитофоретическая сила линейно зависит от этого параметра. Предлагаемое расположение стержней в шахматном порядке на расстоянии $2r$ друг от друга (r – радиус стержня) позволяет увеличить вероятность захвата магнитомаркированных клеток и исключить их взаимное влияние друг на друга [6]. Результаты моделирования силового фактора магнитного поля в сепараторе (рис. 1Б) указывают на то, что наибольшие значения параметра $(\mathbf{H} \cdot \nabla) \mathbf{B}$ были характерны для полюсов стержней и углов магнитов. Отдельно стоит отметить, что на полюсе одного из стержней значение $(\mathbf{H} \cdot \nabla) \mathbf{B}$ превышает таковые в центре и на углах поверхности магнитов в 15 раз и 2 раза соответственно.

Для построения, вычисления и обработки результатов модели использовался программный пакет для мультифизического моделирования Comsol Multiphysics 5.2. При создании модели были использованы модули AC/DC (для моделирования магнитного поля) и CFD (для вычисления гидродинамики процесса) со следующими физическими интерфейсами: Magnetic Fields, No Currents, Laminar Flow и Particle Tracing for Fluid Flow. Решение модели, состояло из двух этапов, первый – моделирование распределения магнитного поля и скорости потока жидкости, второй – вычисление траекторий движения клеток.

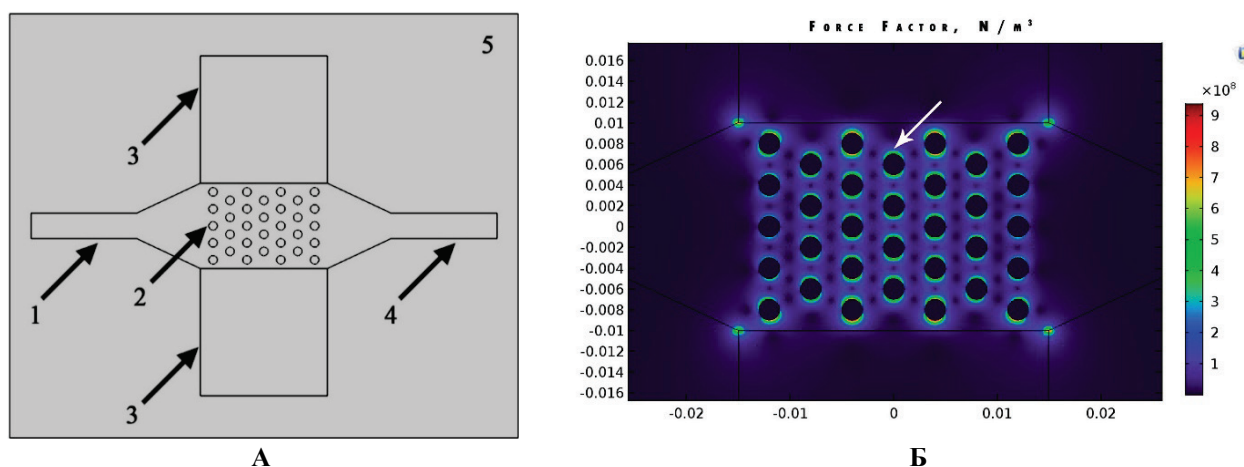


Рисунок 1. А) Геометрия модели сепаратора магнитомаркированных клеток: 1 – входной канал, 2 – сеть ферромагнитных концентраторов, 3 – магнит, 4 – выходной канал; 5 – расчетная область; Б) распределение силового фактора магнитного поля $(\mathbf{H} \cdot \nabla) \mathbf{B}$ в магнитном сепараторе, смоделированное в программе Comsol Multiphysics (стрелкой указан стержень, на полюсе которого вычислялось значение $(\mathbf{H} \cdot \nabla) \mathbf{B}$ для сравнения с силовыми характеристиками магнитов)

Магнитная восприимчивость клеток была представлена в качестве варьируемого параметра. Расчет траекторий движения производили для 100 клеток, выпуск которых осуществлялся со входного канала. Эффективность сепарации биосорбента определялась процентом клеток, удержанных на ферромагнитных концентраторах или у оснований полюсов магнитов.

Нативные, YFT- и YFC-клетки применялись в роли биосорбентов ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} и Fe^{3+} из модельных растворов, для приготовления которых были использованы следующие соли металлов: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (AppliChem GmbH, Германия). Начальные концентрации ионов меди, никеля и железа составляли 200 мг/л, 50 мг/л и 60 мг/л соответственно. На начальном этапе биомассу трехкратно промывали дистиллированной водой путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 7 минут. Далее биосорбенты выдерживали в 0.1 М растворе NaOH на протяжении 5 минут. Затем биомассу еще раз дополнительно двукратно промывали. После чего пробирки с биосорбентом, суспендированном в модельном растворе металла, инкубировали на орбитальном шейкере (при 28 об/мин) на протяжении 30 минут. Концентрация биосорбента составляла 10 г/л. Кинетику концентрации ионов металла регистрировали в течение 30 минут с момента начала контактирования. Определение содержания металлов в растворах осуществляли с помощью фотометрических методов.

Статистическую обработку данных по кинетике биосорбции ионов металлов проводили путем регрессионного анализа. Экспериментальные данные моделировались уравнением кинетики адсорбции псевдотретьего порядка [7]:

$$\frac{dq_t}{dt} = K(q_e - q_t)^2, \quad (2)$$

где t – время, с; q_t – сорбционная емкость в заданный момент времени, мг/г; K – константа равновесной скорости, $\text{г} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$; q_e – равновесная сорбционная емкость, мг/г. Путем интегрирования и применения граничных условий $t=0$, $q_t=0$ и $t=t$, $q_t=q_e$, уравнение (2) можно представить в виде:

$$q_t = \frac{t}{1/Kq_e^2 + t/q_e}. \quad (3)$$

Для регрессионного анализа экспериментальных данных использовалась линейная форма уравнения (3):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{Kq_e^2} + \frac{1}{q_e} t. \quad (4)$$

Сорбционную емкость биосорбента в заданный момент времени рассчитывали по формуле:

$$q_t = \frac{C_i - C_t}{m} \times V, \quad (5)$$

где q_t – сорбционная емкость в заданный момент времени, мг/г; C_i – начальная концентрация металла в растворе, мг/л; C_t – концентрация металла в растворе в заданный момент времени, мг/л; m – масса биосорбента, г; V – объем реакционной смеси, л.

Для определения коэффициентов кинетической модели использовался линейный регрессионный анализ, выполненный с помощью программы OriginPro 9.0 (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассчитанные значения параметров $\chi_{\text{кл}}$ для YFT- и YFC-клеток представлены на рисунке 2. Анализ полученных данных с помощью критерия Шапиро-Вилка свидетельствует о том, что распределение YFT- и YFC-клеток по параметру магнитной восприимчивости является нормальным. Среднее значение восприимчивости, характерное для YFT-клеток (χ_{YFT}) составляет 0,115, в то время как $\chi_{\text{YFC}} = 0,166$. Несмотря на то, что два типа клеток модифицировались при одинаковых дозах внеклеточного железа (2 пг Fe / кл), их магнитные свойства отличаются, свидетельствуя о том, что YFC-клетки обладают более сильными парамагнитными свойствами. Это может быть связано с коагуляцией и неравномерным распределением наночастиц Fe_3O_4 -ТМАН в процессе магнитомаркирования клеток. Микрофотографии фиксированных и окрашенных на выявление ионов железа нативных и модифицированных клеток представлены на рисунках 3А-В.

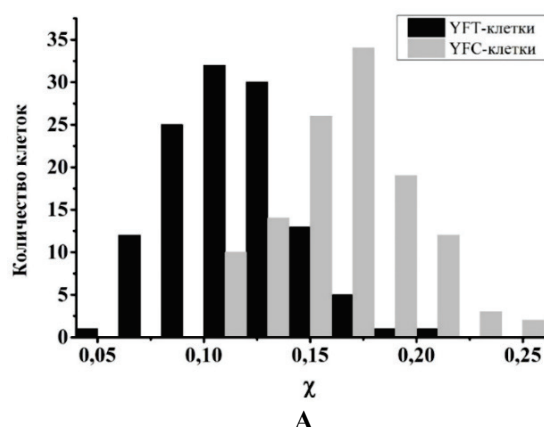


Рисунок 2. Распределение YFT- и YFC-клеток по значениям магнитной восприимчивости (среди каждой фракции проанализировано 120 клеток)

На фотографиях заметно, что YFC-клетки обладают более равномерным распределением наночастиц на своей поверхности, что нельзя сказать о YFT-клетках, конгломераты которых внутри содержат скопления частиц Fe_3O_4 -ТМАН.

Таким образом, коагуляция и неравномерное распределение наночастиц Fe_3O_4 -ТМАН на поверхности дрожжевых клеток может являться причиной сниженного значения χ_{YFT} по сравнению с χ_{YFC} . Полученные в результате расчетов значения χ_{YFT} и χ_{YFC} были использованы при компьютерной симуляции магнитного захвата клеток в модели сепаратора.

Эффективность модельной сепарации магнитомаркированных клеток во многом определяется не только значением их магнитной восприимчивости, но также соотношением силовых характеристик магнитов и скорости выходного потока жидкости. Для оценки оптимальных параметров установки для осуществления биосорбции было проведено моделирование траекторий движения YFT- и YFC-клеток в выходном канале при варьировании индукции магнитов и скорости выходного потока. На основе результатов вычисляли эффективность сепарации, определяемую процентом клеток, удержанных системой магнитов и стержней. Результаты моделирования представлены на рисунке 4.

Так как две фракции полученных модифицированных дрожжей отличаются по средней величине магнитной восприимчивости, определенной методом магнитофореза, то и эффективность их сепарации разнится. Согласно результатам моделирования, при индукции магнитов 0,31 Т и скорости потока 5 см/с эффективность сепарации YFT-клеток составила 92 %, а YFC-клеток – 98 %. На основе полученного распределения эффективности захвата магнитомаркированных клеток можно определять оптимальные сочетания характеристик магнитов и скорости выходного потока в магнитном сепараторе. Если предпочтительным является использование недорогих магнитов, то скорость потока должна быть предельно низкой. Так, при использовании магнитов с индукцией около 0,2 Т для 100 %-ой сепарации YFC-клеток скорость выходного потока не должна превышать 1 см/с. Однако в очистительных сооружениях минимизация времени на сепарацию биосорбента являлась бы более предпочтительной. При максимальной исследуемой скорости выходного потока (10 см/с) наивысшая степень сепарации YFC-клеток наблюдалась при значении индукции магнитов в 0,6 Т.

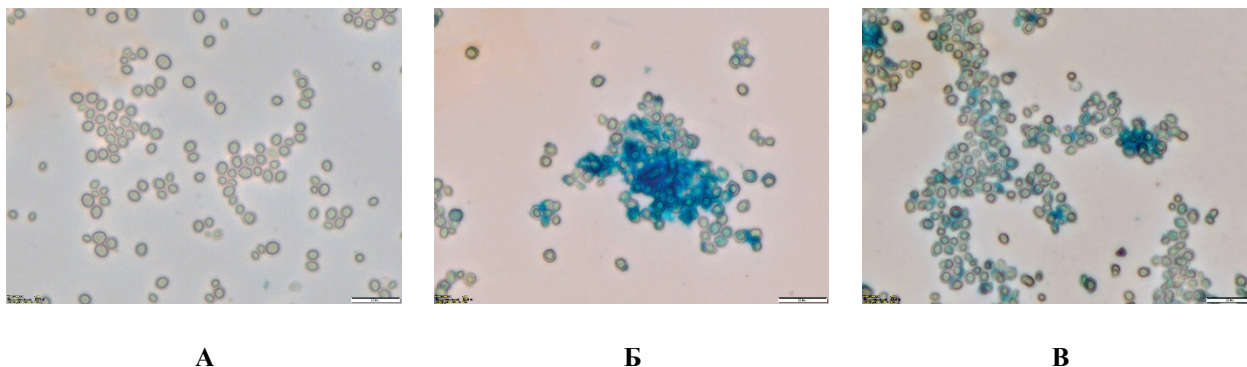


Рисунок 3. Микроскопия нативных (А), YFT- (Б) и YFC-клеток (В), окрашенных гексацианоферратом калия для визуализации распределения наночастиц (увеличение 400х, масштабная линейка 20 мкм)

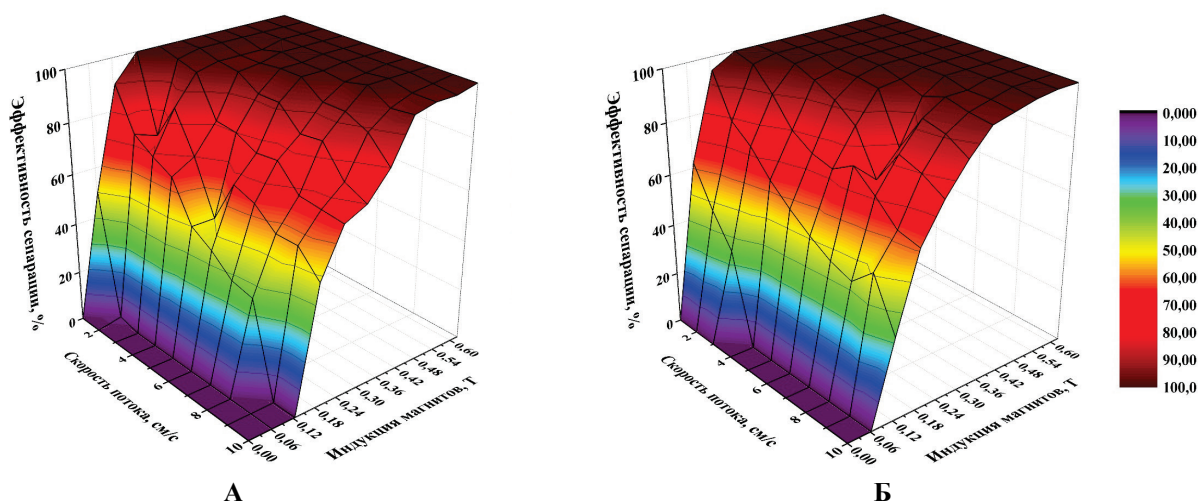


Рисунок 4. Эффективность сепарации YFT- (А) и YFC-клеток (Б) в зависимости от скорости потока жидкости и индукции магнитов

Таким образом, моделирование показало, что YFT- и YFC-клетки могут сепарироваться в разработанной модели при сочетаниях сильный магнит-высокая скорость и слабый магнит-малая скорость потока.

Определение содержания ионов тяжелых металлов позволило выявить, что после 30-минутного контактирования исследуемых биосорбентов с модельными растворами, удается добиться снижения концентрации загрязнителя на 85-100 % (рис. 5А). Стоит отметить, что основная часть ионов металла сорбировалась клетками уже после 1-5 минут контактирования и вплоть до 30-й минуты процесс десорбции не наблюдался. Согласно литературным данным [8, 9] в течение этого периода процесс биосорбции происходит за счет пассивного пути, для осуществления которого метаболическая активность клеток не является необходимостью. Пассивная сорбция характеризуется взаимодействием ионов с функциональными группами поверхностного аппарата клетки за счет механизмов координации, комплексообразования, ионообмена, электростатической адсорбции или неорганического микроосаждения. Высокая эффективность сорбции исследуемых ионов металлов за столь короткий период свидетельствует о перспективности использования магниточувствительных дрожжевых клеток в роли пассивных биосорбентов.

Линейный регрессионный анализ был использован для обработки экспериментальных данных с целью определения параметров равновесной биосорбционной емкости (q_e) исследуемых биосорбентов. Результаты представлены на рис. 5Б-5Г и в таблице 1. Кинетическая модель псевдо-второго порядка удовлетворительно описывает экспериментальные значения, это отображено в высоких значениях коэффициента R^2 . Полученные результаты указывают на усиление биосорбционной емкости у YFT- и YFC-клеток в сравнении с нативными. При биосорбции ионов Cu^{2+} значение q_e для нативных клеток составляет 35,40 мг/г, а YFT- и YFC-клеток – 37,36 мг/г и 37,58 мг/г соответственно. В случае биосорбции ионов Ni^{2+} значение q_e для нативных клеток составляет 5,14 мг/г, а YFT- и YFC-клеток – 5,92 мг/г и 5,96 мг/г соответственно. Параметры биосорбционной емкости исследуемых клеток не имели достоверно значимых различий при сорбции ионов Fe^{3+} . Повышение биосорбционной емкости у магнитомаркированных дрожжей может быть вызвано участием наночастиц Fe_3O_4 в процессе связывания ионов металла или их влиянии на состав и свойства поверхностных сайтов клеток.

Таблица 1. Биосорбционная емкость дрожжевых биосорбентов

Тип клеток	Cu^{2+}			Ni^{2+}			Fe^{3+}		
	q_e , мг/г	$\sigma_{\text{рег}}$	R^2	q_e , мг/г	$\sigma_{\text{рег}}$	R^2	q_e , мг/г	$\sigma_{\text{рег}}$	R^2
Нативные	35.40	0.304	0.999	5.14	0.022	0.999	4.63	0.031	0.999
YFT	37.36	0.666	0.999	5.92	0.066	0.999	4.65	0.077	0.999
YFC	37.58	0.610	0.999	5.96	0.007	0.999	4.69	0.104	0.998

$\sigma_{\text{рег}}$ – стандартная ошибка коэффициента регрессии

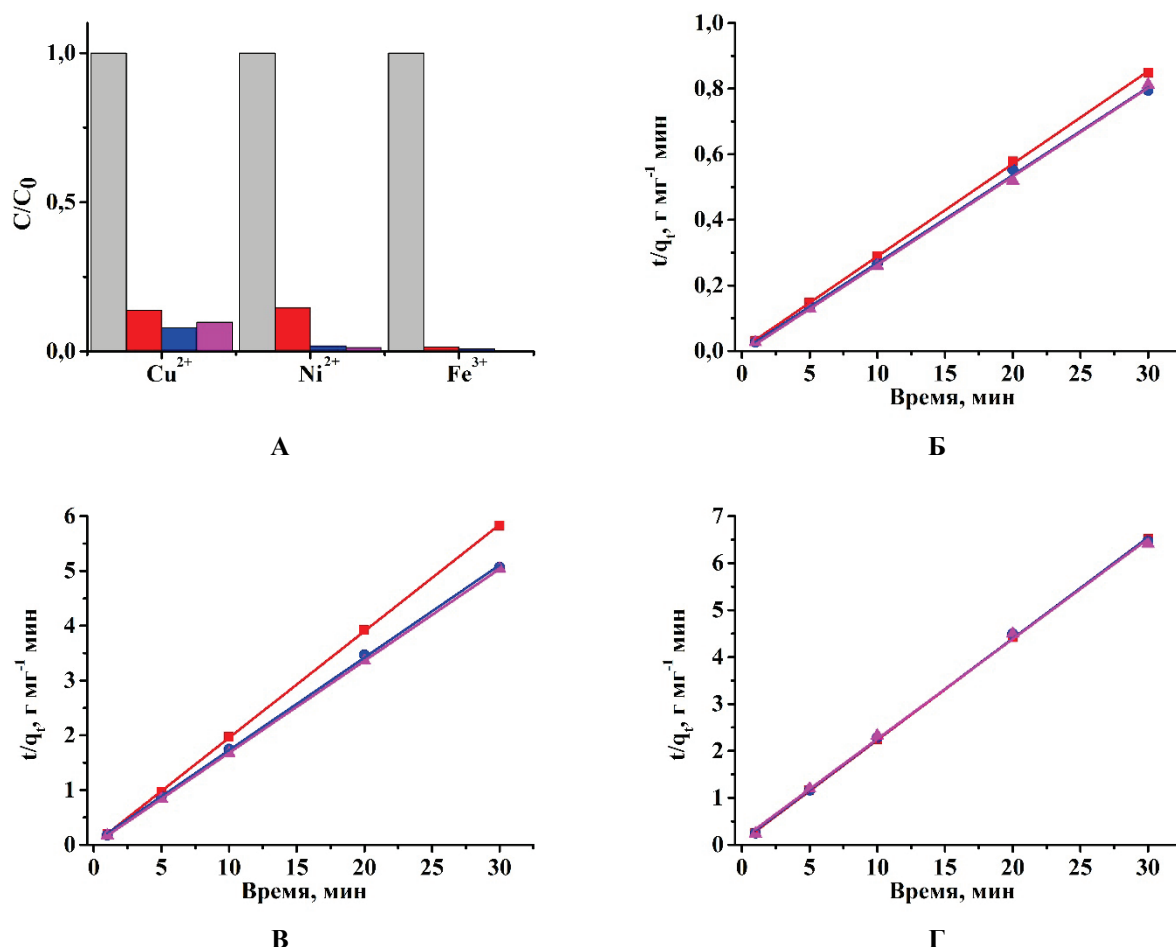


Рисунок 5. Изменение концентрации тяжелых металлов в растворах после 30-минутного взаимодействия с нативными клетками (красный), YFT- (синий) и YFC-клетками (пурпурный), серый столбец отмечает нормированное начальное содержание ионов металла в модельном растворе (А); кинетика биосорбции ионов Cu²⁺ (Б), Ni²⁺ (В) и Fe³⁺ (Г) при контакте с: ■ – нативными клетками, ● – YFT-клетками, ▲ – YFC-клетками

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компьютерное моделирование на основе экспериментально рассчитанных значений магнитной восприимчивости свидетельствует о возможности осуществления проточной высокоэффективной магнитной сепарации дрожжевых клеток, маркированных наночастицами Fe₃O₄. Исследование сорбционных свойств модифицированных дрожжей указывает на высокий уровень очистки растворов (85-100 %) от ионов тяжелых металлов. Связывание наночастиц с поверхностным аппаратом дрожжевой клетки может положительно влиять на ее биосорбционный потенциал путем усиления такой характеристики как биосорбционная емкость. Результаты работы могут быть использованы в реализации технологии очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов с помощью магнитоуправляемых дрожжевых биосорбентов.

Список литературы / References:

1. Wang J., Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 2006, no. 24, pp. 427-451.
2. Safarik I., Maderova Z., Pospiskova K., Baldikova E., Horska K., Safarikova M. Magnetically responsive yeast cells: methods of preparation and applications. *Yeast*, 2015, no. 32, pp. 227-237.
3. Беспалова С.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В., Холявка М.Г. Инверсия сахарозы и биосорбция ионов Cu²⁺ магнитомаркированными клетками *Saccharomyces cerevisiae*. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2017, № 1, с. 98-101. [Bespalova S.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Holyavka M.G. Inversion of sucrose and biosorption of Cu²⁺ ions by magnetically labeled *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2017, no. 1, pp. 98-101 (In Russ.)]

4. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetism*, 1981, vol. 17, iss. 2, pp. 1247-1248.
5. Турчин В.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В., Попандопуло А.Г., Беспалова С.В., Фисталь Э.Я. Магнитофоретические свойства фетальных фибробластов человека, маркированных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, стабилизированными цитратом. *Гены и клетки*, 2017, т. 12, вып. 1, с. 47-53. [Turchyn V.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Popandopulo A.G., Bepalova S.V., Fistal E.Ya. Magnetophoretic properties of human fetal fibroblasts magnetically labeled with citrate stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Genes and cells*, 2017, vol. 12, iss. 1, pp. 47-53 (In Russ.)]
6. Горобец С.В., Горобец О.Ю. Оптимизация функциональных параметров высокоградиентных ферромагнитных насадок магнитных фильтров для очистки жидких сред. *Химия и технология воды*, 2003, № 6, с. 505-514. [Gorobets, S. V., Gorobets, O. Yu. Optimization of functional parameters of high-gradient ferromagnetic nozzles of magnetic filters for cleaning liquid media. *Khimiia i tekhnologiia vody*, 2003, no. 6, pp. 505-514 (In Russ.)]
7. Farhan S.N., Khadom A.A. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Industrial Chemistry*, 2015, no. 6, pp. 119-130.
8. Ferraz A.I., Tavares T., Teixeira J.A. Cr (III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Journal*, 2004, no. 105, pp. 11-20.
9. Suh J.H., Kim D.S., Yun J.W., Song S.K. Process of Pb^{2+} accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 1998, № 20, iss. 2, pp. 153-156.

BIOSORBENT BASED ON THE COMPLEX OF YEAST CELLS AND MAGNETIC NANOPARTICLES FOR REMOVING HEAVY METAL IONS

Solopov M.V., Legenkiy Yu.A., Bepalova S.V.

Donetsk National University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283050, DPR; e-mail: mxsolopov@yandex.ru

Abstract. A wastewater purification from heavy metal ions using biosorbents has a great scientific interest. The article is devoted to the evaluation of magnetic and sorption properties of yeast cells obtained by marking with Fe_3O_4 nanoparticles. Basing on the calculations of the values of the magnetic susceptibility of yeast cells a computer simulation of cells separation in the considering model separator was carried out under various fluid flow rates and inductions of the magnets. The results of simulation indicate the possibility of highly efficient separation of the modified cells. The biosorption properties of the cells were determined by the purification of model solutions from copper, nickel and iron. The biosorption capacity of intact and modified cells was determined by the analysis of kinetics of metal ions sorption from the model solutions. It has been shown that cells labeled with nanoparticles can more effectively accumulate copper and nickel ions compared to intact yeast. The obtained results can be used to implement in the technology of water purification with yeast sorbents.

Key words: yeast cells, biosorbent, heavy metal ions, magnetic nanoparticles, magnetic separation.

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 3, № 2, 2018

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 3, No. 2, 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 26.07.2018.

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе РИИЦ «Медиацентр»
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»,
ул. Курчатова, 7, Севастополь, 299015, Российская Федерация