

ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

**Актуальные вопросы
биологической физики
и химии**

**Том 4, № 1
2019**

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И
ХИМИИ**

Научный журнал

**Том 4, № 1
2019**

**RUSSIAN JOURNAL of
BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY
Volume 4, No. 1, 2019**

Севастополь
2019

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 19-04-20066).

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);
Ризниченко Г.Ю. (Москва);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Тихонов А.Н. (Москва);
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);
Riznichenko G.Yu. (Moscow);
Soldatov A.A. (Sevastopol);
Tikhonov A.N. (Moscow);
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 4, № 1, 2019

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

Т.А. Яхно, В.Г. Яхно

Физико-химическая эволюция дисперсной фазы воды при ее высыхании 9

Н.К. Кочарли, С.Т. Гумматова

Влияние ультрафиолетового - В излучения на структуру плазматических мембран клеток дрожжей 17

Г.А. АхвердиеваОценка биологически активной конформации дельторфинов и построение фармакофорной модели для их взаимодействия с δ -рецепторами.....22**С.Ф. Барановский, Д.Н. Чернышев, Н.С. Ярошенко, С.А. Кукленко**

Ассоциация рибофлавина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе 32

Г.А. Агаева, У.Т. Агаева, Н.М. Годжаев

Сравнительный анализ пространственной и электронной структуры трипептидных ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ).....39

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

С.А. Судоргин, М.А. Заичкина

Исследование термоэлектрических характеристик углеродных нанотрубок для разработки биосенсоров 46

Л.И. Исмаилова, Р.М. Аббаслы, Н.А. Ахмедов

Структурная организация глипролиновой пентапептидной молекулы 51

Л.Н. Агаева, А.А. Абдинова, С.Р. Ахмедова, Н.Ф. Ахмедов, Н.А. Ахмедов

Пространственная структура молекулы АСТН-(4-10)-PGP 57

Н.А. Ахмедов, Л.Н. Агаева, Ш.Н. Гаджиева, Р.М. Аббаслы, Л.И. Исмаилова

Пространственная структура молекул экзорфина А4 и А5 63

Я.М. Дусаева, В.В. Водопьянов

Математическая модель роста зокачественной опухоли 68

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. КрутецкаяИнгибиторы циклооксигеназ подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые хлорпромазином в макрофагах 73

М.А. Моралес Санчез, Э. Велазкез де ла Луз, Г.Д. Галан Трухильо, А. Луна-Флорес, Р. Августин Серрано, А.М. Сервантес Тавера, А.А. Эрнандес Сантьяго Microwaves-assisted chemical synthesis of silver phosphate powder, its morphological change and photocatalytic activity with sunlight	77
Г.Д. Галан Трухильо, М.А. Моралес Санчез, Э. Велазкез де ла Луз, А. Луна-Флорес, Р. Августин Серрано, А.М. Сервантес Тавера, А.А. Эрнандес Сантьяго Study of photocatalytic activity with silver and copper phosphates obtained by chemical synthesis assisted by microwaves.....	81
Е.А. Генералов Влияние полисахаридного препарата «Иммеран» на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки	85
А.В. Мельницкая, З.И. Крутецкая, Н.И. Крутецкая, В.Г. Антонов Трифлуоперазин модулирует транспорт Na^+ в коже лягушки	90
В.В. Внуков, О.И. Гуценко, Н.П. Милютина, А.А. Ананян, И.В. Корниенко, А.А. Плотников Роль митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 в регуляции сигнальной системы KEAP1/Nrf2/ARE и апоптоза в головном мозге при окислительном стрессе	94
Н.А. Роденко, Т.И. Васильева, И.А. Беляева Возможность применения лекарственных препаратов после облучения импульсным магнитным полем высокой напряженности.....	102
Т.И. Васильева, Т.В. Шарова, А.А. Хренова, В.А. Глушников, Н.А. Кленова Влияние импульсных магнитных полей на сорбционные свойства бактериальных целлюлозных пленок	107
Д. де ла Роса Оропеза, Л.А. Рейес Рамирез, М. Карденас Гарсиа, Дж. Корона Моралес, А.М. Сервантес Тавера, А.А. Эрнандес Сантьяго, Х.А. Арзола Флорес Green chemistry: Using the aqueous extract of the leaves of a Mexican oak (<i>Quercus rugosa</i> ; Fagaceae) for synthesis of silver nanoparticles	114

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

Н.М. Барбин, К.С. Алексеев, В.Л. Вершинин Влияние кавитационной обработки воды на рост гидробионтов.....	120
А. Луна Флорес, М.А. Моралес Санчез, А.А. Эрнандес Сантьяго, А.М. Сервантес Тавера Synthesis of ZnO by the hydrothermal method using different precursors for the degradation of methylene blue.....	124
С.М. Молина Монтелеон, М.Ф. Савинон Флорес, Э. Видал Роблес, А.А. Эрнандес Сантьяго, Х.А. Арзола Флорес Characterization of the composting process using machine learning algorithms.....	128

К.Д. Моран Титла, Х.Э. Атенко Росас, Э. Видал Роблес, Р. Муруэта Фортиз, Дж. Корона Моралес, А.А. Эрнандес Сантьяго, Х.А. Арзола Флорес Description and statistical analysis of the SOD1 network and its correlation with its genetic properties	131
В.А. Лисютин, О.Р. Ластовенко Биотурбация и изменчивость акустических характеристик переходного слоя дна мелкого моря	138

CONTENTS

Volume 4, No. 1, 2019

GENERAL BIOPHYSICS

T.A. Yakhno, V.G. Yakhno

Physical-chemical evolution of the dispersed phase of water when it dries 9

N.K. Kocharli, S.T. Hummatova

The influence of ultraviolet –B irradiation on the plasma membrane structure in the yeast cells 17

G.A. Akverdieva

Assessment of biologically active conformations of deltorphins and construction of pharmacophore models for their interactions with δ - receptors 22

S.F. Baranovskiy, D.N. Chernyshev, N.S. Yaroshenko, S.A. Kuklenko

Association of riboflavine and salicylic acid sodium ether in an aqueous solution 32

G.A. Agaeva, U.T. Agaeva, N.M. Godjaev

Comparative analysis of spatial and electronic structure of tripeptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) 39

MODELLING IN BIOPHYSICS

S.A. Sudorgin, M.A. Zaichkina

Investigation of thermoelectric characteristics of carbon nanotubes for the development of biosensors..... 46

L.I. Ismailova, R.M. Abbasli, N.A. Akhmedov

Structural organization of the glyproline pentapeptide molecule 51

L.N. Agayeva, A.A. Abdinova, S.R. Akhmedova, N.F. Akhmedov, N.A. Akhmedov

Spatial structure of ACTH-(4-10)-PGP molecule 57

N.A. Akhmedov, L.N. Agaeva, Sh.N. Gadjeva, R.M. Abbasli, L.I. Ismailova

Spatial structure of exorphin A4 and A5 molecules 63

Ya.M. Dusaeva, V.V. Vodopyanov

Mathematical model of tumor growth 68

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

- L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya**
Cyclooxygenase inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by chlorpromazine in macrophages 73
- M.A. Morales Sanchez, E. Velazquez de la Luz, G.D. Galan Trujillo, A. Luna-Flores, R. Agustin Serrano, A.M. Cervantes Tavera, A.A. Hernandez Santiago**
Microwaves-assisted chemical synthesis of silver phosphate powder, its morphological change and photocatalytic activity with sunlight 77
- G.D. Galan Trujillo, M.A. Morales Sanchez, E. Velazquez de la Luz, A. Luna-Flores, R. Agustin Serrano, A.M. Cervantes Tavera, A.A. Hernandez Santiago**
Study of photocatalytic activity with silver and copper phosphates obtained by chemical synthesis assisted by microwaves.....81
- E.A. Generalov**
Effects of the immeran polisaccharide drug on the course of the personal accident of the stomach and the dualcythermal table 85
- A.V. Melnitskaya, Z.I. Krutetskaya, N.I. Krutetskaya, V.G. Antonov**
Trifluoperazine modulates Na^+ transport in frog skin 90
- V.V. Vnukov, O.I. Gutsenko, N.P. Milyutina, A.A. Ananyan, I.V. Kornienko, A.A. Plotnikov**
The role of mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in regulation of signal system KEAP1/Nrf2/ARE and apoptosis in the brain under oxidative stress..... 94
- N.A. Rodenko, T.I. Vasilyeva, I.A. Belyaeva**
Possibility of application of medicines after the irradiation of the pulse magnetic field of high strength 102
- T.I. Vasilyeva, T.V. Sharova, A.A. Khrenova, V.A. Glushenkov, N.A. Klenova**
Effect of pulsed magnetic fields on sorption properties bacterial cellulose films 107
- D. de la Rosa Oropeza, L.A. Reyes Ramírez, M. Cárdenas García, G. Corona Morales, A.M. Cervantes Tavera, A.A. Hernández Santiago, J.A. Arzola Flores**
Green chemistry: Using the aqueous extract of the leaves of a Mexican oak (*Quercus rugosa*; Fagaceae) for synthesis of silver nanoparticles 114

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

- N.M. Barbin, K.S. Alexeev, V.L. Vershinin**
Effect of cavitation water treatment on the growth of hydrobionts.....120
- A. Luna Flores, M.A. Morales Sánchez, A.A. Hernández Santiago, A.M. Cervantes Tavera**
Synthesis of ZnO by the hydrothermal method using different precursors for the degradation of methylene blue..... 124

**C.M. Molina Monteleón, M.F. Saviñon Flores, E. Vidal Robles,
A.A. Hernández Santiago, J.A. Arzola Flores**

Characterization of the composting process using machine learning algorithms..... 128

**C.D. Morán Titla, J.E. Atenco Rosas, E. Vidal Robles, R. Murueta Fortiz,
G. Corona Morales, A.A. Hernández Santiago, J.A. Arzola Flores**

Description and statistical analysis of the SOD1 network and its correlation with its genetic properties 131

V.A. Lisyutin, O.R. Lastovenko

Bioturbation and variability acoustic properties transitional layer of the bottom of the shallow sea 138

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ДИСПЕРСНОЙ ФАЗЫ ВОДЫ ПРИ ЕЕ ВЫСЫХАНИИ

Яхно Т.А.^{1,2}, Яхно В.Г.^{1,2}

¹ Институт прикладной физики РАН

ул. Ульянова, 46, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603022, РФ; e-mail: yakhta13@gmail.com

Поступила в редакцию: 09.07.2019

Аннотация. Рассмотрена динамика формирования текстуры высыхающего осадка дисперсной фазы (ДФ) воды. Ранее было показано, что ДФ, наблюдаемая через оптический микроскоп, представлена агрегатами жидкокристаллических сфер размером ~ 10 мкм, каждая из которых сформирована вокруг микрокристалла NaCl и является его гидратной оболочкой. После испарения свободной воды центральная зона пленки осадка деформируется и растрескивается, приобретая текстуру горного ландшафта. Микросферы, граничащие с трещинами, разрушаются, гидратные оболочки диссоциируют и солевой раствор проникает в трещины. Образование свободной воды обеспечивает продвижение и каскад рекристаллизаций NaCl по ходу трещин (каналов) до их поступления в общий объем – место слияния каналов. Там формируется область скопления кристаллического NaCl. Таким образом обеспечивается пространственное разделение компонентов осадка. По периферии высыхающей пленки образуются радиально расположенные змеевидные цепочечные структуры, описанные ранее для высыхающих коллоидных дисперсий как результат адвекции, диффузии и капиллярного притяжения (Колегов и Бараш, 2019). Обсуждается сходство и различие наблюдаемых процессов с описанием стареющих коллоидных систем, а также с физикой тектонических разломов.

Ключевые слова: вода, дисперсная фаза, высыхание, деформация, разделение компонентов.

Натурфилософы древности воспринимали мир как единое целое, размышляя об источнике и первоначале всего сущего. В частности, Фалес Милетский (VI век до н.э.) таким первоначалом считал воду: «Все образуется из воды путем её затвердевания/замерзания, а также испарения; при сгущении вода становится землей, при испарении становится воздухом» [1]. С течением времени шло развитие технологий, сопровождавшееся разобщением, дроблением и узкой специализацией наук. В наши дни акцент внимания исследователей Природы сместился на наномасштаб. Именно в этом масштабе, в частности, принято сейчас рассматривать воду и ее фазовые переходы [2-6]. Однако к настоящему времени с помощью разных физических методов получено доказательство структурной неоднородности воды и в масштабе десятков - сотен микрометров¹ [7-15]. Исследование тонкого слоя дистиллированной воды (~ 8 мкм) через оптический микроскоп позволило обнаружить в ней присутствие микрочастиц дисперсной фазы (ДФ) – прозрачных сферических элементов диаметром ~ 10 мкм с темной частицей в центре [16]. Микрочастицы объединялись в агрегаты размером до нескольких сотен микрометров. Как показали наши исследования, центральная структурообразующая частица представляет собой микрокристалл хлорида натрия, а окружающая его сфера – жидкокристаллическую оболочку гидратной воды. Состав, физические свойства и вероятное происхождение ДФ воды обсуждается в работах [16, 17]. Там же рассмотрена динамика фазовых переходов в высыхающих тонких пленках воды с образованием крупных кристаллов хлорида натрия.

В рамках данной статьи мы хотели бы поделиться своими наблюдениями за физико-химическими превращениями слоя ДФ воды, высыхающей на твердой подложке, а также после воздействия на нее повышенной температуры (60 °C).

В качестве исходного материала использовали дистиллированную воду ТУ 2384-009-48326337-2015, pH 7, удельная электропроводность – 4,5 мкСм/см. Вода испарялась с твердотельной подложки (стекло, пластик) на открытом воздухе при комнатных условиях или из препарата «раздавленная капля», при тех же условиях, через открытые границы между подложкой и покровным стеклом, по периметру препарата. Для образования более толстого слоя осадка увеличивали высоту камеры, заполняемой водой, устанавливая углы покровного стекла на пластилиновые шарики высотой ~ 2 мм или предварительно помещая в сухую камеру стеклянные шарики диаметром $\leq 0,5$ мм. Препараты исследовали под микроскопом Levenhuk с видеокамерой, сопряженной с компьютером, при помощи программы TourView. В работе использовали предметные и покровные стекла производства ApexLab (Россия), размерами (25,4 x 72,2 мм x 1 мм) и (24 x 24 x 0,6 мм), соответственно, чашки Петри d = 35 мм (полистирол, стерильные, МиниМед, Россия). Всю стеклянную и пластмассовую посуду использовали новую, без дополнительной обработки.

¹ Во избежание терминологической путаницы, микроструктурой будем называть здесь структуру в масштабе микрометров (но не нанометров).

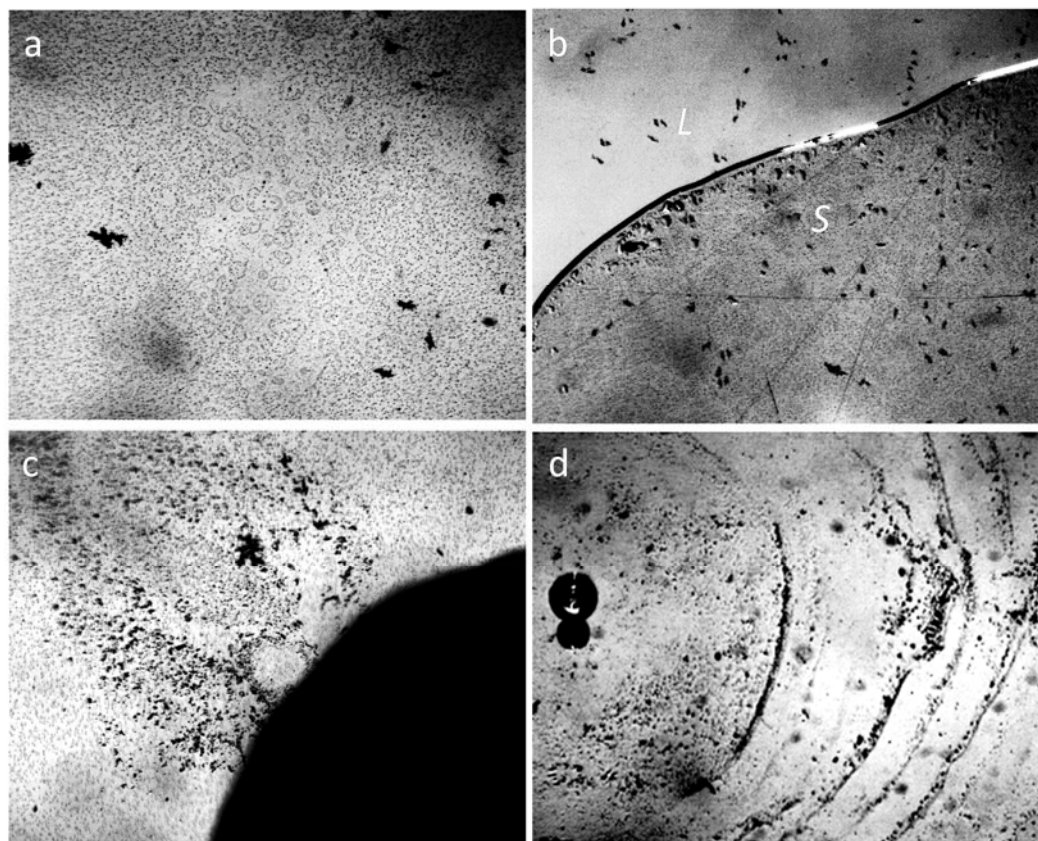


Рисунок 1. ДФ дистиллированной воды между предметным и покровным стеклами: а – в тонком слое воды (8 мкм); б – в процессе испарения жидкой части воды (*L*) из препарата ДФ остается на подложке (*S*); в – крупный агрегат дисперсной фазы, образовавшийся возле пластилинового шарика (темный сегмент справа) в процессе испарения жидкой фазы воды; д – концентрические слои дисперсной фазы, образовавшиеся вокруг стеклянного шарика в процессе испарения. Микрофото. Ширина каждого кадра – 3 мм

В тонком слое воды ДФ представлена агрегатами сферических частиц. При испарении свободной воды через края препарата «раздавленная капля», ДФ остается на поверхности подложки (рис. 1 а, в). Формирование толстого слоя ДФ в высыхающих препаратах шло за счет долгого удержания значительного объема жидкости возле введенных внутрь препаратов посторонних предметов (рис. 1 с, д).

Относительная масса неиспаряющегося осадка дистиллированной воды была определена гравиметрически (весы торсионные, до 500 мг) и составила ~ 10%. При высушивании 1 мл дистиллированной воды через открытую поверхность на предметном стекле при 60°C в течение 4-х часов, на подложке оставался небольшой по площади объем ДФ. На рисунке 2 показаны фрагменты остатков ДФ гантелевидной формы, с двумя более толстыми участками по краям, соединенными тонкой перемычкой. Поверхность толстого участка имеет бугристый светорассеивающий микрорельеф (рис. 2 а), а тонкая перемычка выглядит как черное поле с нечетким микрорельефом (рис. 2 с). В поляризованном свете черные тонкие участки содержат мелкие светящиеся объекты – микрокристаллы соли (рис. 2 б, д).

Рассмотрим преобразование ДФ при испарении свободной воды в условиях ограниченного сверху и снизу объема – в препарате «раздавленная капля» - при постепенном повышении температуры до 60°C и выдерживании в этих условиях в течение 4х часов.

По краям препарата видны змеевидные цепочечные структуры с «головой», обращенной к краю препарата (рис. 3). Эти структуры расположены на однородном мелкозернистом темном фоне. Подобные цепочечные структуры в высыхающих каплях коллоидных жидкостей отмечены неоднократно, а механизм их формирования был описан недавно [18]. Авторы полагают, что этот эффект вызван капиллярным притяжением частиц, которое происходит в разное время в тех областях капли, где толщина слоя жидкости уменьшается до размера частиц. С помощью математической модели, которая учитывает совместное рассмотрение адвекции, диффузии и капиллярности, справедливость такого предположения была подтверждена для капель, высыхающих на твердой подложке. В нашем случае, при высыхании водной дисперсии, ограниченной сверху и снизу стеклами, испарение происходит через края, по периметру препарата. Там также неизбежно развиваются центробежные течения, увлекающие за собой небольшие фрагменты ДФ с присоединившимися к ним «хвостами» частиц ДФ, скрепленными между собой капиллярными силами. В поляризованном свете в зоне «хвостов» видно свечение микрокристаллов соли (рис. 3 б, д).

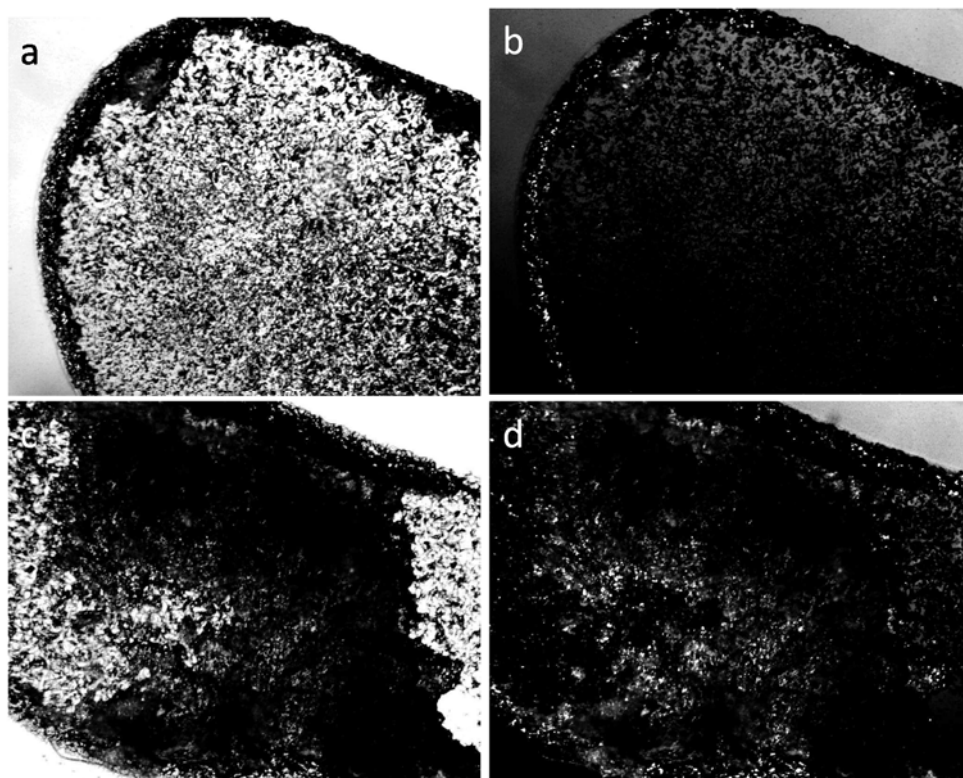


Рисунок 2. Текстура ДФ воды на стеклянной подложке после высушивания препарата в термостате при 60°C в течение 4х часов: а, с – фрагменты препарата; b, d – те же фрагменты в поляризованном свете. Микрофото. Ширина каждого кадра – 3 мм

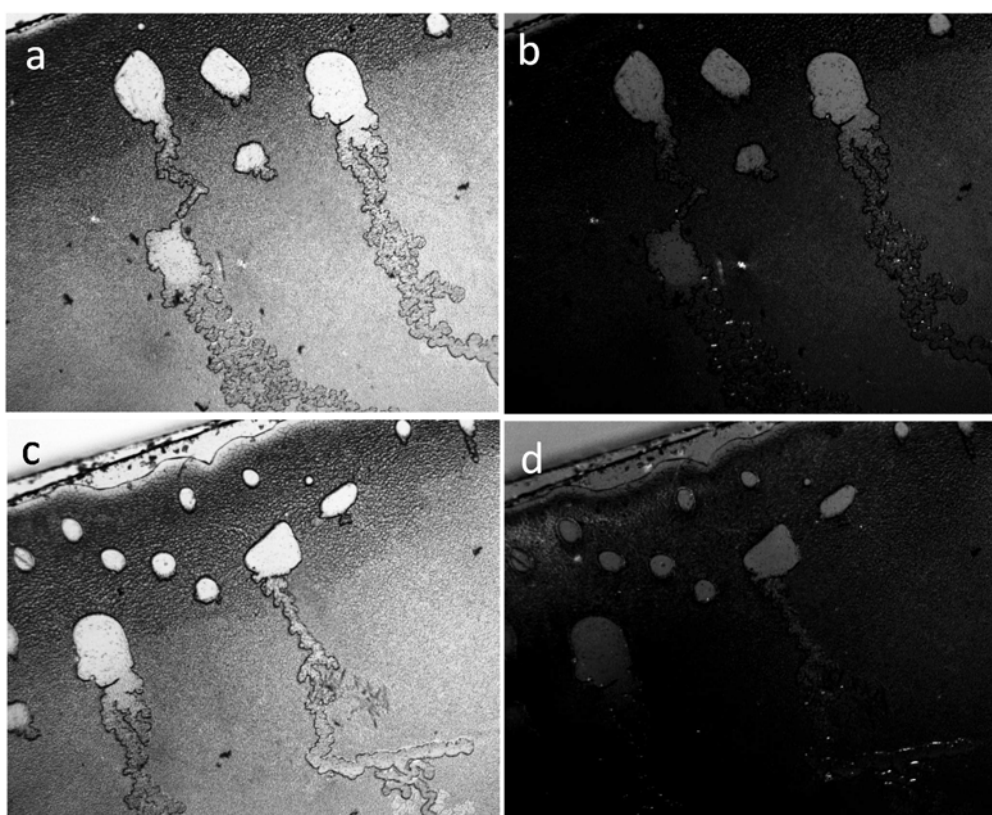


Рисунок 3. Фрагмент краевой зоны препарата: а, с – цепочечные структуры, расположенные поверх темного мелкозернистого адсорбционного слоя; b, d – соответствующие изображения в поляризованном свете. Микрофото. Ширина каждого кадра – 3 мм

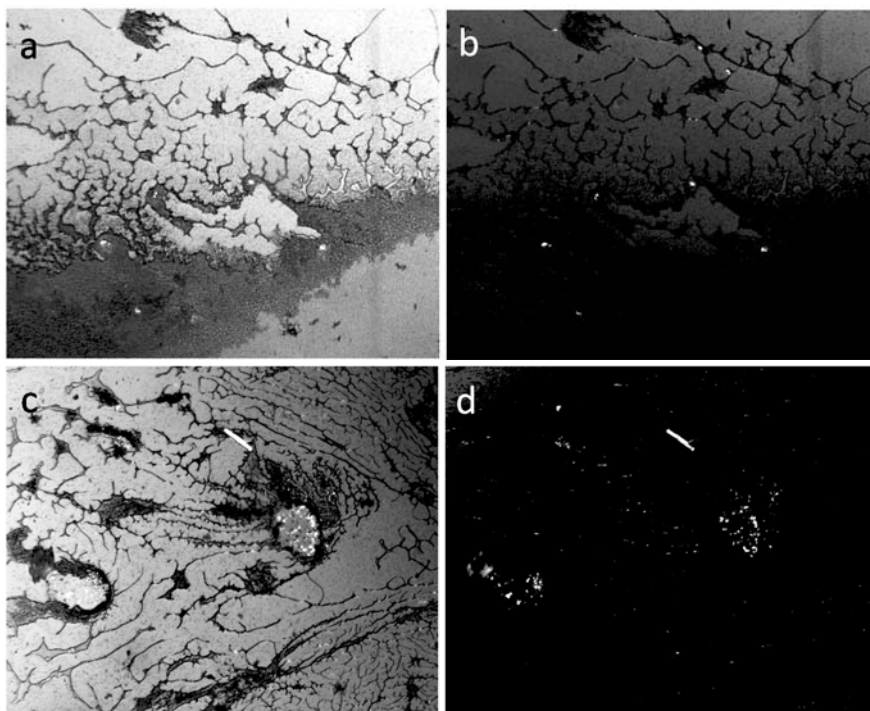


Рисунок 4. Фрагменты центральной зоны препарата: а, с – при обычном освещении, b, d – в поляризованном свете. Микрофото. Ширина каждого кадра – 3 мм

Рельеф основной массы ДФ, расположенной в центральной зоне препарата, сформирован под влиянием растущей энергии деформации. В результате появляются канальные трещины, снижающие эту энергию [19]. При увеличении толщины слоя трещины образуют извилистые линии, которые приводят к частично связанной сети [20]. При еще большей толщине иерархическое образование трещин делит плоскость на многоугольные смежные фрагменты. Средний размер фрагментов увеличивается с толщиной слоя и зависит от его жесткости [20]. В соответствии с разной толщиной слоя ДФ, сформировавшейся в препарате, и разной степенью жесткости отдельных участков, текстура центральной зоны довольно разнообразна (рис. 4).

По ходу трещин (каналов) видны микрокристаллы соли (рис. 4 b, d). Каналы ведут к наиболее низким (темным) участкам поверхности, где видны крупные кристаллические скопления. Учитывая особенности строения элементов ДФ, описанные ранее, логично предположить, что возникающие в слое напряжения и последующее растрескивание приводят к частичному разрушению целостности сфер, диссоциации гидратной воды и растворению солевых микрокристаллов. Солевой раствор постепенно поступает в трещины и стекает в «низины», где вновь кристаллизуется. По мере высыхания препарата в каналы поступает меньше влаги, и микрокристаллы образуются внутри трещин. Таким образом, дегидратация высыхающего массива ДФ сопровождается разделением составляющих ее химических элементов. Аналогичные процессы происходят и в макромире: в частности, геолого-гидродинамические модели показывают, что гидродинамическое поле, возникающее внутри мантийного потока, даже при отсутствии других факторов, способствует перераспределению минеральных фаз в соответствии с их физическими свойствами [21]. В течение 3х месяцев хранения препарата морфологическая картина его существенно не изменилась.

Представляло также интерес проследить за поведением системы при добавлении к ней той же дистиллированной воды. С этой целью препарат погружали в чашку Петри с водой на ночь. Покровное стекло при этом не отделилось благодаря прочной адгезии к подлежащему материалу.

Темный мелкозернистый адсорбционный слой по периферии препарата под действием воды приобрел грубодисперсную структуру (рис. 5 a, b). По-видимому, его мелкие пересохшие гранулы агрегировали под действием капиллярных сил. Островки ДФ начали диссоциировать. Змеевидные цепочечные структуры оставили свои отпечатки в адсорбционном слое, дезагрегировали и были унесены течением (рис. 5 c, d).

Текстуры центральной зоны, как мелко складчатые (рис. 6 a, b), так и крупнотрещинные (рис. 6 c, d), начали расплавляться, превращаясь снова в водную дисперсию. Таким образом, процесс высушивания ДФ был во многом обратим, исключая восстановление ее разрушенных элементов. Мы предполагаем, что солевой раствор, скапливаясь в наиболее низких участках препарата, может приводить к локальным необратимым изменениям за счет более сильной дегидратации подлежащего субстрата и появлению новой темной крошковатой фазы. Природа этой фазы требует дополнительных исследований.

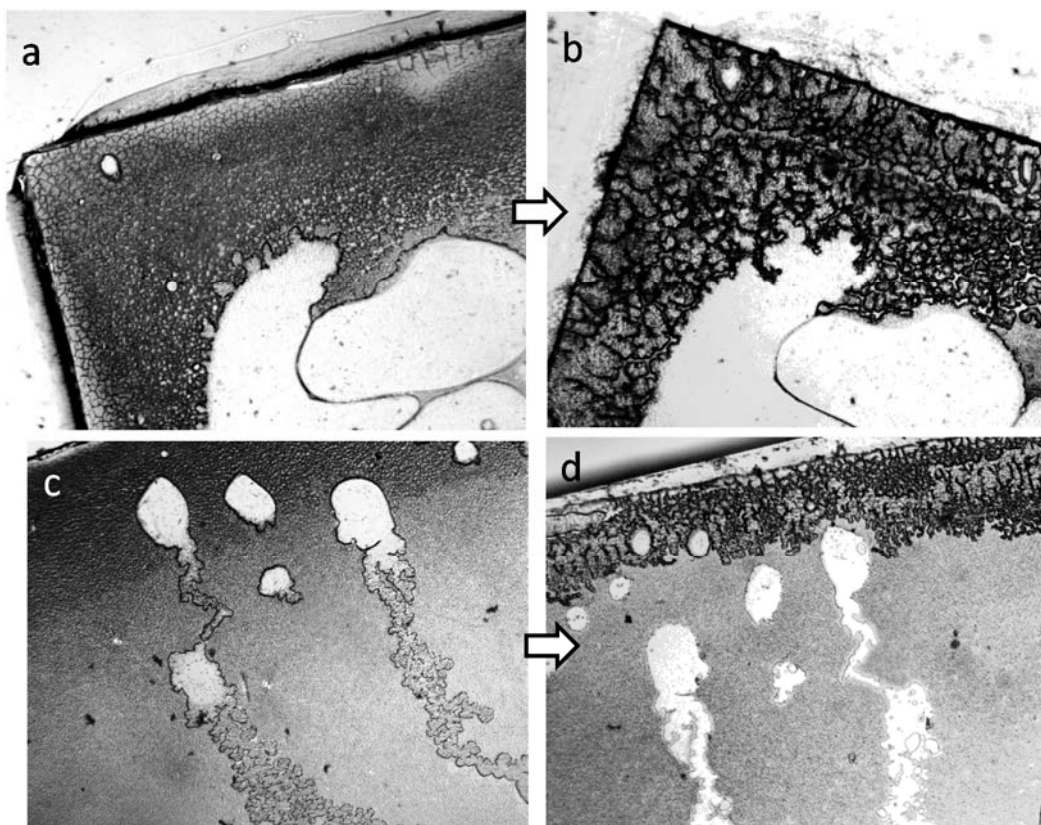


Рисунок 5. Фрагменты краевой зоны препарата до (а, с) и после добавления воды (b, d). Микрофото. Ширина каждого кадра – 3 мм

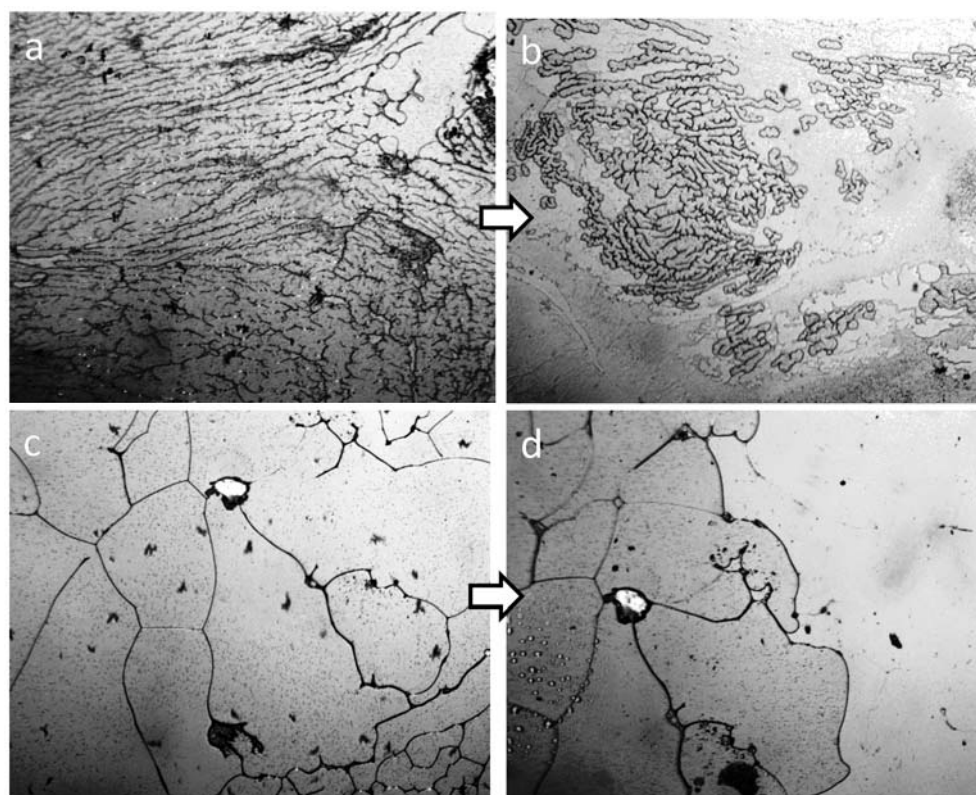
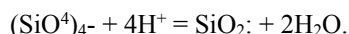


Рисунок 6. Фрагменты центральной зоны препарата до (а,с) и после добавления воды (b,d). Микрофото. Ширина каждого кадра – 3 мм

Возвращаясь к размышлениям древних философов о Воде и Земле, следует отметить, что за последнее десятилетие традиционное противопоставление этих стихий стало меняться в сторону их близкого родства.

Так, в 1998 году советский геолог Ю.А. Калясников высказал мнение, что обычная вода является, скорее всего, неизбежным продуктом главного процесса в рождении силикатной оболочки Земли - полимеризации кремнекислородных тетраэдров [22]. Схематически процесс образования воды автором представлен так:



Суть действия здесь сводится к отрыву протоном иона кислорода от кремнекислородного тетраэдра и вынужденное соединение последнего с соседним, что и есть собственно поликонденсация. Надо только уточнить, что сначала вода появляется в виде гидроксильной группы, поскольку синтез молекулярной воды из H^+ и $(\text{OH})^-$ имеет место лишь при снижении температуры расплавов до 700-600 °С, то есть, при образовании уже конечного продукта литосферы - гранитной магмы [22].

В 2014 году появилось экспериментальное подтверждение предположения Ю.А. Калясникова. Группа японских исследователей подтвердила, что химическая реакция между SiO_2 и жидким H_2 вызывала образование H_2O и SiH_4 . Результаты показали, что часть H_2 окисляется с образованием H_2O , когда компоненты SiO_2 в мантийных минералах растворяются в жидком водороде [23]. Эти данные впоследствии были подтверждены и международной командой исследователей [24]. Моделирование показало, что вода образуется внутри силикатной оболочки, но затем не может оттуда вырваться, и поэтому давление там возрастает. Были проанализированы плотность и структура захваченной воды. Оказалось, что она находится под высоким давлением. Образование и сброс избыточного давления воды может быть реальным спусковым механизмом в глубокой литосфере для сверхглубоких землетрясений, иногда расположенных значительно ниже коры и в более жестких частях глубоких континентальных плит. Вода, образующаяся в мантии, может достигать поверхности несколькими путями, например, переноситься магмой при вулканической активности [25].

В нашем лабораторном эксперименте показано, что ДФ воды при высыхании ведет себя как типичная коллоидная жидкость: образует твердофазные отложения, подвергается старению и растрескиванию. Ранее подобные процессы в коллоидных системах были рассмотрены в работе [20]. Там же отмечено их сходство в микро- и макромире, включая живописные полотна и геофизические явления. Нами показано, что сила деформации высыхающего слоя ДФ воды, ведущая к его повреждению, стимулирует пространственное разделение компонентов осадка. Это воздействие, по сути, является механохимическим. Не все процессы, наблюдавшиеся в условиях нашего эксперимента, были обратимы при добавлении воды. Этот вопрос требует дальнейшего исследования. Приведенная литература свидетельствует о том, что мир, в котором мы живем, един и самоподобен на разных уровнях иерархии. Гениальные догадки натурфилософов вдохновляют на новые исследования.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (грант № 14.Y26.31.0022).

Список литературы / References:

1. Рожанский И.Д. *Развитие естествознания в эпоху античности: ранняя греческая наука «о природе»*. М.: Наука, 1979, 124 с. [Rozhansky I.D. *The development of science in the era of antiquity: the early Greek science "about nature"*. Moscow: Nauka, 1979, 124 p. (In Russ.)]
2. Маленков Г.Г. Структура и динамика жидкой воды. *Журнал структурной химии*, 2006, т. 47, с. 5-35. [Malenkov G.G. Structure and dynamics of liquid water. *Journal of structural chemistry*, 2006, vol. 47, pp. 5-35. (In Russ.)]
3. Саркисов Г.Н. Структурные модели воды. *УФН*, 2006, т. 176, № 8, с. 833-845 [Sarkisov G.N. Structural models of water. *Physics-Uspekhi*, 2006, vol. 176, no. 8, pp. 833-845. (In Russ.)]
4. Nilsson A., Pettersson L.G.M. Perspective on the structure of liquid water. *Chemical Physics*, 2011, vol. 389, pp. 1-34.
5. Мельниченко Н.А. Структура и динамические свойства жидкой воды. *Вестник ДВО РАН*, 2010, т. 1, с. 65-74. [Melnichenko N.A. Structure and dynamic properties of liquid water. *Bulletin of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2010, vol. 1, pp. 65-74. (In Russ.)]
6. Захаров С.Д., Зюзин М.В., Мосягина И.В. Вода: микроструктура и флуктуации. URL: <http://www.biophys.ru/archive/h2o-00027.pdf>. [Zakharov S.D., Zyuzin M.V., Mosyagina I.V. Water: microstructure and fluctuations. URL: <http://www.biophys.ru/archive/h2o-00027.pdf>. (In Russ.)]
7. Ito K., Yoshida H., Ise N. Void Structure in colloidal dispersions. *Science*, 1994, vol. 263, no. 7, pp. 66-68.
8. Ise N., Matsuoka H., Ito K., Yoshida H., Yamanaka J. Ordering of latex particles and ionic polymers in solutions. *Langmuir*, 1990, vol. 6, pp. 296-302.
9. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Kozlov V.A., Starosvetiskij A.V. Laser scattering in water and aqueous solutions of salts. *Proc. of SPIE*, 2010, p. 7376, Article Number: 73761D.
10. Фесенко Е.Е., Терпугов Е.Л. О необычных спектральных свойствах воды в тонком слое. *Биофизика*, 1999, т. 44, № 1, с. 5-9. [Fesenko E.E., Terpugov E.L. On the unusual spectral properties of water in a thin layer. *Biofizika*, 1999, vol. 44, no. 1, pp. 5-9. (In Russ.)]

11. Смирнов А.Н., Лапшин В.Б., Балышев А.В., Лебедев И.М., Сыроешкин А.В. Супранадмолекулярные комплексы воды. *Электронный журнал «Исследовано в России»*, 2004. URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2004/038.pdf>. [Smirnov AN, Lapshin V.B., Balyshv A.V., Lebedev I.M., Syroeshkin A.V. Supranadmolecular complexes of water. *Electronic Journal "Investigated in Russia"*, 2004. URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2004/038.pdf>. (In Russ.)]
12. Гончарук В.В., Смирнов В.Н., Сыроешкин А.В., Мальяренко В.В. Кластеры и гигантские гетерофазные кластеры воды. *Химия и технология воды*, 2007, т. 29, № 1, с. 3-17. [Goncharuk V.V., Smirnov V.N., Syroeshkin A.V., Malyarenko V.V. Clusters and giant heterophase clusters of water. *Chemistry and Technology of Water*, 2007, vol. 29, no. 1, pp. 3-17. (In Russ.)]
13. Sedláč M. Large-scale supramolecular structure in solutions of low molar mass compounds and mixtures of liquids: I. Light scattering characterization. *J. Phys. Chem. B*, 2006, vol. 110, no. 9, pp. 4329-4338.
14. Букатый В.И., Нестерук П.И. Разработка измерительно-вычислительного комплекса и метода малых углов рассеяния для контроля оптических неоднородностей (кластеров) в бидистиллированной воде после действия магнитного поля. *Электронный физико-технический журнал*, 2012, т. 7. URL: <http://eftj.secna.ru/vol7/120702.pdf> [Bukaty V.I., Nesteruk P.I. Development of a measuring and computing complex and a method of small scattering angles to control optical inhomogeneities (clusters) in bidistilled water after the action of a magnetic field. *Electronic Physics and Technology Journal*, 2012, vol. 7. URL: <http://eftj.secna.ru/vol7/120702.pdf>. (In Russ.)]
15. Лаптев Б.И., Сидоренко Г.Н., Горленко Н.П., Кульченко А.К., Саркисов Ю.С., Антошкин Л.В. Оценка структуры воды и водных растворов хлорида натрия с использованием диэлектromетрии и резонансного метода. *Вестник ТГАСУ*, 2013, т. 2, с. 235-244. [Laptev B.I., Sidorenko G.N., Gorlenko N.P., Kulchenko A.K., Sarkisov Yu.S., Antoshkin L.V. Evaluation of the structure of water and aqueous solutions of sodium chloride using dielectrometry and resonance method. *Vestnik of TSUAB*, 2013, vol. 2, pp. 235-244. (In Russ.)]
16. Yakhno T., Yakhno V. A study of structural organization of water and aqueous solutions by means of optical microscopy. *Crystals*, 2019, vol. 9, no. 1, p. 52. DOI: 10.3390/cryst9010052. URL: <http://www.mdpi.com/2073-4352/9/1/52>.
17. Yakhno T., Drozdov M., Yakhno V. Giant Water Clusters: Where Are They From? *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, p. 1582. DOI: 10.3390/ijms20071582. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1582>.
18. Kolegov K.S. and Barash L.Yu. Joint effect of advection, diffusion and capillary attraction on a spatial structure of particle depositions from evaporating droplets. *arXiv:1903.06003 v1 [cond-mat.soft]* 14 Mar 2019
19. Hutchinson J.W., Suo Z. Mixed mode cracking in layered materials. *Advances in Applied Mechanics*, 1991, vol. 29, pp. 63-191. DOI: 10.1016/S0065-2156(08)70164-9.
20. Bacchin P., Brutin D., Davaile A., Giuseppe E., Chen X.D., Gergianakis I., Giorgiutti-Dauphin'e F., Goehring L., Hallez Y., Heyd R., Jeantet R., Floch-Fouere C., Meireles M., Mittelstaedt E., Nicloux C., Pauchard L., Saboungi M.-L. Drying colloidal systems: Laboratory models for a wide range of applications. *Eur. Phys. J. E*, 2018, vol. 4, p. 94. DOI: 10.1140/epje/i2018-11712-x.
21. Савельев Д.Е., Федосеев В.Б. Твёрдофазное перераспределение минеральных частиц в восходящем мантийном потоке как механизм концентрации хромита в офиолитовых ультрамафитах (на примере офиолитов Крака, Южный Урал). *Георесурсы*, 2019, т. 21, № 1, с. 31-46. DOI: <https://doi.org/10.18599/grs.2019.1.31-46>. [Saveliev D.E., Fedoseev V.B. Solid-phase redistribution of mineral particles in the ascending mantle flow as a mechanism for the concentration of chromite in ophiolite ultramafites (using the example of Kraka ophiolites, the South Urals). *Georesources*, 2019, vol. 21, no. 1, pp. 31-46. DOI: 10.18599/grs.2019.1.31-46. (In Russ.)]
22. Калясников Ю.А. *Наноминералогия воды и биосферные процессы*: 2-е изд., перераб. и доп. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2000. 64 с. URL: <http://ukhtoma.ru/koljasnikov1.htm> [Kalyasnikov Yu.A. *Nano-mineralogy of water and biospheric processes*: 2nd ed., Pererab. and add. Magadan: SVNTS FED RAS, 2000, 64 p. URL: <http://ukhtoma.ru/koljasnikov1.htm>. (In Russ.)]
23. Shinozaki A., Kagi H., Noguchi N., Hirai H., Ohfuji H., Okada T., Nakano S., Yagi T. Formation of SiH₄ and H₂O by the dissolution of quartz in H₂ fluid under high pressure and temperature. *American Mineralogist*, 2014, vol. 99, no. 7, pp. 1265-1269. DOI: 10.2138/am.2014.4798.
24. Futera Z., Yong X., Pan Y., Tse J.S., English N.J. Formation and properties of water from quartz and hydrogen at high pressure and temperature. *Earth and Planetary Science Letters*, 2017, vol. 461, pp. 54-60. DOI: 10.1016/j.epsl.2016.12.031.
25. Coghlan A. Deepest water found 1000km down, a third of way to Earth's core. *New Scientist*, 27 January 2017. <https://www.newscientist.com/article/2119475-planet-earth-makes-its-own-water-from-scratch-deep-in-the-mantle>.

PHYSICAL-CHEMICAL EVOLUTION OF THE DISPERSED PHASE OF WATER WHEN IT DRYES

Yakhno T.A.^{1,2}, Yakhno V.G.^{1,2}¹Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences

Ulyanova str., 46, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

²N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University

Gagarin av., 23, Nizhny Novgorod, 603022, Russia; e-mail: yakhta13@gmail.com

Abstract. The dynamics of the formation of the texture of the drying precipitate of the dispersed phase (DP) of water is considered. It was previously shown that DP observed through an optical microscope is represented by aggregates of liquid crystal spheres of $\sim 10 \mu\text{m}$ in size, each of which is formed around a NaCl microcrystal and is its hydration shell. After evaporation of free water, the central zone of the sediment film is deformed and cracks, acquiring the texture of the mountain landscape. The microspheres bordering the cracks are destroyed, the hydrated shells dissociate and the salt solution penetrates the cracks. The formation of free water ensures the advancement and cascade of NaCl recrystallizations along the cracks (channels) before they enter the total volume - the place where the channels merge. A cluster of crystalline NaCl is formed there. This ensures spatial separation of sediment components. On the periphery of the drying film, radially arranged serpentine chain structures are formed, described earlier for drying colloidal dispersions as a result of advection, diffusion, and capillary attraction (Colegov and Barash, 2019). The similarities and differences in the observed processes with the description of aging colloidal systems, as well as with the physics of tectonic faults, are discussed.

Key words: water, dispersed phase, drying, deformation, separation of components.

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО - В ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Кочарли Н.К., Гумматова С.Т.

Бакинский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 09.07.2019

Аннотация. Установлено, что ультрафиолетовое – В (УФ-В) излучение (280-320 нм) индуцирует структурное изменение липидного бислоя и аннулярных липидов плазматических мембран клеток дрожжей. Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Для оценки структурного состояния мембран определяли микровязкость липидной фазы. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофотометр (*Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007*) при максимуме волны возбуждающего света 334 и 275 нм для оценки микровязкости и полярности липидного бислоя и аннулярных липидов клеток дрожжей. Пик флуоресценции эксимера пирена F_2 регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера F_m при длине волны эмиссии 393 нм. Данные полученные при использовании флуоресцентного зонда пирена свидетельствует об изменении исследуемых параметров структурного состояния клеточных мембран. На основании данных об изменении микровязкости мембран дрожжей после облучения можно предположить, что модификация структуры может приводить к изменению полярности липидного бислоя.

Ключевые слова: клетки дрожжей, микровязкость, пирен, ультрафиолетовое - В излучение, липид.

Показано, что с ростом дозы УФ-В излучения увеличивается микровязкость и полярность липидного бислоя и аннулярных липидов. Согласно полученным результатам, предполагается, что увеличение микровязкости и полярности липидов клеточной мембраны связано с перекисным окислением липидов (ПОЛ). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента мембран, являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек. Известно, что при стимуляции ПОЛ в мембранах уменьшается содержание липидов, также меняется микровязкость и электростатический заряд.

ВВЕДЕНИЕ

Мониторинговые исследования состояния озонового слоя (как части атмосферы), проводимые в разных частях Земли, констатируют о прогрессирующем разрушении озонового слоя, связанном с антропогенным воздействием на окружающую среду. Вследствие этого увеличивается интенсивность проникновения в приземные слои атмосферы наиболее опасного вида УФ излучения - средневолнового (УФ-В 280-320 нм), что ведет к целому ряду негативных последствий для человека: преждевременному старению, учащению случаев рака кожи (меланомы), катаракты, ослаблению иммунитета. Возникновение при воздействии УФ-излучения молекулярных повреждений ДНК, не устраняемых (или устраняемых не полностью) репаративными системами клетки, а также фото-деструкция белков и биомембран обуславливают развитие довольно многочисленных биологических эффектов [1-4].

Как известно, действие ионизирующих излучений и УФ-света на клетки вызывает повреждения не только генетических структур, но и клеточных мембран [5, 6].

С возрастанием интенсивности ультрафиолетового излучения и его влияния на процессы, происходящие в биосфере, возникает необходимость оценки цитофизиологических изменений в растениях, которые индуцируются этим фактором. Воздействие ультрафиолетовой радиации на растения в диапазоне 280-320 нм охватывает все уровни биоорганизации [7-9] а также сигнальную, регуляторную и энергетическую функции [7] УФ-В модифицирует воздействие других экологических факторов, действуя часто аддитивно [10].

В полном спектре солнечного света, достигающего земной поверхности, доля УФВ-излучения, которое фильтруется озоновым слоем стратосферы, составляет 1,5%. Однако УФВ-фотоны высокоэнергетичны, и поэтому УФВ-излучение оказывает наиболее сильное повреждающее действие на рост и развитие растений. Высокоинтенсивное УФВ-облучение растений вызывает различные молекулярные повреждения в клеточных структурах, сопровождаемые нарушением их функций [11]. Особое значение с точки зрения биологических последствий действия УФВ-излучения на клетки имеет повреждение ДНК, связанное с образованием в ней ряда фотопродуктов, главным образом пиримидиновых димеров [12]. Молекулярные механизмы ответов на повреждение ДНК изучены в основном у дрожжей и животных. Недавно начатому детальному изучению таких механизмов у растений, в том числе при действии УФВ-излучения, способствует секвенирование геномов у некоторых из них. На основании проведенного анализа у растений выявлены многие гомологи эволюционно консервативных компонентов системы ответов на повреждение ДНК [13].

Установлено, что ультрафиолетовое (УФ) излучение В-области (УФВ 290-320 нм) активирует в клетках растений различные сигнальные механизмы, запускающие процессы программированной смерти клеток либо их

защиты от повреждающего действия этого излучения. Отмечено, что механизмы клеточной смерти при высоких дозах УФВ-облучения связаны с повреждением ДНК и окислительным стрессом, причем в первом случае могут происходить активация чекпойнтов (checkpoints) повреждения ДНК и остановка клеточного цикла, во втором – выход из митохондрий цитохрома с и последующая активация метакаспаз. Обнаружено, что оба механизма индуцируют фрагментацию ДНК и другие типичные для апоптотических клеток изменения, а также что низкоинтенсивное УФ В излучение посредством фоторецептора UVR8 инициирует в клетках защитные процессы, способствующие акклиматизации растений на солнечном свете [11].

В биомембранах липидный компонент, организованный в функционально активную матрицу, интегрирует внешние влияния и участвует в запуске программ клеточного управления. Плазматическая мембрана обладает уникальными рецепторными, сигнальными функциями регуляции важнейших клеточных процессов, поражение которых может привести к гибели клетки. От состояния липидной составляющей мембраны зависит активность связанных с ней ферментов, чувствительность клетки к гормональной и нервной регуляции. Фосфолипиды поддерживают работу важнейших клеточных механизмов, таких как ионный обмен, внутренняя респирация, биологическое окисление, влияют на фиксацию энзимов в митохондриях и окислительное фосфорилирование [14].

Существенная роль в регуляции процессов, происходящих в мембранах, принадлежит их микровязкости – комплексному показателю, который отражает как структурные, так и функциональные аспекты липидной составляющей мембраны. Изменения микровязкости мембраны тесно связаны с метаболическими изменениями, происходящими в клетке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили клетки дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМУ-916. Источником УФ-В – излучения служила ртутная лампа ПРК-4, снабженная светофильтром УФС-2. Доза облучения составляла $0,7 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм². Контролем служила необлученная суспензия. Для оценки структурного состояния мембран определяли микровязкость липидной фазы. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофлуориметре (*Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007*) при максимуме волны возбуждающего света 334 нм для оценки микровязкости липидного бислоя. Пик флуоресценции эксимера пирена F_3 регистрировали при длине волны эмиссии 470 нм, а пик флуоресценции мономера F_m при длине волны эмиссии 393 нм. Коэффициент эксимеризации пирена F_3/F_m (334) отражающий микровязкость липидного бислоя, выражали отношением величины максимума флуоресценции эксимеров пирена F_3 (в относительных единицах флуоресценции при $\lambda_{\text{эмиссии}} = 470$ нм) к величине максимума флуоресценции мономеров пирена F_m $\lambda_{\text{эмиссии}} = 393$ нм) при λ возбуждения 334 нм. Отношение интенсивности флуоресценции эксимеров к мономерам F_3/F_m обратно пропорционально микровязкости липидного бислоя и прямо пропорционально его текучести.

Полярность липидной фазы мембран ($F_{372}/F_{393}(334)$) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_m пирена при длине волны возбуждения 334 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм. Полярность зон белок-липидных контактов ($F_{372}/F_{393}(282)$) оценивали по отношению интенсивности флуоресценции двух мономерных форм F_m в тонком спектре пирена при длине волны возбуждения 282 нм и при длинах волн эмиссии 372 и 393 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что УФ-В облучение клеток дрожжей в дозе $0,7 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм² судя по коэффициенту эксимеризации, приводила к увеличению микровязкости (уменьшению текучести) общего липидного бислоя мембран. Аналогичные процессы отмечались также в областях аннулярных (при белковых) липидов. После облучения высокими дозами ($3,0 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) УФ-В излучения наблюдается изменение параметров, характеризующих физическое состояние липидного бислоя и аннулярных липидов мембран клеток дрожжей. Данные полученные при использовании флуоресцентного зонда пирена свидетельствует об изменении исследуемых параметров структурного состояния клеточных мембран. На основании данных об изменении микровязкости мембран дрожжей после облучения можно предположить, что модификация структуры может привести к изменению полярности липидного бислоя.

Для определения микровязкости зон белок-липидных контактов суспензию клеток содержащего раствор пирена флуориметрировали при длине волны возбуждающего света 272 нм F_{470}/F_{393} .

Полярность окружения зонда пирена в липидном слое мембран $F_{272}/F_{393}(334)$ увеличивается при облучении клеток дозой $0,7 \cdot 10^4$ – $2,2 \cdot 10^4$ эрг/мм². При оценке полярности общего мембранного липидного бислоя установлено, что при облучении в дозе $3,0 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм² наблюдалось незначительное увеличение полярности липидного компонента мембран клеток. В липидном слое мембраны и в зоне белок-липидных контактов полярность несколько возрастает, что согласуется с данными о накоплении в мембранах клеток первичных продуктов ПОЛ.

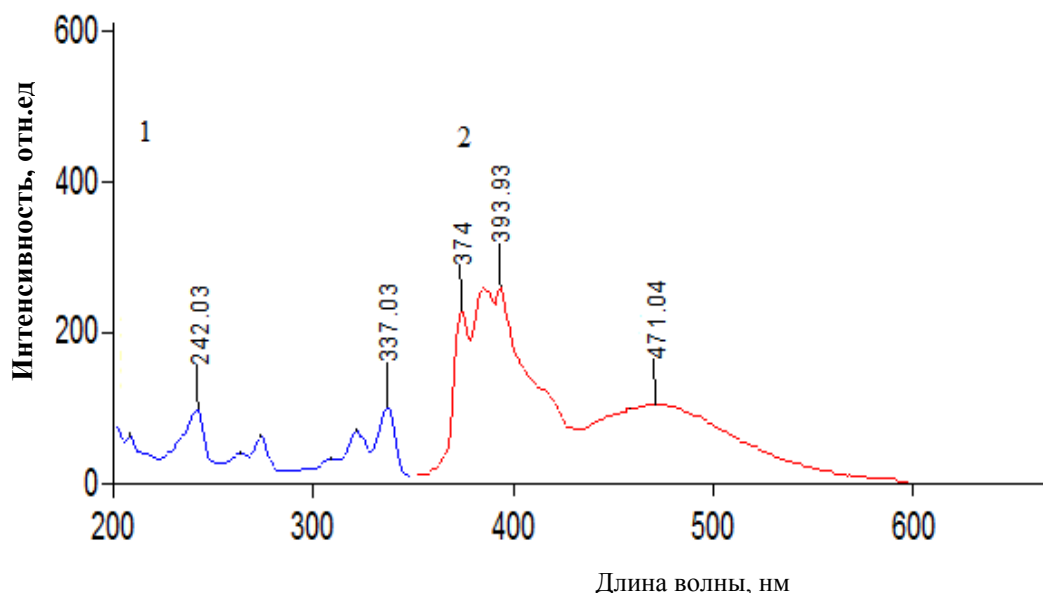


Рисунок 1. Спектры возбуждения и эмиссии пирена в клетках дрожжей

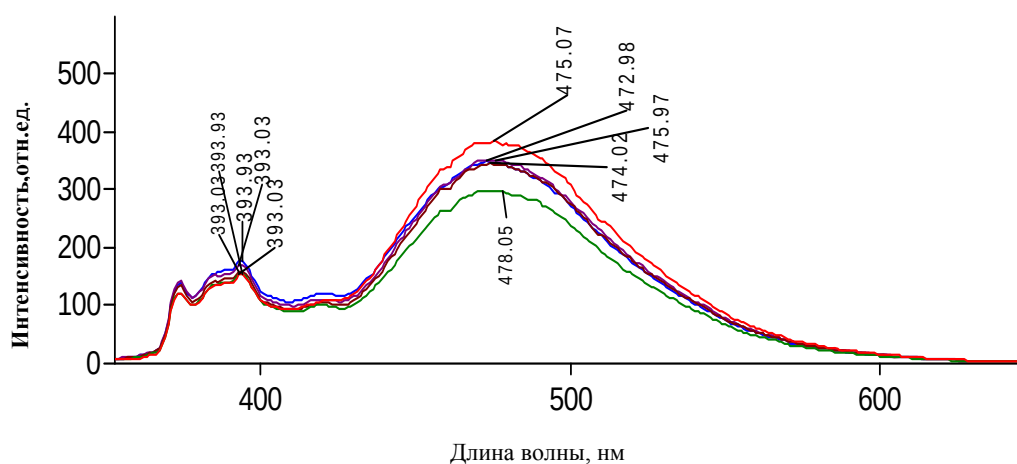


Рисунок 2. Изменение микровязкости (470/393 нм) и полярности (372 /393 нм) зон белок-липидных контактов плазматических мембран клеток дрожжей от дозы УФ-В излучения (возбуждение при 275 нм)
 ● Контроль, ● $0,3 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $0,7 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $1,5 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $2,2 \cdot 10^4$ эрг/мм²

Известно, что при стимуляции ПОЛ в мембранах уменьшается содержание липидов, также меняется микровязкость и электростатический заряд. При более глубоком окислении фосфолипидов нарушается структура липидного бислоя и появляются дефектные зоны в мембранах клеток, а это нарушает функциональную активность. Ранее нами было установлено, что с ростом дозы УФ-В излучения ($0,7 \cdot 10^4$ – $4,5 \cdot 10^4$ эрг/мм²) мембране клеток дрожжей происходит увеличение концентрации МДА, что свидетельствует о развитии процесса ПОЛ.

Из литературы известно, что в мембраны клеток *Candida guilliermondii* содержится 30% фосфолипидов в составе общих липидов [15] имеются данные о тенденции увеличения антиоксидантной активности с возрастанием содержания фосфорлипидов [16]. Следует отметить, что при УФ-В облучении с длиной волны 280–320 нм процесс перекисного окисления липидов в мембранах клеток зависит от дозы [17].

Интенсификация ПОЛ клеточных мембран вызывает уплотнение либо распад липидного слоя, увеличение его микровязкости, сокращение площади белок-липидных взаимодействий, изменение активности ферментных систем, мембранной проницаемости и поверхностного заряда, нарушение состояния рецепторных комплексов. За счёт ПОЛ липидно-белковые компоненты становятся доступными для фосфолипаз и протеаз [14].

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что после облучения клеток дрожжей изменение вязкостных характеристик, уменьшение текучести липидного компонента мембран, являются отражением адаптационных структурно-функциональных перестроек.

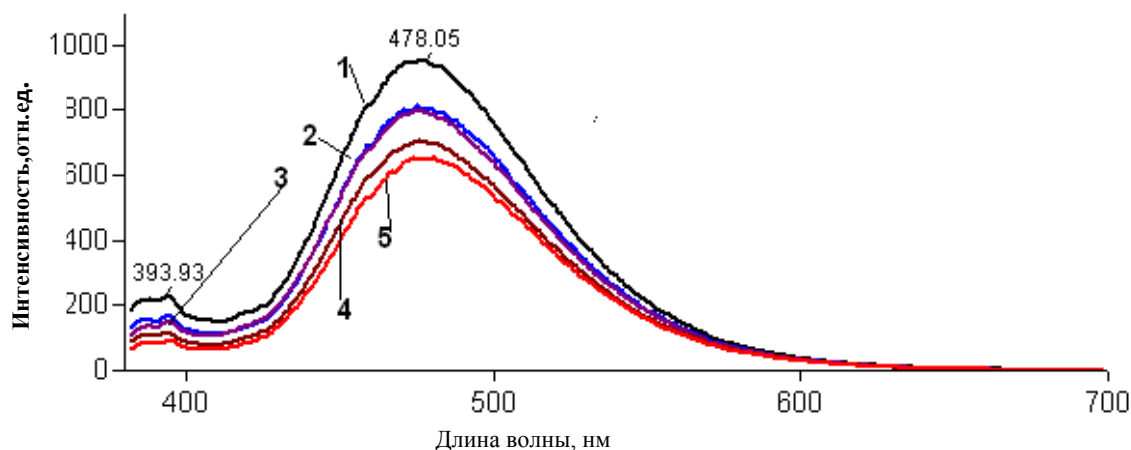


Рисунок 3. Изменение микровязкости (470/393 нм) и полярности (372/393 нм) липидного бислоя плазматических мембран клеток дрожжей от дозы УФ-В излучения (возбуждение при 334 нм)
 ● Контроль, ● $0,3 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $0,7 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $1,5 \cdot 10^4$ эрг/мм², ● $2,2 \cdot 10^4$ эрг/мм²

Список литературы / References:

1. Eskov V.M. Influence of UV irradiation in the presence of AO on free radical oxidation in yeast cells. *Bulletin of New Medical Technologies*, 2002, vol. 3, pp. 15-17.
2. Кравец Е.А., Гродзинский Д.М., Гуца Н.И. Влияние УФ-Б облучения на репродуктивную функцию растений *Hordeum vulgare*, *Цитология и генетика*, 2008, № 5, с. 9-15. [Kravets E.A., Grodzinsky D.M., Gushcha N.I. Effect of UV-B irradiation on plant reproductive function *Hordeum Vulgare*. *Citologija i genetika*. 2008, no. 5, pp. 9-15. (In Russ.)]
3. Matthew R., Drake L. Approaches for determining the effects of UV radiation on Microorganisms in Ballast Water. *Management Biol. Invasions*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 87-99.
4. Zlatev, Z.S., Lidon, F.J., Kaimakanova, M. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2012, vol. 24, no. 6, p. 481.
5. Кочарли Н.К., Гумматова С.Т. Влияние УФ-В- излучения и температуры на МС-ЗЭС в клетках дрожжей. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 2017, т. 2, № 3, с. 361-368. [Kocharli N.K., Hummatova S.T. The influence of uf-b irradiation and temperature on MS-DLE in cell yeast. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 2017, vol. 2, no. 3, pp. 361-368. (In Russ.)]
6. Turker H. Potential effects of Ultraviolet-C radiation on the mole rats (*Spalaxleucodon*), hematological values. *Am. J. Mol. Biol.*, 2013, vol. 3, pp. 235-240.
7. Фрайкин Г.Я., Бельникова Н.С., Рубин А.Б. Повреждающие и защитные процессы, индуцированные в клетках растений УФ В-излучением. *Известия РАН. Серия Биологическая*, 2018, № 6, с. 583-592. [Fraikin G.Ya., Belenkina N.S., Rubin A.B. Damaging and protective processes induced in plant cells by UV B-radiation. *Izvestija RAS. Serija Biologicheskaja*, 2018, no. 6, pp. 583-592. (In Russ.)]
8. Jordan B.R. The effect of ultraviolet B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv. Bot. Res.*, 1996, vol. 122, pp. 97-162.
9. Takshak S., Agrawal S.B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2019, vol. 193, pp. 51-88. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002.
10. Sullivan J.H., Teramura A.H. Field study of the interaction between solar ultraviolet B radiation and drought on photosynthesis and growth in soybean. *Plant. Physiol.*, 1990, vol. 92, no. 1, pp. 141-146.
11. Kuznetsov, V.V., Dmitrieva, G.A. *Plant Physiology*, Moscow, Higher School, 2006, 742 p.
12. Cadet J., Douki T., Ravanat J-L. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.*, 2015, vol. 91, pp. 140-155.
13. Mannuss A., Trapp O., Puchta H. Gene regulation in response to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1819, pp. 154-165.
14. Мухомедзянова С.В. и др. Липиды биологических мембран в норме и патологии. *Acta biomedica scientifica*, 2017, т. 2, № 5, ч. 1, с. 43-49 [Muhomedzyanova S.V. [et al.] Lipids of biological membranes are normal and pathological. *Acta biomedica scientifica*, 2017, vol. 2, no. 5, part 1, pp. 43-49. (In Russ.)]
15. Гордская Н.В. и др. Состав и структура фосфолипидов углеводородных дрожжей. *Биофизика*, 1978, т. 23, № 1, с. 166-171 [Gordskaya N.V. et al. Composition and structure of phospholipids of hydrocarbon yeast. *Biofizika*, 1978, vol. 23, no. 1, pp. 166-171. (In Russ.)]
16. Меньшов В.А., Шишкина Л.Н., Бурлакова Е.Б., Кишковский З.Н. Биофизические и биохимические аспекты регуляции перекисного окисления липидов клеток винных дрожжей, *Биофизика*, 1996, т. 41, № 6, с. 1239-1246. [Menchov V.A. Shishkina L.N., Burlakova E.B., Kishkovsky Z.N. Biophysical and biochemical aspects of the regulation of lipid peroxidation of wine yeast cells. *Biofizika*, 1996, vol. 41, no. 6, pp. 1239-1246. (In Russ.)]
17. Рошупкин Д.И., Аносов А.К., Мургина М.А., Лоркипанидзе А.Т. Фотопревращение мембранных липидов и его роль в изменении функции биомембран под действием УФ-излучения. *Молекулярные механизмы*

биологического действия оптического излучения. М.: Наука, 1988, с. 79-93 [Roshchupkin D.I., Anosov A.K., Murgina M.A., Lorkipanidze A.T. Phototransformation of membrane lipids and its role in changing the function of biomembranes under the action of UV radiation. *Molekuljarnye mehanizmy biologicheskogo dejstvija opticheskogo izluchenija*. М.: Nauka, 1988, pp. 79-93. (In Russ.)]

THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLENT – B IRRADIATION ON THE PLASMA MEMBRANE STRUCTURE IN THE YEAST CELLS

Kocharli N.K., Hummatova S.T.

Baku State University

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

Abstract. It was determined that, ultraviolet- B (UV-B) radiation (280-320) induces the structure changes in the lipid bilayer and annular lipids of the plasma membranes of yeast cells. The object of the investigation was the yeast cells of *Candida guilliermondii* CMU-916. For the evaluation the structural state of the membranes, the microviscosity of the lipid phase was determined. The fluorescence of the samples was measured on a spectrophotometer (Fluorescence spectrophotometer Varian Cary Eclipse 2007) at a peak of the excitation light wavelength of 334 nm to evaluate the microviscosity and polarity of the lipid bilayer and annular lipids of yeast cells. The fluorescence peak of excimer pyrene F_E was recorded at an emission wavelength of 470 nm, and the fluorescence peak of the F_m monomer at an emission wavelength of 393 nm. The obtained data while using a fluorescent probe pyrene indicate a change in the studied parameters of the structural state of cell membranes. Based on the change in microviscosity of the yeast membranes after irradiation, it can be assumed that a structure modification can lead to a change in the polarity in the lipid bilayer. It has been shown that with increasing UV-B radiation, microviscosity and polarity in the lipid bilayer and annular lipids increase. According to the obtained results, it is assumed that an increase in microviscosity and polarity of cell membrane lipids is associated with the lipid peroxidation (POL). The combination of the obtained data suggests that after irradiation of yeast cells, a change in viscosity characteristics, a decrease in the fluidity of the membrane lipid component, are the reflections of adaptive structural and functional rearrangements. It is known that, during the stimulation of lipid peroxidation in the membranes, decreases the lipid content, microviscosity and electrostatic charge also change.

Key words: yeast cells, lipid, microviscosity, pyrene, ultraviolet- B.

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОНФОРМАЦИИ ДЕЛЬТОРФИНОВ И ПОСТРОЕНИЕ ФАРМАКОФОРНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С δ -РЕЦЕПТОРАМИ

Ахвердиева Г.А.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. З. Халилова 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: hagverdighulnara@gmail.com
Поступила в редакцию: 09.07.2019

Аннотация. В работе методами молекулярной механики, молекулярной динамики и квантовой химии с применением современных компьютерных программ исследованы конформационно-электронные аспекты, важные для функционирования дельторфина I и дельторфина II. Установлено, что стабильность пространственной структуры исследованных пептидов определяется взаимным расположением фармакофорных элементов: α -аминогруппы, фенольного кольца остатка Tyr1, ароматического кольца остатка Phe3, отрицательно заряженных групп остатков Asp/Glu и характеризуется специфическим распределением электронной плотности, что играет важную роль при взаимодействии с рецептором. На основе полученных результатов и данных структурно-функциональных отношений оценены биологически активные конформации дельторфинов и построена модель фармакофора для их связывания с δ -рецепторами. Показано, что биологически активные конформации этих молекул характеризуются полусвернутой формой основной цепи: в них С-концевой участок Val-Val-Gly-NH₂, имеющий вытянутую конформацию, благодаря обратному повороту на остатке Val5 сближен в пространстве с N-концевым спиральным участком Tyr-D-Ala-Phe-Asp/Glu, что придает этим молекулам компактность. Можно предположить, что за анальгетическое действие дельторфинов ответственны стерически вероятные пространственные структуры их N-концевого физиологически активного тетрапептидного фрагмента, стабилизирующиеся солевыми мостиками между протонированным атомом азота и атомами кислорода боковых цепей отрицательно заряженных остатков Asp/Glu, а связывание с рецепторами осуществляется формированием водородных связей с участием ионизируемых функциональных групп.

Ключевые слова: дельторфины, биологически активная конформация, фармакофорная модель, методы компьютерного моделирования.

Поскольку биологическая активность пептидных молекул связана непосредственно с их пространственной структурой и характеризующими ее динамическими и электронными свойствами, развитие представлений о механизме их действия является возможным благодаря структурно-функциональным исследованиям, проводимым на молекулярном уровне. Знание пространственной структуры биомолекул является также основой для разработки эффективных лекарственных средств.

Дельторфин I (H-Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂) и дельторфин II (H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂) являются эндогенными линейными пептидами, изолированными из кожи лягушек, принадлежащих семейству *Phyllomedusa* [1]. Связываясь с δ -опиатными рецепторами, они воздействуют на центральную и периферическую нервную систему. В последовательность этих пептидов входит N-концевой физиологически активный тетрапептид Tyr-D-Ala-Phe-Xaa (Xaa – Asp в дельторфине I, Glu – в дельторфине II). Дельторфины являются объектами как структурных модификаций, так и конформационных исследований. Синтез и биологическое тестирование различных аналогов дельторфинов с модификациями аминокислотных остатков в их последовательностях были проведены с целью изучения структурно-функциональных отношений и получения мощных анальгетических препаратов, устойчивых к расщепляющему действию аминопептидаз [2-5]. Установлено, что локальные конформационные ограничения, вводимые в позиции 2 и 3, могут привести к потере биологической активности, α -аминогруппа и фенольное кольцо остатка Tyr1, ароматическое кольцо остатка Phe3, отрицательно заряженные группы атомов остатков Asp/Glu являются фармакофорными элементами, необходимыми для связывания с опиоидным рецептором. В работах [6-8] на основе исследований методами ЯМР спектроскопии предложены модели пространственной структуры дельторфинов. Проведены также спектральные исследования структуры надклеточного кармана рецептора, связывающегося с дельторфинами [9]. Однако до сих пор взаимосвязь конформации дельторфинов с их физиологической деятельностью не изучена достаточно глубоко. Основной проблемой в решении этого вопроса является выявление конформаций, отвечающих физиологически активным состояниям данных молекул. Отметим, что полифункциональность и способность стимулировать с различной эффективностью одни и те же процессы требуют конформационной лабильности молекул и наличия в равновесии общих для пептидов данного семейства структур. Очевидно, что для понимания важных биологических свойств данных пептидов необходимо знать прежде всего полный набор низкоэнергетических структур, отражающих потенцию молекул к конформационным изменениям, что может быть достигнуто с помощью теоретического подхода.

В работе методами молекулярной механики, молекулярной динамики и квантовой химии с применением современных компьютерных программ исследованы конформационно-электронные аспекты, важные для

функционирования дельторфина I и дельторфина II, для молекулярного моделирования был использован пакет прикладных компьютерных программ HyperChem (<http://www.hyper.com/>) [10-13].

На первом этапе исследования был проведен сравнительный анализ пространственных структур физиологически активных N-концевых тетрапептидов дельторфинов, выявлены их конформационные особенности, а также отвечающие за их анальгетическую активность общие конформационные свойства. Установлено, что более половины допустимых конформаций исследованных фрагментов пептидных молекул (56-58%) имеют полусвернутую или полностью свернутую форму основной цепи, близкую к спиральной, что может объясняться благоприятным условием для реализации в них как взаимодействий боковых цепей, так и эффективных стабилизирующих структуру дисперсионных контактов атомов основной цепи из-за свернутости форм основной цепи всех остатков. Именно, в этих конформациях взаимодействия ароматических колец друг с другом наиболее эффективны и имеет место сближение положительно заряженной аминогруппы N-конца с отрицательно заряженной группой атомов боковой цепи остатков Asp или Glu, сопровождающееся эффективными электростатическими контактами и установлением водородных связей между H-атомами N-конца, и атомами указанных боковых цепей. Значительный вклад в конформационную энергию тетрапептидных фрагментов вносят также невалентные взаимодействия боковых цепей остатков Tyr и Phe, несущие в боковой цепи ароматические кольца, обладающие определенной мобильностью. Эти остатки эффективно взаимодействуют как друг с другом, так и с аминокислотным остатком в 4-ой позиции, содержащим отрицательно заряженную атомную группу в боковой цепи. Кроме того, такие структуры стабилизируются также интенсивными дисперсионными контактами атомов основной цепи и характеризуются компактностью пространственного строения, о чем свидетельствуют значения дистанций между тяжелыми атомами концов исследованных фрагментов. Следующим этапом исследования, непосредственно предшествующим анализу пространственного строения молекул дельторфинов, был расчет конформационных возможностей общего для них C-концевого фрагмента Val5-Gly7. Результаты расчета данного фрагмента показали, что оптимальными для данной последовательности являются конформации, характеризующиеся свернутой формой C-концевого дипептидного участка данного трипептида. Пространственное строение молекул дельторфинов I и II было изучено с учетом конформационных возможностей составляющих их физиологически активных N-концевых тетрапептидных фрагментов, соответственно, Tyr1-Asp4 и Tyr1-Glu4, а также стабильных состояний C-концевого трипептидного фрагмента Val5-Gly7. Для дельторфинов I и II, состоящих, соответственно из 107 и 110 атомов, было проминимизировано свыше 400 конформаций, принадлежащих 64 шепам пептидного скелета. Вращению подверглись 35 и 36 двугранных углов, соответственно, дельторфина I и дельторфина II. Пространственное изображение оптимальных структур молекул дельторфинов приведены на рисунках 1 и 2. Геометрические параметры этих конформаций приведены в таблицах 1-2. Результаты расчета выявили, что укладка полипептидной цепи, характерная для оптимальных конформаций исследованных пептидных молекул, приводит к стерическому сближению удаленных по цепи остатков, в том числе остатков, обладающих массивными ионизированными боковыми цепями. Это обстоятельство обеспечивает значительное усиление дисперсионных и кулоновских взаимодействий, сопровождаемое значительным снижением полной энергии молекул. Конформации, соответствующие наиболее выгодной в энергетическом отношении упаковке основной и боковых цепей изучаемых пептидов, обеспечивают оптимальный баланс стабилизирующих внутримолекулярных взаимодействий. Отметим, что при формировании пространственных структур молекул дельторфинов реализуются оптимальные конформации их физиологически активного N-концевого тетрапептидного фрагмента, обеспечивающие сближение положительно заряженной аминогруппы N-конца молекул с отрицательно заряженной группой атомов боковых цепей остатков Asp или Glu. Они стабилизируются эффективными электростатическими контактами и характеризуются солевым мостиком между протонированным атомом азота и атомами кислорода боковых цепей Asp и Glu, соответственно в дельторфине I и II. Установлено, что отрицательно заряженный C-концевой хвост дельторфинов входит в близкий контакт с положительно заряженным N-концевым участком молекул и сворачивает основную цепь, тем самым располагая ароматические кольца Tyr1 и Phe3 в специфических ориентациях, выгодных для связывания с δ -рецепторами. Эти результаты согласуются с данными исследований ЯМР спектроскопии [6-8]. Кроме того, такие структуры стабилизируются также интенсивными дисперсионными контактами атомов основной цепи. Для дельторфина II реализуется также полностью свернутая структура, пептидный остов которой близок к спиральной. В оптимальных структурах исследованных молекул боковая цепь N-концевого остатка Tyr1 обладает высокой степенью подвижности, объясняющейся его локализацией на периферии пептидов и обеспечивающей, как можно полагать, взаимодействие OH-группы имидазольного кольца с молекулами окружающей среды или рецептора. Благодаря лабильности указанного остатка он участвует в эффективных ди-, три-, тетрапептидных взаимодействиях, соответственно, с остатками D-Ala2, Phe3, Asp4/Glu4. Как видно из таблиц 3 и 4, где приведены матрицы межостаточных взаимодействий в оптимальных структурах исследованных молекул, наиболее эффективны взаимодействия остатка Tyr1 с атомами остатков Asp4 и Glu4, вклад от которых составляет, соответственно, от -2,7 до -5,6 ккал/моль в дельторфине I и от -3,3 до -9,7 ккал/моль в дельторфине II.

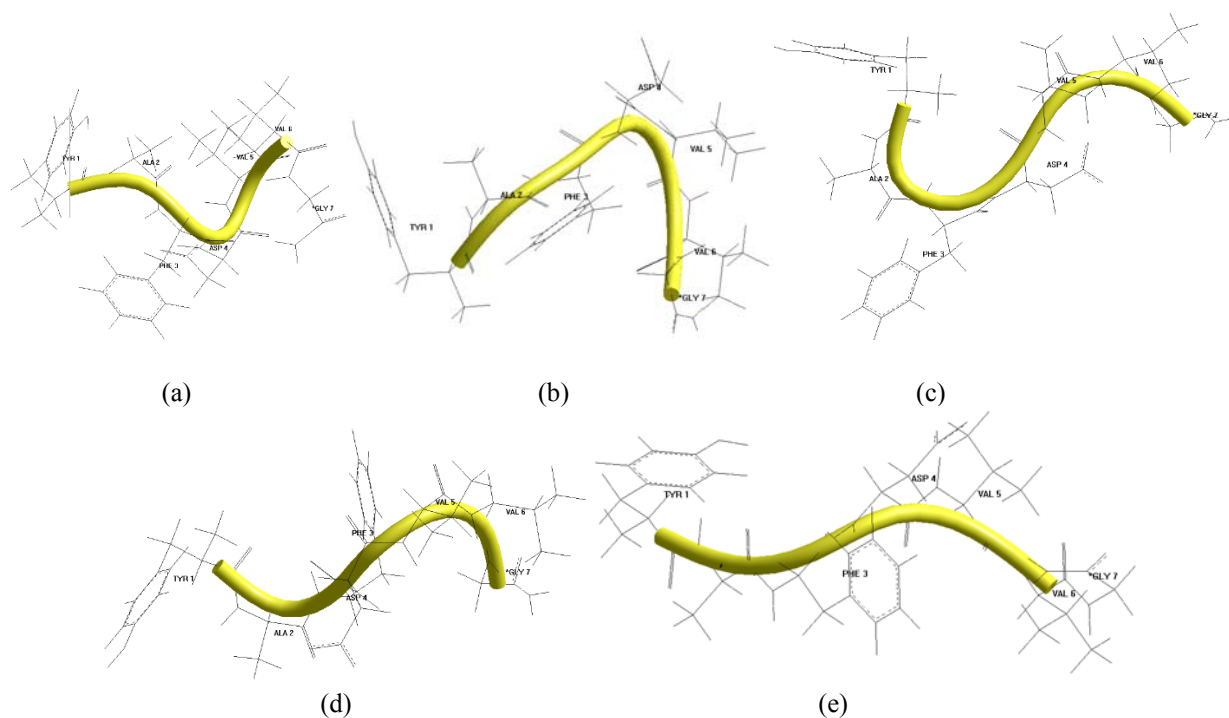


Рисунок 1. Стереизображения оптимальных конформаций дельторфина I с $E_{\text{отн.}} = 0,0$ ккал/моль (а), 1,2 ккал/моль (б), 2,0 ккал/моль (с), 2,9 ккал/моль (д) и 2,9 ккал/моль (е)

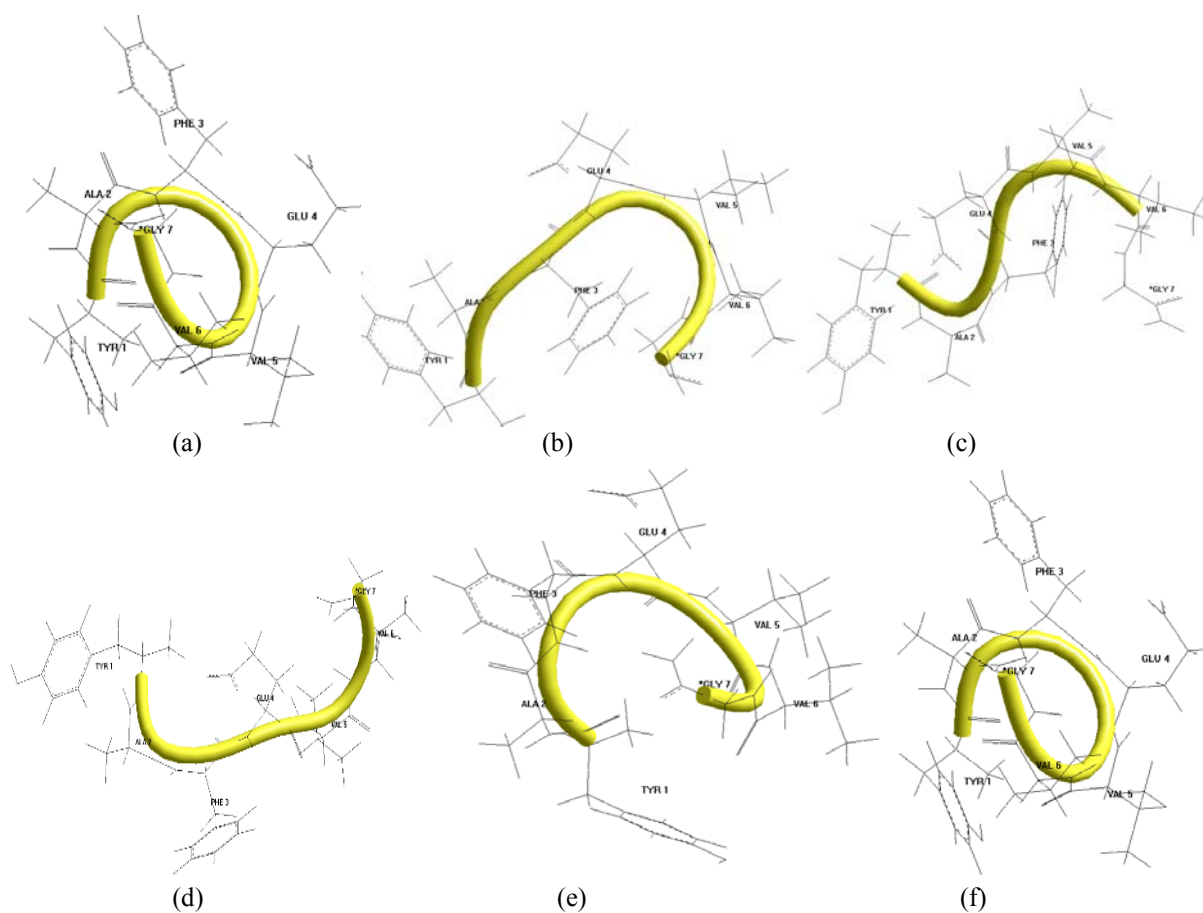


Рисунок 2. Стереизображения оптимальных конформаций дельторфина II с $E_{\text{отн.}} = 0,0$ ккал/моль (а), 0,2 ккал/моль (б), 0,3 ккал/моль (с), 1,1 ккал/моль (д), 1,3 ккал/моль (е) и 1,5 ккал/моль (ф)

Таблица 1. Геометрические параметры (в град.) оптимальных конформаций дельторфина I

Аминок. остаток	Конформация, E _{отн.} в ккал/моль				
	0,0	1,2	2,0	2,9	2,9
Tyr1	59, 179, 78, 180, 151, -179	56, 177, 77, 180, 142, 179	58, 178, 75, 180, 114, -176	63, 179, 80, 180, 129, -175	59, 179, 78, 180, 150, -179
DAla2	76, 179, 42, 178	76, 179, 42, 178	88, 179, -79, 175	88, 178, -70, 171	76, 180, 45, 178
Phe3	-110, 58, 89, -43, -176	-146, 59, 93, 163, -179	-139, -62, 90, -61, 177	-109, 60, 85, 158, -179	-99, 62, 87, -41, 177
Asp4	-82, 64, 100, -32, -171	-84, -65, 90, -64, -175	-96, 178, 77, 152, -175	-87, -64, 89, -63, -178	-84, 64, 98, 154, -179
Val5	-77, 177, -178, 178, -52, -174	-112, -177, -178, -179, -69, 180	-104, -179, -178, 180, -64, -176	-112, -178, -178, 180, -68, -179	-101, 179, -179, 179, -64, -173
Val6	-81, 178, -179, 178, -53, 176	103, 179, -176, 178, -66, -177	-100, 179, -177, 178, -64, -179	-103, 180, -176, 178, -65, -177	-98, 180, -178, 178, -63, -175
Gly7	-80, -74, 179	86, 86, 180	87, 86, 180	87, 86, 180	-85, -80, 180

Примечание: Двугранные углы приведены в следующем порядке ϕ , χ_1 , χ_2 , χ_3 , ψ , ω

Для глобальной структуры дельторфина II, в отличие от дельторфина I, характерны также эффективные взаимодействия тирозина с остатками валина в 5-й и 6-й позициях аминокислотной последовательности, составляющие, соответственно -3,5 и -2,5 ккал/моль. Эта структура характеризуется поворотом пептидной цепи на С-концевом трипептидном участке молекулы дельторфина. Расчеты показывают, что в оптимальных структурах обеих молекул определенной мобильностью обладает также аминокислотный остаток Phe3, несущий ароматическое кольцо в боковой цепи. Он участвует в эффективных взаимодействиях с Asp4 и Glu4.

Следует отметить, что оптимальные структуры дельтофинов, как и дерморфина, характеризуются свернутостью основной цепи дипептидного сегмента Tyr1-DAla2, что играет экранирующую роль для защиты данной пептидной связи от расщепляющего действия аминопептидаз. По-видимому, указанное минимальное структурное требование является важным для физиологической деятельности опиоидных молекул и обеспечивает устойчивость указанной химической связи к действию ферментов в процессе метаболизма пептидов. Полученные данные подтверждаются работами, указывающими на то, что пептидная связь Tyr1-Xaa2 может быть ответственной за связывание опиоидных пептидов с рецептором [14].

На последующем этапе исследования методом молекулярной динамики с использованием силового поля AMBER было прослежено изменение геометрических параметров стабильных состояний молекул дельторфинов на протяжении 300 пс. Исследована подвижность функциональных фрагментов и атомных групп в оптимальных структурах исследованных молекул. Было изучено влияние водного окружения на динамические характеристики дельторфинов. Полученные результаты демонстрируют конформационную жесткость пептидного остова N-концевого тетрапептидного участка молекул, свернутая структура которого сохраняется на протяжении всего моделирования. Выявлена мобильность остатков Tyr1 и Phe3, дающей возможность их фармакофорным группам

Таблица 2. Геометрические параметры (в град.) оптимальных конформаций дельторфина II

Аминок. остаток	Конформация, $E_{\text{отн.}}$ в ккал/моль					
	0,0	0,2	0,3	1,1	1,3	1,5
Tyr1	-78, 63, 87, 180, 165, -179	58, 177, 77, 180, 143, 180	67, 179, 84, 180, 135, -172	67, 179, 85, 180, 137, -171	67, 179, 84, 180, 137, -175	-75, 63, 87, 180, 166, -176
DAla2	79, 179, -80, 173	93, 179, 55, 180	79, 178, -75, 161	87, 179-83, 160	83, 178, -80, 164	90, 179, -80, 176
Phe3	-145, -61, 90, -65, 175	-148, 58, 93, 165, -178	-122, 66, 88, 156, -177	-122, 69, 89, 159, -179	-123, 63, 88, 154, -178	-139, -60, 90, -63, 180
Glu4	-97, -77, 60, 80, -89, -175	-88, -74, 64, 79, -72, -173	-105, -72, 63, 62, -63, -177	-99, -72, 64, 63, -54, 177	-104, -71, 64, 62, 142, -177	-100, -78, 62, 76, -104, -168
Val5	-104, 78, -178, 179, -63, -178	-107, 180, -178, 180, -64, -174	-108, 180, -178, 180, -66, -173	-145, 59, 176, 180, 143, 175	-100, 177, 180, 178, -62, 180	-112, 179, -179, 179, -69, -174
Val6	-99, 179, -178, 178, -63, -179	-99, 179, -177, 178, -63, -177	-100, 179, -177, 178, -64, -176	-94, -179, -179, 178, 94, -175	-94, 179, -179, 178, -57, 78	-93, 180, -177, 178, -63, 175
Gly7	87, 86, 180	88, 86, 180	89, 86, 180	72, 60, -179	-83, -75, 180	-87, -84, -179

Примечание: Двугранные углы приведены в следующем порядке ϕ , χ_1 , χ_2 , χ_3 , ψ , ω

принимать определенные положения в пространстве, выгодные для связывания с δ -рецепторами. Установлено, что в отличие от Phe3 аминокислотный остаток Tyr1 в вакууме более динамичный, но при переходе в водное окружение происходит более интенсивная стабилизация энергии и уменьшение амплитуды атомных флуктуаций. Можно прийти к выводу, что атомы в боковой цепи тирозина, связавшись с определенным числом молекул воды, ограничивают подвижность данного остатка и в целом всей молекулы. Можно предположить, что при ингибировании ферментов боковая цепь Tyr1, освобождаясь от молекул воды, участвует в межмолекулярных контактах в роли субстрата. Это предположение подтверждается работой [2], в которой предполагается, что гидроксильная группа данного остатка может участвовать в роли донора или акцептора при формировании водородной связи с менее кислыми гидроксильными группами рецептора. Отметим, что боковые цепи остатков Val5 и Val6 проявили определенную динамичность в процессе моделирования молекулярной динамики, которая позволяет, по-видимому, участвовать им в рецепторной избирательности молекул дельторфинов. Возможная топографическая роль указанных гидрофобных остатков С-концевого адресного домена, заключающаяся в схожих конформационных эффектах их боковых цепей, обсуждается в работе [15].

На последнем этапе исследования оптимальные конформации дельторфинов были уточнены квантовохимическим методом CNDO при помощи пакета программ HyperChem. На основе значений эффективных зарядов на атомах, дипольных моментов, анализа картины распределения электростатического потенциала, энергетических параметров, характеризующих электронную структуру, были изучены электронно-конформационные свойства молекулы. Выявлено, что оптимальным конформациям дельторфинов присуще

Таблица 3. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (в ккал/моль) в оптимальных конформациях дельторфина I

Аминок. остаток	Tyr1	DAla2	Phe3	Asp4	Val5	Val6	Gly7	№ конф.
Tyr1	1,7	-3,3	-2,7	-3,8	-0,2	0,1	0,1	1
	1,5	-3,0	-3,2	-2,7	-0,1	-0,2	-0,2	2
	1,4	-1,9	-1,1	-5,6	-2,0	-0,2	-0,2	3
	1,3	-2,3	-2,3	-4,7	-0,2	-0,1	-0,1	4
	1,6	-3,3	-1,8	-3,7	-0,1	0,0	0,0	5
DAla2		1,2	-0,6	-1,4	-1,2	-1,3	-0,2	1
		1,0	-2,1	-0,3	0,0	-0,2	-0,1	2
		1,5	-2,1	-0,5	0,0	0,0	0,0	3
		1,6	-1,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	4
		1,2	-0,1	-2,2	-0,2	0,0	0,0	5
Phe3			0,0	-1,7	-1,2	-0,8	-0,8	1
			0,1	-2,0	-1,8	-2,3	-2,3	2
			-0,1	-0,5	-0,5	0,0	0,0	3
			0,3	-1,9	-2,0	-2,2	-2,2	4
			0,2	-2,6	-0,6	0,0	-0,0	5
Asp4				2,8	-1,8	-0,8	-2,2	1
				2,3	-1,3	-0,4	-0,2	2
				2,5	-2,5	-1,6	-1,3	3
				2,3	-1,2	-0,5	-0,2	4
				3,5	-1,8	-0,6	-2,6	5
Val5					0,8	-2,3	-1,0	1
					0,0	-2,0	-0,4	2
					0,4	-2,5	-0,4	3
					0,4	-2,0	-0,5	4
					0,4	-2,7	-0,6	5
Val6						0,7	-1,0	1
						0,4	-1,3	2
						0,4	-1,2	3
						0,4	-1,3	4
						0,4	-1,1	5
Gly7							-0,8	1
							-0,8	2
							-0,8	3
							-0,8	4
							-0,8	5

Примечание: номера 1-5 обозначают, соответственно, конформации с $E_{\text{отн.}} = 0,0$ ккал/моль, 1,2 ккал/моль, 2,0 ккал/моль, 2,9 ккал/моль, 2,9 ккал/моль

специфическое распределение электронной плотности, что отражается на значениях эффективных зарядов атомов функциональных остатков. Наблюдаются различия в значениях зарядов на атомах боковых цепей заряженных остатков Asp и Glu, а также концевых атомных групп, что диктуется спецификой их взаимного расположения в каждой молекуле. Установлено, что электронная структура оптимальных конформаций обеих молекул характеризуется значительно меньшим дипольным моментом в сравнении с остальными исследованными структурами, что объясняется равномерностью распределения в них электронной плотности, отрицательного и положительного зарядов. Похоже, что наличие отрицательно заряженной группы атомов в последовательности дельторфинов необходимо для электростатического притяжения к положительно заряженным связывающим местам δ -опиатных рецепторов (Arg292) и электростатического отталкивания от отрицательно заряженных мест μ -рецептора.

Сравнением конформационных профилей дельторфина I и дельторфина II была оценена биоактивная конформация данных пептидов, выявлены структурные критерии, необходимые для их биологической активности. Сопоставление конформаций молекул было проведено на основе анализа величин среднеквадратичных отклонений координат атомов и межатомных расстояний, вычисленных при оптимальном совмещении сравниваемых структур. Визуальная проверка наложенных друг на друга пар конформаций выявила, что конформации молекул со среднеквадратичными отклонениями ниже $1 \text{ \AA}$ могут рассматриваться аналогичными. Суперимпозиция предполагаемых биологически активных конформаций данных пептидов показана на ниже рисунке 3. Установлено, что биологически активные конформации дельторфинов характеризуются полусвернутой формой основной цепи: в них C-концевой участок Val-Val-Gly-NH₂, имеющий вытянутую конформацию, благодаря обратному повороту на остатке Val5 сближен в пространстве с N-концевым спиральным участком Tyr-D-Ala-Phe-Asp/Glu, что придает этим молекулам компактность.

Таблица 4. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (в ккал/моль) в оптимальных конформациях дельторфина II

Аминок. остаток	Tyr1	DAla2	Phe3	Glu4	Val5	Val6	Gly7	№ конф.
Tyr1	2,1	-2,3	0,3	-5,6	-3,5	-2,5	-0,9	1
	1,5	-3,0	-3,2	-3,3	-0,1	-0,2	-0,2	2
	1,4	-2,6	-2,0	-9,7	-0,1	0,0	0,0	3
	1,4	-2,7	-2,6	-8,8	-0,1	0,0	0,0	4
	1,4	-2,8	-2,2	-9,0	0,0	0,1	0,2	5
	1,9	-2,3	-1,0	-5,5	-2,2	-1,9	-1,0	6
DAla2		1,6	-2,1	-0,4	0,1	-0,7	-0,9	1
		1,0	-2,1	-0,5	0,0	0,0	-0,1	2
		1,6	-1,1	-0,7	0,0	0,0	-0,1	3
		1,4	-1,1	-0,5	0,0	0,0	0,0	4
		1,5	-1,1	-0,8	0,0	0,0	0,0	5
		1,4	-2,1	-0,5	0,0	0,0	-0,7	6
Phe3			0,0	-2,1	-0,4	-0,3	-1,7	1
			1,1	-3,1	-1,7	-2,0	-2,0	2
			0,1	-2,7	-1,1	-1,1	-1,6	3
			0,2	-3,0	-1,8	-1,9	0,0	4
			0,0	-2,8	-1,7	0,0	0,0	5
			-0,1	-2,3	-0,3	0,0	-2,2	6
Glu4				4,5	-0,9	-0,5	-0,3	1
				4,5	-2,1	-0,5	-0,2	2
				4,3	-2,1	-0,5	-0,2	3
				4,4	-1,8	-0,2	-0,1	4
				4,7	-1,6	-0,5	-2,3	5
				4,3	0,9	-0,4	-1,8	6
Val5					0,4	-2,4	-0,5	1
					0,4	-2,6	-0,5	2
					0,4	-2,4	-0,4	3
					1,5	-2,3	-3,2	4
					0,4	-2,9	-0,6	5
					0,4	-2,7	-0,8	6
Val6						0,4	-1,3	1
						0,4	-1,3	2
						0,4	-1,3	3
						0,7	-1,0	4
						0,5	-1,1	5
						0,5	-0,9	6
Gly7							-0,8	1
							-0,8	2
							-0,8	3
							-0,7	4
							-0,8	5
							-0,8	6

Примечание: номера 1-6 обозначают, соответственно, конформации с $E_{\text{отн.}} = 0,0$ ккал/моль, 0,2 ккал/моль, 0,3 ккал/моль, 1,1 ккал/моль, 1,3 ккал/моль, и 1,5 ккал/моль

На основе полученных результатов построена модель фармакофора для связывания дельторфинов с δ -опиатными рецепторами (рис. 4.) Расстояния между центрами фармакофорных областей на представленном рисунке даны в Å. Предлагаемая модель определяет наличие общих структурных участков биомолекул, участвующих во взаимодействии с δ -опиатными рецепторами и может быть использована для дизайна опиоидных пептидомиметиков.

Таким образом, можно предположить, что за анальгетическое действие дельторфинов ответственны стерически вероятные пространственные структуры их N-концевого физиологически активного тетрапептидного фрагмента, стабилизирующиеся солевыми мостиками между протонированным атомом азота и атомами кислорода боковых цепей отрицательно заряженных остатков Asp/Glu, а связывание со специфическими рецепторами осуществляется формированием водородных связей с участием ионизируемых функциональных групп.

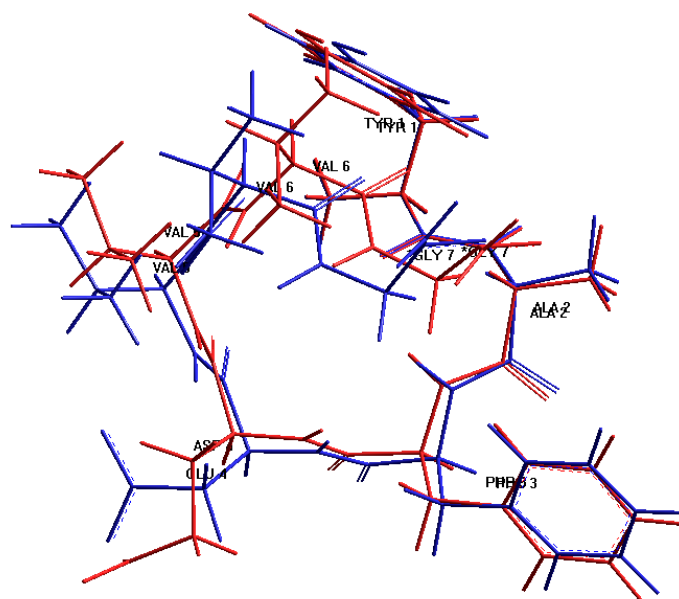


Рисунок 3. Суперимпозиция предполагаемых биологически активных конформаций дельторфина I (красный цвет) и дельторфина II (синий цвет)

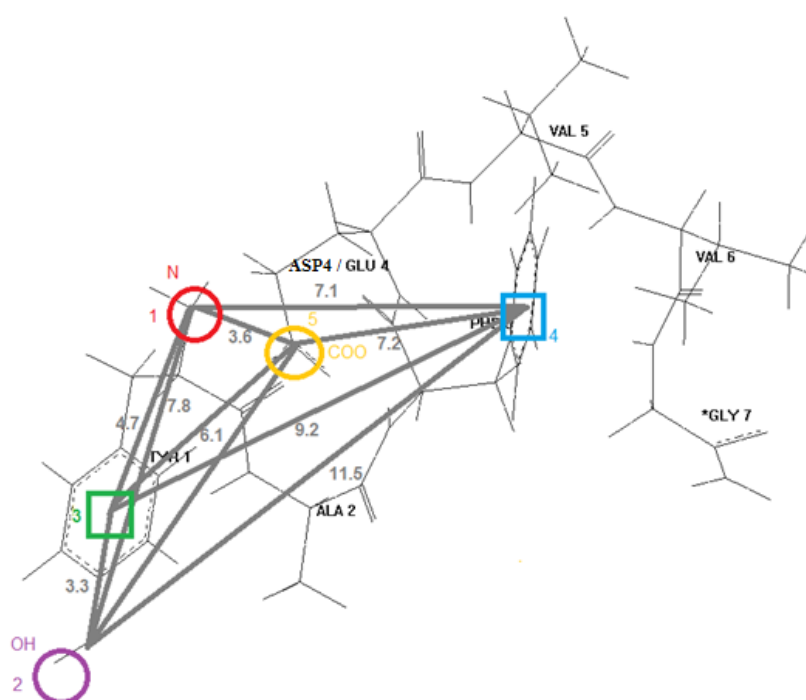


Рисунок 4. Модель фармакофора для связывания дельторфинов с δ -рецепторами

Полученные структурные данные представляют интерес для объяснения на атомно-молекулярном уровне механизма физиологического действия, лежащего в основе анальгетического эффекта опиатоподобных пептидов, а также могут быть использованы при проектировании аналогов, проявляющих устойчивый и сильный анальгетический эффект.

Список литературы / References:

1. Erspamer V., Melchiorri P., Falconieri-Erspamer G. et al. Deltorphins: A family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, iss. 13, pp. 5188-5192.

2. Heyl D., Schullery S., Renganathan K. et al. pK_a and Volume of residue one influence opioid binding: QSAR analysis of tyrosine replacement in a nonselective deltorphin analogue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, vol. 11, pp. 3761-3768.
3. Schullery S., Mohammadshah T., Makhlof H. et al. Binding to δ and opioid receptors by deltorphin I/II analogues modified at the Phe³ and Asp⁴/Glu⁴ side chains: a report of 32 new analogues and a QSAR study. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1999, vol. 17, iss. 3, pp. 445-460.
4. Schullery S., Rodgers D., Tripathy S. et al. The role of backbone conformation in deltorphin II binding: A QSAR study of new analogues modified in the 5-, 6-positions of the address domain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, vol. 9, iss. 10, pp. 2633-2642.
5. Thomas S., Abbruscato T., Hau V. et al. Structure-activity relationships of a series of [D-Ala²]deltorphin I and II analogues; in vitro blood-brain barrier permeability and stability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, vol. 281, pp. 817-825.
6. Ohno Y., Segawa M., Ohishi et al. Conformation of of deltorphin-II in membrane environment studied by two-dimensional NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 212, iss. 1, pp. 185-191.
7. Riand J., Baron D., Nicolas P. et al. The δ -selective opioid peptide dermenkephalin delta-selective opioid peptide dermenkephalin and the μ -selective hybrid peptide dermenkephalin-[1-4]-dermorphin-[5-7] display strikingly different conformations despite identical tetrapeptide N-termini. A quantitative 2-D NMR and molecular modeling analysis. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2000, vol. 17, iss. 3, pp. 445-460.
8. Segawa M., Ohno Y., Doi M. et al. Comparative conformational analyses of mu-selective dermorphin and delta-selective deltorphin-II in aqueous solution by 1H-NMR spectroscopy. *Biomol. Struct. Dyn.*, 2003, vol. 17, iss. 3, pp. 445-460.
9. Fadhil I., Schmidt R., Walpole C. et al. Exploring Deltorphin II Binding to the Third Extracellular Loop of the Opioid Receptor. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, iss. 20, pp. 21069-21077.
10. Akverdieva G.A. Insights into spatial structure of deltorphins. *Journal of Qafqaz University*, 2016, vol. 4, no. 1, pp. 13-20.
11. Годжаев Н.М., Максумов И.С., Исмаилова Л.И. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148 [Godjayev N.M., Maksumov I.S., Ismailova L.I., Programm of semiempirical calculations of conformations of molecular complexes. *J. Struct. Chem.*, vol. 4, 1983, pp. 147-148. (In Russ.)]
12. Shaitan K.V., Saraykin S.S. *Molecular dynamics method*, 1999. URL: <http://www.moldyn.ru> (In Russ.)
13. Allinger N.L., Yuh Y., QCPE 395, *Quantum chemistry program exchange*. Indiana Univ., Indiana, 1982.
14. Lodyga-Chruscinsca E., Oldziej S., Micera G. et al. Effects of tetra zole moiety on coordinating efficiency of deltorphin. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, vol. 51, no. 1, pp. 93-106.
15. Schullery S., Rodgers D., Tripathy S. et al. The role of backbone conformation in deltorphin II binding: A QSAR study of new analogues modified in the 5-, 6-positions of the address. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, vol. 9, iss. 10, pp. 2633-2642.

ASSESSMENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE CONFORMATIONS OF DELTORPHINS AND
CONSTRUCTION OF PHARMACOPHORE MODELS FOR THEIR INTERACTIONS WITH
 δ - RECEPTORS

Akverdieva G.A.

Institute for Physical Problems, Baku State University

Z.Khalilov st.23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: hagverdighulnara@gmail.com

Abstract. In the work the conformational-electronic aspects important for the functional activity of deltorphin I and deltorphin II are investigated by the methods of molecular mechanics, molecular dynamics and quantum chemistry using modern computer programs. It was established that the stability of the spatial structure of deltorphins is determined by the mutual arrangement of the pharmacophore elements: α -amino group, phenolic ring of Tyr1 residue, aromatic ring of Phe3 residue, negatively charged Asp/Glu residue groups and characterized by a specific distribution of electron density, which plays an important role in the interaction with receptor. Based on the obtained results and data of structure-function relationships, the biologically active conformations of deltorphins were assessed and a pharmacophore model was constructed for their binding to δ - receptors. It is shown that the biologically active conformations of these molecules are characterized by a semi-folded form of the main chain: in them the C-terminal fragment Val-Val-Gly-NH₂, which has an elongated conformation, due to reverse turn on the Val5 residue in space is close to the N-terminal helical fragment Tyr-D -Ala-Phe-Asp/Glu, that makes these molecules compact. It can be assumed that for the analgesic action of deltorphins the sterically probable spatial structures of their N-terminal physiologically active tetrapeptide fragment which are stabilized by salt bridges between the protonated nitrogen atom and the oxygen atoms of the side chains of negatively charged Asp/Glu residues are responsible, while binding to the receptors is formed by the formation of hydrogen bonds with involving ionizable functional groups.

Key words: deltorphins, biologically active conformation, pharmacophore model, computer modelling methods.

АССОЦИАЦИЯ РИБОФЛАВИНА И НАТРИЕВОГО ЭФИРА САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Ярошенко Н.С., Кукленко С.А.

Севастопольский государственный университет

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

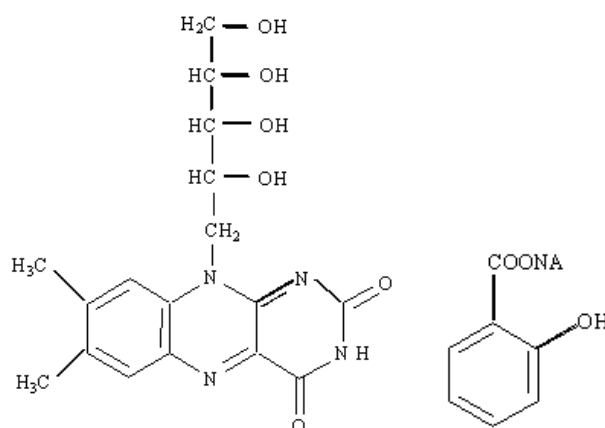
Поступила в редакцию: 11.07.2019

Аннотация. Экспериментальные результаты исследования ассоциации молекул рибофлавина и салицилата натрия в водном растворе методом спектрофотометрии проанализированы с применением димерной модели. Выполнено разложение экспериментального спектра поглощения смеси гетероциклических молекул на индивидуальные компоненты с использованием метода регуляризации. Получена количественная информация о структуре молекулярных комплексов по данным отдельных компонентов спектра: расстояния и углы между точечными дипольными моментами переходов молекул.

Ключевые слова: спектрофотометрия, поглощение, рибофлавин, салицилат натрия, мономер, димер, димерная модель, константы ассоциации, дипольный момент перехода, структурные параметры.

Изучение закономерностей процессов ассоциации гетероциклических молекул в водном растворе, структурных особенностей молекулярных комплексов важно для понимания взаимодействия подобных молекул как между собой, так и с биополимерами. Рибофлавин (РФН) – витамин роста – обладает различными биологическими действиями [1], обнаружено протекторное действие РФН по отношению к ДНК [2, 3], выражающееся в значительном уменьшении связывания ароматических мутагенов с нуклеиновой кислотой в присутствии витамина. Салицилат натрия (НАС) – натриевый эфир салициловой кислоты – содержит в бензольном ядре карбоксиланион и гидроксильную группу, что делает его хорошо растворимым в воде. НАС по фармакологическому действию близок к ацетилсалициловой кислоте (аспирину). Салицилаты щелочных металлов наряду с лечебными обладают гидротропными свойствами [4], что проявляется в их способности увеличивать растворимость терапевтических средств [5, 6], в том числе РФН [7]. К механизмам, лежащим в основе их гидротропного действия, относятся специфическое взаимодействие с растворителем, сомоассоциация гидротропного агента и комплексообразование между молекулами гидротропных и лекарственных средств [8].

В данной работе изучена ассоциация рибофлавина и НАС наиболее чувствительным методом исследования нековалентного связывания молекул – электронной спектроскопией, позволяющей количественно оценить параметры образующихся ассоциатов [9, 10]. При интерпретации экспериментальных данных использована димерная модель, в которой рассматриваются реакции димеризации для самоассоциации и образования комплексов 1:1 при гетероассоциации молекул.



Рибофлавин Салицилат натрия

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

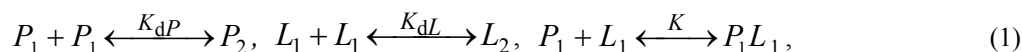
Электронные спектры поглощения растворов зарегистрированы на спектрофотометре СФ-46 в видимой области. РФН фирмы Serva Feinbiochemica GmbH (Heidelberg, Germany) и НАС фирмы Sigma (USA) использовались без дополнительной очистки. В связи с чувствительностью к световому воздействию (к голубому участку спектра) взвешивание препаратов и приготовление их растворов проводились в затемненном помещении. Растворы готовились на основе бидистиллированной воды непосредственно перед измерениями. Осуществлялось титрование РФН (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,86) салицилатом натрия в диапазоне концентраций $2 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-1}$ М. Концентрация РФН в смешанных растворах поддерживалась постоянной

($10^{-4} \text{ M} = \text{const}$). Измерения проводились в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,02 см при температуре $T = (298 \pm 0,25) \text{ K}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены экспериментальные спектры водных растворов РФН с различным содержанием НАС. Как видно, титрование РФН салицилатом натрия приводит к гипохромному эффекту и батохромному сдвигу полосы поглощения относительно максимума мономерной полосы РФН (446 нм) с одновременным появлением изобестических точек на длинах волн 405 и 470 нм. Эти изменения в спектрах поглощения флавина, а также наличие изобестических точек свидетельствуют о присутствии специфических взаимодействий [9] между молекулами РФН и НАС и формировании в водном растворе гетерокомплексов взаимодействующих молекул.

Динамическое равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K_{dP} и K_{dL} и K – равновесные константы димеризации молекул РФН и НАС и их гетероассоциации соответственно; P_1 , P_2 , L_1 и L_2 – мономеры и димеры молекул РФН и НАС; P_1L_1 – гетерокомплекс. Экспериментально наблюдаемое поглощение исследуемых растворов описывается выражением:

$$A = A_1 + A_2, \quad (2)$$

где A_1 и A_2 – оптические плотности свободных и связанных молекул РФН и НАС при толщине поглощающего слоя исследуемых растворов 1 см [10, 11]:

$$A_1 = \epsilon_m^P[P_1] + 2\epsilon_d^P K_{dP}[P_1]^2 + \epsilon_m^L[L_1] + 2\epsilon_d^L K_{dL}[L_1]^2 + \epsilon_k K[P_1][L_1]. \quad (3)$$

Здесь ϵ_m^P , ϵ_d^P , ϵ_m^L , ϵ_d^L – коэффициенты молярного поглощения лигандов P и L в мономерной и димерной формах соответственно; ϵ_k – коэффициент экстинкции гетерокомплекса; $[P_1]$ и $[L_1]$ – концентрации мономеров РФН и НАС.

Ассоциация исследуемых молекул существенно влияет на интенсивность и положение полос их спектров поглощения: они зависят от взаимного расположения мономеров в димерных комплексах, поэтому из спектров поглощения ассоциатов можно получить информацию о структуре димеров. Для оценки структурных параметров молекулярных комплексов использованы их спектры, выделенные из экспериментальных спектров (рис. 1), в составе пяти компонентов (двух мономерных и трех димерных). Индивидуальные составляющие (ϵ_{mi}^P , ϵ_{mi}^L , ϵ_{di}^P , ϵ_{di}^L , ϵ_{ki}) получены при совместной обработке экспериментальных данных (рис. 1) с использованием равновесных констант K , K_{dP} , K_{dL} [9]. Поиск спектральных составляющих, принадлежащий к классу обратных задач, осуществлен путем минимизации функционала:

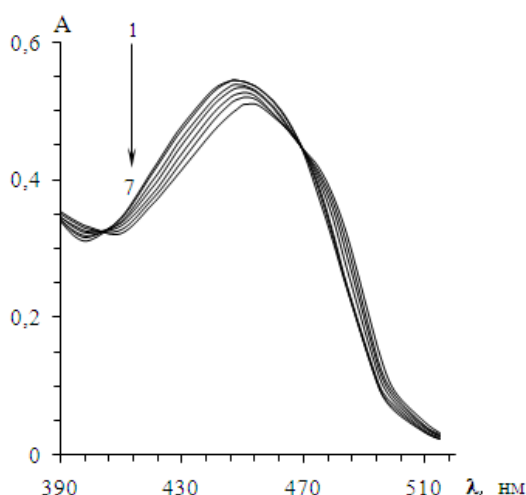


Рисунок 1. Спектры поглощения водных растворов рибофлавина ($[РФН] = 10^{-4} \text{ M} = \text{const}$), содержащих различные концентрации салицилата натрия: 0 (1), $2 \cdot 10^{-4}$ (2), $1,5 \cdot 10^{-3}$ (3), $1,25 \cdot 10^{-2}$ (4), $3 \cdot 10^{-2}$ (5), $5 \cdot 10^{-2}$ (6), 10^{-1} (7)

$$S = \sum_{j=1}^l \sum_{i=1}^n (A_{ji}^{\delta} - A_{ji})^2, \quad (4)$$

где A_{ji}^{δ} – экспериментальные оптические плотности растворов, измеренные с погрешностью δ ; A_{ji} – расчетные оптические плотности растворов; j – номер спектра (концентрации); i – номер оптической плотности, соответствующей λ_i . Концентрации $[P_l]$ и $[L_l]$ определяли из уравнений материального баланса [10].

При выполнении вычислительной процедуры обработки экспериментальных спектров задача поиска индивидуальных составляющих (или минимизации функционала (4)) заменялась несколькими задачами меньшей размерности. Спектральные характеристики раствора, согласно их физическому смыслу, объединены в три группы, содержащие одинаковое количество параметров. Одной группой параметров ε_{ai} описывается поглощение молекул в ассоциированной форме, остальными (ε_{mi}^P и ε_{mi}^L) – поглощение молекул в свободной форме. Минимизация функционала выполнена варьированием спектральных параметров каждой группы в отдельности внутри физически допустимой области их изменения при фиксированных параметрах остальных групп. На начальном этапе минимизации параметрам ε_{mi}^P и ε_{mi}^L присваивались числовые значения, полученные ранее при изучении самоассоциации молекул РФН и НАС [9]. Параметры ε_{ai} вычислены путем их варьирования до тех пор, пока они не стабилизировались при некотором минимальном значении суммы (4). На следующих этапах минимизации варьируются другие спектральные характеристики, а две оставшиеся группы параметров фиксируются. С учетом положения оптимума суммы (4) в многомерном пространстве спектральные характеристики ε_{ai} , обобщенно отражающие ассоциацию молекул, представляются тремя группами параметров: ε_{ki}^P , ε_{di}^P и ε_{di}^L , описывающими поглощение молекул в составе димеров: P_1L_1 , P_2 и L_2 . При замене исходной задачи пятью подзадачами сумма квадратов невязок (4) дополняется регуляризующим членом [12]:

$$S = \sum_{j=1}^l \sum_{i=1}^n (A_{ji}^{\delta} - A_{ji})^2 + \text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k^P, \alpha), \quad (5)$$

где α – коэффициент регуляризации. Регуляризующий член, состоящий из трех слагаемых

$$\text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k^P, \alpha) = \alpha((\varepsilon_m^P - \varepsilon_{m446}^P)^2 + (\varepsilon_d^P - \varepsilon_{d446}^P)^2 + (\varepsilon_k^P - \varepsilon_{k446}^P)^2), \quad (6)$$

содержит коэффициент регуляризации α и числовые значения параметров ε_m^P , ε_d^P , ε_k^P , полученные ранее [9] на длине волны 446 нм (ε_{m446}^P , ε_{d446}^P , ε_{k446}^P). Регуляризующее звено делает функционал (7) более выпуклым, позволяющим точнее определить компоненты спектра поглощения смеси РФН и НАС. Выбор регуляризующего решения осуществляется при условии, что невязки не превышают заданную величину δ и

$$\text{reg}(\varepsilon_d^P, \varepsilon_m^P, \varepsilon_k^P, \alpha) = \min. \quad (7)$$

Таким образом, мы приходим к задаче о минимизации функционала (5), решаемой при каждом значении коэффициента α и согласовании его с погрешностью измерений δ по сумме квадратов невязок

$$\sum_{j=1}^l \sum_{i=1}^n (A_{ji}^{\delta} - A_{ji})^2 \leq nl\delta^2. \quad (8)$$

Это значит, что перебирая различные значения коэффициента регуляризации α , необходимо следить за получаемыми невязками и выбирать такие решения ($\varepsilon_{mi}^P, \varepsilon_{mi}^L, \varepsilon_{di}^P, \varepsilon_{di}^L, \varepsilon_{ki}^P$), которые удовлетворяют критериям (7) и (8), при этом значение $\alpha > 0$, как правило, уменьшается вплоть до выполнения условия (8). Процедура поиска α и индивидуальных составляющих останавливается, когда впервые выполняется неравенство (8), поскольку нет оснований минимизировать отклонения от данных измерений за пределами уровня ошибки.

Заданная точность решения достигается в ходе последовательного уточняющего поиска спектральных характеристик, состоящего из решения пяти подзадач минимизации функционала (5). Полученному минимуму функционала соответствует набор спектральных (индивидуальных) составляющих экспериментального спектра

(рис. 2). На рисунке 2 составляющие ε_{mi}^L и ε_{di}^L не представлены, так как в исследуемом диапазоне длин волн числовые значения молярных коэффициентов поглощения НАС в свободном и димерном состояниях на три-четыре порядка меньше ε_{mi}^P , то есть оценка пространственных параметров молекулярных комплексов проведена по данным ε_{mi}^P , ε_{ki} и ε_{di}^P . Из сопоставления экспериментальных и расчетных данных следует, что при разнородной ассоциации происходит сдвиг полосы поглощения РФН. Максимум спектра поглощения рибофлавина, входящего в состав гетерокомплекса, под влиянием НАС смещен относительно полосы свободных молекул РФН (446 нм) в длинноволновую сторону на 7 нм (кривая 2). Интенсивность и расположение полос поглощения свободных молекул РФН и в составе разнородного димера свидетельствуют о стопкообразном расположении РФН и НАС в составе гетерокомплекса [13].

В точно-дипольном приближении положение полосы поглощения РФН ($\lambda = 453$ нм) в составе гетерокомплекса можно представить в виде [13-15]:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{\text{РФН}}} + \frac{2\lambda_{\text{РФН}}^2 \lambda_{\text{НАС}} \mu_{\text{РФН}}^2 \mu_{\text{НАС}}^2 G^2}{(\lambda_{\text{НАС}}^2 - \lambda_{\text{РФН}}^2) h^2 c^2}, \quad (9)$$

где $\mu_{\text{РФН}}$ и $\mu_{\text{НАС}}$ дипольные моменты переходов мономеров молекул РФН и НАС на длинах волн $\lambda_{\text{РФН}}$ и $\lambda_{\text{НАС}}$, соответствующих максимумам поглощения молекул в свободном состоянии; c – скорость света; h – постоянная Планка; G – геометрический фактор, зависящий от взаимного расположения дипольных моментов переходов разнородных мономеров в составе гетерокомплекса: $G = (\cos\varphi - 3\cos\theta_{\text{РФН}} \cos\theta_{\text{НАС}})/4\pi\epsilon_0\epsilon R^3$, φ – угол между дипольными моментами переходов молекул РФН и НАС в составе гетерокомплекса; R – расстояние между точечными дипольными моментами переходов молекул РФН и НАС, $\theta_{\text{РФН}}$, $\theta_{\text{НАС}}$ – углы между вектором $\vec{R}$, соединяющим $\mu_{\text{РФН}}$ и $\mu_{\text{НАС}}$, и векторами этих дипольных моментов, ϵ_0 , ϵ – электрическая постоянная и диэлектрическая проницаемость среды.

Интенсивность полосы поглощающих молекул РФН (f) в составе гетерокомплекса можно описать выражением [13-15]:

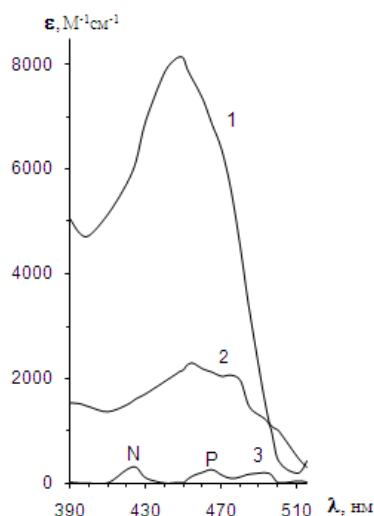


Рисунок 2. Отдельные компоненты спектра поглощения смеси рибофлавина и салицилата натрия в водном растворе ($[P_0] = 10^{-4}$ М; $[L_0] = 1,245 \cdot 10^{-2}$ М): 1 – мономеры РФН; 2 – разнородные димеры РФН + НАС; 3 – однородные димеры РФН + РФН

$$\frac{f}{f_{\text{РФН}}} = 1 + \frac{4}{hc} \cdot \frac{\lambda_{\text{РФН}}^2 \lambda_{\text{НАС}} \mu_{\text{НАС}}^2 G}{\lambda_{\text{НАС}}^2 - \lambda_{\text{РФН}}^2} \cdot \cos\varphi, \quad (10)$$

где f и $f_{\text{РФН}}$ – сила осциллятора электронного перехода молекул РФН на длине волны максимума поглощения РФН в составе гетерокомплекса и на длине волны $\lambda_{\text{РФН}}$.

По данным положения и интенсивности полос поглощения молекул свободного РФН, а также и в составе гетерокомплекса (рис. 2) (формулы (9) и (10)) можно оценить структурные параметры разнородного ассоциата, учитывая [9, 13], что при формировании гетерокомплекса РФН – НАС имеет место стэкинг-взаимодействие лигандов с образованием структуры сэндвичевого типа. Оценочные структурные параметры гетерокомплекса:

$$\theta_{\text{РФН}} = \theta_{\text{НАС}} = \pi/2, \varphi \approx 35^\circ, R \approx 2,8 \text{ Å}.$$

Из данных представленных на рисунке 2 (составляющих экспериментального спектра) видно, что спектр димеров РФН содержит две полосы поглощения разной интенсивности на длинах волн $\lambda_N = 423$ и $\lambda_P = 463$ нм, смещенные батохромно и гипсохромно относительно максимума поглощения мономеров РФН. Согласно [16], положение полос (рис. 2, кривая 3) зависит от расстояния между мономерами, образующими димер, и ориентации их дипольных моментов переходов:

$$\lambda_{NP} = \frac{hc}{\frac{hc}{\lambda_{PФН}} \pm \frac{(\vec{\mu}_{PФН1} \vec{\mu}_{PФН2}) R_{12}^{-3} - 3(\vec{\mu}_{PФН1} \vec{R}_{12})(\vec{\mu}_{PФН2} \vec{R}_{12}) R_{12}^{-5}}{4\pi\epsilon_0\epsilon}}}. \quad (11)$$

Первый член в знаменателе – энергия возбужденного состояния свободного мономера РФН, второй – энергия взаимодействия между молекулами димера, расположенными на расстоянии R_{12} и имеющими дипольные моменты переходов $\vec{\mu}_{PФН1}$ и $\vec{\mu}_{PФН2}$; $\vec{R}_{12}$ – вектор, направленный от диполя мономера РФН₁ к диполю мономера РФН₂. Приблизительно одинаковая интенсивность полос (рис. 2, кривая 3), определяемых переходами $\Psi_G \rightarrow \Psi_N$ и $\Psi_G \rightarrow \Psi_P$, позволяет предположить [16], что мономеров, в основном, лежат в одной плоскости, при этом угол между векторами $\vec{\mu}_{PФН1}$ и $\vec{\mu}_{PФН2}$ рассчитанный по формуле [16-18]:

$$\alpha \approx 2 \arctg \sqrt{\frac{\epsilon_P \lambda_P \delta_P}{\epsilon_N \lambda_N \delta_N}}, \quad (12)$$

где ϵ_P , ϵ_N , δ_P , δ_N – коэффициенты экстинкции максимумов полос P и N , и их полуширина, близок к 90° .

Используя положение и интенсивность полос P и N , можно оценить расстояние между точечными дипольными моментами переходов однородных мономеров в димерных комплексах РФН [19]:

$$R \approx \sqrt[3]{\frac{9\epsilon^2 f_{PФН} \lambda_{PФН} \lambda_N \lambda_P}{8\pi^3 \epsilon_0 \epsilon m c^2 \Delta\lambda}}, \quad (13)$$

где $\Delta\lambda = \lambda_P - \lambda_N$; e , m – заряд и масса электрона.

Расчетные значения параметров α и R для однородных димеров РФН при данных условиях эксперимента и структурных особенностях составляют приблизительно 90° и $8,7 \text{ \AA}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При совместной обработке экспериментальных спектров поглощения смеси гетероциклических молекул методом регуляризации проведено разложение экспериментального спектра на отдельные компоненты. По данным индивидуальных составляющих спектра и формул (9)-(13) получены структурные параметры однородных и разнородных димеров, в значительной степени зависящие от структурных особенностей хромофоров ассоциирующих молекул и их дипольных моментов переходов. Анализ ассоциации гетероциклических молекул важен для выяснения сиквенс-специфичного взаимодействия лигандов с биополимерами. Можно предположить, что основной вклад в стабилизацию гетерокомплекса вносит стэкинг-взаимодействие молекул, одновременно являющееся важным фактором гидротропного действия НАС на РФН в водном растворе.

Список литературы / References:

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. *Биологическая химия*. М.: Медицина, 1998, 223 с. [Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biological chemistry*. M.: Medicine, 1998, 223 p. (In Russ.)]
2. Webster R.P., Gawde M.D., Bhattacharya R.K. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Letters*, 1996, vol. 98, pp. 129-135.
3. Pangrekar J., Krishnaswamy K., Jagadeesan K. Effects of riboflavin deficiency and riboflavin administration on carcinogen - DNA binding. *Fd. Chem. Toxic.*, 1993. vol. 31, pp. 745-750.
4. Balasubramanian D., Friberg S. E. Surface and Colloid Science. *Plenum Press*, New York, 1993, vol. 15, pp. 197-220.

5. Jarho P., Urtti A., Pate D.W., Suhonen P., Järvinen U. Increase in aqueous solubility, stability and in vitro corneal permeability of anandamide by hydroxyl-b-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.*, 1996, vol. 137, pp. 209-216.
6. Etman M.A., Nada A. H. Hydrotropic and cosolvent solubilisation of indomethacin. *Acta Pharm.* 1999, vol. 49, pp. 291-298.
7. Coffman R.E, Kildsig D.O. Effect of nicotinamide and urea on the solubility of riboflavin in various solvents. *J. Pharm Sci.*, 1996, vol. 85, pp. 951-954.
8. Roy B.K., Moulik S.P. Effect of hydrotropes on solution behaviour of amphiphiles. *Current Sci.*, 2003, vol. 85, no. 8, pp. 1148-1155.
9. Барановский С.Ф., Болотин П.А. Ассоциация рибофлавина, кофеина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе. *Журн. прикл. спект.*, 2007, т. 74, № 2, с. 188-194. [Baranovsky S.F., Bolotin P.A. Association of riboflavine, caffeine, and salicylic acid sodium ether in an aqueous solution. *J. Appl. Spectr.*, 2007, vol. 74, no. 2, pp. 211-218. (In Russ.)]
10. Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н. Гетероассоциация молекул кофеина и фенантридинового красителя в водном растворе. *Журн. прикл. спект.*, 2018, т. 85, № 4, с. 532-537. [Baranovsky S.F., Bolotin P.A. Heteroassociation of caffeine and phenanthridine dye in aqueous solution. *J. Appl. Spectr.*, 2018, vol. 85, no. 2, pp. 532-537. (In Russ.)]
11. Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н., Бучельников А.С. Исследование комплексов молекул акридинового и фенантридинового красителей в водном растворе. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, № 1, с. 235-239. [Baranovskiy S.F., Chernyshev D.N., Buchelnikov A.S. The study of the complexes of molecules of acridine and phenanthridine dyes in aqueous solution. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 235-239. (In Russ.)]
12. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. *Методы решения некорректных задач*. М.: Наука, 1979, 285 с. [Tikhonov T.N., Arsenin V.Y. *The Methods of Solution of incorrect Problems*. Moscow: Nauka, 1979, 285 p. (In Russ.)]
13. *Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот*. Ю.С. Лазуркин. М.: Наука, 1967, 323 с. [Physical methods of investigation of proteins and nucleic acids. Yu.S. Lazurkin. Moscow: Nauka, 1967, 323 p. (In Russ.)]
14. Tinoco J. Hypochromism in polynucleotides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, pp. 4785-4790.
15. Rhodes W. Hypochromism and other spectral properties of helical polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, vol. 83, pp. 3609-3617.
16. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия. т. 2*. М.: Мир, 1984, 493 с. [Cantor C., Schimmel P. *Biophysical Chemistry. Vol. 2*. Moscow: Mir, 1984, 493 p. (In Russ.)]
17. Kasha M., Rawls H.R., El-Bayomi M.A. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.*, 1965, no. 11, pp. 371-392.
18. Antonov L., Gergov G., Petrov V., Kubista M., Nygren J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta*, 1999, vol. 49, no. 1, pp. 99-106.
19. Бучельников А.С., Чернышев Д.Н., Милосердов П.Г., Барановский С.Ф. Спектрофотометрическое изучение ассоциирующих молекул красителей в водном растворе. *Матер. VII междунар. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФХ-2011»*. Севастополь, 2011, с. 139-141. [Buchelnikov A.S., Chernyshev D.N., Miloserdov P.G., Baranovskiy S.F. Spectrophometric study of the associating dye molecules in aqueous solution. *Proceedings of VII International Science-Technical Conference "Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2011"* Sevastopol, 2011, pp. 139-141. (In Russ.)]

ASSOCIATION OF RIBOFLAVINE AND SALICYLIC ACID SODIUM ETHER IN AN AQUEOUS SOLUTION

Baranovskiy S.F., Chernyshev D.N., Yaroshenko N.S., Kuklenko S.A.

Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Abstract. Results of spectrophotometric research of the association of riboflavine and sodium salicylate molecules in aqueous solution are presented. Experimental data was analyzed using a dimer model of association of molecules. The experimental spectrum of absorption of a mixture of heterocyclic molecules was decomposed into individual components by the means of the regularization method. The quantitative information on structure of molecular complexes according to separate components of a range, specifically distance and corners between electrical dipole moments of transitions of molecules is obtained.

Key words: *spectrophotometry, absorption, riboflavine, sodium salicylate, monomer, dimer, dimer model, association constant, transition dipole moment, structural parameters.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ СТРУКТУРЫ ТРИПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА (АПФ)

Агаева Г.А.¹, Агаева У.Т.¹, Годжаев Н.М.^{1,2}

¹Бакинский государственный университет
ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан

²Бакинский инженерный университет
Сумгаитское шоссе, 16 км, г. Баку, AZ-0101, Азербайджан; e-mail: gulshen@mail.ru
Поступила в редакцию: 15.07.2019

Аннотация. Методами молекулярной механики и квантово-химических расчетов исследовано пространственное и электронное строение антигипертензивных трипептидов LPP, IPP, VPP, LKP, LQP и LRP. Эти антигипертензивные трипептиды действуют как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ). Расчет исходных структурных вариантов молекул трипептидов, составленных на основе стабильных конформеров соответствующих монопептидов, выявил ограниченный набор энергетически предпочтительных конформационных состояний молекул в определенном интервале энергии. В результате расчетов были определены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекул. Конформационный анализ трипептидов позволил выявить природу сил, стабилизирующих энергетически предпочтительных пространственных структур молекул. На основе полученных результатов были определены энергетические и электронные характеристики оптимальных пространственных структур молекул трипептидов. В результате исследования были также определены энергетически предпочтительные области величин двугранных углов, величины энергетических вкладов межостаточных взаимодействий и водородных связей, а также взаимное расположение остатков и их боковых цепей в низкоэнергетических конформациях трипептидов. На основе полученных параметров были построены молекулярные модели наиболее стабильных конформаций трипептидных ингибиторов, сопоставление которых дает возможность выделить структурные критерии, необходимые для создания лекарственных препаратов пригодных для клинического использования.

Ключевые слова: антигипертензивные пептиды, ангиотензин-превращающий фермент, ингибиторы, конформация, метод молекулярной механики, квантово-химический метод.

Как известно, ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) играет основополагающую роль в системах кровяного давления. Этот фермент преобразовывает ангиотензин I в ангиотензин II, который способствует развитию гипертонии [1]. Фармацевтические лекарства зачастую приводят к нежелательным побочным эффектам. Необходимо разрабатывать новые, эффективные и безопасные природные замены, чтобы уменьшать применение химических лекарств. В настоящей работе методами молекулярной механики и квантово-химических расчетов исследовано пространственное и электронное строение антигипертензивных трипептидов LPP, IPP, VPP, LKP, LQP и LRP, выделенные из продуктов питания [2-4]. Эти антигипертензивные трипептиды действуют как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ). Трипептиды Ile-Pro-Pro (IPP), Val-Pro-Pro (VPP) и Leu-Pro-Pro (LPP) называют лактотрипептидами поскольку они вырабатываются пробиотиками *Lactobacillus helveticus* или являются продуктами распада казеина. Рядом исследований показано, что они обладают антигипертензивным эффектом [5-8]. Используют их для получения продукта, снижающего артериальную жесткость, и для получения продукта, улучшающего эластичность кровеносных сосудов. Лактотрипептиды обладают также способностями к связыванию опиоидного рецептора и антимикробными свойствами. Для улучшения эластичности артериальных сосудов индивидууму вводят продукт, включающий Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro и/или Leu-Pro-Pro, для применения указанных биологически активных пептидов. Исследовано также, что указанные пептиды способны нормализовать эндотелиальные функции, улучшая эластичность кровеносных сосудов и противодействовать жесткости артерий [8]. Эндотелиальная дисфункция играет значительную роль в определении жесткости или эластичности кровеносных сосудов, что, в свою очередь, весьма важно при многих тяжелых заболеваниях, например, ишемической болезни сердца, атеросклерозе, стенокардии, тромбозе коронарных артерий и хроническом заболевании легких. Следовательно, способность повышать эластичность кровеносных сосудов является особенно важным свойством антигипертензивных трипептидов.

Трипептид LRP (Leu-Arg-Pro) с потенциальной АПФ ингибиторной активностью был выделен из белковой молекулы бычьего лактоферрина. Результаты биологических исследований показали, что LRP, помимо антигипертензивного действия, обладает противоокислительной и противовоспалительной активностью [7]. LKP (Leu-Lys-Pro), выделенный из белка яичного белка овотрансферрина, также является ингибитором АПФ [2, 8]. Применение LKP в лечении гипертонии снижало среднее кровяное давление на ~ 19 и ~ 30 мм рт.ст. и изменение артериального давления сопровождалось сохранением вазорелаксации, зависящей от оксида азота, и снижением уровней ангиотензина II в плазме. Биоинформационный анализ последовательностей белков хлебных злаков

обнаружил также трипептид с известной АПФ ингибиторной активностью LQP (Leu-Gln-Pro) [7, 8]. Ингибиторная активность этих пептидов обуславливается низкой молекулярной массой и аминокислотной последовательностью. Большинство пептидных ингибиторов АПФ содержат в С-концевой части последовательности остаток пролина. Поскольку осуществление и эффективность биологического действия молекулы пептида, так или иначе, связаны с его структурной комплементарностью с взаимодействующими молекулами, то для выяснения механизма функционального действия пептидной молекулы необходимо знание пространственного строения и конформационных особенностей пептида. В свою очередь пространственное и электронное строение молекулы также тесно взаимосвязаны: при изменении положения ядра меняется электронное строение. Замещение одних атомных групп на другие меняет электронное распределение и геометрические параметры, в результате меняется характер взаимодействия и функциональные свойства молекулы. Флуктуации отдельных атомных групп в пределах пептидной молекулы в зависимости от заряда, электростатического поля или конформационного изменения играют важную роль в определении структуры и связывающих свойств молекулы. Электронная структура пептидной молекулы является ключом для продуктивного пептид-рецепторного взаимодействия.

В данной работе расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы и системы потенциальных функций, ранее описанных и примененных в работе [9]. При обсуждении результатов расчета была использована принятая классификация пептидных структур [9]. Конформационное состояние каждого остатка определялось значениями двугранных углов ϕ , ψ и ω основной цепи и χ^i , боковых цепей. Введено понятие формы остатка, которое характеризует область (R,B,L или P) значений углов ϕ и ψ . Углы ϕ и ψ основной цепи в конформациях находятся из низкоэнергетических областей 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 ($\phi = 0^\circ \div 180^\circ, \psi = -180^\circ \div 0^\circ$). Выбор структурных вариантов при расчете конформаций отдельных трипептидов осуществлялся на основе известных значений двугранных углов (ϕ и ψ) соответствующих низкоэнергетическим областям конформационной карты R,B и L для каждого монопептида, а для монопептида пролина конформации выбирались из двух B и R областей [9]. Отсчет двугранных углов вращения ϕ , ψ , ω и χ^i проведен согласно общепринятой номенклатуре IUPAC-IUB [10]. Расчет стабильных конформаций пептидов проводился с помощью программы [11]. Поиск минимумов потенциальной энергии осуществлялся методом сопряженных градиентов [11]. Электронное строение молекул трипептидов изучалось с помощью полуэмпирического метода квантовой химии AM1, позволяющего количественно оценить суммарное влияние структурных изменений на распределение электронной плотности молекулы в целом и в любой ее части. Расчеты электронной структуры проводились с использованием комплекса сервисных программ HyperChem v. 8.0, позволяющего проводить квантово-химические расчеты молекул методом AM1.

Определение пространственного строения гипотензивных трипептидных молекул LPP, IPP, VPP, LKP, LQP и LRP проводилось путем минимизации потенциальной энергии выбранных конформационных состояний, исходя из особенностей, составляющих их аминокислотных остатков. При составлении структурных вариантов трипептидов ориентации боковых цепей остатков брались с учетом возможных межостаточных взаимодействий, образуемых данными остатками в конформационных состояниях. В трипептидах LPP, IPP и VPP имеются два сопряженных остатков пролина, которые ограничивают конформационные возможности предыдущих остатков. Остатки пролина, как известно [12], обладают конформационным своеобразием, благодаря циклическому строению основной цепи. Остатки пролина ограничивают конформационные возможности предыдущего остатка, для которого реализуется только B форма основной цепи. Поэтому для рассматриваемых трипептидов стерически допустим только один структурный тип: *ee* и одна форма основной цепи BBB. Пептиды LKP, LQP и LRP содержат один остаток пролина и поэтому для них стерически допустимо два структурных типа для пептидного остова – *ee* и *fe*.

В результате минимизации энергии составленных структурных вариантов были найдены низкоэнергетические конформации трипептидных молекул LPP, IPP, VPP, LKP, LQP и LRP. Для каждой из рассчитанных конформаций трипептидов определены вклады всех видов энергий внутримолекулярных взаимодействий. В таблице 1 приведены энергетические параметры наиболее стабильных конформаций для каждого из трипептидов. Как следует из таблицы 1 энергетически наиболее предпочтительными для каждого трипептида оказались конформации одного структурного типа с формой основной цепи BBB. Все низкоэнергетические конформации трипептидов формируют бета-изгиб пептидного остова молекулы. Эти конформации отличаются в основном энергетическим вкладом электростатических и дисперсионных взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки пептидной цепи. Самые низкоэнергетические конформации трипептидов отличаются структурной особенностью и ориентацией боковой цепи второго аминокислотного остатка. Структурный анализ трипептидов позволяет сделать заключение, что благодаря наличию двух сопряженных остатков пролина молекулы трипептидов LPP, IPP и VPP обладают существенной конформационной ограниченностью. Благодаря наличию изгиба пептидной цепи, полученную двумя остатками пролина, стабильные конформации трипептидов LPP, IPP и VPP характеризуется образованием эффективных ди- и трипептидных межостаточных взаимодействий. Для трипептида LPP самой низкоэнергетической оказалась $B_{21}BB$ конформация. В предпочтительной конформации этого трипептида все остатки вовлечены в эффективные взаимодействия. Самой низкоэнергетической структурой трипептида IPP является $B_{12}BB$ конформация.

Таблица 1. Энергетические параметры внутримолекулярных взаимодействий в предпочтительных конформациях молекул IPP, VPP, LPP, LKP, LRP и LQP

№	Пептид	Конформация	Энергетические вклады, ккал/моль				
			Е _{нев}	Е _{эл}	Е _{торс}	Е _{полн}	Е _{отн}
1.	IPP	B ₁₂ BB	-2,9	-4,2	1,7	-5,4	0
2.	VPP	B ₂ BB	-1,3	-2,8	1,0	-3,1	0
3.	LPP	B ₂₁ BB	-4,7	-3,6	1,4	-6,9	0
1.	LKP	B ₃₂ B ₂₃ B	-11,5	-1,1	3,8	-8,8	0
2.	LRP	B ₂₁ B ₂₃ B	-10,7	-3,5	3,7	-10,6	0
3.	LQP	B ₂₁ B ₃₁₂ B	-10,3	-1,6	1,6	-10,3	0

Эта конформация превосходит следующую по стабильности конформацию B₂₂BB лишь на 0,5 ккал/моль. Энергетически предпочтительной структурой для трипептида VPP оказалась конформация B₂BB. К тому же все низкоэнергетические конформации формируют изгиб пептидного остова. Образование системы дисперсионных и электростатических взаимодействий между пептидными звеньями цепи придает изгибной структуре особую прочность. Молекулярные модели энергетически предпочтительных конформации молекул трипептидов LPP, IPP и VPP, построенные на основе рассчитанных величин двугранных углов, представлены на рисунке 1. Низкоэнергетические конформации трипептидов отличаются в основном энергией дисперсионных и электростатических взаимодействий, т.е. в конечном счете, плотностью упаковки пептидной цепи. Практически самые низкоэнергетические конформации трипептидов отличаются друг от друга положением N-концевого остатка. Расчет конформаций антигипертензивных трипептидов позволяет сделать заключение, что молекулы обладают существенной конформационной ограниченностью. В таблице 2 представлены величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков молекул IPP, VPP, LPP, LKP, LQP и LRP в низкоэнергетических конформациях. На рисунке 2 приведены молекулярные модели энергетически предпочтительной конформации молекул трипептидов LKP, LQP и LRP.

Таблица 2. Величины двугранных углов (град) аминокислотных остатков молекул IPP, VPP, LPP, LKP, LRP и LQP в низкоэнергетических конформациях I – B₁₂ BB (Е_{отн} = 0 ккал/моль), II – B₂ BB (Е_{отн} = 0 ккал/моль), III – B₂₁ BB (Е_{отн} = 0 ккал/моль), IV – B₂₁B₂₃B- (Е_{отн} = 0 ккал/моль), V – B₂₁B₂₃B- (Е_{отн} = 0 ккал/моль), VI – B₂₁B₃₁₂B- (Е_{отн} = 0 ккал/моль)

Пептид	Конформация	Основная цепь			Боковая цепь				
		φ	ψ	ω	χ ₁	χ ₂	χ ₃	χ ₄	χ ₅
IPP	I	-80	150	186	59	188	170	185	-
VPP	II	-66	117	181	180	185	177	-	-
LPP	III	-76	98	173	174	58	178	174	-
LKP	IV	-60	146	177	181	70	179	176	-
LRP	V	-70	141	178	178	70	180	178	-
LQP	IV	-71	114	182	175	60	179	175	-
IPP	I	-60	163	177	-	-	-	-	-
VPP	II	-60	160	178	-	-	-	-	-
LPP	III	-60	162	177	-	-	-	-	-
LKP	IV	-121	92	164	187	-63	189	179	178
LRP	V	-120	92	167	188	-80	190	180	-
LQP	IV	-105	149	176	-68	69	-112	-	-
IPP	I	-60	140	180	-	-	-	-	-
VPP	II	-60	139	180	-	-	-	-	-
LPP	III	-60	142	180	-	-	-	-	-
LKP	IV	-60	83	180	-	-	-	-	-
LRP	V	-60	167	180	-	-	-	-	-
LQP	IV	-60	149	176	-	-	-	-	-

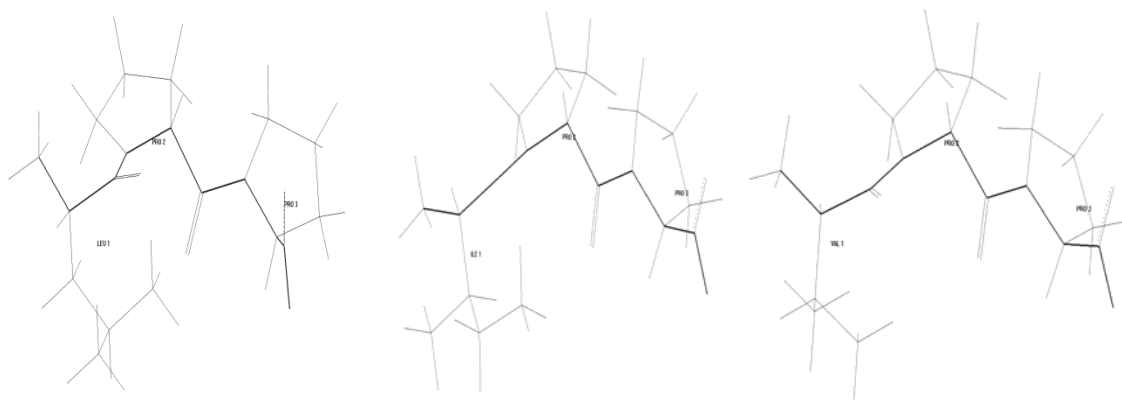


Рисунок 1. Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур трипептидных ингибиторов АПФ: LPP (Leu-Pro-Pro); IPP (Ile-Pro-Pro); VPP (Val-Pro-Pro) соответственно. Ширной линией указан пептидный остов молекул

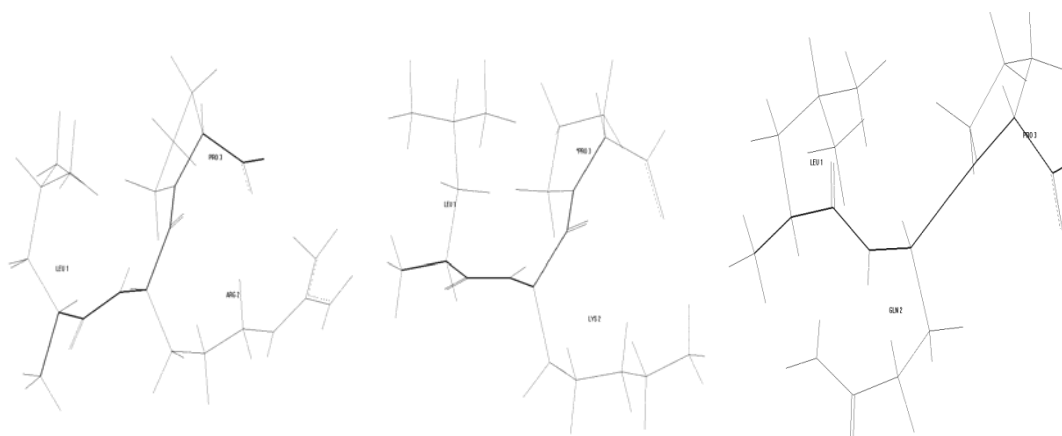


Рисунок 2. Молекулярные модели энергетически наиболее предпочтительных пространственных структур трипептидных ингибиторов АПФ: LRP (Leu-Arg-Pro); LKP (Leu-Lys-Pro); LQP (Leu-Gln-Pro) соответственно. Ширной линией указан пептидный остов молекул

Таблица 3. Электронные характеристики в энергетически предпочтительной конформации молекул IPP, VPP и LPP, LKP, LRP и LQP

Пептид	Полная энергия	Энергия связывания	Энергия изолированных атомов	Электронная энергия	Энергия взаимодействия ядер	Суммарный дипольный момент (Debye)
IPP	-99555,7	-4720,3	-94,835,4	-786398,1	686842,4	3,9
VPP	-95998,4	-4474,8	-91523,7	-724156,6	628158,1	3,7
LPP	-99515,5	-4680,1	-94835,4	-795246,6	695731,0	4,7
LKP	-109194,9	-5328,8	-103866,1	-908392,7	799197,8	12,0
LRP	-118774,1	-5572,5	-113201,6	-998493,7	879719,7	20,2
LQP	-112108,9	-5053,5	-107055,5	-886981,4	774872,4	4,6

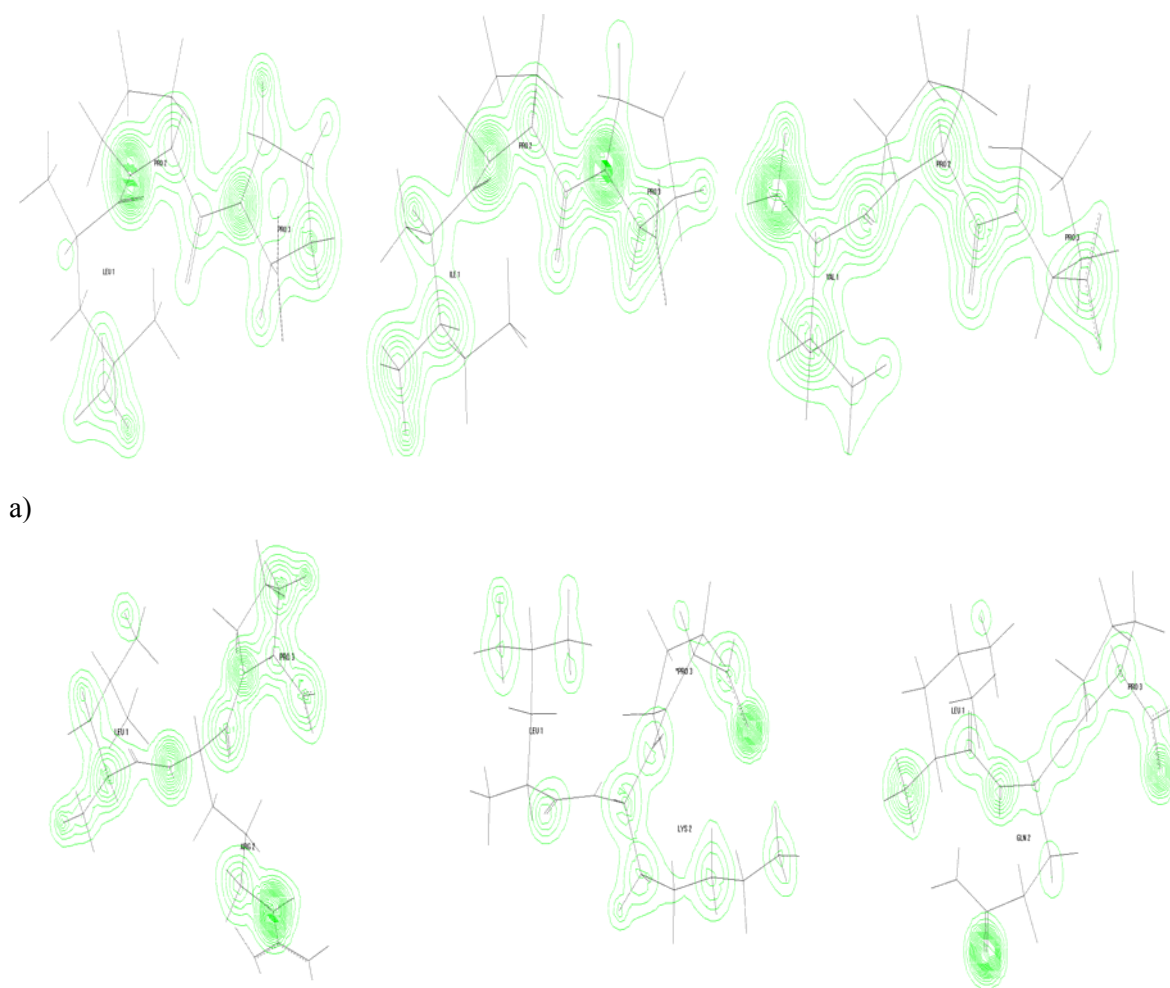


Рисунок 3. Распределения электронной плотности в энергетически наиболее предпочтительных пространственных структурах трипептидных ингибиторов АПФ: а) LPP (Leu-Pro-Pro); IPP (Ile-Pro-Pro); VPP (Val-Pro-Pro), б) LRP (Leu-Arg-Pro); LKP (Leu-Lys-Pro); LQP (Leu-Gln-Pro) соответственно

При расчете электронной структуры молекул трипептидов суммарный заряд системы брался равным нулю, для каждого трипептида учитывалось число электронов, количество заселенных уровней и исходное число орбиталей. На рисунке 3 приведены распределения электронной плотности в энергетически предпочтительной конформации каждого из трипептидов. Расчеты показывают высокую электронную плотность вблизи атомов кислорода карбонильной группы, расположенной в пептидной цепи между двумя остатками Pro и самые большие отрицательные заряды в трипептидах сконцентрированы на атомах кислорода карбонильной группы и атомах азота аминогруппы. По всей видимости наличие в трипептидах высокозаряженных пептидных групп может играть существенную роль в их реакционной способности, т.е. биологической активности. В таблице 3 приведены электронные характеристики и величины дипольного момента энергетически предпочтительной конформации соответствующей молекулы трипептида. Анализ зарядовых характеристик и электронной плотности на атомах пептидных групп молекул трипептидов позволяет сделать вывод, что большей электронодонорной способностью обладают атомы кислорода карбонильной группы по сравнению с ее другими атомами, т.е. наличие высокозаряженных пептидных групп играет существенную роль в реакционной способности молекулы. На рисунке 3 (а и б) приведены распределения электронной плотности в энергетически предпочтительной конформации каждого из трипептидов. В настоящее время известно, что если в молекуле пептида отсутствуют другие координационно-активные заместители, то в качестве акцептора протона при образовании комплексов выступает карбонильный кислород. Связь $C=O$ пептидной группы является эффективным акцептором протонов, обладает высокой химической активностью и способностью к образованию межмолекулярных комплексов. Сравнение рассчитанных величин дипольных моментов исследуемых молекул LPP, IPP и VPP, согласно таблицы 3, показывает, что более высоким дипольным моментом обладает молекула трипептида LPP, а меньшее значение у трипептида VPP, что вероятно связано с различиями природного строения боковой цепи N-концевого остатка. Как видно из таблицы 3 среди трипептидов LKP, LQP и LRP высоким дипольным моментом обладает молекула трипептида LRP, благодаря длинной положительно заряженной боковой цепи остатка аргинина.

Таким образом, результаты конформационного анализа антигипертензивных трипептидов LPP, IPP, VPP, LKP, LQP и LRP выявили для них одинаковую развернутую форму пептидного остова низкоэнергетических структур. Расчет показал, что данные структурно похожие трипептиды формируют практически идентичные пространственные конформации, различающиеся лишь ориентацией боковых цепей отдельных остатков. Полученные величины энергетических и электронных параметров наиболее стабильных конформаций трипептидов дают представление о предпочтительной пространственной структуре молекул. В результате расчетов были определены и сопоставлены величины энергетических вкладов внутримолекулярных взаимодействий в низкоэнергетических конформационных состояниях молекул. Полученные характеристики пространственной и электронной структуры антигипертензивных трипептидных молекул могут способствовать целенаправленному поиску эффективных аналогов молекул в качестве лекарственных препаратов для стимулирования или блокирования конкретного физиологического воздействия в лечении ряда сердечно-сосудистых заболеваний. Предполагается, что среди рассчитанных низкоэнергетических структур находится биологически активная конформация трипептидов, способная участвовать в процессе ингибирования АПФ.

Список литературы / References:

1. Raia J.J.Jr., Barone J.A., Byerly W.G., Lacy C.R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a comparative review. *Ann. Pharmacother.*, 1990, vol. 24, pp. 506-525.
2. Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Peptide Science*, 1997, vol. 43, pp. 129-134.
3. Jakala P., Jauhiainen T., Korpela R., Vapaatalo H., Milk protein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro protect endothelial function *in vitro* in hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 2009, vol. 1, iss. 3, pp. 266-273.
4. FitzGerald R.J., Murray B.A., Walsh D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. Review. *J. Nutr.*, 2004, vol. 134, pp. 980-988.
5. Foltz M., Cerstiaens A., van Meensel A., Mols R., van der Pijl P.C., Duchateau G.S.M.J.E., Augustijns P. The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides*, 2008, vol. 29, pp. 1312-1320.
6. Hirota, T., Ohki K., Kawagishi R., Kajimoto Y., Mizuno S., Nakamura Y. and Kitakaze M. Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens Res.*, 2007, vol. 30, pp. 489-496.
7. Miyoshi S., Ishikawa H., Kanako T., Fukui F., Tanaka H., Maruyama S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, vol. 55, pp. 1313-1318.
8. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 1995, vol. 78, pp. 777-783.
9. Агаева Г.А., Агаева У.Т., Годжаев Н.М. Особенности пространственной организации молекул гемокина-1 человека и гемокина-1 мыши/крысы. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып. 3, с. 457-470. [Agaeva G.A., Agaeva U.T., Godzhaev N.M. Features of the spatial organization of human hemokinin-1 molecules and mouse/rat hemokinin-1 molecules. *Biophysics*, 2015, vol. 60, iss. 3, pp. 457-470. (In Russ.)]
10. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, pp. 291-308.
11. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полумпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godzhaev N.M. The program of semi-empirical calculation of conformations of molecular complexes on a computer. *Journal of Structural Chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148. (In Russ.)]
12. Schimmel P.R., Flory P.J. Conformational energies and conformational statistics of copolypeptides containing L-proline. *J. Mol. Biol.*, 1968, vol. 34, pp. 105-111.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SPATIAL AND ELECTRONIC STRUCTURE OF TRIPEPTIDE INHIBITORS OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME (ACE)**Agueva G.A.¹, Agueva U.T.¹, Godjaev N.M.^{1,2}**¹ Baku State University*Z. Khalilov str., 23, Baku, Az1148, Azerbaijan*² Baku Engineering University*Sumqait Road, 16 km, Baku, Az010, Azerbaijan; e-mail: gulshen@mail.ru*

Abstract. By means of molecular mechanics and quantum-chemical calculations have been investigated of the spatial and electronic structures of antihypertensive tripeptide molecules. LPP, IPP, VPP, LKP, LQP and LRP tripeptides act as angiotensin-converting enzyme ACE inhibitors in vitro. The conformational study of molecules was carried out on base the low-energy conformations of its mono-peptides. The calculation show the values of all intermolecular interactions between residues of optimal conformations in molecules. On the basis of obtained results have been determined the energy and electronic characteristics of these tripeptides. Theoretical conformational analysis permit to found the forces, stabilized the energy preferable spatial structures of molecules. As a result of this study were also determined energy preferred areas of the values of dihedral angles of the backbone and side chains, values energy contributions of inter-residues interactions and hydrogen bonds, as well as orientations of the side chains in the lowest energy conformations. On base got geometry parameters were built molecular models the most stable conformations of tripeptide inhibitors, which collation enables to select the structured criteria required for making medicinal preparation suitable to clinical use.

Key words: *antihypertensive tripeptide, angiotensin converting enzyme (ACE), conformation, inhibitor, molecular mechanics method, quantum-chemical method.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОСЕНСОРОВ

Судоргин С.А., Заичкина М.А.

Волгоградский государственный аграрный университет
пр. Университетский, 26, г. Волгоград, 400002, РФ; e-mail: sergsud@mail.ru
Поступила в редакцию: 04.07.2019

Аннотация. В данной работе исследуются термоэлектрические характеристики углеродных нанотрубок. Была изучена дифференциальная термоЭДС однослойных углеродных нанотрубок типа «zig-zag», которые находятся во внешнем продольном постоянном электрическом поле. Динамика электронной подсистемы трубок описывается при помощи квазиклассического метода с использованием кинетического уравнения Больцмана. Так же выведена формула для коэффициента дифференциальной термоЭДС и показана нелинейная зависимость от величины напряженности внешнего поля. Для расчета термоэлектрических характеристик углеродных нанотрубок использовался метод разложения их периодического закона дисперсии в ряд Фурье. С его помощью определяются транспортные характеристики: электропроводность, коэффициент Холла, теплопроводность и другие. При вычислении коэффициента дифференциальной термоЭДС была использована методика по изучению зависимости дифференциальной термоЭДС от напряженности внешнего постоянного электрического поля для углеродных нанотрубок типа «зигзаг». В итоге все полученные результаты могут быть использованы для разработки биосенсоров на основе углеродных наноструктур.

Ключевые слова: нанотрубки, термоэдс, электропроводность, наноструктуры, сенсоры.

Исследование транспортных и проводящих характеристик новых материалов – является одной из ключевых задач при проектировании и модернизации компонентов наноэлектронных устройств, в том числе сенсоров, сконструированных на базе новых материалов на основе углерода: графена и нанотрубок. И графен и углеродные нанотрубки также могут использоваться в качестве сверхчувствительного сенсора для обнаружения отдельных молекул химических веществ [1]. Изучению термоэлектродвижущей силы в низкоразмерных структурах посвящено значительное число публикаций, далеко неполный перечень которых представлен в работах [2, 3].

Следует отметить, что из-за многообразия структурных особенностей термоэлектрические свойства углеродных нанотрубок (УНТ) [4] характеризуются значительным разбросом. Наблюдающиеся в полупроводниковых нанотрубках явления локализации электронов, зачастую приводят к зависимости транспортных коэффициентов от температуры и напряженности электрического поля, особенно в области низких температур [2-4]. Все вышеуказанные особенности делают изучение термоэлектрических свойств сложной и интересной задачей. В работе предложен аналитический метод расчета коэффициента дифференциальной термоЭДС углеродных нанотрубок типа «зигзаг» во внешнем сильном электрическом поле.

Значение термоэлектродвижущей силы выражается через логарифмическую производную продольной электропроводности материала при помощи формулы Мотта [2]. Выяснено также, что в ряде случаев применение этой формулы не дает корректного результата, т.к. в ряде ситуаций поведение термоэлектродвижущей силы отличается от показываемого формулой Мотта [2]. Например, было выявлено возрастание термоэлектродвижущей силы в металлических структурах при температурах, близких к температуре Кондо, а также аномальное поведение термоЭДС при электронных переходах и осцилляции в сильных внешних магнитных полях [2].

В настоящее время интерес к исследованию термоэлектрических характеристик углеродных наноструктур вызван тем, что при помощи постоянного сильного электрического поля появилась возможность управлять этими свойствами и добиваться их значительного изменения. Разработанный метод дает возможность рассчитывать коэффициент дифференциальной термоЭДС не только при слабых полях, в которых выполнено условие $eEb\tau / \hbar T \leq 1$, где b – расстояние между атомами углерода в графене; τ – время релаксации; T – абсолютная температура, но и при значительно более сильных полях, существенно больших, чем те, которые заданы таким условием.

Аналитическая модель термоэлектрических характеристик углеродных нанотрубок построена на основе квазиклассического приближения. Дисперсионное соотношение электронов в УНТ получено с использованием квантово-механических расчетов электронной динамики с использованием метода сильной связи [4]. Как правило электронное строение углеродных наночастиц отражает только движение π -электронов проводимости внутри минизоны и не учитывает переходов между энергетическими зонами (приближение Хюккеля). Используем закон дисперсии, описывающий электронные свойства однослойного графена, без учета электростатического взаимодействия электронов на одном узле, используя способ сворачивания углеродного листа в цилиндр и применяя условия квантования квазиимпульса p по окружности трубки, получим дисперсионное соотношение для зигзагообразных УНТ типа $(n, 0)$ [4]:

$$E(\mathbf{p}) = \pm \gamma \sqrt{1 \pm 4 \cos(ap_x) \cos\left(\frac{\pi s}{n}\right) + 4 \cos^2\left(\frac{\pi s}{n}\right)}, \quad (1)$$

где $a = 3b/2\hbar$; $b = 0,142$ нм – среднее расстояние между атомами углерода в графене; $p = (p_x, s)$ – квазиимпульс электронов в углеродной нанотрубке; p_x – параллельная оси нанотрубки компонента квазиимпульса; $s = 1, 2, \dots, n$ – нумерует квантование компоненты импульса по окружности нанотрубки; $\gamma \approx 2,7$ эВ – интеграл перескока электронов между соседними узлами решетки кристалла [5]. Разные знаки в законе дисперсии относятся к зоне проводимости и валентной зоне соответственно. Появление разных знаков под корнем по сравнению со спектром графена [4] связано с тем, что в элементарную ячейку УНТ входит 4 атома углерода.

Для расчета термоэлектрических характеристик углеродных нанотрубок используем разложение их периодического закона дисперсии в ряд Фурье [6]. В рамках квазиклассического подхода функция распределения электронов $f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})$, зависящая от их импульсов и координат, находится из решения кинетического уравнения Больцмана [7], которое широко применяется для изучения процессов переноса тепла и электрического заряда в системах, в которых взаимодействие между соседними частицами можно считать пренебрежимо малым. С его помощью определяются транспортные характеристики: электропроводность, коэффициент Холла, теплопроводность и другие. Интеграл столкновений выбирается в виде, используемом в приближении времени релаксации (τ -приближении). Можно считать, что время релаксации постоянным, т.к. экспериментально установлено, что в наноструктурах уже при температурах порядка 40 К время релаксации и существенно не зависит от температуры [4].

Кинетическое уравнение Больцмана на неравновесную функцию распределения электронов однородных УНТ в τ -приближении записывается в традиционном виде [7]:

$$\frac{\partial f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\partial t} + \mathbf{F} \frac{\partial f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\partial \mathbf{p}} = \frac{f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r}) - f_{0s}(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\tau}, \quad (2)$$

где $f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ – функция распределения электронов, зависящая от импульса и координат; $f_{0s}(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ – равновесная функция распределения Ферми; $\mathbf{F}$ – электростатическая сила, действующая на электрон; E – напряженность внешнего постоянного электрического поля, в котором находится нанотрубка.

При вычислении коэффициента дифференциальной термоЭДС используем методику, подробно изложенную в работе [8] и успешно примененную к расчету удельной электропроводности и коэффициента диффузии электронов бездефектных и примесных однослойных углеродных нанотрубок, однослойного графена и двухслойных графеновых нанолент [6, 9, 10]. Необходимо, чтобы функция распределения электронов $f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ должна удовлетворять условию непрерывности. Плотность тока вычисляется по формуле:

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}) = e \sum_{\mathbf{p}, s} \mathbf{v}_s(\mathbf{p}) f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r}) \quad (3)$$

Учитывая это, уравнение Больцмана с интегралом столкновений в полуклассическом приближении времени релаксации используется в операторном виде. В стационарном случае при отсутствии источников зарядов,

дивергенция плотности тока должна быть равна нулю $\text{div} \mathbf{j}(\mathbf{r}) = 0$, и решение уравнения на функцию распределения (2) примет вид:

$$f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = \hat{L}_p^{-1} \left(\frac{f_{0s}(\mathbf{p}, \mathbf{r})}{\tau} \right) \quad (4)$$

Правило нахождения обратного оператора [8]:

$$\hat{L}_{\pm \mathbf{p}}^{-1} \psi(\mathbf{p}) = \int_0^\infty \psi(\mathbf{p} \mp \mathbf{p}(t)) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt, \quad (5)$$

где $\mathbf{p}(t)$ является решением уравнения движения $d\mathbf{p}/dt = \mathbf{F}$, с начальным импульсом равным нулю.

В первом приближении разложения функция распределения имеет следующий вид:

$$f_s(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) \hat{L}_p^{-1} \phi(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) + \hat{L}_p^{-1} \left\{ \frac{f_s^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) \operatorname{div} \mathbf{j}}{en} - \operatorname{div}(\mathbf{v}(\mathbf{p}) f^{(0)}(\mathbf{p}, \mathbf{r})) \right\} \quad (6)$$

С учетом постоянства концентрации электронов проводимости $n = \text{const}$ в первом приближении по величине градиента $\nabla_x T$ из формулы (6) выведено выражение для коэффициента дифференциальной термоэлектродвижущей силы углеродных нанотрубок во внешнем электрическом поле:

$$S(E) = \sum_s \int_{-\pi}^{\pi} \frac{\partial f}{\partial T} \sum_m A_{ms} m \sum_{m'} A_{m's} m' \left\{ \frac{E^2(m^2 + m'^2) + 1}{K(E, m, m')} * \right. \\ * [EmR(E, m, m', p_x) + M(E, m, m', p_x)] + \\ \left. + \frac{E^3(m'^3 - 2m^2 m') + Em'}{K(E, m, m')} T(E, m, m', p_x) \right\} dp_x + \\ + \frac{1}{\sum_s \int_{-\pi}^{\pi} f dp_x} \sum_{s'} \int_{-\pi}^{\pi} f \sum_{s''} \int_{-\pi}^{\pi} \frac{\partial f}{\partial T} \sum_m A_{ms} m \sum_{m'} A_{m's} m' \frac{1}{P(E, m, m')} F(E, m, m', p_x, p_{x'}) dp_x dp_{x'}. \quad (7)$$

Здесь введены следующие обозначения:

$$K(E, m, m') = [E^4(m^4 + m'^4 - 2m^2 m'^2) + 2E^2(m^2 + m'^2) + 1] [E^2 m^2 + 1], \\ P(E, m, m') = [E^2 m^2 + 1]^2 [E^2 m'^2 + 1], \\ R(m, m', p_x) = \cos(mp_x) \sin(m'p_x) + \cos(mp_x) \cos(m'p_x) - \sin(mp_x) \sin(m'p_x), \\ M(m, m', p_x) = \sin(mp_x) \sin(m'p_x) + \sin(mp_x) \cos(m'p_x) + \cos(mp_x) \sin(m'p_x), \\ T(E, m, m', p_x) = [\cos(mp_x) \cos(m'p_x) - Em \sin(mp_x) \cos(m'p_x)], \\ F(E, m, m', p_x) = [\sin(m'p_x) + Em \cos(m'p_x)] * \\ * [\sin(mp_x) + 2Em \cos(mp_x) - E^2 m^2 \sin(mp_x)],$$

где f – функция распределения Ферми-Дирака; A_{ms} и $A_{m's}$ – коэффициенты разложения дисперсионного разложения электронов в ряд Фурье, определяемые по формуле:

$$A_{ms} = \pm \frac{\gamma}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} \sqrt{1 + 4 \cos(ap_x) \cos\left(\frac{\pi s}{n}\right) + 4 \cos^2\left(\frac{\pi s}{n}\right) \cos\left(\frac{mp_x b}{\hbar}\right)} dp_x \quad (8)$$

Изучены зависимости дифференциальной термоЭДС от напряженности внешнего постоянного электрического поля для углеродных нанотрубок типа «зигзаг». В данном выражении для дифференциальной термоЭДС используются относительные безразмерные единицы (за единицу величины, отложенной по оси u , принято значение 3,1 В/К).

Дифференциальная термоЭДС однослойных УНТ нелинейно зависит от напряженности внешнего постоянного электрического поля. При увеличении значений напряженности внешнего поля дифференциальная термоЭДС сначала увеличивается по модулю, а затем снижается и стремится к постоянной величине. Такая зависимость термоЭДС от напряженности поля наблюдается для всех рассмотренных типов УНТ: (5,0), (10,0) и (20,0). При температуре $T = 300$ К для УНТ (5,0) типа максимальное по абсолютной величине значение дифференциальной термоЭДС зафиксировано при напряженности поля $E \approx 5,06 \cdot 10^5$ В/м и составляет 26,4 мкВ/К, для УНТ (10,0) типа – при $E \approx 3,12 \cdot 10^5$ В/м составляет 97,6 мкВ/К, для УНТ (20,0) типа – при $E \approx 1,94 \cdot 10^5$ В/м составляет 347,2 мкВ/К, что находится в качественном согласовании с экспериментальными данными [12-14]. Тип носителей заряда определяет знак термоЭДС. Так как это электроны проводимости, то дифференциальная термоЭДС имеет знак «минус». При напряженности внешнего электрического поля $E > 1,2 \cdot 10^7$ В/м коэффициент термоэлектродвижущей силы однослойных УНТ можно считать практически

константой.

Изучено влияние температуры внешней среды на коэффициент дифференциальной термоэлектродвижущей силы однослойных беспримесных углеродных нанотрубок, что имеет большое значение при проектировании биосенсоров. Численный анализ температурных зависимостей термоЭДС полупроводниковых УНТ проведен для трубок типа (10,0). Исследованы зависимости дифференциальной термоЭДС $S(E)$ от величины напряженности E внешнего постоянного электрического поля при различных температурах. При низких температурах термоЭДС значительно больше по абсолютной величине. При увеличении температуры от 50 К до 300 К абсолютные значения термоЭДС уменьшаются более чем в 30 раз, с 3,36 мВ/К до 97,6 мВ/К для УНТ (10,0) типа, что происходит за счет собственной динамики носителей заряда. Такой характер зависимости дифференциальной термоЭДС от температуры в углеродных нанотрубках подтверждается результатами экспериментальных работ [12-14]. Данный эффект играет существенную роль при низких температурах, что можно наглядно видеть на рисунке 2. Подобная зависимость дифференциальной термоЭДС от амплитуды внешнего поля наблюдается и для других низкоразмерных структур с периодическим и ограниченным законом дисперсии, например, для сверхрешеток [8, 11], что подтверждает корректность предложенной математической модели термоэлектрических свойств углеродных нанотрубок во внешнем электрическом поле.

Экспериментальные значения дифференциальной термоЭДС для однослойных углеродных нанотрубок достигают 200-260 мВ/К [12-14] при комнатной температуре ($T = 300$ К). Некоторая разница данных, полученных из численных расчетов по формуле (15) от полученных экспериментально, может быть объяснена тем, что использованная полуклассическая модель содержит ряд приближений: не учтено электрон-фононное взаимодействие, взаимодействие с магнитным полем, наличие контактов и т.д. Следует отметить, что электрон-фононное взаимодействие в углеродных нанотрубках, как в однослойных, так и в многослойных, проявляется достаточно слабо. В таких системах реализуется преимущественно баллистический режим транспорта электронов [15].

Кратко сформулируем основные результаты проведенного исследования и выводы:

1. Выведена формула для дифференциальной термоэлектродвижущей силы для однослойных УНТ в рамках квазиклассического подхода с использованием приближения времени релаксации в сильном внешнем электрическом поле.

2. Дифференциальная термоЭДС однослойных идеальных углеродных нанотрубок имеет знак минус вследствие того, что носителями зарядов в углеродных наночастицах являются отрицательно заряженные электроны; нелинейно и немонотонно зависит от амплитуды внешнего постоянного электрического поля, а в сильном поле стремится к постоянному значению.

3. С ростом диаметра УНТ дифференциальная термоЭДС возрастает по абсолютной величине, что объясняется увеличением числа квантовых состояний электронов в зоне проводимости.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-42-343001).

Список литературы / References:

1. Schedin F., Geim A.K., Morozov S.V., Hill E.V., Blake P., Katsnelson M.I., Novoselov K.S. Detection of individual gas molecules adsorbed on grapheme. *Nature Materials*, 2007, vol. 6, pp. 652-655.
2. Варламов А.А., Кавокин А.В., Лукьянчук И.А., Шарапов С.Г. Аномальные термоэлектрические и термомагнитные свойства графена. *УФН*, 2012, т. 182, с. 1229-1234. [Varlamov A.A., Kavokin A.V., Lukuanchuk I.A., Sharapov S.G. Anomalous thermoelectric and thermomagnetic properties of graphene. *UFN*, 2012, vol. 182, pp. 1229-1234 (In Russ.)]
3. Sharapov S.G., Varlamov A.A. Anomalous growth of thermoelectric power in gapped grapheme. *Phys. Rev. B*, 2012, vol. 86, p. 035430.
4. Дьячков П.Н. *Электронные свойства и применение нанотрубок*. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2010, 488 с. [Diachkov P.N. *Electronic properties and application of nanotubes*. М.: BINOM, Laboratory of knowledge, 2010, 488 p. (In Russ.)]
5. Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.C. *Science of fullerenes and carbon nanotubes*. Acad. Press, New York, 1996, 965 p.
6. Белоненко М.Б., Лебедев Н.Г., Судоргин С.А. Коэффициенты диффузии и проводимости полупроводниковых углеродных нанотрубок во внешнем электрическом поле. *ФТТ*, 2011, т. 53, с. 1841-1844. [Belonenko M.B., Lebedev N.G., Sudorgin S.A. Diffusion and conductivity coefficients of semiconductor carbon nanotubes in an external electric field. *PoSS*, 2011, vol. 53, pp. 1841-1844. (In Russ.)]
7. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. *Физическая кинетика*. М.: Физ.-мат. лит., 1979, 528 с. [Landau L.D., Lifshits E.M. *Physical kinetics*. М.: Fiz.-mat. lit., 1979, 528 p. (In Russ.)]
8. Булыгин А.С., Шмелев Г.М., Маглеванный И.И. Дифференциальная термоэдс сверхрешетки в сильном электрическом поле. *ФТТ*, 1999, т. 41, с. 1314-1316. [Bulygin A.S., Shmelev G.M., Maglevanny I.I. Differential thermoelectric power of a superlattice in a strong electric field. *PoSS*, 1999, vol. 41, p. 1314-1316 (In Russ.)]
9. Белоненко М.Б., Лебедев Н.Г., Судоргин С.А. Электропроводность и коэффициент диффузии электронов в бислое графена. *ЖТФ*, 2012, т. 82, с. 129-133. [Belonenko M.B., Lebedev N.G., Sudorgin S.A. Electrical conductivity and diffusion coefficient of electrons in graphene bilayer. *JTF*, 2012, vol. 82, pp. 129-133 (In Russ.)]

10. Sudorgin S.A., Belonenko M.B., Lebedev N.G. Effect of an electric field on the transport and diffusion properties of bilayer graphene ribbons. *Physica Scripta*, 2013, vol. 87, p. 015602.
11. Дыкман И.М., Томчук П.М. *Явления переноса и флуктуации в полупроводниках*. Наук. думка, Киев, 1981, 320 с. [Dykman I.M., Tomchuk P.M. *Transport and fluctuation phenomena in semiconductors*. Nauk. Dumka, Kiev, 1981, 320 p. (In Russ.)]
12. Small J., Perez K., Kim P. Modulation of Thermoelectric power of Individual Carbon Nanotubes. *Phys. Rev. Lett.*, 2003, vol. 91, p. 256801.
13. Small J., Kim P. Thermopower measurement of individual single walled nanotubes. *Microscale thermophysical engineering*, 2004, vol. 8, p. 1.
14. Egorushkin V.E., Melnikova N.V., Bobenko N.G., Ponomarev A.N. Low-temperature thermopower in disordered carbon nanotubes. *Nanosystems: physics, chemistry, mathematics*, 2013, vol. 4, pp. 622-629.
15. Елецкий А.В. Транспортные свойства углеродных нанотрубок. *УФН*, 2009, т. 179, № 3, с. 225-242. [Eletsky A.V. Transport properties of carbon nanotubes. *UFN*, 2009, vol. 179, no. 3, pp. 225-242. (In Russ.)]

INVESTIGATION OF THERMOELECTRIC CHARACTERISTICS OF CARBON NANOTUBES FOR THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS

Sudorgin S.A., Zaichkina M.A.

Volgograd State Agricultural University

University ave., 26, Volgograd, 400002, Russia; e-mail: sergsud@mail.ru

Abstract. In this paper, the thermoelectric characteristics of carbon nanotubes are investigated. The differential thermo pods of single-layer carbon nanotubes of the "zig-zag" type, which are in the external longitudinal constant electric field, were studied. The dynamics of the electronic tube subsystem is described using the quasi-classical method using the Boltzmann kinetic equation. The formula for the differential thermal EMF coefficient is also derived and the nonlinear dependence on the external field strength is shown. To calculate the thermoelectric characteristics of carbon nanotubes, a method of decomposition of their periodic dispersion law into a Fourier series was used. With its help, transport characteristics are determined: electrical conductivity, Hall coefficient, thermal conductivity, and others. When calculating the coefficient of differential thermal EDC, a technique was used to study the dependence of the differential thermal EDC on the external constant electric field strength for carbon.

Key words: carbon nanotubes, thermopower, conductivity, nanostructures, sensors.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЛИПРОЛИНОВОЙ ПЕНТАПЕПТИДНОЙ МОЛЕКУЛЫ

Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.

Бакинский Государственный университет, Институт физических проблем
ул. 3. Халилова 23, Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2019

Аннотация. К регуляторным пептидам относится семейство глипролинов - коротких пептидов, аминокислотные последовательности которых содержат остатки глицина и пролина. В настоящее время механизмы действия глипролинов и их мишени мало изучены. Важной задачей также является создание синтетических аналогов глипролинов, молекулы которых отличаются высокой стабильностью и эффективностью. Актуальным представляется проведение структурно-функциональных исследований глипролинов и их синтетических аналогов на модельных системах с помощью теоретических методов исследования. С помощью метода молекулярной механики было определено пространственное строение и конформационные свойства глипролиновой пентапептидной молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro. Потенциальная энергия молекулы оценивалась как сумма невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены 7 низкоэнергетических конформаций для глипролинового пентапептида, значения двугранных углов основной и боковых цепей, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Расчет показал, что низкоэнергетическими для пентапептида являются полусвернутые формы основной цепи. Боковые цепи аминокислот Thr и Lys в низкоэнергетических конформациях осуществляют эффективные взаимодействия и являются конформационно лабильными аминокислотами, они сближают участки основной цепи и боковые цепи аминокислот, входящих в пентапептид.

Ключевые слова: пентапептид, конформация, молекула, пространственная структура.

В настоящее время активно исследуется роль регуляторных пептидов в жизни и деятельности живых организмов. Регуляторные пептиды контролируют все биохимические процессы в живом организме. Среди них класс глипролинов, коротких пептидных молекул, состоящих из аминокислотных остатков глицина и пролина, привлекает внимание ученых, так как они являются источниками фармацевтических препаратов, которые составляет сам организм. Глипролины – это нейрорхимические молекулы психотропного действия, регулируют систему свертывания крови, влияют на работу иммунной и нервной систем [1, 2]. Создание новых лекарственных препаратов на основе глипролинов – современное направление фармакологии. Понять механизмы действия этих биомолекул можно, если решить задачу их структурно-функциональной организации. Целью данной работы является определение трехмерной структуры глипролиновой пентапептидной молекулы с аминокислотной последовательностью Thr-Lys-Pro-Gly-Pro.

Пентапептидная молекула состоит из двух трипептидных самостоятельно активных молекул трипептида макрофагально-микроглиального ингибирующего фактора (Thr-Lys-Pro) и глипролинового трипептида Pro-Gly-Pro. Известно, что трипептид Thr-Lys-Pro, представляющий часть второго домена IgG человека, тормозит функцию макрофагов, а трипептид Pro-Gly-Pro обладает нейропротективными свойствами, обеспечивает сохранение нормальной функции инсулярной и противосвертывающей систем крови на фоне развития диабета. Конформационные свойства пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro рассчитывались фрагментарно: сначала изучалась пространственная структура двух трипептидов Thr-Lys-Pro и Pro-Gly-Pro, а затем на основе полученных результатов исследовалась трехмерная структура всей пентапептидной молекулы.

Компьютерное моделирование, основанное на использовании метода теоретического конформационного анализа и программ, позволяющих получать графическое изображение пространственной структуры молекулы, было выполнено для молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro семейства глипролинов. Метод теоретического конформационного анализа дает возможность рассчитывать трехмерную структуру пептидных молекул исходя из известной аминокислотной последовательности [3]. В расчетах использовалась разработанная специальная классификация (конформация, форма основной цепи, шейп). Формы остатков определялись областями B, R, L и P двугранных углов основной цепи ϕ - ψ . При расчете рассматривались развернутые формы дипептидной молекулы (BB, BR, LB, LR, RL, PL, PP - шейпе) и свернутые формы основной цепи (RB, RR, BL, LL, PR, PB - шейп f). Для глицина начальные приближения формировались из низкоэнергетических конформаций (R форма – $\phi = -90^\circ$; $\psi = -90^\circ$; B форма – $\phi = -90^\circ$; $\psi = 100^\circ$; L форма – $\phi, \psi = 90^\circ$ и P форма основной цепи – $\phi = 90^\circ$; $\psi = -90^\circ$). Для аминокислоты пролин учитывались два положения (B форма – $\psi = 130^\circ$ и R форма – $\psi = -50^\circ$). Для аминокислотных остатков Thr рассматривались R, B и L формы основной цепи, а для Lys только B и L формы основной цепи, так как R форма является высокоэнергетичной для остатка, стоящего перед Pro. Положения боковой цепи треонина определялись тремя двугранными углами χ^1, χ^2, χ^3 , а для лизина - пятью углами $\chi^1, \chi^2, \chi^3, \chi^4$ и χ^5 .

Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учётом невалентных ($E_{нв}$), электростатических ($E_{эл}$), торсионных взаимодействий ($E_{тор}$) и энергии водородных связей ($E_{вс}$). Конформационное состояние каждого аминокислотного остатка обозначалось через X_{ij} , где X – характеризует форму основной цепи остатка

(R,B,L,P), а символы $ij = 11\dots, 12\dots, 13\dots, 21\dots$, и т.д. отвечают положениям боковой цепи ($\chi^1, \chi^2, \dots$). Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют принятой международной номенклатуре [4]. Для нахождения пространственного строения данных пептидных молекул использовалась специально разработанная программа [5]. Расчеты трехмерной структуры пептидных молекул позволяют определять геометрические и энергетические параметры пептидов, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий.

Трипептидная молекула Thr-Lys-Pro представляет собой N-концевой участок пентапептидной молекулы. Ее расчет выполнялся на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L-треонина, лизина и пролина. Для аминокислоты треонин учитывались B, R и L формы основной цепи. Остаток лизина в расчетах имел две формы основной цепи B и L, так как R форма основной цепи аминокислоты, стоящей перед пролином, является высокоэнергетичной. Для аминокислоты пролин учитывались две формы основной цепи B и R. Трипептид включал в себя 56 атомов и 17 переменных двугранных углов основной и боковых цепей. Расчет выявил, что для трипептидной молекулы Thr-Lys-Pro низкоэнергетическими являются конформации RBR и RBB с полусвернутой формой основной цепи. В глобальной конформации $R_{122} B_{21222} R$ ход основной цепи приводит к сближенности участков основной цепи и боковых цепей аминокислотных остатков. Вклад невалентных взаимодействий составляет -8,8 ккал/моль, электростатических взаимодействий 2,6 ккал/моль и торсионных 1,0 ккал/моль. Эффективными в этих конформациях являются ди- и трипептидные взаимодействия. Определены геометрические параметры – значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в трипептидную молекулу. Расчет показал энергетическую дифференциацию конформаций молекулы Thr-Lys-Pro. Все низкоэнергетические конформации в энергетическом интервале 0 – 4 ккал/моль были включены в расчет пентапептидной молекулы.

Конформационные возможности трипептида Pro-Gly-Pro были изучены на основе стабильных конформаций монопептидов N-ацетил-L-пролина и N-ацетил-L-глицина. Для данного трипептида, содержащего 39 атомов и 7 переменных двугранных углов, возможны 4 шейпа, представленных 16-ю формами основной цепи. Для аминокислоты Gly рассматривались и граничные значения углов ϕ и ψ . Из 16 рассчитанных форм основной цепи самой низкоэнергетической является RRR, которая имеет свернутый ход основной цепи. В глобальной конформации RRR ($E_{\text{отн}} = 0$ ккал/моль) энергия невалентных взаимодействий составляет -4,3 ккал/моль, электростатических -3,7 ккал/моль и торсионных 0,7 ккал/моль. При этом основной стабилизирующий вклад вносят ди- и трипептидные взаимодействия. Всего 1,1 ккал/моль проигрывает конформация с полусвернутой формой основной цепи RPR. Таким образом, проведенный расчет не обнаружил резкой энергетической дифференциации по шейпам и формам основной цепи. В энергетический интервал 0-3 ккал/моль попадают 12 конформаций, принадлежащих всем возможным шейпам. Лучшей конформацией с полностью развернутой основной цепью является RLR, а у другой полусвернутой формы основной цепи fe самой низкоэнергетической является конформация BLR. Расчет выявил 20 низкоэнергетических конформаций для трипептида Pro-Gly-Pro.

Найденные низкоэнергетические конформации двух трипептидных молекул послужили основой для определения начальных приближений всей пентапептидной молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro. Молекула содержала 77 атомов и 22 переменных двугранных угла основной и боковых цепей аминокислот, входящих в эту молекулу. Боковые цепи треонина и лизина лабильны, причем боковая цепь лизина объемна и несет положительный заряд. Пролин имеет жесткую боковую цепь, а глицин в качестве боковой цепи имеет только один атом водорода. Специфика боковых цепей всех аминокислот пентапептидной молекулы определила количество начальных приближений. Всего было рассчитано 144 формы основной цепи, принадлежащих 128 возможным шейпам. Было составлено свыше 250 начальных приближений. Все они были проминимизированы по энергии, оценены их геометрические и энергетические параметры. Низкоэнергетические конформации молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro представлены в таблице 1.

Расчет выявил, что для молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro в энергетический интервал 0-5 ккал/моль попадают конформации полусвернутых шейпов. Для пентапептида самыми низкоэнергетическими оказались конформации с формой основной цепи BBBLB, BBBLR, RBBRR, RBBLR, RBRPR и RBRRR. Для низкоэнергетических конформаций пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro в таблице 1 приведены энергетические вклады невалентных ($E_{\text{нв}}$), электростатических ($E_{\text{эл}}$), торсионных ($E_{\text{торс}}$) взаимодействий, а также общая и относительная энергия молекулы.

Самой низкоэнергетической конформацией оказалась форма основной цепи $R_{122} B_{21222} RPR$ (шейп feef), которая имеет полусвернутый ход основной цепи. В глобальной конформации RBRPR ($E_{\text{отн}} = 0$ ккал/моль) энергия невалентных взаимодействий составляет -16,6 ккал/моль, электростатических 0,3 ккал/моль и торсионных 2,3 ккал/моль. При этом основной стабилизирующий вклад вносят ди-, три-, тетра- и пентапептидные взаимодействия аминокислотных остатков.

Таблица 1. Энергетические параметры низкоэнергетических конформаций пентапептидной глипролиновой молекулы

№	Конформация (шейп)	$E_{\text{нв}}$	$E_{\text{эл}}$	$E_{\text{торс}}$	$E_{\text{общ}}$	$E_{\text{отн}}$
Молекула Thr-Lys-Pro-Gly-Pro						
1	B ₂₂₂ B ₂₃₂₂₂ BLB (eefe)	-13,4	-1,0	2,7	-11,6	2,4
2	B ₂₂₂ B ₂₃₂₂₂ BLR (eefe)	-13,8	-1,4	2,5	-12,5	1,5
3	R ₁₂₂ B ₂₁₂₂₂ BRR (feef)	-13,6	-0,5	2,6	-11,5	2,5
4	R ₁₂₂ B ₃₂₂₂₂ BLR (feff)	-15,0	-1,3	2,8	-13,5	0,5
5	R ₁₂₂ B ₂₁₂₂₂ RPR (feef)	-16,6	0,3	2,3	-14,0	0,0
6	R ₁₂₂ B ₃₂₂₂₂ RRR (feff)	-16,2	1,9	1,7	-12,5	1,5
7	R ₁₂₂ B ₃₂₂₂₂ BLB (feff)	-11,4	-0,2	2,4	-9,2	4,8

Всего 0,5 ккал/моль проигрывает другая конформация с полусвернутой формой основной цепи R₁₂₂ B₃₂₂₂₂ BLR (шейпа feff). Формы с полностью развернутой основной цепью уступают по энергии от 5 до 9 ккал/моль. Таким образом, расчет обнаружил резкую энергетическую дифференциацию конформаций по шейпам и формам основной цепи. В энергетический интервал 0-5 ккал/моль попадают 26 конформаций, принадлежащих 8 возможным шейпам. Геометрические параметры (в градусах) четырех низкоэнергетических конформаций пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro представлены в таблице 2.

Полученные результаты могут быть использованы для изучения пространственного строения гексапептидных молекул глипролинов, а также исследования конформационных возможностей боковых цепей при взаимодействии с молекулами рецепторов. Можно сравнить результаты расчета глипролиновой пентапептидной молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro с данными пространственной структуры молекулы селанк, аминокислотная последовательность которой представляет собой гептапептидную молекулу Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro [6].

Селанк является синтезированным гептапептидом на основе модификации структуры молекулы тафцина. Эта молекула имеет структуру, в которой к тетрапептиду Thr-Lys-Pro-Arg дополнен трипептидный участок Pro-Gly-Pro. Считается, что именно этот трипептид защищает гептапептидную молекулу от быстрого распада под действием протеолитических ферментов. Известно, что именно пространственная структура определяет функциональные свойства пептидных молекул.

Молекула гептапептида включала в себя 115 атомов и 31 переменный двугранный угол основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в нее. Расчет пространственной структуры гептапептидной молекулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro выполнялся в два этапа. Сначала определялись конформационные возможности тетрапептида Thr-Lys-Pro-Arg и трипептида Pro-Gly-Pro. Низкоэнергетические конформации рассчитанных участков были использованы для нахождения пространственной структуры всей молекулы селанк. Было составлено свыше 400 вариантов, которые были проминимизированы по энергии. Расчет обнаружил наличие резкой энергетической дифференциации пространственных структур гептапептидной молекулы Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro.

Проведенный расчет обнаружил, что для молекулы селанк самыми низкоэнергетическими оказались конформации с формами основной цепи RBRRBLR, RBRBBLR, RBRBBPR и BBRRBLR. Глобальной конформацией гептапептидной молекулы является RBRRBLR. Данная конформация является компактной структурой, поэтому между аминокислотными остатками молекулы возникают сильные взаимодействия. Низкая энергия этой конформации обусловлена наличием всех возможных для гептапептидной молекулы взаимодействий. В энергетический интервал 0-7 ккал/моль попадают конформации четырех форм основной цепи. Проведенный расчет пространственной структуры пептидной молекулы селанк позволил определить геометрические и энергетические параметры пептида, значения двугранных углов основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, а также энергетические вклады внутримолекулярных взаимодействий.

Таблица 2. Геометрические параметры (град.) низкоэнергетических конформаций пентапептидной молекулы Thr-Lys-Pro-Gly-Pro

	Углы	RBRPR	RBBLR	RBRRR	BBBLB
Thr1	φ_1	-84	-83	-81	-138
	χ^1_1	57	57	57	-178
	χ^1_2	-179	-179	180	177
	χ^1_3	175	176	176	175
	ψ_1	-64	-61	-60	161
	ω_1	175	176	176	178
Lys2	φ_2	-123	-121	-130	-124
	χ^2_1	177	-158	-61	-157
	χ^2_2	58	-58	-178	-57
	χ^2_3	172	179	180	178
	χ^1_4	170	-178	180	-169
	χ^1_5	179	176	180	-179
	ψ_2	92	100	74	95
	ω_2	177	176	177	178
Pro3	φ_3	-60	-60	-60	-60
	ψ_3	-46	107	-51	126
	ω_3	-176	183	181	-176
Gly4	φ_4	141	74	-74	61
	ψ_4	-70	73	-73	67
	ω_4	168	-178	-172	-178
Pro5	φ_5	-60	-60	-60	-60
	ψ_5	-51	-54	-44	131
	ω_5	179	179	-177	180
Энергия $E_{\text{отн}}$ (ккал/моль)		0,0	0,5	1,5	2,4

Расположение аминокислот в трех низкоэнергетических конформациях пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro представлено на рисунках 1-3. Из приведенных рисунков можно увидеть сближенность участков основной цепи и боковых цепей аминокислот, входящих в данную молекулу. Полученные результаты могут быть использованы для изучения пространственного строения аналогов пента- и гексапептидных молекул глипролинов, а также исследования конформационных возможностей боковых цепей Thr и Lys при взаимодействии с молекулами рецепторов.

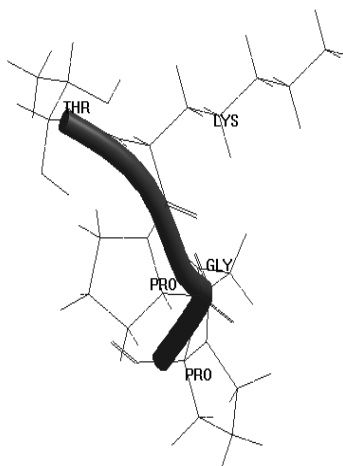


Рисунок 1. Низкоэнергетическая пространственная структура R₁₂₂ B₂₁₂₂₂RPR пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro

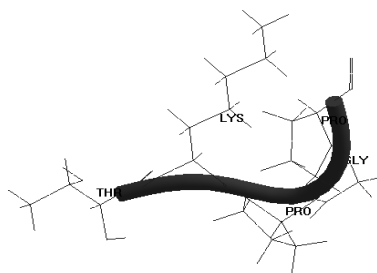


Рисунок 2. Низкоэнергетическая пространственная структура R₁₂₂ B₃₂₂₂₂ BLR пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro

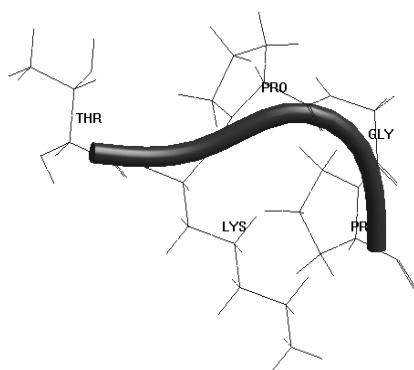


Рисунок 3. Низкоэнергетическая пространственная структура B₂₂₂ B₃₂₂₂₂ BLB пентапептида Thr-Lys-Pro-Gly-Pro

Список литературы / References:

1. Мартынова К.В., Андреева Л.А., Климова П.А. и др. Структурно-функциональные исследования глицин и пролин содержащих пептидов, являющихся нейропротекторами. *Биоорг. хим.*, 2009, т. 35, № 2, с. 165-171. [Martynova K.V., Andreeva L.A., Klimova P.A. et al. Structure-functional investigation of the glysin and prolin containing peptides, which are neyroprotectors, *Bioorg. chim.*, 2009, vol. 35, no. 2, pp. 165-171. (In Russ.)]
2. Falalyeyeva T.M., Samonina G.E., Beregovaya T.V. [et. al] Effects of glyprolines PGP, PG and GP on homeostasis of gastric mucosa in rats with experimental ethanol-induced gastric ulcers. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2010, vol. 149, no. 6, pp. 699-701.
3. Попов Е.М. *Белки и пептиды*. М.: Наука, 1995, 442 с. [Popov E.M. *Proteins and peptides*. Moscow: Science, 1995, 442 p.]
4. IUPAC-IUB *Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988. vol. 39.
5. Максумов И.С., Исмаилова Л.И., Годжаев Н.М. Программа полуэмпирического расчета конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ. *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, № 4, с. 147-148. [Maksumov I.S., Ismailova L.I., Godjayev N.M. Program of the semi-empirical calculation of the conformations of the molecular complexes on the IBM. *Journal of structural chemistry*, 1983, vol. 24, no. 4, pp. 147-148]
6. Ismailova L.I., Abbasli R.M., Akhmedov N.A. Use of Informational Technologies in Study of the spatial structure of glyprolines. *AICT 2012, VI International Conference Application of Information and Communication Technologies*, Tbilisi, Georgia, 2012, pp. 389-392.

STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE GLYPROLINE PENTAPEPTIDE MOLECULE

Ismailova L.I., Abbasli R.M, Akhmedov N.A.

Baku State University, Institute for Physical Problems

Z. Khalilov Str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: lara.ismailova.52@mail.ru

Abstract. Regulatory peptides include a family of glyprolines, short peptides whose amino acid sequences contain glycine and proline residues. At present, the mechanisms of action of glyprolines and their targets are poorly understood. An important task is also the creation of synthetic analogues of glyprolines, the molecules of which are distinguished by high stability and efficiency. It seems relevant to carry out structural and functional studies of glyprolines and their synthetic analogues on model systems using theoretical research methods. Using the method of molecular mechanics, the spatial structure and conformational properties of the glyproline pentapeptide molecule Thr-Lys-Pro-Gly-Pro were determined. The potential energy of the molecule was estimated as the sum of non-valent, electrostatic, torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. 7 low-energy conformations were found for glyproline pentapeptide, the values of structure the dihedral angles of the main and side chains, and the energy of intra- and inter-residue interactions was estimated. It is revealed that low energy conformations of this molecule have the half-folded type of backbone. The side chains of the Thr and Lys amino acids in low-energy conformations carry out effective interactions and are conformationally labile amino acids, they bring together the regions of the main chain and the side chains of the amino acids included in the pentapeptide.

Key words: *pentapeptide, conformation, molecule, spatial structure.*

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ АСТН-(4-10)-PGP Агаева Л.Н., Абдинова А.А., Ахмедова С.Р., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А.

Бакинский государственный университет
Азербайджанский государственный педагогический университет
Азербайджанский технический университет
ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: Namiq.49@bk.ru
Принята в редакцию: 11.07.2019

Аннотация. В качестве пептидов, которые по своей ноотропной и нейропротективной активности не уступали бы семаксу, испытывали различные фрагменты АСТН: АСТН-(7-10)-PGP, АСТН-(4-10)-PGP, АСТН-(6-10)-PGP, АСТН-(5-7)-PGP. Эксперименты на животных показали, что особенно успешным с точки зрения биологических свойств оказался АСТН-(6-9)-PGP. Этот пептид не только проявлял ноотропную и анксиолитическую активности, но также увеличивал жизнеспособность культивируемых клеток глии, полученных из коры больших полушарий мозга крыс с ишемическим повреждением мозга. При исследовании влияния АСТН-(4-10)-PGP на размер некротического очага у крыс оказалось, что данный пептид, как и семакс, уменьшает размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс приблизительно на 50%. Все эти препараты планируется использовать в качестве лекарственных средств. При разных способах введения исходных пептидов образуется разный набор продуктов гидролиза, при этом известно, что образующиеся более короткие пептиды часто имеют собственную биологическую активность. Для нахождения пространственного строения этой пептидной молекулы использовался метод теоретического конформационного анализа, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру биомолекул исходя из известной аминокислотной последовательности. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности данной молекулы изучены в условиях водного окружения, в связи с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе. Пространственная структура молекулы АСТН-(4-10)-PGP (Met4-Glu5-His6-Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro) исследована фрагментарно. На первом этапе изучены конформационные возможности N-концевого трипептидного фрагмента Met4-Glu5-His6 и C-концевого гептапептидного фрагмента Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro. Расчет показал, что возникает сильная энергетическая дифференциация между формами основной цепи. В широкий энергетический интервал 0-15 ккал/моль попадают конформации 11 форм основной цепи. Показано, что пространственная структура гептапептидной молекулы может быть представлена одиннадцатью низкоэнергетическими формами основной цепи. Найдены низкоэнергетические конформации молекулы, значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, оценена энергия внутри- и межостаточных взаимодействий.

Ключевые слова: АСТН-(4-10)-PGP, теоретический конформационный анализ, пространственная структура, конформация.

В качестве пептидов, которые по своей ноотропной и нейропротективной активности не уступали бы семаксу, испытывали различные фрагменты АСТН: АСТН-(7-10)-PGP, АСТН-(4-10)-PGP, АСТН-(6-10)-PGP, АСТН-(5-7)-PGP. Эксперименты на животных показали, что особенно успешным с точки зрения биологических свойств оказался АСТН-(6-9)-PGP. Этот пептид не только проявлял ноотропную и анксиолитическую активности, но также увеличивал жизнеспособность культивируемых клеток глии, полученных из коры больших полушарий мозга крыс с ишемическим повреждением мозга. При исследовании влияния АСТН-(4-10)-PGP на размер некротического очага у крыс оказалось, что данный пептид, как и семакс, уменьшает размер некроза при развитии ишемического инсульта у крыс приблизительно на 50%. Все эти препараты планируется использовать в качестве лекарственных средств. При разных способах введения исходных пептидов образуется разный набор продуктов гидролиза, при этом известно, что образующиеся более короткие пептиды часто имеют собственную биологическую активность [1].

Для нахождения пространственного строения пептидной молекулы использовался метод теоретического конформационного анализа, позволяющий рассчитывать трехмерную структуру биомолекул исходя из известной аминокислотной последовательности. Расчет выполнялся в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монопольном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности данной молекулы изучены в условиях водного окружения, в связи, с

чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей оценивалась с помощью потенциала Морзе.

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R,B,L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа X_{ij} , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты $\varphi - \psi$: $R(\varphi, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$, $B(\varphi = -180^\circ - 0^\circ, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$, $L(\varphi, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$ и $P(\varphi = 0^\circ - 180^\circ, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$; $ij \dots = 11 \dots, 12 \dots, 13 \dots, 21 \dots$ определяет положение боковой цепи ($\chi_1, \chi_2 \dots$), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120° , 2 – от 120° до -120° , и 3 – от -120° до 0° . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [2].

Пространственная структура молекулы АСТН-(4-10)-PGP (Met4-Glu5-His6-Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro) исследована фрагментарно и является продолжением наших исследований в этой области. [2-3]. На первом этапе изучены конформационные возможности N-концевого трипептидного фрагмента Met4-Glu5-His6 и C-концевого гептапептидного фрагмента Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro.

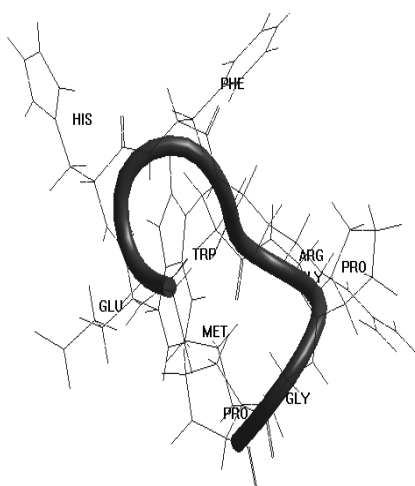
Конформационный анализ трипептидного фрагмента Met4-Glu5-His6 проведен на основе низкоэнергетических конформаций метиламида N-ацетил-L-метионина, метиламида N-ацетил-L-глутаминовой кислоты и метиламида N-ацетил-L-гистидина. Из рассмотренных свыше 200 структурных вариантов трипептидной молекулы, некоторые оказались стерически запрещенными, относительная энергия остальных распределилась от 0 до 10 ккал/моль. Результаты расчета показывают, что происходит энергетическая дифференциация по конформациям и по формам основной цепи. В энергетический интервал 0-4 ккал/моль попадают конформации четырех форм основной цепи. Конформации этих четырех форм основной цепи были выбраны как начальные варианты для расчета пространственной структуры всей молекулы АСТН (4-10). Трехмерная структура C-концевого гептапептидного фрагмента Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro тоже рассчитана фрагментарно. Как отмечено выше фрагмент АСТН (7-10)-PGP также является отдельной функционирующей молекулой, для которой нами были исследована ее пространственная структура [3]. Показано, что этот фрагмент имеет восемь низкоэнергетических форм основной цепи, относительная энергия которых изменяется в энергетическом интервале 0-10 ккал/моль. Эти конформации, вклады невалентных, электростатических и торсионных энергий, их общая и относительная энергии приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы 2, N-концевой тетрапептидный фрагмент молекулы представлен четырьмя шейпами: fff – шейп 4, eee – 3, fee – 3, eff шейп – одной конформацией. C-концевой гептапептидный фрагмент представлен 5 шейпами пептидного скелета. Центральная часть молекулы Phe4-Gly7 является конформационно лабильной, представлена 5 шейпами пептидного скелета. C-концевой трипептидный фрагмент Pro-Gly-Pro является конформационно жестким и представлен только свернутым шейпом ff. На основе четырех форм основной цепи N-концевого трипептидного фрагмента и восьми форм C-концевого гептапептидного фрагмента формировались начальные конформации декапептидной молекулы АСТН-(4-10)-PGP. Были рассчитаны несколько сот конформаций, часть из них оказались стерически невозможными, относительная энергия остальных конформаций изменялась в энергетическом интервале 0-30 ккал/моль. Расчет показал, что возникает сильная энергетическая дифференциация между формами основной цепи. В широкий энергетический интервал 0-15 ккал/моль попадают конформации 11 форм основной цепи. Невалентные взаимодействия конформаций, представленные в таблице 2, изменяются в широком энергетическом интервале $(-52,1) - (-36,2)$ ккал/моль, электростатические взаимодействия 0,9-5,9 ккал/моль, торсионные взаимодействия 4,3-6,6 ккал/моль.

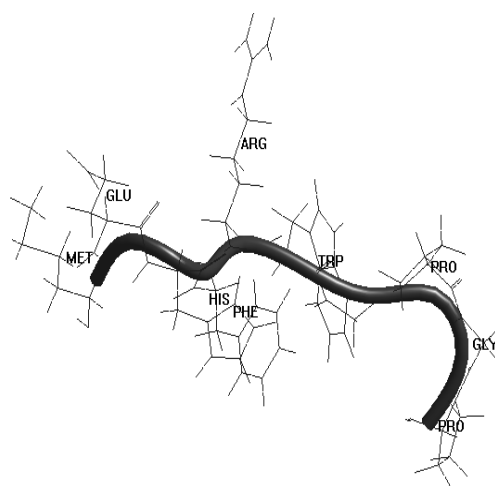
В таблице 3 показана энергия внутри- и межостаточных взаимодействий в низкоэнергетических конформациях, а численные значения геометрических параметров этих конформаций приведены в таблице 4. Расположение атомов в низкоэнергетических конформациях показано на рисунке 1 (а, б, в).

Таблица 1. Энергетические вклады невалентных ($U_{\text{нев}}$) электростатических ($U_{\text{эл}}$), торсионных ($U_{\text{тор}}$) взаимодействий, общая ($U_{\text{общ}}$) и относительная ($U_{\text{отн}}$) энергии оптимальных конформаций молекулы АСТН-(7-10)-PGP

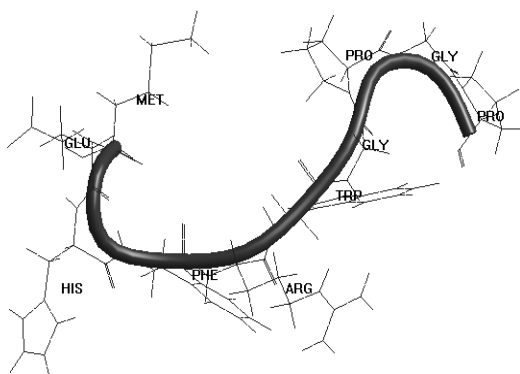
№	Шейп	Конформация	Энергия				
			$U_{\text{нев}}$	$U_{\text{эл}}$	$U_{\text{тор}}$	$U_{\text{общ}}$	$U_{\text{отн}}$
1	feffff	$R_2B_{3322}R_{33}RBPR$	-23,1	1,0	3,2	-18,9	0
2	efeeff	$B_1R_{3122}B_{23}BRRR$	-23,1	0,7	3,6	-18,8	0,1
3	feeeff	$R_2B_{2122}B_{13}BBPR$	-21,0	0,4	3,5	-17,1	1,8
4	ffeeff	$R_2R_{3322}B_{11}BBPR$	-20,3	0,5	3,1	-16,8	2,1
5	eeeeff	$B_2B_{2122}B_{11}BBPR$	-20,7	0,4	4,1	-16,3	2,6
6	ffffee	$R_2R_{3322}R_{21}RBPR$	-19,3	0,5	2,8	-16,0	2,9
7	efffff	$B_1R_{3122}R_{33}RBPR$	-21,4	0,4	5,4	-15,5	3,3
8	eeffef	$B_2B_{2322}R_{11}RRPR$	-17,3	0,1	5,5	-11,6	7,3



1.a)



1.b)



1.c)

Рисунок 1. Низкоэнергетические конформации молекулы АСТН-(4-10)-PGP (a, b, c)

Таблица 2. Энергетические вклады невалентных ($U_{нев}$), электростатических ($U_{эл}$), торсионных ($U_{тор}$) взаимодействий, общая ($U_{общ}$) и относительная ($U_{отн}$) энергии оптимальных конформаций молекулы АСТН-(4-10)-PGP

№	Шейп	Конформации	$U_{нев}$	$U_{эл}$	$U_{тор}$	$U_{общ}$	$U_{отн}$
1	ffffeffff	R ₂₁₂₂ R ₁₂ R ₃₁ R ₂ B ₃₃₂₂ R ₃₃ RBPR	-52,1	5,2	6,6	-40,4	0
2	eeefeffff	B ₂₁₂₂ B ₃₃ B ₃₁ R ₂ B ₃₃₂₂ R ₃₃ RBPR	-43,5	5,9	4,8	-328	7,6
3	fffeffeff	R ₂₁₂₂ R ₁₂ R ₃₁ B ₁ R ₃₁₂₂ B ₂₃ BRRR	-43,6	0,9	6,4	-36,3	4,1
4	eeefeffff	B ₂₁₂₂ B ₃₃ B ₃₁ B ₁ R ₃₁₂₂ B ₂₃ BRRR	-40,0	2,6	4,4	-32,9	7,5
5	feefeffff	R ₂₁₂₂ B ₁₂ B ₁₁ B ₁ R ₃₁₂₂ B ₂₃ BRRR	-39,7	2,4	5,1	-32,3	8,1
6	efffeffff	B ₁₂₂₂ R ₁₂ R ₃₁ B ₁ R ₃₁₂₂ B ₂₃ BRRR	-38,0	4,9	6,6	-26,5	13,9
7	ffffeffff	R ₂₁₂₂ R ₁₂ R ₃₁ R ₂ B ₂₁₂₂ B ₁₃ BBPR	-45,3	4,4	6,2	-34,7	5,7
8	eeeeeffff	B ₂₁₂₂ B ₃₃ B ₃₁ R ₂ B ₂₁₂₂ B ₁₃ BBPR	-37,8	5,4	4,4	-28,0	12,4
9	feeeeffff	R ₂₁₂₂ B ₁₂ B ₁₁ R ₂ B ₂₁₂₂ B ₁₃ BBPR	-36,2	4,3	5,1	-29,9	13,5
10	feeffeffff	R ₂₁₂₂ B ₁₂ B ₁₁ R ₂ R ₃₃₂₂ B ₁₁ BBPR	-39,2	4,2	4,3	-30,8	9,6
11	fffeeffff	R ₂₁₂₂ R ₁₂ R ₃₁ B ₂ B ₂₁₂₂ B ₁₁ BBPR	-40,0	4,6	5,2	-29,8	10,6

Таблица 3. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в конформациях молекулы АСТН (4-10)-PGP: R₂₁₂₂R₁₂R₃₁R₂B₃₃₂₂R₃₃RBPR ($U_{отн.}=0$ ккал/моль, первая строка), R₂₁₂₂R₁₂R₃₁B₁R₃₁₂₂B₂₃BRRR ($U_{отн.}=-4.1$ ккал/моль), R₂₁₂₂R₁₂R₃₁R₂B₂₁₂₂B₁₃BBPR ($U_{отн.}=5.7$ ккал/моль)

Met4	Glu5	His6	Phe7	Arg8	Trp9	Gly10	Pro11	Gly12	Pro13	
0,8	-3,3	-3.5	-3.3	-3.1	-0.2	0	-0.7	-0.6	-0.2	Met4
0,6	-3,3	-3.4	-2.9	0.9	0	0	0	0	-0.1	
0,6	-3,3	-3.5	-3.4	-3.3	-0.1	0	0	0	-0.1	
	3,8	-1.9	-0.9	-4.0	-1.9	0.1	0.2	-0.1	0.2	Glu5
	3,8	-2.3	-0.5	-6.9	0.2	0	0	0	0.2	
	3,8	-1.8	-0.9	-4.1	-0.9	0.1	0	0	0.4	
		0,3	-1.1	-1.1	-2.6	0	0	0	0	His6
		0,2	-1.3	-3.8	0	0	0	0	0	
		0,3	-1.1	-1.1	-1.1	0	0	0	0	
			-0,2	-4.9	-1.6	0	-0.1	0	0	Phe7
			-0,2	-3.5	-2.8	-1.1	-0.2	0	-0.1	
			-0,3	-4.7	-2.0	0	0	0	0	
				0,1	-1.1	-0.3	-3.3	-0.3	-0.4	Arg8
				0,2	-1.7	-0.2	0	0	-0.2	
				0,1	-2.2	-0.2	0	0	-0.2	
					-0,6	-0.3	-1.6	-0.2	-0.8	Trp9
					-0,5	-2.7	-3.1	-0.4	-1.3	
					-0,8	-1.2	-2.9	-0.2	-0.6	
						1,4	-3.2	-0.7	-2.3	Gly10
						1,2	-0.4	-0.8	-1.9	
						1,2	-0.7	-0.7	-2.9	
							0,2	1.0	-1.4	Pro11
							0,3	-0.6	-1.2	
							0,3	1.1	-1.4	
								1,3	-4.0	Gly12
								1,3	-3.2	
								1,3	-4.1	
									-0,5	Pro13
									-0,6	
									-0,5	

Глобальной конформацией молекулы АСТН-(4-10)-PGP является $R_{2122}R_{12}R_{13}R_2B_{3322}R_{33}RBPR$ шейпа ffffeffff. В этой конформации вклад невалентных взаимодействий составляет -52,1 ккал/моль, торсионных взаимодействий 6,6 ккал/моль (табл. 2). Она, благодаря невалентным взаимодействиям, стала глобальной. N-концевой тетрапептидный фрагмент Met4-Glu5-His6-Phe7 и C-концевой пентапептидный фрагмент Trp9-Gly10-Pro11-Gly12-Pro13 свернуты в виде спирали, их друг от друга отделяет Arg8, который находится в В форме основной цепи. Боковая цепь Arg8 направлена к N-концу молекулы и эффективно взаимодействует с предыдущими остатками, вклад которых составляет -13,1 ккал/моль, а с остальными остатками взаимодействия составляют -5,4 ккал/моль (табл. 3, рис. 1 а). В глобальной конформации N-концевой участок молекулы образует две водородные связи между атомами основной цепи первого и пятого остатков и второго и пятого остатков.

Второй низкоэнергетической конформацией молекулы АСТН-(4-10) PGP является $R_{2122}R_{12}R_{31}R_{31}B_{13}B_{3122}B_{23}BRRR$ шейпа ffffeeff с относительной энергией 4,1 ккал/моль. В этой конформации вклад невалентных взаимодействий составляет -43,6 ккал/моль, электростатических взаимодействий - (0,9) ккал/моль, торсионных взаимодействий - 6,4 ккал/моль (табл. 2). Она, благодаря электростатическим взаимодействиям стала низкоэнергетической, электростатическое отталкивание наименьшее. При изменении среды относительная энергия этой конформации может резко измениться. В этой конформации боковая цепь Arg8 повернута к N-концу и взаимодействия Arg8 с предыдущими остатками составляет -14,2 ккал/моль. Образуется водородная связь между атомами основной цепи первого и пятого аминокислотных остатков.

Расположение атомов N-концевого тетрапептидного фрагмента и C-концевого трипептидного фрагмента в пространстве почти такие же, как и в глобальной конформации. Они отличаются конформацией центральной части молекулы Arg8-Trp9-Gly10 (табл. 2, рис. 1 б).

Третьей низкоэнергетической конформацией исследуемой молекулы является $R_{2122}R_{12}R_{31}R_2B_{2122}B_{13}BPR$ шейпа ffffeeff, относительная энергия которой равна 5,7 ккал/моль. Эта конформация от глобальной отличается конформацией Trp9-Gly10. В глобальной конформации они образуют свернутую форму основной цепи, а здесь – развернутую форму. Поэтому, взаимодействия между аминокислотными остатками N-концевой части молекулы остаются почти такими же, как и в глобальной конформации (табл. 2, рис. 1 с).

Таким образом, пространственную структуру молекулы АСТН (4-10)-PGP можно представить тремя структурными типами и можно предположить, что молекула свои физиологические функции осуществляет в этих структурах. На основе этих структур можно придумать её синтетические аналоги.

Теоретический конформационный анализ декапептидной молекулы АСТН-(4-10)-PGP привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

Таблица 4. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы АСТН (4-10) –PGP

Остаток	Конформации								
	fffeffff			fffeefff			fffeefff		
Met1	-63	-51	178	-64	-45	176	-64	-49	177
	178	58	180	-178	59	-178	-178	59	179
		179			180			179	
Glu2	-62	-36	-173	-65	-38	-170	-63	-37	-174
	68	-176	90	68	-176	90	68	177	90
His3	-70	-39	-176	-73	-46	-176	-69	-38	-174
	-58	92		-58	92		-58	91	
Phe4	-91	-50	177	-107	139	178	-92	150	178
	-164	83		-178	89		-168	85	
Arg5	-102	116	-177	-113	-63	-176	-102	113	179
	-54	-63	-174	-75	79	172	-57	-63	-172
		179			-177			-188	
Trp6	-99	-56	174	-156	149	-179	-158	150	178
	-60	94		180	74		48	-86	
Gly7	-65	-67	176	-85	122	-176	-90	122	178
Pro8	-60	122	180	-60	-53	179	-60	115	-179
Gly9	133	-79	167	-83	-79	-176	127	-76	169
Pro10	-60	-51	179	-60	-56	-178	-60	-51	179
U _{отн.}	0			4,1			5,7		

Список литературы / References:

1. Шевченко К.В., Дулов С.А., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Радилов А.С., Мясоедов Н.Ф. Устойчивость His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro к действию лейцинаминопептидазы, карбоксиеотеидазы Y и ферментным системам назальной слизи, крови и плазмы крови крыс. *Биоорганическая химия*, 2016, т. 42, № 2, с. 171-181. [Shevchenko K.V., Dulov S., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Myasoedov N.F. Stability of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro to Leucine Aminopeptidase, Carboxypeptidase Y, Nasal Slime, Blood and Plasma of Rats. *Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, vol. 42, no. 2, pp. 171-181. (In Russ.)]
2. Akhmedov N.A., Tagiyev Z.H., Hasanov E.M., Akverdieva G.A. Theoretical conformational analysis of the bovine adrenal medulla 12 residue peptide molecule. *J. Molecular Structure*, 2003, vol. 646, pp. 75-80.
3. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Gocayev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Peptid and Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
4. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590 (In Russ.)]
5. Akverdieva G.A., Akhmedov N.A., Godjaev N.M. Insights into bioactive conformation of melanotropins. *AJP, Fizika*, 2017, vol. 22, no. 4, Section: En, pp. 6-12.
6. Hasanov E.M., Akhmedov N.A. Spatial Structure of Peptide BAM-20P. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 2018, vol.3, iss. 3, pp. 72-76.
7. IUPAC-IUB, Quantibity, Units and Sybbols in Physical Chemistry. *Blackwell Scientific Publications*, 1988, vol. 39.

SPATIAL STRUCTURE OF ACTH-(4-10)-PGP MOLECULE

Agayeva L.N., Abidinova A.A., Akhmedova S.R., Akhmedov N.F., Akhmedov N.A.

Baku State University

Azerbaijan State Pedagogical University

Azerbaijan Technical University

Z. Khalilov st., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan, e-mail: Namiq.49@bk.ru

Abstract. As peptides, which by their nootropic and neuroprotective activity would not be inferior to Semax, different fragments of ACTH were tested: ACTH-(7-10)-PGP, ACTH-(4-10)-PGP, ACTH-(6-10)-PGP, ACTH-(5-7)-PGP. The animal experiments have shown that ACTH-(6-9)-PGP has proven to be particularly successful in terms of biological properties. This peptide not only showed nootropic and anxiolytic activity, but also increased the viability of cultured glial cells obtained from the cerebral cortex of rats with ischemic brain damage. When studying the effect of ACTH-(4-10)-PGP on the size of the necrotic focus in rats, it turned out that this peptide, like Semax, reduces the size of necrosis during the development of ischemic stroke in rats by approximately 50%. All these drugs are planned to be used as medicines. With different ways of introducing the original peptides, a different set of hydrolysis products is formed, while it is known that the resulting shorter peptides often have their own biological activity. To find the spatial structure of this peptide molecule, we used the theoretical conformational analysis method, which allows us to calculate the three-dimensional structure of biomolecules based on the known amino acid sequence. The calculation was carried out within the framework of the mechanical model of molecules, taking into account the non-valent, electrostatic, torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. The non-valent interactions were assessed by Lennard-Jones potential. Electrostatic interactions were calculated in a monopole approximation according to the Coulomb law using partial charges on atoms. The conformational capabilities of this molecule are studied under the conditions of the water environment, in connection with which the value of the dielectric constant is assumed to be 10. The energy of hydrogen bonds was estimated using Morse potential. The spatial structure of the ACTH-(4-10)-PGP molecule (Met4-Glu5-His6-Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro) has been studied fragmentarily. At the first stage, the conformational capabilities of the N-terminal tripeptide fragment Met4-Glu5-His6 and the C-terminal heptapeptide fragment Phe7-Arg8-Trp9-Gly10-Pro-Gly-Pro were studied. The calculation showed that there is a strong energy differentiation between the forms of the main chain. The conformations of 11 forms of the main chain fall into a wide energy range of 0-15 kcal/mol. It is shown that the spatial structure of the heptapeptide molecule can be represented by eleven low-energy forms of the main chain. The low-energy conformations of the molecule, the values of the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues are found, the energy of intra-and inter-residual interactions is estimated.

Key words: ACTH-(4-10)-PGP, theoretical conformational analysis, spatial structure, conformation.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ ЭКЗОРФИНА А4 и А5

Ахмедов Н.А., Агаева Л.Н., Гаджиева Ш.Н., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И.

Бакинский государственный университет, Институт физических проблем
ул. 3. Халилова, 23, г. Баку, Азербайджан; e-mail: Namiq.49@bk.ru

Поступила в редакцию: 11.07.2019

Аннотация. Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоидоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами. Методом теоретического конформационного анализа исследованы конформационные возможности молекул экзорфина А4 и А5. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Найдены низкоэнергетические конформации этих пептидов, оценены значения двугранных углов основных и боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в их состав, энергия внутри- и межостаточных взаимодействий. Показано, что пространственная структура исследованных молекул может быть представлена восемью конформациями. Полученные результаты могут быть использованы для выяснения структурной и структурно-функциональной организации молекул экзорфинов.

Ключевые слова: экзорфин, опиоид, структура, конформация.

Регуляторные пептиды, впервые обнаруженные во второй половине XX века, активно изучаются как физиологами, так и фармакологами, поскольку область биологической активности пептидов чрезвычайно широка. Они являются одним из главных звеньев, объединяющих три главные регуляторные системы организма – нервную, эндокринную и иммунную в единое целое. В настоящее время у разных видов животных и у человека охарактеризовано уже более 9000 физиологически активных пептидов. Это короткие цепочки аминокислот (2-70 остатков), выполняющие функцию сигнальных молекул. Большинство таких пептидов нельзя с уверенностью относить ни к нейромедиаторам, ни к гормонам, поскольку они синтезируются как нейронами (передавая сигнал на уровне синапса), так и клетками периферических тканей (передавая сигнал на более дальние расстояния подобно гормонам). Для регуляторных пептидов характерно воздействие сразу на многие системы организма. Опиоидные пептиды в настоящее время считаются наиболее изученной группой сигнальных веществ пептидной природы. Опиум вызывает обезболивание, успокоение и засыпание, также эйфорическое состояние и ряд вегетативных реакций. Опиоидные пептиды бывают животного и растительного происхождения. Ряд экзогенных пептидов, получаемых с пищей, обладают опиоидоподобными свойствами. Такие пептиды были названы экзорфинами [1].

Нами были исследованы структурно-функциональные организации ряда опиоидных пептидов и эта работа является продолжением наших предыдущих исследований [2-6].

Расчет молекулы выполнен с помощью метода теоретического конформационного анализа. Потенциальная функция системы выбрана в виде суммы невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Невалентные взаимодействия были оценены по потенциалу Леннарда-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополярном приближении по закону Кулона с использованием парциальных зарядов на атомах. Конформационные возможности молекулы экзорфина изучены в условиях водного окружения, в связи, с чем величина диэлектрической проницаемости принята равной 10. Энергия водородных связей, оценивалась с помощью потенциала Морзе.

При изложении результатов расчета использована классификация пептидных структур по конформациям, формам основной цепи и шейпам пептидного скелета. Конформационные состояния полностью определяются значениями двугранных углов основной и боковых цепей всех аминокислотных остатков, входящих в данную молекулу. Формы основной цепи фрагмента образуются сочетаниями форм R, B, L остатков в данной последовательности. Формы основной цепи дипептида могут быть разделены на два класса – свернутые (f) и развернутые (e) формы, которые названы шейпами. Все конформации группируются по формам основной цепи, а формы – по шейпам. Для обозначения конформационных состояний остатков использованы идентификаторы типа X_{ij} , где X определяет низкоэнергетические области конформационной карты $\varphi - \psi : R(\varphi, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$, $B(\varphi = -180^\circ - 0^\circ, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$, $L(\varphi, \psi = 0^\circ - 180^\circ)$ и $P(\varphi = 0^\circ - 180^\circ, \psi = -180^\circ - 0^\circ)$; $ij \dots = 11 \dots, 12 \dots, 13 \dots, 21 \dots$ определяет положение боковой цепи ($\chi_1, \chi_2 \dots$), причем индекс 1 соответствует значению угла в пределах от 0 до 120° , 2 – от 120° до -120° , и 3 – от -120° до 0° . Обозначения и отсчеты углов вращения соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB [7].

Таблица 1. Энергетическое распределение конформаций молекулы экзорфина А4

Шейп	Форма основной цепи	Энергетические интервалы (ккал/моль)					
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	>5
e e e	B B B B	3	-	2	2	2	-
	L B B B	1	3	1	3	1	-
f e e	R B B B	2	2	1	2	2	-
	P B B B	2	1	2	2	2	-
f f e	R R B B	-	1	2	3	1	2
	P R B B	-	1	3	3	-	2
e f e	B R B B	-	-	1	6	-	2
	L R B B	-	-	3	4	-	2

Пространственная структура молекулы экзорфина А4 (Gly1-Tyr2-Tyr3-Pro4) исследована на основе низкоэнергетических конформаций метиламида N-ацетилглицина, метиламида N-ацетил-L-тирозина и метиламида N-ацетил-L-пролина. Результаты расчета показаны в таблицах 1 и 2. В таблице 1 приведено энергетическое распределение рассчитанных конформаций молекулы экзорфина А4.

Результаты расчета молекулы экзорфина А4 показывают, что происходит энергетическая дифференциация по конформациям и по формам основной цепи. В энергетический интервал 0-1 ккал/моль попадают восемь конформаций четырех форм основной цепи (табл. 1). Геометрические параметры самой низкоэнергетической конформации каждой формы даны в таблице 2.

Глобальной конформацией молекулы экзорфина А4 является RB_2B_3B . В этой конформации вклад невалентных взаимодействий составляет -10,4 ккал/моль, электростатических взаимодействий -1,1 ккал/моль, торсионных взаимодействий 1,5 ккал/моль. В этой структуре возникают эффективные взаимодействия Tyr2 с Tyr3 и Pro4, которые вносят вклад в общую энергию соответственно -3,5 ккал/моль и -1,5 ккал/моль. Взаимодействие Tyr3 с Gly1 вносит вклад в общую энергию -3,4 ккал/моль, а с Pro4 -4,2 ккал/моль.

Во всех низкоэнергетических структурах молекулы экзорфина А4 боковые цепи Tyr2 и Tyr4 в одинаковых положениях, боковая цепь Tyr2 направлена к С-концу молекулы, а боковая цепь Tyr3 направлена к N-концу молекулы. В таких положениях они эффективно взаимодействуют друг с другом и атомами основной цепи молекулы.

Вторая низкоэнергетическая конформация молекулы экзорфина А4 является BB_2B_3B с относительной энергией 0,2 ккал/моль. Эта конформация от глобальной отличается только основной цепью Gly1.

Вклад невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий в общую энергию почти такой же, как и в глобальной конформации. Наблюдается эффективные взаимодействия Tyr2 и Tyr3 с другими аминокислотными остатками.

Их вклад такой же, как и в глобальной конформации. Относительная энергия конформации основной цепи BRBB и LRBB шейпа efe выше 2,0 ккал/моль (табл. 1).

Таблица 2. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы экзорфина А4

Остаток	Конформации			
	RB_2B_3B	BB_2B_3B	RR_2B_3B	BR_2B_3B
Gly1	-75 -120 177	-71 125 -179	-74 -73 173	-79 120 180
Tyr2	-97 140 178 177 87 0	-92 147 174 171 87 -0.3	-97 -48 -179 -171 96 0	-99 -49 -178 -177 95 0
Tyr3	-126 148 177 -58 89 0	-132 143 179 -58 85 0	-97 149 177 -58 93 0	-98 148 177 -58 92 0
Pro4	-60 131 180	-60 131 180	-60 131 180	-60 130 180
$U_{отн}$	0	0,2	1,2	2,3

Примечание: значения двугранных углов даны в последовательности $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2$.

Таблица 3. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий предпочтительных конформаций молекулы экзорфина А5

№	Шейп	Конформация	$U_{\text{нев.}}$	$U_{\text{эл.}}$	$U_{\text{торс.}}$	$U_{\text{общ.}}$	$U_{\text{отн.}}$
1	feee	PB ₂ B ₃ BB ₁	-15.3	-0.4	2.2	-13.7	0
2		RB ₂ B ₃ BB ₁	-14.6	-0.4	1.8	-13.2	0.5
3	eeee	BB ₂ B ₃ BB ₁	-14.7	-0.3	2.1	-12.9	1.0
4		LB ₂ B ₃ BB ₁	-14.6	-0.2	2.1	-12.7	1.0
5	ffee	RR ₂ B ₃ BB ₁	-12.5	-0.3	1.9	-10.8	2.9
6		PR ₂ B ₃ BB ₁	-12.4	-0.2	1.8	-10.7	3.0
7	efee	LR ₂ B ₃ BB ₁	-11.4	-0.3	1.7	-9.7	4.0
8		BR ₂ B ₃ BB ₁	-11.0	-0.1	1.8	-9.4	4.3

Трехмерная структура молекулы экзорфина А5 Gly1-Tyr2-Tyr3-Pro4-Thr5 изучена на основе низкоэнергетических конформаций молекулы экзорфина А4 и метиламида N-ацетил-L-треонина. Начальные конформации пентапептидной молекулы экзорфина А5 формировались из низкоэнергетических конформаций молекулы экзорфина А4, приведенных в таблице 1 и трех форм основной цепи Thr с учетом всех возможных положений боковой цепи. Результаты расчета показали, что возникает энергетическая дифференциация между шейпами, формами основной цепи и конформациями. В широкий энергетический интервал 0-5,0 ккал/моль попадают восемь конформаций, принадлежащих восьми формам основной цепи и четырем шейпам пептидного скелета. Относительная энергия и энергетические вклады невалентных, электростатических, торсионных взаимодействий этих конформаций молекулы экзорфина А5 показаны в таблице 3.

Каждый шейп представлен двумя формами основной цепи. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий, геометрические параметры самых низкоэнергетических конформаций каждого шейпа приведены в таблицах 4 и 5.

Пространственное расположение аминокислот в низкоэнергетических конформациях PB₂B₃BB₁, BB₂B₃BB₁, RR₂B₃BB₁, LR₂B₃BB₁ представлено на рисунке 1 (a, b, c, d).

Таблица 4. Энергия внутри- и межостаточных взаимодействий (ккал/моль) в конформациях молекулы экзорфина А5: PB₂B₃BB₁ ($U_{\text{отн.}} = 0$ ккал/моль, 1 строка), BB₂B₃BB₁ ($U_{\text{отн.}} = 0,8$ ккал/моль, 2 строка), RR₂B₃BB₁ ($U_{\text{отн.}} = 2,9$ ккал/моль, 3 строка), LR₂B₃BB₁ ($U_{\text{отн.}} = 4,0$ ккал/моль, 4 строка)

..Gly1	Tyr2	Tyr3	Pro4	Thr5	
2,2	-1,0	-3,3	-0,1	0	Gly1
2,0	-1,0	-2,0	0,1	-0,1	
2,9	-1,1	-2,5	-0,1	-0,6	
2,9	-1,2	-1,4	-0,1	-0,1	
	1,4	-4,0	1,7	-1,7	Tyr2
	1,5	-4,0	-2,3	-2,3	
	0,8	-4,7	-0,5	-0,5	
	0,9	-4,9	-0,5	-0,5	
		0,9	-3,5	-0,9	Tyr3
		0,9	-3,6	-0,9	
		1,1	-3,9	-0,9	
		1,1	-4,0	-0,9	
			0,3	-1,2	Pro4
			0,3	-1,1	
			0,3	-1,0	
			0,3	-1,1	
				-2,4	Thr5
				-2,4	
				-2,4	
				-2,4	

Таблица 5. Геометрические параметры (град.) оптимальных конформаций молекулы экзорфина A5

Остаток	Конформации			
	PB ₂ B ₃ BB ₁	BB ₂ B ₃ BB ₁	RR ₂ B ₃ BB ₁	LR ₂ B ₃ BB ₁
Gly1	76 -121 176	-70 126 -179	-73 -74 174	75 74 -179
Tyr2	-93 146 177	-91 151 173	-95 -48 180	-96 -50 -179
	173 86 -0,7	172 86 -0,3	-172 97 0	-171 98 0
Tyr3	-129 148 -176	-130 145 -177	-97 150 177	-96 149 176
	-56 88 0	-59 85 0	-58 94 0	-60 94 0
Pro4	-60 134 -175	-60 134 180	-60 133 180	-60 135 176
Thr5	-106 149 180	-107 150 180	-108 150 180	-107 150 180
	61 -178 179	60 -179 179	60 -179 180	60 -178 179
U _{отн.}	0	0.8	2.9	4.0

Примечание: значения двугранных углов даны в последовательности $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2$.

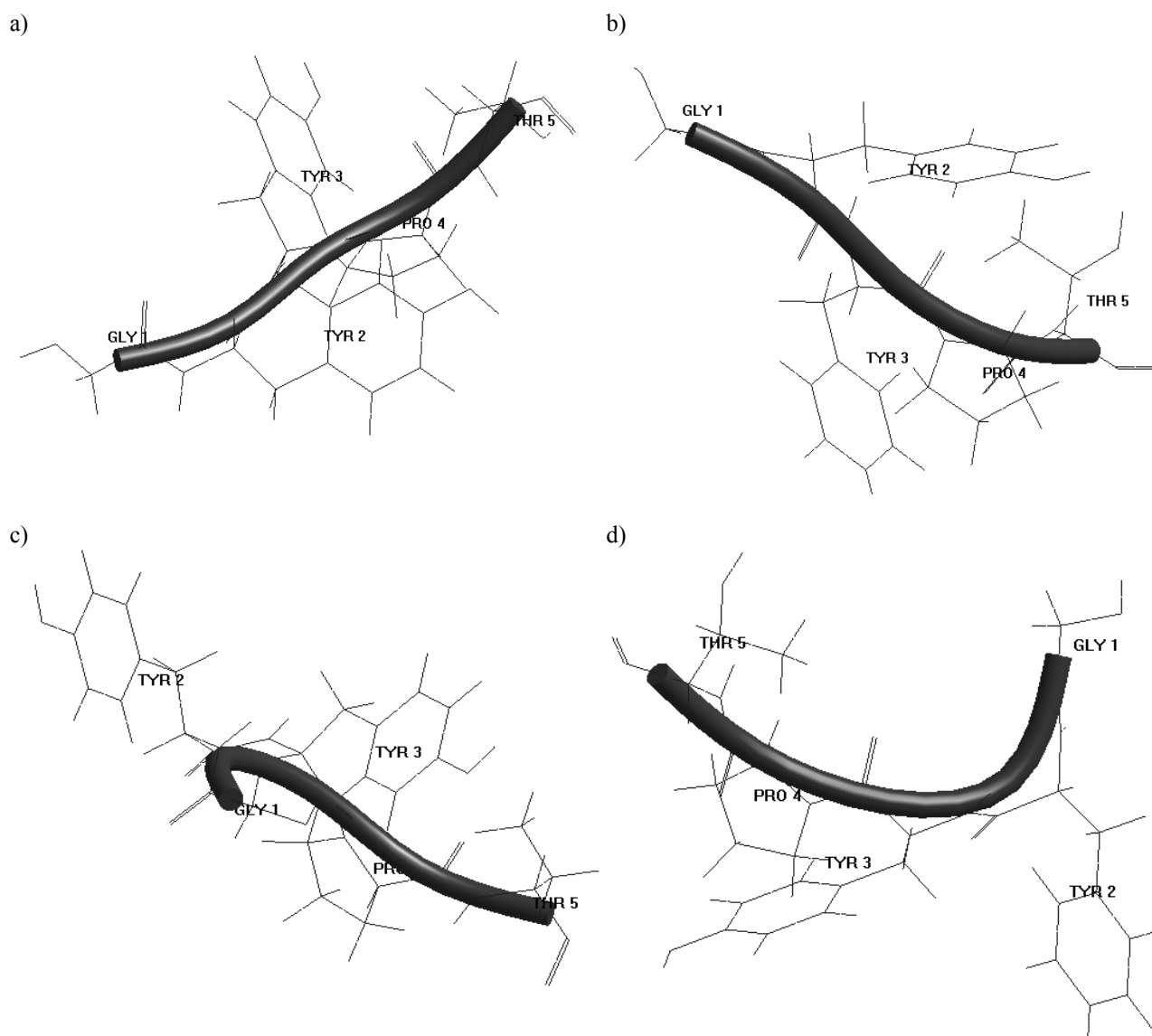


Рисунок 1. Пространственное расположение аминокислот в низкоэнергетических конформациях а) PB₂B₃BB₁, б) BB₂B₃BB₁, в) RR₂B₃BB₁, г) LR₂B₃BB₁

Список литературы / References:

1. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей и их влияние на нервную систему. *Успехи физиологических наук*, 2015, т. 46, № 1, с. 22-46. [Chesnokova E.A., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A., Kamensky A.A. Food-Derived Opioid Peptides and Their Neurological Impact. *Advances in physiological sciences*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 22-46 (In Russ.)]
2. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Gocayev N.M. The spatial structure of the cardio active peptides. *Peptid and Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
3. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М.. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590 (In Russ.)].
4. Ахмедова С.Р., Агаева Л.Н., Ахмедов Н.Ф., Ахмедов Н.А. Пространственная структура молекулы ACTH-(5-7) PG-P. *Scientific Journal "Scientific Pages"*, 2017, Брно, Чехия, с. 37-41. [Akmedova S.R., Agaeva L.N., Akhmedov N.F., Akhmedov N.A. Spatial Structure of molecule ACTH-(5-7) PG-P. *Scientific Journal "Scientific Pages"*, 2017, pp. 37-41 (In Russ.)].
5. Akverdieva G.A., N.A.Akhmedov, N.M.Godjayevev Insights into bioactive conformation of melanotropins. *AJP, Fizika*, 2017, vol. 22, no. 4, Section: En, pp. 6-12
6. Hasanov E.M., Akhmedov N.A. Spatial Structure of Peptide BAM-20P. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 2018, vol. 3, pp. 72-76, ISSN:-2456-2165.
7. IUPAC-IUB *Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988. vol. 39.

SPATIAL STRUCTURE OF EXORPHIN A4 AND A5 MOLECULES**Akhmedov N.A., Agaeva L.N., Gadjieva Sh.N., Abbasli R.M., Ismailova L.I.**

Baku State University, Institute for Physical Problems

Z. Khalilov str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan, e-mail: Namiq.49@bk.ru

Abstract. The opioid peptides are currently considered as the most studied group of peptide signaling substances. The opium causes the pain relief, sedation and falling asleep, as well as a euphoric state and a number of vegetative reactions. The opioid peptides are of animal and plant origin. A number of exogenous peptides derived from food have opioid-like properties. Such peptides were called exorphins. The conformational capabilities of exorphin A4 and A5 molecules were studied by the method of theoretical conformational analysis. The potential function of the system is chosen as the sum of non-valent, electrostatic and torsion interactions and the energy of hydrogen bonds. Low-energy conformations of these peptides are found, the values of the dihedral angles of the main and side chains of amino acid residues forming them, the energy of intra- and interactions are estimated. It is shown that the spatial structure of the investigated molecules can be represented by eight conformations. The obtained results can be used to clarify the structural and structural-functional organization of the exorphin molecules.

Key words: *exorphin, opioid, structure, conformation.*

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ

Дусаева Я.М., Водопьянов В.В.

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

Поступила в редакцию: 16.07.2019

Аннотация. В данной статье рассматривается инвазивная опухоль, обладающая большой площадью поражения ткани и малой относительной плотностью злокачественных клеток. Динамику воспалительного процесса количественно описывается, следя за изменением концентрации клеток – числа клеток в единице объема ткани. В работе предложена математическая модель роста злокачественной опухоли. В рассматриваемой модели роста опухоли учитывается 3 вида клеток: злокачественные, здоровые и белые кровяные клетки – лимфоциты. Считается что распространение злокачественных, здоровых клеток и лимфоцитов в пространстве происходит за счет диффузии. Апоптоз (смерть клетки после определенного числа делений) у злокачественных клеток отсутствует. То есть, злокачественные клетки «бессмертны». Здоровые клетки могут быть «заражены»: из-за разрастания опухолевых клеток сигнальные молекулы не поступают к здоровым клеткам, из-за чего они начинают бесконтрольно размножаться. Построенная модель была решена численно методом предиктора-корректора. Было рассмотрено несколько случаев: модель без злокачественных клеток, случай с недостаточным количеством лимфоцитов и когда иммунной системе удается победить болезнь. Модель показала хорошую сходимость с экспериментальными данными.

Ключевые слова: хемотаксис, злокачественная опухоль, иммунотерапия, математическая модель.

Классическими методами лечения рака являются химиотерапия, гормональная и таргетная терапия (вид медикаментозного лечения заболевания, при котором блокируется рост только раковых клеток, а не просто препятствует размножению всех делящихся клеток). Все вышеперечисленные методы либо напрямую убивают опухолевые клетки, либо вмешиваются в их процессы, что тоже приводит к их гибели. В противовес им ставится иммунотерапия, которая не обладает противоопухолевым эффектом, а заставляет собственные иммунные клетки организма убивать опухоль. Иммунотерапия является одной из перспективнейших методов лечения рака; её исследованиями сейчас активно занимаются ученые. В 2018 году Нобелевскую премию по медицине дали двум ученым – Джеймсу Эллисону из США и Тасуку Хондзэ из Японии за изобретение препаратов, которые заставляют иммунитет активно уничтожать опухоль.

В связи с дорогостоящими экспериментами по прогнозированию роста злокачественных опухолей, математическое моделирование весьма перспективно. На данный момент построено сотни математических моделей роста злокачественного образования, некоторые из которых сейчас используются при работе с пациентами.

Нужно отметить, что согласно негласному закону природы, все живое стремится из неблагоприятных условий в более благоприятные. Это касается не только многоклеточных организмов, но и отдельных клеток организма. Экспериментально доказано, что многие типы опухолевых клеток, особенно метастатически активные, обладают хемотаксисом. Существует целый ряд работ по математическому моделированию роста и инвазии опухоли, использующих модель Келлера-Сигела для учета хемотаксиса.

Будем рассматривать инвазивную опухоль, обладающую большой площадью поражения ткани и малой относительной плотностью злокачественных клеток. Хорошо известно, что клетки инвазивных опухолей обладают большой подвижностью, и ее распространение происходит за счет случайного или направленного блуждания клеток. Мы будем рассматривать лишь направленное движение клеток, исключая случайную составляющую. Динамику воспалительного процесса можно количественно описать, следя за изменением концентрации клеток – числа клеток в единице объема ткани. Контроль над делением и запрограммированной смертью клеток – апоптозом – осуществляется биохимическим путем – «доставкой» к клеткам определенных сигнальных молекул. В рассматриваемой модели роста опухоли учитывается 3 вида клеток: злокачественные, здоровые и белые кровяные клетки – лимфоциты. Зафиксируем следующие утверждения:

1. В начальный момент времени плотность здоровых клеток и лимфоцитов одинакова во всей области – поддерживается равновесие между рождающимися и умирающими клетками.
2. Апоптоз у злокачественных клеток отсутствует. То есть, злокачественные клетки «бессмертны». В процессе роста делящиеся клетки, выделяя токсичные вещества [2], оказывают отрицательное влияние на здоровые.
3. Здоровые клетки могут быть «заражены»: из-за разрастания опухолевых клеток сигнальные молекулы не поступают к здоровым клеткам, из-за чего они начинают бесконтрольно размножаться.
4. Будем считать, что распространение злокачественных, здоровых клеток и лимфоцитов в пространстве происходит за счет диффузии.
5. На начальном этапе роста клеток иммунная система распознает злокачественные клетки, и лимфоциты начинают их убивать.

Пусть $M(x,t)$ – плотность здоровых клеток, $C(x,t)$ – злокачественных, $Y(x,t)$ – лимфоцитов. С учетом введенных обозначений система дифференциальных уравнений, описывающая динамику трех типов клеток, имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{\partial M(x,t)}{\partial t} = M(x,t) \cdot \left[\frac{M_0 - kM(x,t)}{K_M + M(x,t)} \left(\alpha - \beta \frac{C(x,t)}{K_C + C(x,t)} \right) \right] + k_1 \frac{\partial^2 M(x,t)}{\partial x^2}, \\ \frac{\partial Y(x,t)}{\partial t} = \frac{Y_0 - \tilde{k}Y(x,t)}{Y(x,t) + K_Y} \left(\nu C(x,t) - \eta \frac{Y(x,t)}{K_Y + Y(x,t)} \right) + k_2 \frac{\partial^2 Y(x,t)}{\partial x^2}, \\ \frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = -C(x,t) \left[\mu_C \cdot \frac{C(x,t)}{C(x,t) + K_{SC}} \cdot \left(\frac{Y(x,t)}{Y(x,t) + K_{YY}} + \left(-\tilde{\alpha} - \tilde{\beta} \frac{M_0 - kM(x,t)}{K_{MM} + M(x,t)} \right) \right) \right] + k_3 \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \end{cases}$$

В первом уравнении $M(x,t) \cdot \frac{M_0 - kM(x,t)}{K_M + M(x,t)}$ – скорость «собственного» роста здоровых клеток,

$M(x,t) \cdot \left(\alpha - \beta \frac{C(x,t)}{K_C + C(x,t)} \right)$ – скорость ингибирования злокачественными клетками здоровых. Слагаемое

$\frac{Y_0 - \tilde{k}Y(x,t)}{Y(x,t) + K_Y} \cdot \nu C(x,t)$ описывает прирост лимфоцитов при наличии делящихся клеток,

$-\eta \frac{Y(x,t)}{K_Y + Y(x,t)} \frac{Y_0 - \tilde{k}Y(x,t)}{Y(x,t) + K_Y}$ – убыль лимфоцитов в отсутствие делящихся клеток. Скорость роста делящихся

клеток в третьем уравнении пропорционально $-\tilde{\alpha} \cdot \mu_C \cdot \frac{C(x,t)^2}{C(x,t) + K_{SC}}$, а $-C(x,t) \frac{Y(x,t)}{Y(x,t) + K_{YY}}$ – скорость

уничтожения злокачественных клеток лимфоцитами, $\frac{C(x,t)^2}{C(x,t) + K_{SC}} \cdot \tilde{\beta} \frac{M_0 - kM(x,t)}{K_{MM} + M(x,t)}$ – переход от нормальных клеток к делящимся (мутирование).

Для решения системы уравнений была написана численная схема методом предиктора-корректора.

Рассмотрим несколько случаев. Сначала проверим, как ведут себя здоровые клетки в отсутствие зараженных.

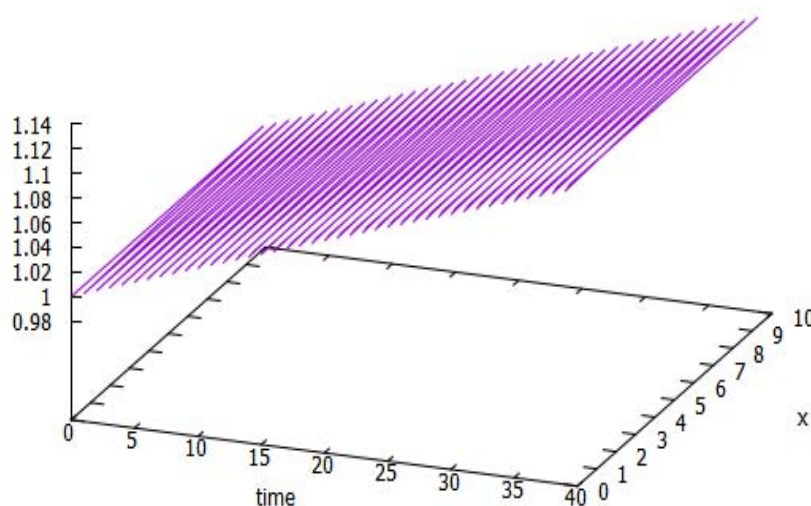


Рисунок 1. Динамика роста здоровых клеток в отсутствие злокачественных

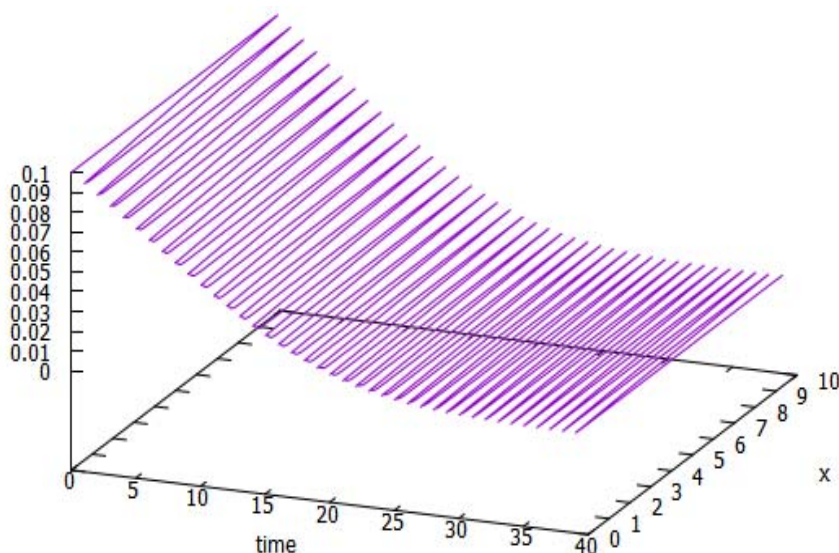


Рисунок 2. Динамика роста лимфоцитов в отсутствие злокачественных клеток

Из графиков следует, что в отсутствие злокачественных клеток здоровые клетки равномерно растут, а лимфоциты начинают погибать, так как для их жизнедеятельности недостаточно питательных веществ.

Теперь пусть в точке возникают злокачественные клетки, при этом начальное количество лимфоцитов мало по сравнению с количеством мутировавших клеток.

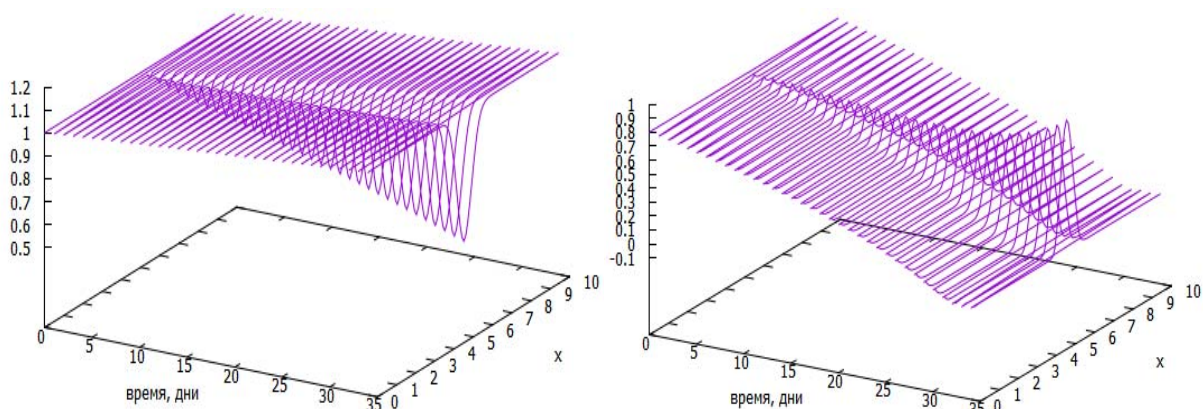


Рисунок 3. Динамика роста нормальных клеток (слева) и лимфоцитов (справа)

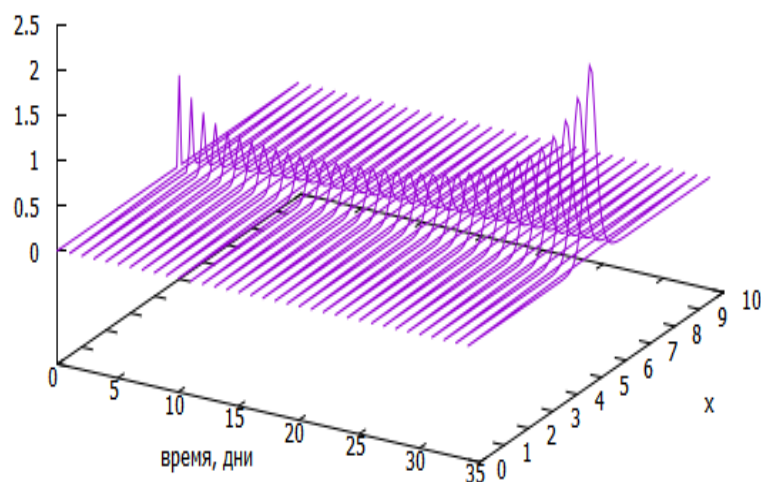


Рисунок 4. Динамика роста зараженных клеток

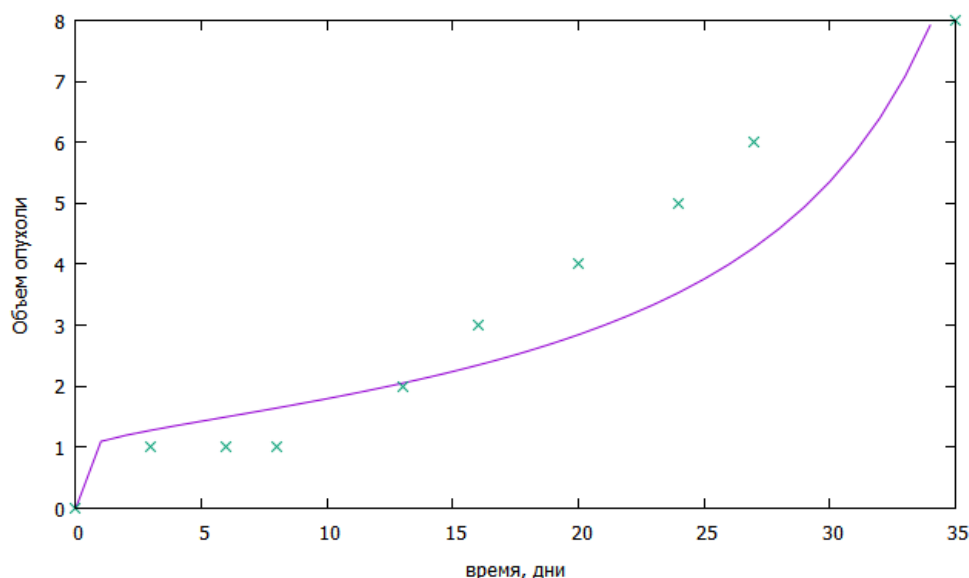


Рисунок 5. Динамика роста объема опухоли: сплошная линия – решение численной схемы, крестиками обозначены экспериментальные данные роста аденокарциномы Эриха без лечения [1]

В данном случае лимфоциты стекаются в область опухоли, однако не могут справиться с ростом злокачественных клеток. Плотность здоровых клеток в области роста опухоли сильно падает. Злокачественные клетки растут и занимают все большую территорию. На рисунке 5 приведены экспериментальные данные роста аденокарциномы Эриха. Из графиков видно, что построенная модель достаточно точно описывает рост данной опухоли.

Теперь рассмотрим случай, когда количества лимфоцитов достаточно для подавления роста злокачественного образования.

Из графиков видно, что лимфоциты начинают активно «сбегаться» к опухоли, при этом наблюдается резкое падение их плотность в области здоровой ткани. Здоровые клетки в области опухоли погибают, однако во всей остальной области наблюдается их естественный рост. Плотность злокачественных клеток в области возникновения опухоли падает, однако они начинают распространяться по пространству, занимая все больше места и заражая новые ткани.

Полученные результаты показывают, что данная модель может служить основой для построения более сложных моделей роста злокачественных образований, учитывающих больше факторов.

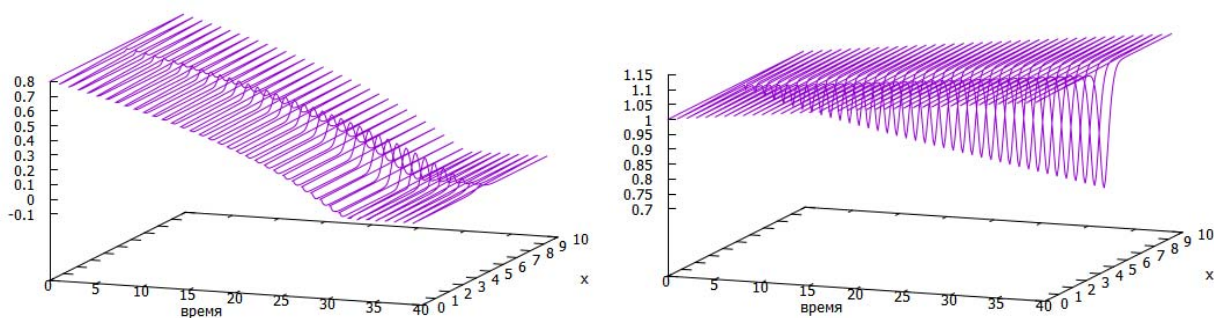


Рисунок 6. Динамика роста лимфоцитов (справа) и здоровых клеток (слева)

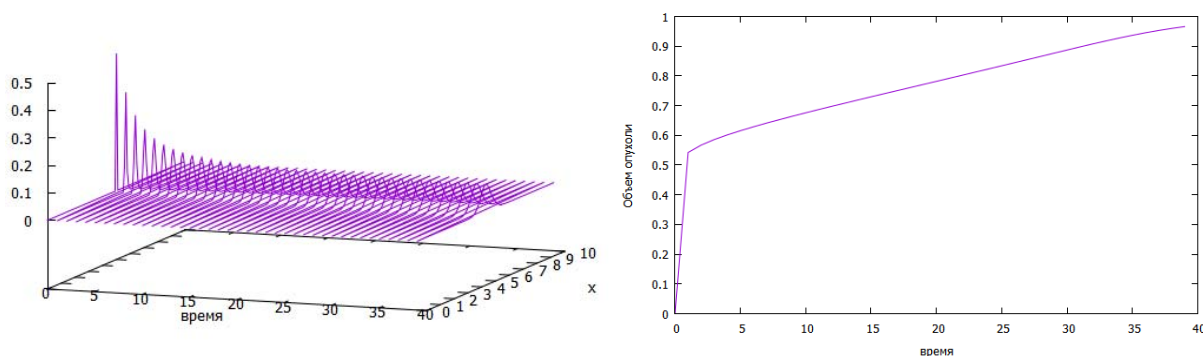


Рисунок 7. Динамика роста злокачественных клеток

Список литературы / References:

1. Бабушкина Н.А., Кузина Е.А., Лоос А.А., Беляева Е.В. Оценка эффективных стратегий применений противоопухолевой вакцинотерапии на основе математического моделирования. *Математическая биология и биофизика*, 2019, т. 14, № 1, с. 34-54. [Babushkina N.A., Kuzina E.A., Loos A.A., Belyaeva E.V. Evaluation of effective strategies for the use of anticancer vaccine therapy based on mathematical modeling. *Mathematical biology and Biophysics*, 2019, vol. 14, no. 1, p. 34-54. (In Russ.)]
2. Белотелое Н.В., Лобанов А.И. Популяционные модели с нелинейной диффузией. *Математическое моделирование*, 1997, т. 9, № 12, с. 43-56. [Belotelov N.V., Lobanov A.I. Population model with nonlinear diffusion. *Mathematical modeling*, 1997, vol. 9, no. 12, p. 43-56. (In Russ.)]
3. Бернет Ф. *Клеточная иммунология*. М.: Мир, 1971, 542 с. [Burnett F. *Cell immunology*. M.: World, 1971, 542 p. (In Russ.)]
4. Водопьянов В.В., Водопьянова Л.Л. Математическое моделирование нефти в ризосфере растений с использованием диффузии. *Вестник УГАТУ*, 2014, т. 18, № 4, вып. 65, с. 178-182. [Vodopyanov V.V., Vodopyanova L.L. Mathematical modeling of oil in the rhizosphere of plants using diffusion. *Bulletin of USATU*, 2014, vol. 18, no. 4, iss. 65, pp. 178-182. (In Russ.)]
5. Колобов А.В., Анашкин А.А., Губернов В.В., Полежаев А.А. Математическая модель роста опухоли с учетом дихотомии миграции и пролиферации. *Компьютерные исследования и моделирование*, 2009, т. 1, № 4, с. 415-422. [Kolobov A.V., Anashkin A. A., Gubernov V.V., Polezhaev A.A. Mathematical model of tumor growth taking into account the dichotomy of migration and proliferation. *Computer studies and modeling*, 2009, vol. 1, no. 4, pp. 415-422. (In Russ.)]

MATHEMATICAL MODEL OF TUMOR GROWTH**Dusaeva Ya.M., Vodopyanov V.V.**

Ufa state aviation technical University

K. Marx st., 12, Ufa, 450008, Russia; e-mail: yanadusaeva@mail.ru

Abstract. The article describes an invasive tumor with a large area of tissue damage and a small relative density of malignant cells. The dynamics of the inflammatory process is quantitatively described, following the change in cell concentration — the number of cells per unit volume of tissue. A mathematical model for the growth of a malignant tumor is proposed. In this tumor growth model, 3 types of cells are taken into account: malignant, healthy and white blood cells - lymphocytes. It is believed that the proliferation of malignant, healthy cells and lymphocytes in space occurs due to diffusion. Apoptosis (cell death after a certain number of divisions) in malignant cells is absent. That is, malignant cells are "immortal". Healthy cells can be "infected": because of the proliferation of tumor cells, the signaling molecules do not flow to healthy cells, which is why they begin to multiply uncontrollably. The constructed model was solved numerically by the predictor-corrector method. Several cases were considered: a model without malignant cells, a case with an insufficient number of lymphocytes, and when the immune system manages to defeat the disease. The model showed good convergence with experimental data.

Key words: chemotaxis, malignant tumor, immunotherapy, mathematical model.

ИНГИБИТОРЫ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ ПОДАВЛЯЮТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ХЛОРПРОМАЗИНОМ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: cozy@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.06.19

Аннотация. Нейролептик первого поколения хлорпромазин, широко применяемый в терапии шизофрении и других психических заболеваний, оказывает многогранное влияние на внутриклеточные процессы. Так, ранее нами было показано, что хлорпромазин вызывает увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крыс, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующим входом Ca^{2+} из наружной среды. Однако, механизмы, посредством которых хлорпромазин вызывает Ca^{2+} -ответы в макрофагах, до конца не изучены. В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты. В макрофагах арахидоновая кислота окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии нейролептика фенотиазинового ряда хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что два структурно различных ингибитора циклооксигеназ ацетилсалициловая кислота (аспирин) и индометацин подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые хлорпромазином в перитонеальных макрофагах крысы. Полученные данные свидетельствуют об участии циклооксигеназ и (или) продуктов циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. Участие ферментов каскада метаболизма арахидоновой кислоты во влиянии хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} может быть объяснено моделью встраивания амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазинового нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Это может приводить к изменению жидкостности мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза A_2 , запуская каскад метаболизма арахидоновой кислоты. В свою очередь, ферменты и/или продукты метаболизма арахидоновой кислоты участвуют в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых хлорпромазином.

Ключевые слова: хлорпромазин, циклооксигеназы, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Хлорпромазин (аминазин) (ХП) относится к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) фенотиазинового ряда, широко применяемых в терапии шизофрении и других психических заболеваний [1]. Выявлено многогранное влияние ХП на внутриклеточные процессы [2].

Множественность эффектов ХП, как и других фенотиазинов, может быть связана с его амфифильной природой. Будучи амфифильным соединением, он хорошо проникает через мембраны. Предложен механизм встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды, в первую очередь фосфоинозитиды [3]. Благодаря этому, ХП может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт.

Ранее нами было впервые показано, что ХП и другой нейролептик фенотиазинового ряда – трифлуоперазин – увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крыс [4, 5]. Однако механизмы, посредством которых фенотиазины вызывают увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах, до конца не изучены.

В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты (АК) [6]. АК высвобождается из мембранных липидов под действием фосфолипазы A_2 (ФЛА₂) и далее окисляется в клетке по трём основным ферментативным путям с образованием биологически активных продуктов – эйкозаноидов [6]. В макрофагах АК окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ [7]. На тромбоцитах человека было ранее установлено, что психотропные соединения могут модулировать активность ФЛА₂ и продукцию метаболитов циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления АК [8, 9].

В связи с этим, в настоящей работе была поставлена **задача** исследовать возможное участие циклооксигеназного пути окисления АК во влиянии ХП на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22 °С через 1-2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны ранее [5]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотоблеширования измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [10]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [11].

Для выявления участия циклооксигеназного пути окисления АК во влиянии ХП на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах использовали структурно различные ингибиторы циклооксигеназ ацетилсалициловую кислоту (аспирин) и индометацин [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 25 мкг/мл ХП к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, приводит к быстрому повышению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ от базального уровня, равного 92 ± 16 нМ, до 241 ± 22 нМ, после чего наблюдается длительная фаза «плато» Ca^{2+} -ответа (рис. 1а, 2а).

Показано, что преинкубация клеток с 100 мкМ аспирина (рис. 1б) или 10 мкМ индометацина (рис. 2б) в течение 5 мин до введения 25 мкг/мл ХП приводит к подавлению увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызываемого ХП, по сравнению с контрольными экспериментами. Подавление Ca^{2+} -ответов, индуцируемых ХП, аспирином и индометацином составило $27,9 \pm 8,1$ и $38,2 \pm 9,4$ % соответственно ($n = 9$ для каждого из фармакологических агентов).

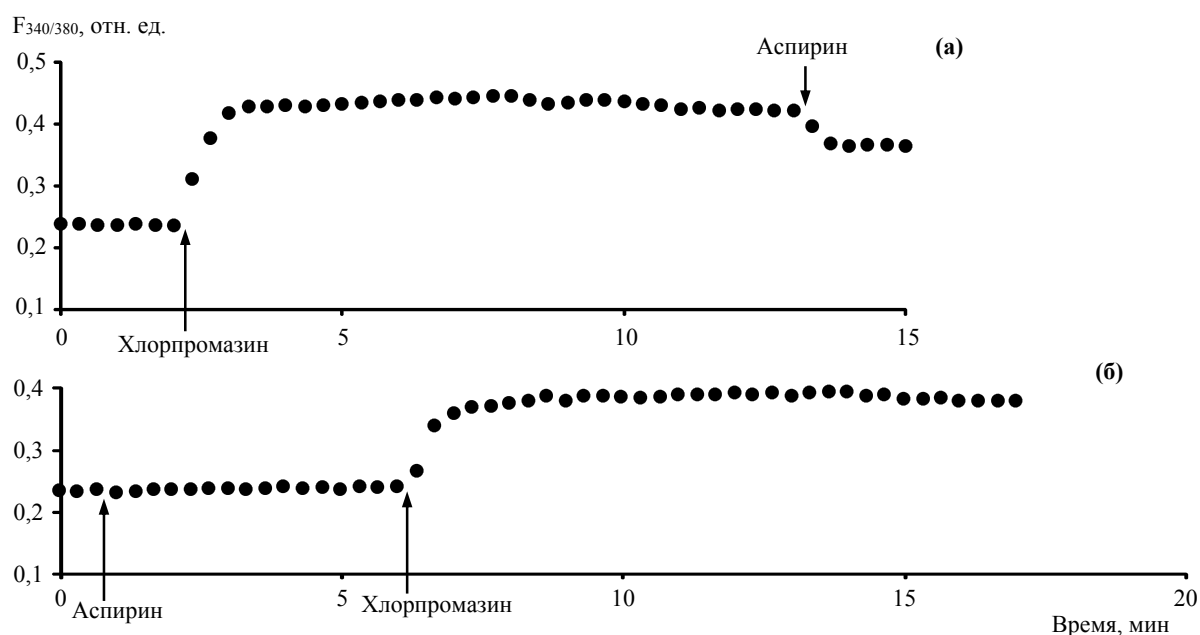


Рисунок 1. Влияние аспирина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые хлорпромазином в макрофагах. Здесь и на рисунке 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 25 мкг/мл хлорпромазина. На фоне развившегося Ca^{2+} -ответа вводили 100 мкМ аспирина; б – клетки инкубировали с 100 мкМ аспирина в течение 5 мин до введения 25 мкг/мл хлорпромазина. Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов

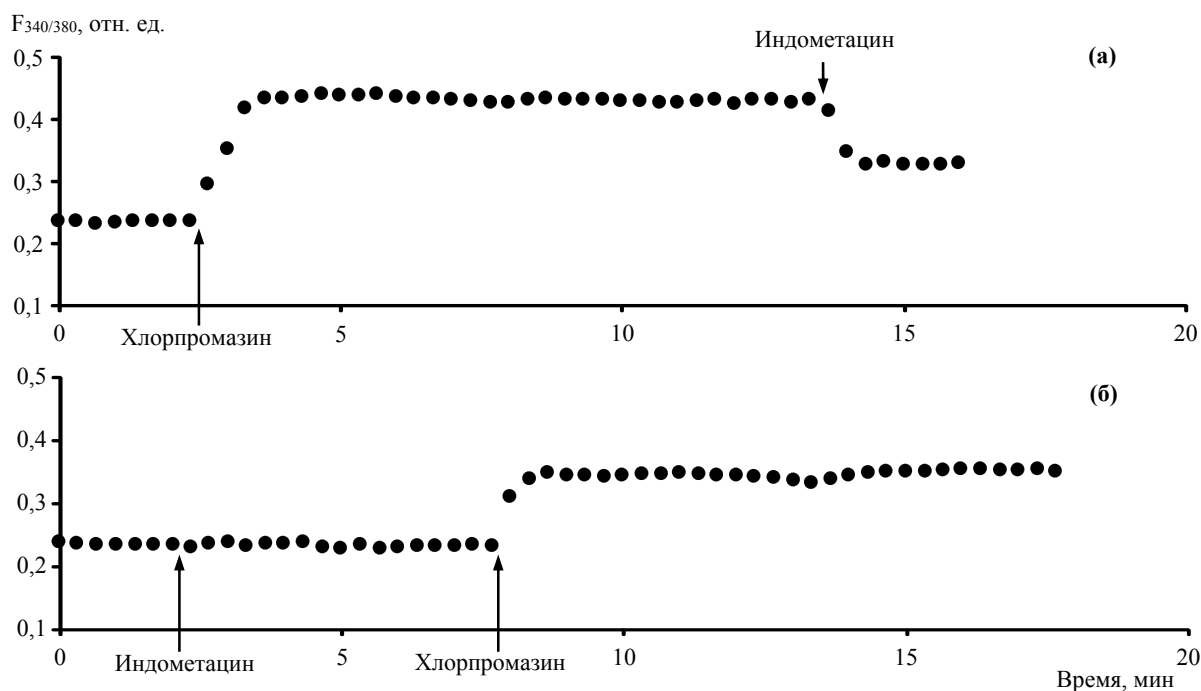


Рисунок 2. Влияние индометацина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые хлорпромазином в макрофагах. а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 25 мкг/мл хлорпромазина. На фоне развившегося Ca^{2+} -ответа вводили 40 мкМ индометацина; б – клетки инкубировали с 10 мкМ индометацина в течение 5 мин до введения 25 мкг/мл хлорпромазина

Обнаружено также, что при введении 100 мкМ аспирина (рис. 1а) или 40 мкМ индометацина (рис. 2а) во время развившегося плато Ca^{2+} -ответа, вызываемого ХП, происходит снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на $32,5 \pm 8,4\%$ ($n = 8$) и $40,1 \pm 10,8\%$ ($n = 6$) соответственно.

Полученные данные позволяют предположить, что циклооксигеназы и/или их продукты принимают участие в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых ХП в перитонеальных макрофагах.

Ингибиторы циклооксигеназ индометацин и аспирин – нестероидные противовоспалительные агенты, которые обладают противовоспалительным, анальгетическим и жаропонижающим эффектами [14]. Полученные нами результаты свидетельствуют о нежелательности совместного клинического применения ХП с лекарственными средствами на основе индометацина или аспирина.

Участие ферментов каскада метаболизма АК во влиянии ХП на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может быть объяснено моделью встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Трициклическое гидрофобное кольцо молекулы ХП встраивается в гидрофобную фазу мембраны, в то время как алкильный фрагмент с терминальной аминогруппой взаимодействует с полярными головками кислых липидов [3, 15]. Это может приводить к изменению жидкости мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза A_2 , запускающая каскад метаболизма АК. В свою очередь, ферменты и/или продукты метаболизма АК участвуют в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых ХП.

Список литературы / References:

1. Dilsaver S.C. Antipsychotic agents: a review. *Am. Fam. Phys.*, 1993, vol. 47, pp. 199-204.
2. Sudeshna G., Parimal K. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Europ. J. Pharmacol.*, 2010, vol. 648, pp. 6-14.
3. Oruch R., Lund A., Pryme I.F., Holmsen H. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J. Chem. Biol.*, 2010, vol. 3, pp. 67-88.
4. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Влияние хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. *Докл. Акад. Наук*, 2017, т. 474, № 1, с. 116-118. [Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The effect of chlorpromazine on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. *Dokl. Bioch. Biophys.*, 2017, vol. 474, pp. 162-164.]
5. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые трифлуоперазином, в макрофагах. *Цитология*, 2018, т. 60, № 2, с. 116-121. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Arachidonic acid metabolism inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, № 4, pp. 315-322.]

6. Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, vol. 55, pp. 69-102.
7. Brown G.P., Monick M. M., Hunninghake G.W. Human alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1988, vol. 254, pp. C809-C815.
8. Walenga R.W., Opas E. E., Feinstein M.B. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases A₂ and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, pp. 12523-12528.
9. Oruch R., Pryme I. F., Holmsen H. Effects of psychotropic drugs on the thrombin-induced liberation of arachidonate in human platelets. *Saudi Med. J.*, 2008, vol. 29, pp. 1397-1407.
10. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
11. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J. A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559- 16566.
12. De Witt D.L., El Harish E.A., Kraemer S.A., Andrews M.J., Yao E.F., Armstrong R.L., Smith W.L. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, pp. 5192- 5198.
13. Mitchell J.A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R.J., Vane J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 90, pp. 11693-11697.
14. Dubois R. N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van de Putte L.B.A., Lipsky P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.*, 1998, vol. 12, pp. 1063-1073.
15. Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matusiewicz B. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, pp. 16-23.

CYCLOOXYGENASE INHIBITORS ATTENUATE Ca²⁺ RESPONSES INDUCED BY CHLORPROMAZINE IN MACROPHAGES

Milénina L.S., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I.

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia; e-mail: cozy@mail.ru

Abstract. Chlorpromazine belongs to the first antipsychotics generation widely used in treatment of mental diseases. A multifaceted influence of chlorpromazine on intracellular processes has been revealed. Earlier we have shown that chlorpromazine increases intracellular Ca²⁺ concentration, causing Ca²⁺ mobilization from intracellular Ca²⁺-stores and subsequent Ca²⁺-entry from external medium, in rat peritoneal macrophages. However, the mechanisms by which chlorpromazine causes Ca²⁺-responses are not fully understood. In activation and functioning of immune cells, including macrophages, the arachidonic acid metabolism cascade plays an important role. In macrophages arachidonic acid is oxidized predominantly by cyclooxygenases and lipoxygenases. Therefore, it was useful to investigate the involvement of cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in the effect of phenothiazine neuroleptic chlorpromazine on intracellular Ca²⁺-concentration in macrophages. Using Fura-2AM microfluorimetry it was shown for the first time that two structurally distinct cyclooxygenase inhibitors acetylsalicylic acid (aspirin) and indomethacin attenuate Ca²⁺-responses, induced by chlorpromazine in rat peritoneal macrophages. The data obtained suggest the involvement of cyclooxygenases and (or) cyclooxygenase pathway products in the chlorpromazine effect on intracellular Ca²⁺-concentration in macrophages. The participation of arachidonic acid cascade enzymes in the influence of chlorpromazine on intracellular Ca²⁺ concentration can be explained by the model of embedding of amphiphilic antipsychotic agents, including phenothiazine neuroleptics, in the membrane inner monolayer. This can lead to a change in membrane fluidity and functioning of membrane-bound enzymes, such as phospholipase A₂, which triggers arachidonic acid cascade. In turn, the enzymes and/or products of arachidonic acid metabolism are involved in the formation of chlorpromazine-induced Ca²⁺ responses.

Key words: chlorpromazine, cyclooxygenases, intracellular Ca²⁺-concentration, peritoneal macrophages.

MICROWAVES-ASSISTED CHEMICAL SYNTHESIS OF SILVER PHOSPHATE POWDER, ITS MORPHOLOGICAL CHANGE AND PHOTOCATALYTIC ACTIVITY WITH SUNLIGHT

Morales M.A., Velazquez de la Luz E., Galan Trujillo G.D., Luna-Flores A.,
Agustin Serrano R., Cervantes Tavera A.M., Hernandez Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla
Puebla, Mexico.

Received: 15.06.2019

Abstract. Three types of materials in silver phosphate powder were obtained by means of the microwaves-assisted chemical synthesis method. Each type of material in powder have a particle size and morphology characteristic, according has been subjected additional to thermal or surfactant treatment. The surfactant employed is sodium dodecyl sulfate and the treatment temperature was 200 °C. The material in powder obtained without any additional treatment, have size particle in micrometers and polyhedral morphology, while with the surfactant treatment the size particle is nano metric and its pseudo spherical morphology. The thermal treatment gives origin to powder particles with size micrometric and sub micrometric, both with morphology of polyhedrons with shape corners and edges. The photocatalytic activity of these three materials is measure under sunlight to degradation of methylene blue in 10 ppm. The type of silver phosphate powder more efficient are the obtained by microwaves-assisted chemical synthesis with additional thermal treatment.

Key words: Polyhedral morphology, methylene blue, photoelectric effect.

INTRODUCTION

Heterogeneous photo catalysis is a promising approach for environmental technology improving biological degradation due to high toxicity, a biggest XXI century problem. Today, powder material has been demonstrated an easily-made and economical method to obtain carbon-doped amorphous TiO_2 that is efficiency for the chains (rhodamine B) degradation under visible light from this photo catalyst [1]. The chains degradation using this powder material is reached through a mechanism of water splitting accompanied by an adsorption process, which takes place in the presence of sunlight. Nevertheless, employing other semiconductor type in powder could be improved in the reduction of photo degradation time of organic chains. In research recent [2-5] has been showed the obtaining of silver phosphate (Ag_3PO_4) by different variants of chemical reduction synthesis and its efficient of this powder to the degradation methylene blue and rhodamine B. The improvement photocatalytic activity of Ag_3PO_4 powder is due to the following underlying mechanism of splitting water: it is well known that any semiconductor exhibit the property known as photoelectric effect that makes them to absorb photons and produce electrons owing to their intrinsic bandgap structure. Even more, the morphology of the particles from semiconductor powder, favors the valence electrons (photo carriers) transports to its surface, which has been demonstrated when the Ag_3PO_4 particles have tetrahedral and cubic morphologies [6]. This counterintuitive behavior is well known in recent studies using the same semiconductor [3, 7] and Ag- Ag_3PO_4 hetero structures powders [4, 5, 8] where to a low surface adsorption area have a high photocatalytic activity for the Rhodamine B degradation. Although, the contact of dye molecules with Ag_3PO_4 implies the photocatalytic gradual deterioration as has been reported in elsewhere [7], as well improve of this aspect [9]. Therefore, in this research is evaluated the photocatalytic activity of materials in Ag_3PO_4 powder under sunlight to degradation of methylene blue. These powders are obtained by microwaves-assisted chemical synthesis method and thermal or surfactant treatment.

MATERIALS AND METHODS

Chemical reagents: All the chemical reagents used were of analytical grade. Ammonium acid phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, from JT Baker brand), Ammonium hydroxide (NH_4OH from JT Baker brand), Silver nitrate (AgNO_3 , from JT Baker brand), methylene blue ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}$ from JT Baker brand), the surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS from HYCEL) and ultra-pure deionized water (also from JT Baker brand).

Preparation of Ag_3PO_4 : First procedure. Two solutions were prepared, one for silver nitrate (Solution A) and another for acid phosphate for ammonium (Solution B), in concentrations of 0.15 and 0.10 respectively, after which solution B was added to the solution A and remained in constant turmoil. The pH = 9 was adjusted with the help of ammonium hydroxide by drip of the same. The final solution was brought to microwave exposure for a time of 7 minutes. The solution obtained was centrifuged and washed with distilled water, the product in powder was decanted and dried for a period of 30 minutes. Second procedure. To obtain powders with nano metric particle size, after mixing solutions A and B, the surfactant SDS was added to 1% by weight of the total mixture, then proceed as in the first procedure. Finally in a *third procedure*, the Ag_3PO_4 powder that is obtained as in the first procedure was subjected to a heat treatment of 200°C for a time of 30 min.

Photocatalytic activity evaluation: In a typical solution of methylene blue (MB) at a concentration of 10 ppm, was brought to sunlight exposure in a batch reactor with air pumping and with a ratio of 200 mg of catalyst per liter of solution.

Characterization methods: The characterizations of the materials in Ag_3PO_4 powder obtained were made by Electron Microscopy of Dispersion (SEM), X-Ray Diffraction (XDR), UV Spectroscopy (ERDT).

RESULTS

The X-ray diffraction pattern obtained is shown in the image left of figure 1. The diffraction planes describe the Ag_3PO_4 unit cell. The crystalline structure of Ag_3PO_4 synthesized in a basic medium exhibits the characteristic diffraction peaks of this material in angles of 20.9, 29.8, 33.4, 36.7, 42.7, 52.9, 55.0, 57.5, 61.9 and 63.9 degrees attributed to diffraction planes (110), (200), (210), (211), (220), (310), (222), (320), (321), (400), (330) and (411), respectively according to the JCPDS tab 06-0505. The FWHM was calculated with least-squares fit 0.06 degrees in equipment precision value. Also, the synthesis optimal time is to 7 min. because to 5 min. the crystallinity formation starts, while to the 10 min. it is destroyed.

In figure 2 is showed the morphologies obtained by three types of materials in Ag_3PO_4 powder. Figures 2a) and 2b) shows the particle polyhedral morphology with micrometrical size of Ag_3PO_4 powder without any treatment, while the effect of heat treatment decreases the particles size to sub micrometrical scale and change the morphology to polyhedrons with shape corners and edges more pronounced, as can be seen in Figures 2c) and 2d). Conversely, when the particles of this semiconductor are treatment with the surfactant SDS, the morphology is very simple: the particle conglomerates are pseudo-spheroids of Nano metric and sub micrometric size (Fig. 2e and 2f).

In the figure 3 are shown the results of photocatalytic activity evaluation, which can be observed the degradation aliquots of the methylene blue dye in a concentration of 10 ppm for the $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ powder with thermal treatment. During the 35-minute span I reached a degradation of 41.55%. This taking into account that no type of lamp was taken, it was simply done with the help of sunlight. For the case of $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ powder with the surfactant SDS treatment, the degradation is slightly smaller than the case previously said. While for the case of $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ powder without any treatment, the photocatalytic activity is slightly older. All these results can be confirmed by means of dye MB concentration degradation curve, which can be seen in the figure 1b). An advantage that have the $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ powder with thermal treatment is their stability improvement as has been reported in elsewhere [9].

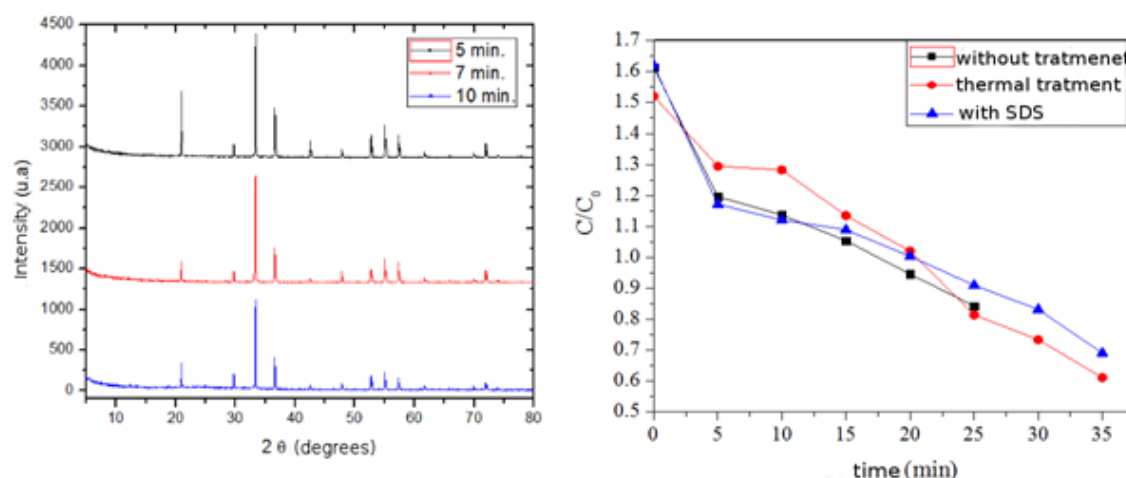


Figure 1. Left image represent the Ag_3PO_4 DRX diffraction in basic medium showing diffraction peaks. Right image represent a comparative graph of dye MB concentration degradation curve

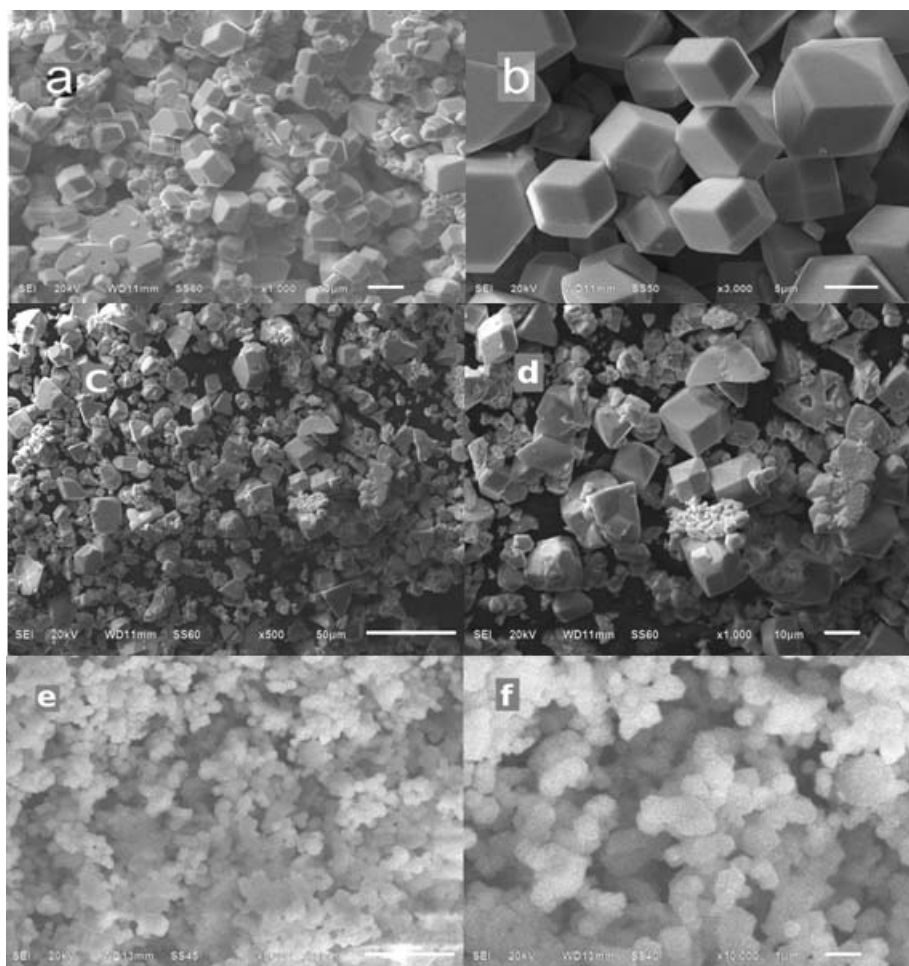


Figure 2. Images of Ag_3PO_4 powder obtained by SEM characterization. a) micrometric particles size and polyhedral morphology to 1000 X without any treatment, b) the image is zoom of a) to 3000 X, c) micrometric and sub micrometric particles size and polyhedral morphology with shape corners and edges to 500 X with thermal treatment, d) the image is zoom of c) to 1000 X, e) particles conglomerates with pseudo-spherical morphology of Nano metric size to 5000 X with surfactant SDS, f) the image is zoom of e) to 10000 X

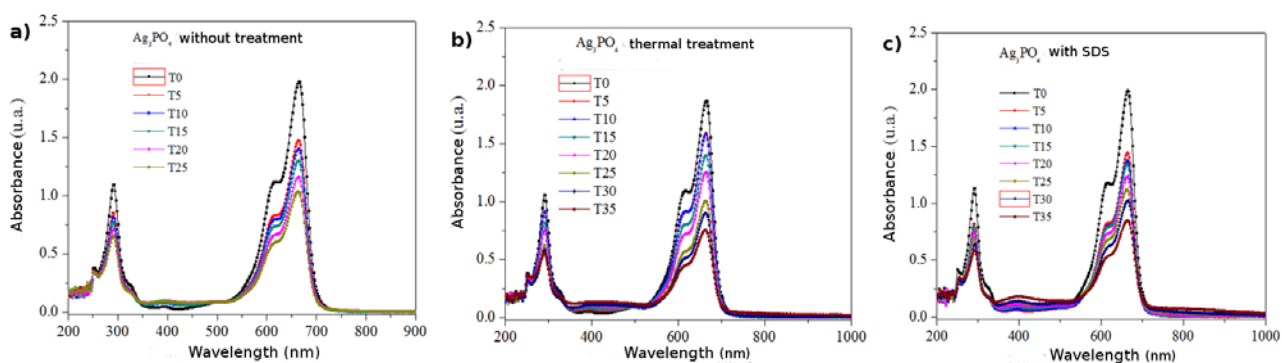


Figure 3. UV spectrum taken from degradation of $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$

CONCLUSIONS

According to the results obtained, it is concluded that the size and the modification of the morphology of the particles of our three types of samples influence the photocatalytic activity.

The best result to perform the photo catalysis was with the sample to which a heat treatment was applied due to the observations of the vitas morphology in the Scanning Electron Microscope. In combination with Nano metric and sub micrometric size of polyhedral morphology with good results are obtained to degrade the blue methylene dye.

References:

1. Luna-Flores A. [et al.] An easy-made, economical and efficient carbon-doped amorphous TiO₂ photocatalyst obtained by microwave assisted synthesis for the degradation of rhodamine B. *Materials*, 2017, vol. 10, no 12, p. 1447.
2. Jiao Z., Zhang Y., Yu H., Lu G., Yeb J., Bi Y. *Chem. Commun.*, 2013, vol. 49, no. 6, p. 6368.
3. Bi Y., Ouyang S., Umezawa N., Cao J., Ye J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, no. 17, pp. 6490-2.
4. Bi Y., Hu H., Ouyang S., Jiao Z., Lu G., Ye J. *Chem. Eur. J.*, 2012, vol. 18, no. 45, pp. 14272-5.
5. Bi Y., Hu H., Ouyang S., Jiao Z., Lu G., Ye J. *J. Mater. Chem.*, 2012, vol. 22, no. 30, p. 14847.
6. Kim S. [et al.] *Chemistry – A European Journal*, 2018, vol. 24, no 56, p. 14928-14932.
7. Morales M.A. [et al.] *Results in Physics*, 2019, vol. 12, p. 1344-1356.
8. Wu Q., Wang P., Niu F., Huang C., Li Y., Yao W. *Appl. Surf. Sci.*, 2016, vol. 378, pp. 552-63.
9. Dong P., Hou G., Liu C., Zhang X., Tian H., Xu F. et al. *Materials*, 2016, vol. 9, no. 12, p. 968.

STUDY OF PHOTOCATALYTIC ACTIVITY WITH SILVER AND COPPER PHOSPHATES OBTAINED BY CHEMICAL SYNTHESIS ASSISTED BY MICROWAVES

Galan Trujillo G.D., Morales Sanchez M.A., Velazquez de la Luz E., Luna-Flores A., Agustín Serrano R., Cervantes Tavera A.M., Hernández Santiago A.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla
Puebla, Mexico.

Received: 15.06.2019

Abstract. Copper and silver phosphate was synthesized from chemical synthesis assisted by microwaves, which allows obtain materials in powder with time of synthesis very short. These materials are characterized by methods such as: Electronic dispersion microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRD) and UV spectroscopy (ERDT). Their photocatalytic properties were evaluated employing methylene blue dye at a concentration of 10 ppm. The results show that these materials contribute greatly to the degradation of the dye in both cases.

Key words: Microwave, Photocatalytic activity, Degradation, photoelectric effect.

INTRODUCTION

The high growth in the textile industries due to its high demand which has generated a serious environmental problem, due to its toxicity, high content of chemical oxygen demand and resistance to chemical, photochemical and biological degradation. The heterogeneous photo catalysis has generated great interest due to the resolution of said problem and in turn to the conversion of solar energy. The pioneering work of Fujishima and Honda [1] has created a great study gap in materials with a high photocatalytic activity, due to its particularity of the degradation of contaminants of the textile industry, as well as the use of sunlight covering said activity in the visible region of the electromagnetic spectrum (380-780 nm) [2]. A particular material as silver phosphate (Ag_3PO_4) that has become an object of study due to its extremely high capacity for the evolution of O_2 from H_2O and the decomposition of organic dye under visible light irradiation [3]. Ag_3PO_4 has been generated by various synthesis routes such as; hydrothermal, precipitation, microwave-assisted chemistry, where the latter has given to speak because of its rapid synthesis time and the ease with which its microstructure is modified such as; branch, tetrapod, nano rod, triangular prism [4]. Another particular material is copper phosphate ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$), which has become an interesting material due to the structural multiplicity, which gives rise to a wide variety of structures observed in ternary and quaternary phosphates, as well as silicates [5]. $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ has been generated by conventional methods of high temperature, solid state precursors or hydrothermal techniques [6]. However the chemical synthesis route assisted by microwaves has been studied, which promises to be an effective route due to its low cost and time of preparation compared to the mentioned methods.

MATERIALS AND METHODS

The reagents used were: Ammonium acid phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, from JT Baker brand), Ammonium hydroxide (NH_4OH from JT Baker brand), Silver nitrate (AgNO_3 , from JT Baker brand), Copper nitrate (CuNO_3 , from JT Baker brand).

Preparation of Ag_3PO_4 : Two solutions were prepared, one for silver nitrate (Solution A) and another for acid phosphate for ammonium (Solution B), in concentrations of 0.15 and 0.10 respectively, after which solution B was added to the solution A and remained in constant turmoil. The pH = 13 was adjusted with the help of ammonium hydroxide. The final solution was brought to microwave exposure for a time of 5 minutes. The solution obtained was centrifuged and washed with distilled water, the product in powder was decanted and dried for a period of 30 minutes. Finally, the material was subjected to a heat treatment of 200 °C and a time of 30 min.

Preparation of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$: Two solutions of copper nitrate (solution A) and another of ammonium acid phosphate (solution B), in concentrations of 0.15 and 0.10 respectively, were prepared, after which solution B was added to the solution A and remained in constant turmoil. Subsequent to this, microwave exposure was carried out for a period of 5 minutes. The final solution was centrifuged and washed with distilled water; the product was decanted and dried for a period of 30 minutes.

Photocatalytic activity evaluation: In a typical solution of methylene blue (MB) at a concentration of 10 ppm, was brought to exposure to sunlight in a batch reactor with air pumping, and with a ratio of 200 mg of catalyst per liter of solution.

The characterizations of the materials powder obtained were made by Electron Microscopy of Dispersion (SEM), X-Ray Diffraction (XDR), UV Spectroscopy (ERDT).

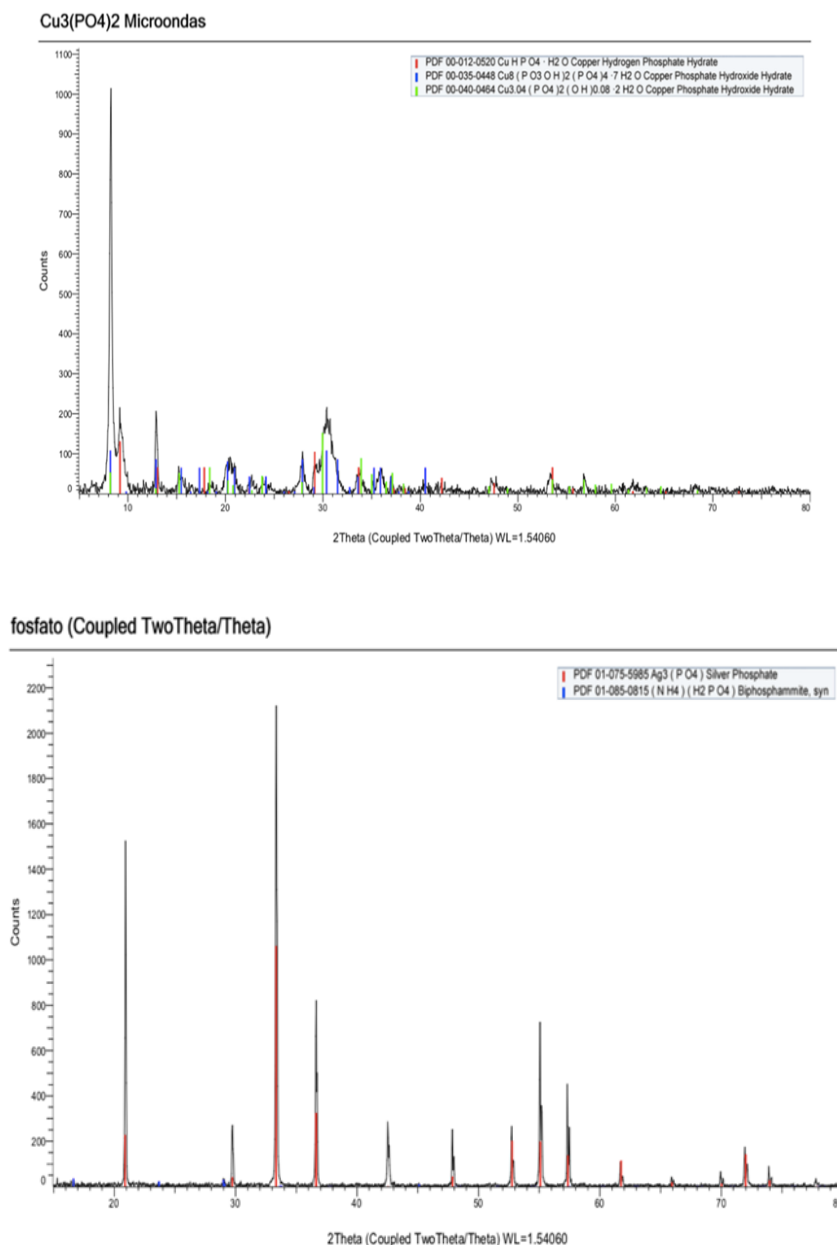


Figure 1. Left image: X-ray diffraction spectrum of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, right image: X-ray diffraction spectrum of $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$

RESULTS

The image left of Fig. 1 shows the characteristic peaks of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ obtained by X-ray diffraction, although, other peaks are attributed to it due to the hydration of the material. The material was obtained directly, a thermal treatment must be taken into account to improve the purity of the material, and eliminate the hydration obtained by the microwave-assisted synthesis. While the image right of figure 1 shows the X-ray diffraction spectrum of $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$, unlike copper phosphate, the high purity of the material can be attributed due to the increase in pH with the help of Ammonium Hydroxide.

Figure 2 shows the types of morphology reached for the case of silver phosphate, reaching a particle size in microns, where you can see cubic type, dodecahedral and some other complex morphology, which are favorable for the activity photocatalytic material. Furthermore, figure 3 shows the types of morphology obtained for the case of copper phosphate, the main morphology found are flake type. Although, there are agglomerates of particles can be attributed to the hydration of the material. This may be due to because in the case of copper phosphate the $\text{pH} = 13$ was not adjusted.

For the degradation tests the methylene blue dye (MB) in a concentration of 10 ppm was used, the tests were developed in solar ray capture reactors, in the figure 4 the UV spectra of the degradations with each material. For the case of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ for a time of 3 hours and for silver phosphate a time of 30 minutes. The difference in time is due to the great efficiency that $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ has presented in the literature [7].

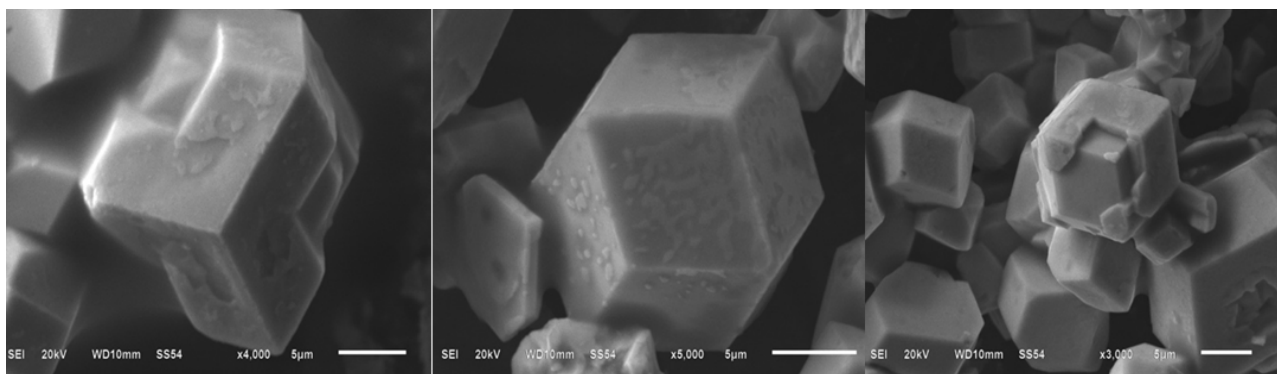


Figure 2. SEM images of $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ particles whose complex crystalline habits are showed

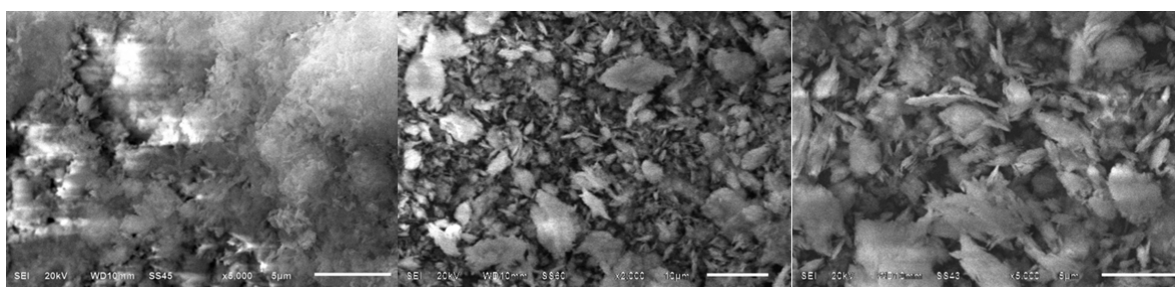


Figure 3. SEM images of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ particles which shows the flakes type morphology obtained

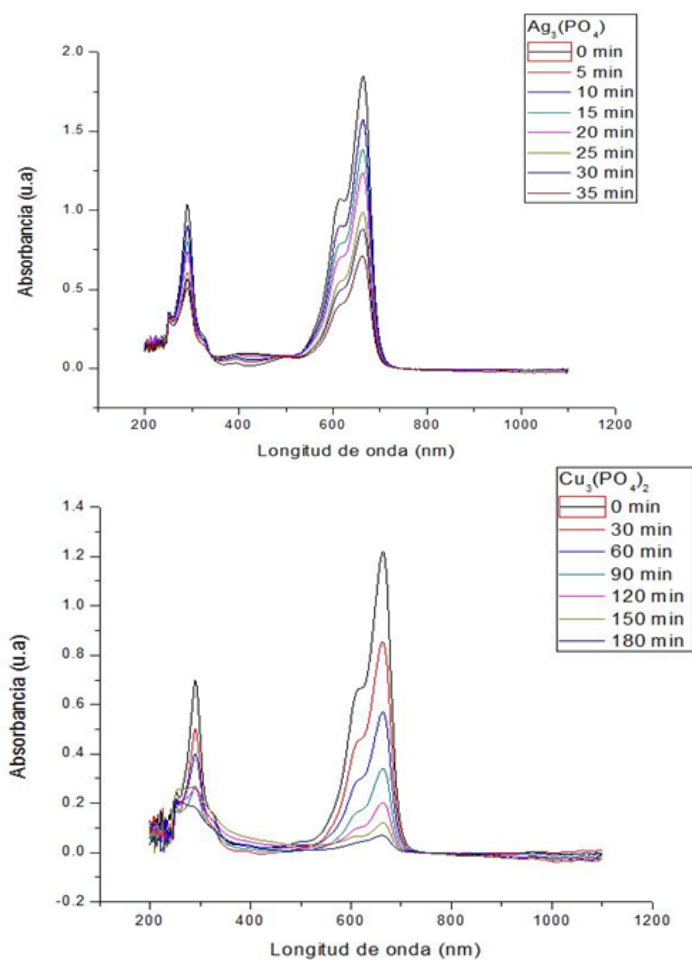


Figure 4. UV spectrum taken from degradation: left image for $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ and right image for $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

In the left image of figure 4, can be observed the degradation aliquots of the methylene blue dye in a concentration of 10 ppm for the $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ powder. During the 30-minute span I reached a degradation of 41.55%. This taking into account that no type of lamp was taken, it was simply done with the help of sunlight. While in the right image of figure 4 is shows the degradation aliquots taken from the degradation of $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ powder. This material was left for a longer time to have a closer information about the times necessary for the complete degradation of methylene blue. For comparative purposes degradation is observed at 30 min time in both cases, which is 70.34% for the $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ almost double that obtained by $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. Nevertheless, there must be more factors when comparing such as the cost of raw materials, since Silver nitrate is more expensive than copper nitrate. The synthesis time of the material $\text{Ag}_3(\text{PO}_4)$ is longer, due to its thermal treatment, in addition to the pH adjustment, which can be the key to increase the efficiency of the material.

CONCLUSION

The materials presented in this article show a desirable photocatalytic activity, although there are several points to consider, be it the cost-benefit of the raw material, the time of exposure to degradation and not using lamps to perform such tests. In general, the silver phosphate material has a better photocatalytic activity since degradation is faster in the first 30 minutes, but running degradation tests in a longer time could increase the percentage of degradation. Otherwise with copper phosphate, adjusting the pH = 13 could accelerate the photo catalysis process and thereby obtain a better photocatalytic activity.

References:

1. Fujishima A., Honda K. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature*, 1972, vol. 238, pp. 37-38.
2. Wang W., Lu C.H., Su M.X., Ni Y.R., Xu Z.Z. Synthesis Characterization, and Nitrogen Concentration Depended Visible-Light Photoactivity of Nitrogen-Doped TiO_2 Nanosheets with Dominant (001) Facets. *Chin. J. Catal.*, 2012, vol. 33.
3. Bi Y., Ouyang S., Umezawa N., Cao J. and Ye J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, pp. 6490-6492.
4. Dong P., Wang Y., Li H., Ma X., Han L. Shape-controllable synthesis and morphology-dependent photocatalytic properties of Ag_3PO_4 crystals. *J. Mater. Chem. A*, 2013, vol. 1, pp. 4651-4656.
5. Etheredge K.M.S. and Hwu S.-J. A Novel Honeycomb-like Copper(II) Phosphate Framework, $[\text{BaCl}][\text{CuP}_04]$. *Inorganic chemistry. ACS Publications*, 2019, vol. 34, pp. 3123-3125,
6. Hua Z., Li B., Li L., Yin X., Chen K. and Wang W. Designing a Novel Photothermal Material of Hierarchical Microstructured Copper Phosphate for Solar Evaporation Enhancement. *The journal of physical chemistry*, 2019, vol. 121, pp. 60-69.
7. Morales M.A., Fernández-Cervantes I., Agustín-Serrano R., Ruiz-Salgado S., Sampedro M.P., Varela-Caselis Portillo R.J.L., Rubio E. Ag_3PO_4 microcrystals with complex polyhedral morphologies diversity obtained by microwave-hydrothermal synthesis for MB degradation under sunlight. *Results in Physics*, 2019, vol. 12, pp. 1344-1356.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО ПРЕПАРАТА «ИММЕРАН» НА ТЕЧЕНИЕ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Генералов Е.А.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, д. 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: generals1179@gmail.com

Поступила в редакцию: 23.06.2019

Аннотация. В проведенном исследовании изучалось влияние полисахаридного противоязвенного регенераторно-репаративного препарата «Иммеран», экстрагированного из *Solanum tuberosum* L., на течение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки в модели Окабэ у белых крыс породы Wistar. Вместе с тем изучалось влияние полисахаридного препарата на уровень цитокинов в сыворотке крови крыс. Обнаружено, что «Иммеран» модулирует уровень про- и противовоспалительных цитокинов согласованно с периодом развития болезни – в деструктивной фазе и фазе заживления язвенного дефекта. Уровень цитокинов IL-1b и IFN- γ на 4 день течения язвенной болезни являлся высоким, а IL-4 – низким, введение препарата «Иммеран» приводило обратному эффекту, что положительно сказывалось на ранозаживлении. Параллельно с этим проводили гистологическое изучение язвенного дефекта, на котором обнаружено значительное изменение в процессах регенерации слизистой оболочки желудка под действием полисахаридного препарата «Иммеран». В том числе определяли язвенный индекс и патоморфологические изменения стенки желудка после забоя животных. Обнаружено, что применение препарата «Иммеран» в модели хронической язвы достоверно улучшает состояние подопытных при двух-, а острой – при трехкратном введении.

Ключевые слова: «Иммеран», полисахарид, язвенный дефект, IL-1b, IL-4, IFN- γ .

ВВЕДЕНИЕ

Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки является хроническим, рецидивирующим, мультифакторным и одним из широко распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Несмотря на недавние успехи в изучении патогенеза течения язвенной болезни и сравнительные успехи в купировании и лечении проявлений язвенной болезни заболевание распространенность данного заболевания в популяции весьма высока – до 10% в странах Европы, а в некоторых странах мира выше [1].

Стандартным подходом в лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки является прямое воздействия на предрасполагающие и раздражающие факторы, такие как: кислотность желудка (ингибиторы протонной помпы), количество *Helicobacter pylori* (антибиотикотерапия), раздраженность стенки желудка (обволакивающие и противовоспалительные средства) и др. [2] При этом схемы лечения язвенной болезни многокомпонентной сочетанной терапией чаще всего нарушаются пациентами в силу психологических факторов и негативных побочных явлений. Вместе с тем лишь относительно недавно стал развиваться подход иммунотерапии язвенного дефекта, основанный на регулировании уровня про- и противовоспалительных цитокинов в организме больного, а также уровне Т-хелперов (Th) первого и второго типов [3-5]. Вместе с тем показано, что полисахариды из природных источников могут оказывать благотворное действие на процессы ранозаживления, например, экстрагированные полисахариды из *Radix Hedysari* могут запускать процессы регенерации в периферических нейронах крыс [6], полисахариды, выделенные из фруктов, оказывают гастропротективное и ранозаживляющее действие [7], а полисахариды из *Helianthus tuberosus* L. – колониестимулирующее, радиопротекторное и иммуномодулирующее действие [8]. В связи с этим возникает необходимость получения биологически активного препарата из сравнительно дешевого растительного сырья, способного к нормализации иммунного ответа при язвенной болезни желудка, низкотоксичного и способного активировать процессы регенерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полисахаридный препарат «Иммеран» имеет молекулярную массу около 70 кДа, и имеет моносахаридный состав в пределах: глюкоза 57,3%, арабиноза 14,7%; галактоза 30,2%; уроновых кислот 6,4%, а также в минорных количествах ксилозы и маннозы и содержит в своем составе около 5% белка.

Опыты проводили на 190-210 г крысах линии Wistar обоего пола. Производитель – филиал «Андреевка» ГУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН. Каждая группа состояла из 5 животных. За сутки до операции прекращалась подача пищи с сохранением свободного доступа к воде, после операции корм давали в стандартном режиме. Через 3 и 10 суток крыс забивали – группы модели острой и хронической язвы соответственно.

Полисахаридный препарат «Иммеран» (ЛП-004128 2017-02-08) вводили через зонд в дозе 0.5 мг/животное через 30 минут после операции – первое введение, в модели острой язвы: раз в сутки 3 раза и однократно, в модели хронической язвы: ежедневно 3 суток и на 5 сутки однократно, двукратно – в первые и 6

сутки. В группе контроля выбраны крысы с введением препарата «Солкосерил» (ежедневно внутримышечно 21 мг/0,5 мл на животное) – положительный контроль и трехкратное введение 0,9% раствора NaCl.

Для изучения действия препарата «Иммеран» использовали модель Окабэ экспериментальной ацетатной язвы [9]. У животных, находящихся под общим наркозом, извлекали желудки и накладывали кольца с внутренним $d = 0,5$ см, внутрь которого наносили 0,02 мл концентрированной уксусной кислоты на 25-30 сек. После чего зашивали брюшную стенку послойно. В дальнейшем, после забоя животных, желудок наполняли 1% раствором формалина. Проводили оценку язвенного индекса по площади пораженного участка (см^2). Вместе с тем наборами ELISE-kit оценивали концентрацию цитокинов в сыворотке крови крыс. С этой целью использовали спектрофотометр Multiscan.

Гистологические препараты готовили из кусочков передней стенки желудка. Ткани помещали в один блок, декальцинировали, проводили и помещали в раствор целлоид-парафина. После чего получали срезы с использованием микротомы. Окрашивание проводили гематоксилинэозином по Ван-Гизону, шик-реакцией, альциановым синим и толуидиновым синим.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Полученные данные демонстрируют, что применение препарата «Иммеран» в разной степени эффективно во всех экспериментальных группах.

В результате проведенного эксперимента были получены следующие данные, представленные в таблицах 1, 2 и на рисунке 1. В модели острой токсичности наилучший результат продемонстрировал препарат Иммеран при трехкратном введении, что выразилось в стимуляции ранозаживления язвенного дефекта почти в 2,5 раза эффективнее, чем у препарата сравнения «Солкосерил» и почти в 3,5 раза эффективнее контроля.

Вместе с тем в модели хронической язвы желудка крыс препарат «Иммеран» в схеме двукратного применения стимулировал ранозаживление в 1,8 раза эффективнее препарата «Солкосерил» и в 3,8 раза эффективнее, чем в контрольной группе. Введение полисахаридного препарата «Иммеран» в четырехкратной схеме так же приводило к ускоренному заживлению язвенного дефекта по сравнению с контрольными группами.

Динамика показателей уровней цитокинов в сыворотке крови крыс также была оценена. В результате получено, что препарат «Иммеран» модулирует уровень концентрации про- ($\text{IFN-}\gamma$, IL-1b) и противовоспалительных цитокинов (IL-4). Наблюдалась фазность изменений их концентрации в зависимости от периода регенераторно-репаративных процессов в заживлении язвенного дефекта. Модулирующее действие на провоспалительные цитокины, в свою очередь, приводит к тому, что снижается цитотоксический эффект, интоксикация и, как следствие, ускоряется ранозаживление.

С другой стороны, концентрация противовоспалительного цитокина IL-4 начинает возрастать и к 10 суткам достигает своего максимума при падении концентрации провоспалительных цитокинов. Такие результаты свидетельствуют об иммунопосредованном воздействии полисахаридного препарата на течение язвенной болезни, а именно – регуляции клеточного и гуморального иммунитета, которые гиперактивированы за счет повреждения тканей. Более того периодичность выработки антител, Т-клеточного ответа, увеличение популяции Th2 типа или Th1 типа равна 7 и 14 суткам.

Таблица 1. Язвенный индекс при введении препарата «Иммеран» в модели острой язвы.

	Препарат	Схема введения	ЯИ, см^2	
1	Иммеран	Ежедневно, 3 раза	$0,121 \pm 0,03$	$P < 0,05$
2	Иммеран	Однократно в 1-е сутки	$0,23 \pm 0,04$	$P > 0,05$
3	Физ. р-р	Ежедневно, 3 раза	$0,417 \pm 0,081$	
5	Солкосерил	Ежедневно, 3 раза	$0,31 \pm 0,07$	

Таблица 2. Язвенный индекс при введении препарата «Иммеран» в модели хронической язвы.

	Препарат	Схема введения	ЯИ, см^2	
1	Иммеран	Ежедневно, 3 раза и однократно на 5-е сутки	$0,057 \pm 0,01$	$P < 0,05$
2	Иммеран	Однократно на 6-е сутки	$0,063 \pm 0,012$	$P < 0,05$
3	Иммеран	Двукратно в 1-е и 6-е сутки	$0,037 \pm 0,007$	$P_1 < 0,05$ $P_2 < 0,05$ (с +-контролем)
4	Физ. р-р, P_1	Двукратно в 1-е и 6-е сутки	$0,14 \pm 0,03$	
5	Солкосерил, P_2	Двукратно в 1-е и 6-е сутки	$0,068 \pm 0,008$	

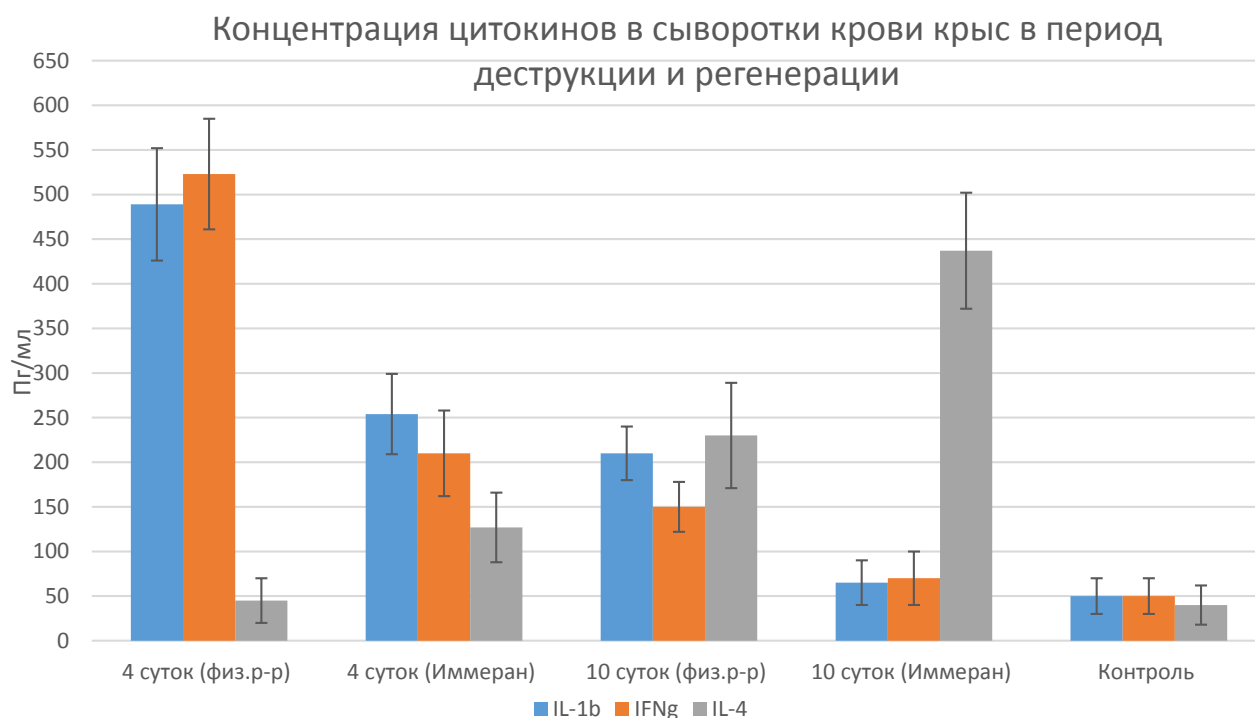


Рисунок 1. Концентрация цитокинов в сыворотке крови в период деструкции (4 суток) и в период регенераторно-репаративных процессов (10 суток)

На рисунке 2 представлены характерные гистологические картины для данного эксперимента. Гистологическая картина в контрольной группе отличалась тем, что дно язвы было обширным с некоторым количеством некротических масс, низким содержанием коллагеновых волокон, грануляционная ткань на раннем этапе формирования и находится под негативным действием некротических масс, также обнаружено большое количество кист и расширения железистых протоков по краям язвенного дефекта.

Одновременно с этим в группах подопытных животных, получавших препарат «Иммеран», патоморфологически ткани с язвенными дефектами значительно отличались от контроля с введением физиологического раствора. Так отмечалось уплощение язвенного дефекта, сильное истончение слоя или полное отсутствие некротических масс и его обильная инфильтрация лейкоцитами. При этом элиминация некротических масс в основном происходила в группах с введением препарата «Иммеран», чем в группах с введением препарата «Солкосерил». С другой стороны, отмечается улучшение микроциркуляционного потенциала, за счет увеличения числа фибробластов и новообразованных сосудов в грануляционной ткани, в сравнении с контрольной группой. В контрольной группе наблюдалась картина образования фибриноидного некроза и ростом колоний микробов.

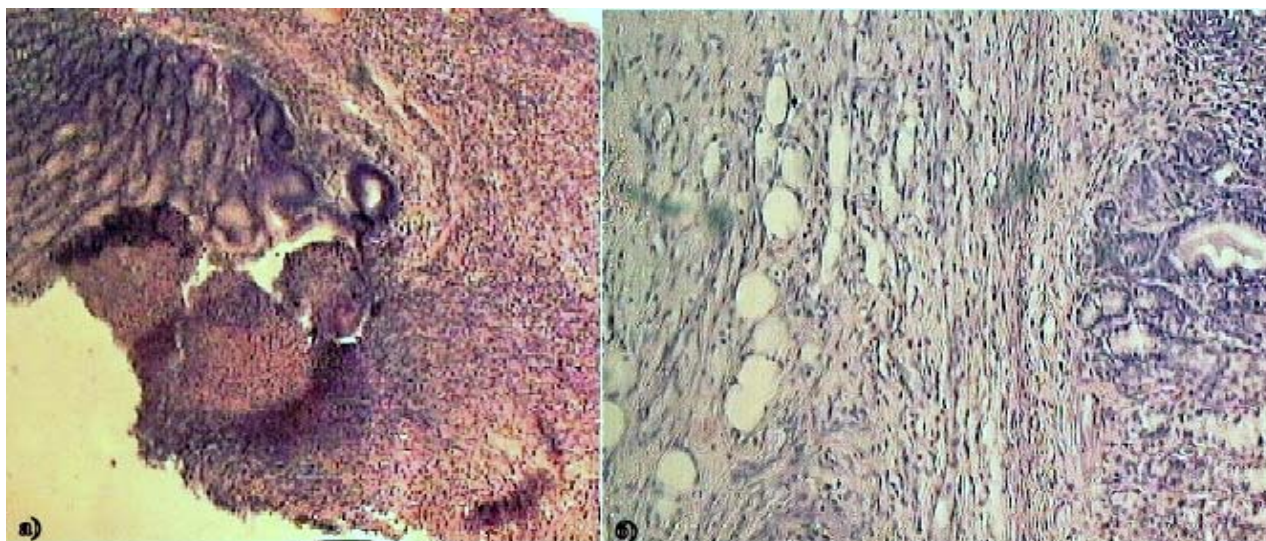


Рисунок 2. Гистологическая картина состояния язвенного дефекта на 10-е сутки: а) контроль с физ. раствором, б) введение препарата «Иммеран»

Помимо прочего следует отметить, что в опытных группах происходило наложение уплощенного эпителия на поверхность дна язвенного дефекта и формирование структур пилорического типа. Окрашивание позволило обнаружить высокое содержание кислых и нейтральных глюкозамингликанов в эпителии, расположенном дистальнее язвенной ямки, покрытой новообразованной слизистой. Наблюдалось формирование фундальной слизистой – увеличенное содержание главных и париетальных клеток. Гистологически подслизистый слой демонстрирует большое количество тонких коллагеновых волокон и фибробластов. Все эти признаки свидетельствуют о более быстром и надежном заживлении.

ВЫВОДЫ

Препарат «Иммеран» обладает ярко выраженными регенераторно-репаративными свойствами, обусловленными влиянием на иммунокомпетентные клетки, которые продуцируют про- и противовоспалительные цитокины. Для эффективного заживления язвенного дефекта в модели «острой» язвы достаточно трех введений, а «хронической» – двух и не требует ежедневного приема. При этом регенераторные процессы в слизистой развиваются быстрее, слизистая более дифференцирована, обнаруживаются элементы восстановления железистой ткани и сосудистой сетки, что улучшает кровоток и трофику тканей. Введение препарата «Иммеран» приводит к изменению глубины язвенного дефекта и отсутствию грубой рубцовой ткани, что существенно снижает риск рецидива и эффективнее восстанавливает работу органа. Более того применение препарата «Иммеран» приводит к значительному снижению провоспалительных цитокинов с одновременным повышением противовоспалительных цитокинов, что согласуется с изменением язвенного индекса и патоморфологической картиной язвенного дефекта.

Список литературы / References:

1. Габбасова Л.В., Волевач Л.В., Палтусов А.И. и др. *Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки у лиц молодого возраста: Монография*. БГМУ Минздрава России. Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком», 2017, 48 с. [Gabbasova L.V., Volevach L.V., Paltusov A.I. et al. *Duodenal ulcer in young people: Monograph*. BSMU Ministry of Health of Russia. Tambov: Consulting Company Ucom LLC, 2017, 48 p. (In Russ.)] DOI: 10.17117/mon.2017.11.01.
2. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А., Маев И.В. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению язвенной болезни. *Рос. Журн. Гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.*, 2016, т. 26, № 6, с. 40-54. [Ivashkin V.T., Sheptulin A.A., Maev I.V. et al. *Diagnostics and treatment of peptic ulcer: clinical guidelines of the Russian gastroenterological Association*. *Ross. Z. gastroenterol., gepatol., koloproktol.*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 40-54.]
3. Bagheri N., Salimzadeh L., Shirzad H. The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylori*-infection. *Microb Pathog*, 2018, vol. 123, pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.06.033.
4. Mahdi B.M. Role of Immunity in Gastric Ulcer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*, 2013, vol. 2, no. 10, pp. 803-806. DOI:10.6051/j.issn.2224-3992.2013.02.347.
5. Larussa T., Leone I., Suraci E., et al. *Helicobacter pylori* and T Helper Cells: Mechanisms of Immune Escape and Tolerance. *Journal of Immunology Research*, 2015, vol. 12, pp. 1-10. DOI: 10.1155/2015/981328.
6. Wei S.Y., Zhang P.X., Han N., et al. Effects of Hedysari polysaccharides on regeneration and function recovery following peripheral nerve injury in rats. *Am. J. Chin. Med.*, 2009, vol. 37, no. 1, pp. 57-67. DOI: 10.1142/S0192415X09006618.
7. Khan M.S.A., Khundmiri S.U.K., Khundmiri S.R. Fruit-Derived Polysaccharides and Terpenoids: Recent Update on the Gastroprotective Effects and Mechanisms. *Front Pharmacol.*, 2018, vol. 9, p. 569. DOI: 10.3389/fphar.2018.00569.
8. Генералов Е.А. Водно-растворимый полисахарид из *Helianthus tuberosus* L.: радиозащитная, колониестимулирующая и иммуномодулирующая активность. *Биофизика*, 2015, т. 60, № 1, с. 73-79. [Generalov E.A. Water-soluble polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L.: radioprotective, colony-stimulation and immunomodulation activities. *Biofizika*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 73-79. (In Russ.)]
9. Okabe S., Amagase K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models – The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, vol. 28, no. 8, pp. 1321-1341. DOI: 10.1248/bpb.28.1321.

EFFECTS OF THE IMMERAN POLISACCHARIDE DRUG ON THE COURSE OF THE PERSONAL ACCIDENT OF THE STOMACH AND THE DUALCYTHERNAL TABLE**Generalov E.A.***Lomonosov Moscow State University**Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia; email: generals1179@gmail.com*

Abstract. In the conducted study the effect of the polysaccharide anti-ulcer regenerative-reparatory drug «Immeran», extracted from *Solanum tuberosum L.*, on the course of gastric ulcer and duodenal ulcer in the Okabe model in Wistar white rats was studied. At the same time, the effect of the polysaccharide preparation on the level of cytokines in the serum of rats was studied. «Immeran» has been found to modulate the level of pro- and anti-inflammatory cytokines consistently with the period of development of the disease – in the destructive and healing phases of the ulcer. The level of cytokines IL-1b and IFN- γ on day 4 of the course of peptic ulcer was high, and IL-4 was low, the administration of «Immeran» resulted in the opposite effect, which had a positive effect on wound healing. In parallel with this, a histological study of the ulcerative defect was performed, on which a significant change was found in the processes of regeneration of the gastric mucosa under the action of the polysaccharide preparation «Immeran». Including determined the ulcer index and pathological changes in the stomach wall after slaughter of animals. It was found that the use of the drug «Immeran» in the model of chronic ulcer reliably improves the condition of the experimental patients with two, and acute - with a threefold administration.

Key words: *Immeran, polysaccharide, ulcerative defect, IL-1b, IL-4, IFN- γ .*

ТРИФЛУОПЕРАЗИН МОДУЛИРУЕТ ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ**Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.**

Санкт-Петербургский государственный университет,

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2019

Аннотация. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Однако роль сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в эпителиальных системах практически не изучалась. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейролептик фенотиазинового ряда трифлуоперазин. С использованием метода фиксации потенциала показано, что обработка кожи лягушки 20 мкг/мл трифлуоперазина снижает транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что ингибирующий эффект трифлуоперазина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, и характеризуется двухфазной кинетикой изменения тока короткого замыкания при приложении трифлуоперазина со стороны апикальной поверхности кожи лягушки. Сходные результаты были получены нами ранее при исследовании влияния на транспорт Na^+ в коже лягушки другого антагониста сигма-1 рецепторов, также нейролептика фенотиазинового ряда – хлорпромазина. Таким образом, в настоящей работе и ранее, нами показано модулирующее влияние структурно различных антагонистов рецепторов сигма-1 на трансэпителиальный транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки.

Ключевые слова: кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na^+ , сигма-1 рецепторы, трифлуоперазин.

ВВЕДЕНИЕ

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев [1], что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). ENaC являются представителями обширного суперсемейства дегенерины/эпителиальные Na^+ -каналы (Deg/ENaC), объединяющего лиганд-управляемые Na^+ -проводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом. Deg/ENaC универсальны для всех многоклеточных организмов; экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях и участвуют в таких разнообразных процессах, как болевая чувствительность, механочувствительность и направленный перенос Na^+ [2]. Несмотря на то, что представители суперсемейства Deg/ENaC функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией.

Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [3, 4]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [5]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [6, 7]. В последнее время появляются данные о том, что сигма-1 рецепторы участвуют в модуляции активности протон-активируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC. На клетках эмбриональной почки человека (линия HEK-293) показано, что сигма-1 рецепторы прямо взаимодействуют с ASICs, образуя комплекс со стехиометрией 1 сигма-рецептор / 1 субъединица ASIC [8]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие сигма-

1 рецепторов в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ и активности ENaC в коже лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейролептик фенотиазинового ряда трифлуоперазин (трифтазин, стелазин) [9].

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга («World Precision Instruments, Inc.», Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в mM): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22-23 °C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик. Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T .

Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} . В связи с этим, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 47,32 \pm 5,11$ мкА; $V_{OC} = -81,42 \pm 10,04$ мВ; $g_T = 1,73 \pm 0,44$ мСм.

Показано, что обработка кожи лягушки блокатором сигма-1 рецепторов трифлуоперазином снижает транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что степень и кинетика ингибирующего действия трифлуоперазина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рисунок 1). В среднем (по данным 10 экспериментов), изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 20 мкг/мл трифлуоперазина было следующим: I_{SC} уменьшился на $9,13 \pm 3,45$ или $29,79 \pm 11,34$ %, V_{OC} уменьшился на $28,06 \pm 10,13$ или $31,79 \pm 14,16$ %, а g_T уменьшилась на $21,84 \pm 9,42$ или увеличилась на $6,89 \pm 1,56$ % при приложении трифлуоперазина со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. Результаты, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о том, что приложение трифлуоперазина к апикальной поверхности кожи вызывает двухфазное изменение I_{SC} : подавление I_{SC} , наблюдаемое в течение 30-40 мин после приложения агента, сменяющееся некоторым увеличением I_{SC} , наблюдаемым в течение второго часа после приложения трифлуоперазина. В случае добавления трифлуоперазина со стороны базолатеральной поверхности кожи, наблюдается последовательное снижение I_{SC} в течение первого часа после приложения агента. Фазы увеличения I_{SC} в этом случае не наблюдалось.

Результаты, представленные в настоящей работе, согласуются с данными, полученными нами ранее при сравнительном исследовании влияния на транспорт Na^+ в коже лягушки двух структурно различных антагонистов сигма 1 рецепторов – нейролептика фенотиазинового ряда хлорпромазина и производного бутирофенона – галоперидола. Хлорпромазин (аминазин), также как и трифлуоперазин, относится к первому поколению типичных нейролептиков фенотиазинового ряда, широко применяемых в качестве антипсихотических, миорелаксирующих, седативных средств, а также для лечения шизофрении и других психических заболеваний [10]. Ранее нами было показано, что обработка кожи лягушки 50 мкг/мл хлорпромазина снижает трансэпителиальный транспорт Na^+ в коже лягушки [11]. При этом обнаружено, что ингибирующий эффект хлорпромазина различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, и также характеризуется двухфазной кинетикой изменения I_{SC} при приложении хлорпромазина со стороны апикальной поверхности кожи лягушки.

Полученные результаты также согласуются с данными литературы. Так, обнаружено, что приложение 100 мкМ трифлуоперазина со стороны базолатеральной мембраны, вызывает снижение I_{SC} и V_{OC} в мочевом пузыре жабы [12]. Двухфазное дозо-зависимое изменение I_{SC} под действием трифлуоперазина показано для изолированной кожи лягушки *Rana esculenta* [13, 14]. Однако в этом случае, добавление трифлуоперазина вызывало стимуляцию транспорта Na^+ через кожу лягушки. В цитируемых работах также высказывается предположение о том, что молекулярные механизмы, вовлеченные в регуляцию трифлуоперазином транспорта Na^+ в коже лягушки, различаются в зависимости от приложения агента к апикальному или базолатеральному домену полярных клеток эпителия. Так, наиболее вероятно, что влияние трифлуоперазина на I_{SC} в случае приложения агента к апикальной поверхности связано с модуляцией активности ENaC [14] или с изменением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [13], тогда как влияние трифлуоперазина на I_{SC} при приложении

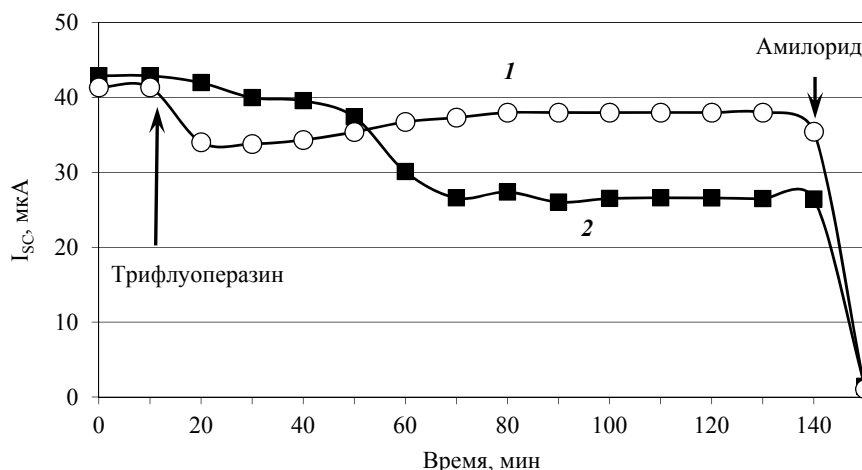


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки в ответ на приложение блокатора сигма-1 рецепторов трифлуоперазина, добавленного со стороны апикальной (1) или базолатеральной (2) поверхности кожи лягушки. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) – амилорид (20 мкМ)

агента к базолатеральной поверхности кожи, опосредуется Ca^{2+} -зависимым синтезом и последующим выделением из базолатеральной мембраны простагландина E_2 , что, в свою очередь, приводит к стимуляции транспорта Na^+ через кожу лягушки [13, 14]. Известно, что трифлуоперазин является антагонистом Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина, играющего ключевую роль в регуляции процессов Ca^{2+} -сигналикации [15]. Однако, данные о том, что различные производные фенотиазина (хлорпромазин и трифлуоперазин) обладают сходным влиянием на I_{sc} , свидетельствует о том, что влияние трифлуоперазина на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется, по-видимому, без участия комплекса Ca^{2+} -кальмодулин [14].

Транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки. Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление I_{sc} (рисунок 1), что свидетельствует о том, что влияние антагониста сигма-1 рецепторов трифлуоперазина на транспорт Na^+ связано, преимущественно, с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, в настоящей работе и ранее, нами показано модулирующее влияние структурно различных антагонистов рецепторов сигма-1 на трансэпителиальный транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные данные позволяют также предположить, что влияние антагонистов сигма-1 рецепторов на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным или базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток. Полученные нами данные о влиянии трифлуоперазина на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенотиазина.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*, L.: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Kellenberger S., Schild L. Epithelial sodium channel/Degenerin family of ion channels: a variety of function for a shared structure. *Physiol. Rev.*, 2002, vol. 82, pp. 735-767.
3. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ Rs]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal. Trans.*, 2016, vol. 36, pp. 327-388.
4. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., Orringer J., Williams W., Bowen W.D. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 268, pp. 9-18.
5. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, pp. 344-366.
6. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*, 2018, vol. 16, pp. 97-116.
7. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.

8. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., Jackson M.B., Edwardson J.M. Demonstration of a direct interaction between σ -1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys. J.*, 2010, vol. 98, pp. 1182-1191.
9. Schuster D.I., Arnold F.J., Murphy R.B. Purification, pharmacological characterization and photoaffinity labeling of sigma receptors from rat and bovine brain. *Brain Res.*, 1995, vol. 670, pp. 14-28.
10. Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H. Binding of umespirone to the sigma receptor: evidence for multiple affinity states. *Neuropharmacol.*, 1990, vol. 29, pp. 181-184.
11. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние нейролептиков на транспорт Na^+ в коже лягушки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, с. 272-275. [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of neuroleptics on Na^+ transport in frog skin. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, pp. 272-275. (In Russ.)]
12. Levine S.D., Kachadorian W.A., Levin D.N., Schlondorff D. Effects of trifluoperazine on function and structure of toad urinary bladder. Role of calmodulin vasopressin-stimulation of water permeability. *J. Clin. Invest.*, 1981, vol. 67, no. 3, pp. 662-72.
13. Bjerregaard H.F., Nielsen R. Trifluoperazine stimulated sodium transport by increased prostaglandin E_2 synthesis in isolated frog skin (*Rana esculenta*). *Acta. Physiol. Scand.*, 1986, vol. 127, no. 1, pp. 75-85.
14. Bjerregaard H.F., Nielsen R. Trifluoperazine stimulated sodium transport through the apical surface of isolated frog skin. *Acta. Physiol. Scand.*, 1988, vol. 134, no. 1, pp. 43-52.
15. Feldkamp M.D., O'Donnell S.E., Yu L., Shea M.A. Allosteric effects of the antipsychotic drug trifluoperazine on the energetics of calcium binding by calmodulin. *Proteins*, 2010, vol. 78, no. 10, pp. 2265-82.

TRIFLUOPERAZINE MODULATES Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN

Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Krutetskaya N.I., Antonov V.G.

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

Abstract. The skin of amphibians and other isolated epithelial systems are classic model objects for the study of ion transport mechanisms through biological membranes. By the ability to transport electrolytes and by the response to certain hormones, the skin and bladder of amphibians are similar to the distal renal tubules, which allow the data obtained on these objects to be used to determine the water and ion transport mechanisms in kidney cells. Sigma-1 receptors are unique ligand-regulated molecular chaperones located in the plasmalemma and endoplasmic reticulum membrane at the boundary with mitochondria. However, the role of sigma-1 receptors in Na^+ transport regulation in epithelial systems is not fully understood. In this regard, it was appropriate to study the involvement of sigma-1 receptors in Na^+ transport regulation in frog skin. In the experiments, we used the sigma-1 receptor antagonist – the phenothiazine derivative neuroleptic trifluoperazine. Using voltage-clamp technique, we have shown that preincubation of the frog skin with 20 $\mu\text{g/ml}$ trifluoperazine inhibits Na^+ transport in frog skin. It was also observed that trifluoperazine inhibitory effect on Na^+ transport depended on the application of the agent from the apical or basolateral surface of the skin and was characterized by biphasic short-circuit current changes upon application of trifluoperazine from the skin apical surface. Similar data were obtained by us earlier when studying the effect of another sigma-1 receptor antagonist phenothiazine neuroleptic chlorpromazine on Na^+ transport in frog skin. Thus, in this study and earlier we showed that structurally different sigma-1 receptor antagonists modulate transepithelial Na^+ transport, indicating the involvement of sigma-1 receptors in regulation of Na^+ transport in frog skin epithelium.

Key words: frog skin, transepithelial Na^+ transport, sigma-1-receptors, trifluoperazine.

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА SkQ1 В РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ KEAP1/Nrf2/ARE И АПОПТОЗА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Внуков В.В.¹, Гуценко О.И.¹, Милютин Н.П.¹, Ананян А.А.¹, Корниенко И.В.²,
Плотников А.А.¹

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского
ул. Стачки, 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: natmilut@rambler.ru

² Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН

ул. Чехова, 41, г. Ростов-на-Дону, 344006, РФ

Поступила в редакцию: 08.07.2019

Аннотация. В работе исследовано влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на уровень экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов, гена *CASP3* и активность ферментов, кодируемых исследуемыми генами, в коре больших полушарий мозга крыс при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО). Установлено, что в физиологических условиях введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к значительному повышению уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx4* на фоне базального уровня экспрессии гена *CASP3* в коре больших полушарий мозга крыс. При этом наблюдается активация антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST) и повышение концентрации восстановленного глутатиона (GSH), активность каспазы-3 не изменяется. При ГБО-индуцированном окислительном стрессе (0,5 МПа, 90 мин) отмечено снижение уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2*, значительное повышение экспрессии гена *CASP3*, тогда как не выявлено достоверных различий в транскрипционной активности *Nrf2*-регулируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD1-3*, *CAT*, *GPx4*) в коре больших полушарий мозга крыс. В условиях гипероксии наблюдается повышение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне ингибирования CAT и умеренной активации GST, сохранения стационарного уровня активности SOD и GPx и существенной активации каспазы-3 в больших полушариях мозга крыс. Предварительное применение SkQ1 перед сеансом ГБО приводит к повышению уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-регулируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD1-2*, *CAT* и *GPx4* и поддержанию базального уровня экспрессии гена *CASP3* в коре больших полушарий мозга при окислительном стрессе. Одновременно наблюдается увеличение активности антиоксидантных ферментов, содержания восстановленного глутатиона и поддержание близкой к норме активности каспазы-3. Предполагается, что защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

Ключевые слова: окислительный стресс, гипероксия, митохондриально-направленный антиоксидант, головной мозг, экспрессия генов, антиоксидантные ферменты, каспаза-3.

Окислительный стресс, вызывающий повреждение клеток мозга, вносит существенный вклад в патогенез многих заболеваний нервной системы. В последнее время в качестве чувствительного сенсора и регулятора окислительного стресса рассматривается сигнальный путь Keap1/Nrf2/ARE, который вовлечен в молекулярные механизмы многих патологических процессов [1]. Установлено, что транскрипционный фактор *Nrf2* и его репрессор Keap1 регулируют сеть цитопротекторных генов, включающих около 1% генома [2]. Экспрессия транскрипционного фактора *Nrf2* в ЦНС рассматривается как важный элемент ответной реакции при острых и хронических патологиях нервной системы, связанных с окислительным стрессом [3]. Известно, что окислительный стресс вызывает различные формы гибели клеток, в том числе, апоптоз, который является важнейшей причиной потери нейронов при нейродегенеративных расстройствах, ишемии и травматических повреждениях головного мозга [4, 5]. К распространенным моделям окислительного стресса относится гипербарооксигенация (ГБО), посредством которой исследуются механизмы нарушения свободнорадикального гомеостаза и программированной гибели клеток в нервной и других тканях организма [6]. Установлено, что окислительный стресс, развивающийся при гипероксии, индуцирует митохондриальный и рецепторный пути апоптоза, что рассматривают как важнейший механизм повреждающего действия ГБО [6].

Цель работы – исследование влияния митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 – катионного производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония – на уровень экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов, а также гена *CASP3* и активность ферментов, кодируемых исследуемыми генами, в коре больших полушарий мозга крыс при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на беспородных крысах – самцах *Rattus norvegicus* массой 180-200 г. Все подопытные животные были разделены на четыре группы: 1 группа (контроль) – интактные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария; 2 группа – крысы, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, (группа «K+ SkQ1»); 3 группа – животные, подвергнутые действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после ГБО (группа «ГБО»). Подопытных животных помещали в барокамеру объемом 60 л, снабженную щелочным поглотителем углекислоты. После 3-минутной вентиляции чистым кислородом в барокамере создавалось давление 0,5 МПа. Компрессию и декомпрессию проводили со скоростью 0,2 МПа/мин, изопрессия составляла 90 мин. Данный режим ГБО (0,5 МПа 90 мин) вызывает острый окислительный стресс [7]. 4 группу составили животные, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, а затем через 1 час после последнего введения подвергали действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после сеанса ГБО – группа («SkQ1 + ГБО»). Препарат вводили в рассчитанной дозе, растворенной в 100 мкл 0,2%-ного раствора этанола в защитные мешки животных. Выбор дозы и схемы введения препарата проводили согласно рекомендациям [8] и собственным исследованиям.

При исследовании экспрессии генов количество животных в каждой из четырех групп составило: 18-22, в биохимических и биофизических исследованиях количество животных во всех группах – 12.

Все процедуры, выполненные на животных, проводились с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте или в научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) и положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (статья 27).

Анализ экспрессии мРНК проводили с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами. Для исследования брали 30 мг коры больших полушарий головного мозга. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с помощью коммерческого набора «РИБО-золь-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле, количество выделенной РНК определяли по оптической плотности при 260 нм. Для синтеза кДНК использовали набор реагентов для обратной транскрипции («Syntol», Россия), содержащий MMLV-RT (ревертазу вируса лейкемии мышей Молони), праймер Random-6, смесь дезоксирибонуклеотид трифосфатов (dNTP), ингибитор РНКаз.

Исследование уровня экспрессии генов фактора транскрипции Nrf2 (*Nrf2*), изоферментов супероксиддисмутазы – Cu,Zn-СОД (*SOD1*), Mn-СОД (*SOD2*), экстрацеллюлярной СОД – Э-СОД (*SOD3*), каталазы (*CAT*), глутатионпероксидазы 4 (*Gpx4*), каспазы-3 (*CASP3*) выполняли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green («Molecular probes», США) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ производства «SYNTOLE» (Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовался прибор iQ5 real-time PCR detection system («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве гена сравнения использовали β -актин (*BACT*). Специфические праймеры подбирали с помощью программы Primer BLAST и Primer 3.

ПЦР-РВ проводили при условиях: 1-й этап – 95 °C 300 с, 2-й этап – 58(60) °C 50 с (детекция флуоресценции), 3-й этап – 95 °C 15 с с переходом на шаг № 2. Этап 2 и 3 повторяли 40 раз, после завершения данной операции получали графики изменения флуоресценции со временем. Специфичность получаемого продукта амплификации проверяли с помощью кривых плавления продуктов ПЦР.

Ткань мозга гомогенизировали в соотношении 1 : 10 (масса/объем) в буфере, состоявшем из 100 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,5 мМ ЭДТА в гомогенизаторе Potter S (тефлон-стекло) со скоростью 1500 об/мин. Часть полученных гомогенатов обрабатывали Triton X-100 (конечная концентрация 0,1%) и инкубировали в течение 10 мин при 37 °C, затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Полученный супернатант использовали для определения активности ферментов.

О состоянии антиоксидантной системы судили по активности супероксиддисмутазы (SOD) [9], каталазы [10], глутатион-зависимой антиоксидантной системы [11]. Определяли активность глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST), содержание восстановленного глутатиона (GSH). Определение активности каспазы-3 проводили с помощью набора «Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric» («Sigma», США). В гомогенатах, не обработанных детергентом, определяли интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по накоплению молекулярных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) [12], малонового диальдегида (МДА) [13], шиффовых оснований [14]. Хлороформный экстракт готовили по методу Bligh и Dyer [15].

Статистический анализ данных проводился при помощи пакета программ Statistica 10 («Stat-Soft»). Проверка нормальности распределения проводилась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующими попарными сравнениями групповых средних (Newman–Keuls test). Множественную линейную регрессию, с включением всех предикторов, использовали для оценки потенциальной взаимосвязи между зависимой переменной – экспрессией гена *CASP3* – и экспрессией гена *Nrf2* и Nrf2-контролируемыми генами антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *GPx4*, *CAT*). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. При $0,05 < p < 0,1$ рассматривали тенденцию к достоверности различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, что в физиологических условиях применение SkQ1 (50 нмоль/кг, 5 дней) приводит к повышению более, чем вдвое, транскрипционной активности гена *Nrf2* в коре больших полушарий мозга крыс. Влияние SkQ1 на уровень мРНК фактора транскрипции в условиях нормы статистически значимо и на 121% ($F = 13,95$; $p = 0,001$) превышает контроль. В этих же условиях наблюдается повышение уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов: *SOD1* – на 41% ($F = 13,95$; $p = 0,0004$), *SOD2* – на 50% ($F = 9,7$; $p < 0,003$), *CAT* – на 62% ($F = 10,66$; $p < 0,002$), *GPx4* – на 58% ($F = 7,81$; $p = 0,007$) на фоне стационарного уровня мРНК гена *SOD3*. Это свидетельствует о повышении уровня экспрессии гена *Nrf2*, способного регулировать собственную транскрипцию и транскрипцию *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов. Как было показано ранее [16, 17], SkQ1 повышает экспрессию гена *Nrf2* в лейкоцитах периферической крови крыс в физиологических условиях и при окислительном стрессе, индуцированном гипероксией, тем самым оказывая стимулирующее действие на сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE.

В настоящее время открыты различные индукторы *Nrf2*, среди которых важнейшая группа – хиноны природного происхождения (флавоноиды, куркумин, ресвератрол, пластохинон и др.) [6, 18]. Многие авторы указывают, что наличие ОН-групп в орто- и пара-положении в структуре фенольных антиоксидантов обуславливает их стимулирующее влияние на *Nrf2* [18]. Именно такое положение ОН-групп характерно для SkQ1, содержащего в своем составе пластохинон (производное 1,4-бензохинона) [19]. Как известно, антиоксидантные свойства фенольных соединений связаны, в первую очередь, с наличием в их структуре ОН-групп. Можно полагать, что благодаря хинонной составляющей в молекуле SkQ1, последний может индуцировать *Nrf2*. Важно подчеркнуть, что в промоторной области гена *Nrf2* имеются две ARE-подобные последовательности. Вследствие этого *Nrf2* способен регулировать собственную транскрипцию и транскрипцию *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов через антиоксидант-респонсивные элементы (ARE), которые содержатся в промоторах как *Nrf2*, так и ARE-контролируемых генов [20, 21]. Наличие петли положительной обратной связи внутри сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE существенно повышает чувствительность системы и мощность клеточных защитных механизмов [22].

Известно, что *Nrf2* (NF-E2-related factor 2) относится к семейству Cap'n'Collar (CNC), входит в большую группу ДНК-связывающих белков с «лейциновой молнией» bZIP [1] и широко экспрессируется в различных тканях, и, в том числе, в мозге [23]. *Nrf2* контролирует как базальную экспрессию генов в условиях гомеостаза, так и индуцибельную экспрессию множества генов при нарушениях редокс-баланса и развитии окислительного/электрофильного стресса [3].

Действительно индуцированное SkQ1 повышение экспрессии *Nrf2* в коре больших полушарий мозга в физиологических условиях стимулирует увеличение содержания мРНК *Nrf2*-регулируемых генов антиоксидантных ферментов, что может способствовать повышению антиоксидантного потенциала клеток нервной ткани. Установлено, что введение животным SkQ1 в течение 5 дней в условиях физиологической нормы приводит к активации антиоксидантных ферментов в больших полушариях мозга. Показано, что активность SOD повышается на 50% ($F = 32,86$; $p < 0,0001$), каталазы – на 53% ($F = 41,2$; $p < 0,0001$), GPx – на 63% ($F = 23,6$; $p < 0,0001$), GST – на 55% ($F = 23,0$; $p < 0,0001$) относительно контроля, при этом уровень восстановленного глутатиона (GSH) возрастает на 39% ($F = 10,77$; $p = 0,002$). Это имеет особое значение, так как мозг весьма чувствителен к окислительному стрессу, и окислительная модификация компонентов клеток нервной ткани может развиваться как при острых повреждениях, так и хронических расстройствах ЦНС [23].

Полученные результаты показывают, что применение SkQ1 в течение 5 дней в условиях нормы не вызывает изменения интенсивности ПОЛ в больших полушариях мозга.

В данном исследовании после ГБО-индуцированного окислительного стресса (0,5 МПа, 90 мин) выявлено снижение на 23% ($F = 11,83$; $p < 0,001$) транскрипционной активности гена *Nrf2* в мозге крыс. В нашей работе [17], выполненной ранее, также показано ингибирование экспрессии гена *Nrf2* в лейкоцитах крови крыс при ГБО. Снижение экспрессии гена фактора транскрипции при гипероксии вследствие повышенной дегградации *Nrf2*, в свою очередь, неизбежно уменьшит его способность к аутоактивации и ауторегуляции, связанные с наличием в его промоторном регионе ARE-элементов [20]. В исследовании [24] на хромосоме 2 был идентифицирован локус 1, чувствительный к гипероксии, содержащий ген-кандидат *Nrf2*, кодирующий транскрипционный фактор *Nrf2*. Доказано, что мыши с нокаутированным геном *Nrf2* более чувствительны к повреждению легких и клеточной гибели, индуцированных гипероксией, чем дикий тип животных [25]. В то же время при ГБО содержание мРНК генов антиоксидантных ферментов (*SOD1-3*, *CAT*, *GPx4*) незначительно изменяется относительно контроля. Следует отметить, что в исследовании [26] при действии нормобарической гипероксии (95% O₂, 18 ч) также обнаружено существенное снижение экспрессии гена *Nrf2* и отсутствие изменений транскрипционной активности генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *HO1*) в мозге самцов мышей CBA/H. Очевидно, что уровень экспрессии генов, регулирующих состояние антиоксидантной системы, в значительной степени зависит от выраженности окислительного стресса, типа ткани, ее метаболического статуса, взаимодействия сигнальных путей и многих других факторов.

При окислительном стрессе, вызванном ГБО (через 12 ч после воздействия), на фоне незначительных изменений активности СОД наблюдается снижение на 18% активности каталазы ($F = 11,49$; $p < 0,001$), повышение на 18% активности GST ($F = 8,06$; $p < 0,01$) относительно контрольной группы животных, т.е. наблюдается

дисбаланс компонентов антиоксидантной системы. Как правило, нарушение сопряженности функционирования антиоксидантной системы в мозге и других тканях выражено в значительно большей степени сразу после действия гипероксии, чем в течение постгипероксического периода [7].

После ГБО-индуцированного окислительного стресса в мозге крыс наблюдается интенсификация ПОЛ. В группе «ГБО» содержание первичных молекулярных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов – повышается на 30% ($F = 18,93$; $p < 0,0001$), промежуточного продукта ПОЛ – МДА – на 42% ($F = 12,95$; $p < 0,001$), конечных продуктов ПОЛ – шиффовых оснований – на 18% ($F = 7,02$; $p = 0,015$) относительно контроля.

Предварительное введение SkQ1 (50 нмоль/кг) в течение 5 дней перед сеансом ГБО приводит к достоверному повышению уровня мРНК как гена *Nrf2*, так и *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов в коре больших полушарий мозга. Установлено, что в группе «SkQ1 + ГБО» уровень мРНК *Nrf2* повышается на 41% ($F = 16,14$; $p < 0,0003$) по сравнению с контролем и вдвое превышает ее содержание относительно группы «ГБО» ($F = 7,12$; $p = 0,0012$), в которой не применялся препарат перед действием гипероксии. Повышение экспрессии *Nrf2* в постгипероксический период сопровождается достоверным возрастанием уровня мРНК *Nrf2*-контролируемых генов антиоксидантных ферментов: *SOD1* – на 54% ($F = 9,04$; $p = 0,005$), *SOD2* – на 48% ($F = 5,12$; $p = 0,03$), *CAT* – на 39% ($F = 3,08$; $0,05 < p < 0,1$), *GPx4* – на 44% ($F = 3,97$; $p = 0,05$) относительно контроля. Следует отметить, что уровень мРНК генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx4* достоверно возрастает на 29–72% относительно группы животных, которым не применяли SkQ1 перед воздействием ГБО (группа «ГБО»), что свидетельствует о стимулирующем эффекте препарата. При этом содержание мРНК *SOD3* в этих условиях изменяется незначительно.

Повышение уровня экспрессии *Nrf2* и *Nrf2*-регулируемых генов при введении животным SkQ1 в течение 5 дней перед сеансом ГБО приводит к активации антиоксидантных ферментов в больших полушариях мозга. Показано, что активность SOD возрастает на 43% ($F = 22,72$; $p < 0,0001$), каталазы – на 27% ($F = 7,95$; $p = 0,01$), GPx – на 65% ($F = 29,78$; $p < 0,0001$), глутатион-S-трансферазы – на 25% ($F = 13,76$; $p < 0,001$) и уровень GSH увеличивается на 35% ($F = 10,76$; $p = 0,003$) в больших полушариях мозга крыс относительно контроля. При этом в данной группе животных («SkQ1 + ГБО») активность антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, GPx) достоверно увеличивается на 27–55% и в два раза возрастает уровень GSH по сравнению с группой «ГБО», которой предварительно не применяли SkQ1, что указывает на эффект препарата. Это существенно повышает антиоксидантный потенциал мозга в постгипероксический период и способствует поддержанию стационарного уровня ПОЛ, что свидетельствует об эффективности применения SkQ1 в условиях окислительного стресса, вызванного гипероксией.

При ГБО в группе с предварительным введением SkQ1 интенсивность ПОЛ в больших полушариях мозга поддерживается на стационарном уровне, но достоверно снижается относительно группы «ГБО», т.е. группы животных, не получавших SkQ1 перед сеансом гипероксии. Уровень ДК снижается на 24% ($F = 6,46$; $p = 0,015$), МДА – на 25% ($F = 6,39$; $p = 0,015$), в содержании ШО наблюдается тенденция к снижению ($0,05 < p < 0,1$) по сравнению с группой «ГБО». Таким образом, дисперсионный анализ показывает достоверные различия в содержании продуктов ПОЛ: увеличение их уровня относительно контроля при гипероксии и снижение их содержания в группе «SkQ1 + ГБО» по сравнению с группой «ГБО», что свидетельствует о достоверном эффекте SkQ1.

Таким образом, предварительное применение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней в физиологических условиях и перед действием ГБО стимулирует защитную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE путем стимуляции экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов и повышения их активности.

В проведенном исследовании установлено, что в физиологических условиях применение митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 не приводит к изменению экспрессии гена *CASP3* и активности каспазы-3 в клетках коры головного мозга крыс. Каспаза-3 – внутриклеточная эффекторная протеаза, содержащая активированный цистеин внутри высоко консервативного активного сайта, что определяет связывание субстрата и его гидролиз после аспартата. Фермент локализован в цитоплазме и межмембранном пространстве митохондрий, он является центральным эффектором многих апоптотических путей и фактором терминальной стадии апоптотической гибели нервных и глиальных клеток [27]. Ген *CASP3* локализован в четвертой хромосоме (4q35.1), его промотор лишен ТАТА-бокса и содержит сайты связывания различных факторов транскрипции, регулирующих экспрессию гена [28]. Выявлена многоуровневая регуляция активности каспаз, включая транскрипцию, протеолитический процессинг, модуляцию энзиматической функции и деградацию [27].

При окислительном стрессе, вызванном ГБО (0,5 МПа, 90 мин, через 12 ч после действия) в клетках коры больших полушарий мозга содержание мРНК *CASP3* увеличивается на 57% ($F = 9,96$; $p = 0,0002$) по сравнению с нормой. Это может свидетельствовать о стимуляции экспрессии гена эффекторной каспазы-3, которая способна к расщеплению множества жизненно важных белковых субстратов клетки в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса. При этом в условиях ГБО найдено достоверное увеличение на 89% ($F = 62,15$; $p < 0,0001$) активности каспазы-3 в коре полушарий мозга относительно контроля.

Очевидно, что повышение транскрипционной активности гена эффекторной каспазы-3 в условиях окислительного стресса может быть следствием различных причин, среди которых важное место принадлежит факторам транскрипции, регулирующим экспрессию гена. Анализ промотора гена *CASP3* выявил сайты связывания для различных факторов транскрипции: кластеров Sp1, Ets1-подобных элементов [28], AP1, NF-kB, p53 и др. [29]. В то же время в условиях гипероксии показана активация этих и других транскрипционных

факторов, которые могут активировать ген *CASP3* и способствовать повышению интенсивности апоптоза [30]. Снижение транскрипционной активности гена *Nrf2* в коре больших полушарий мозга крыс при ГБО также может способствовать усилению запрограммированной гибели клеток. Поскольку известно, что антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) в своих промоторах содержат ARE-последовательности, с которыми связывается транскрипционный фактор Nrf2, регулируя их экспрессию [31]. Дефицит антиапоптотических белков семейства Bcl-2 может приводить к повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий (MOMP), выходу цитохрома c, образованию апоптосомы и запуску каспазного каскада с последующим расщеплением и активацией каспазы-3.

Предварительное применение SkQ1, катионного производного пластохинона, в течение 5 дней перед действием гипероксии способствует сохранению уровня экспрессии гена *CASP3* и активности каспазы-3, которые характерны для нормы. Этот результат заслуживает особого внимания, вследствие того, что поддержание базального уровня активности каспаз в условиях окислительного стресса относится к перспективным стратегиям нейропротекции. Можно полагать, что одной из причин нормализующего влияния SkQ1 на экспрессию гена *CASP3* и активность фермента в мозге крыс при ГБО-индуцированном окислительном стрессе является активация транскрипционной активности гена *Nrf2* и Nrf2-контролируемых генов антиоксидантных ферментов. Это, с одной стороны, приводит к снижению уровня окислительного стресса, вызванного ГБО, и нормализации транскрипционной активности гена *CASP3*, который, как известно, активируется редокс-чувствительными факторами транскрипции. С другой стороны, повышение экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, регулируемых Nrf2, предотвращает формирование апоптосомы, где по механизму индуцированного сближения активируется каспаза-9, активирующая затем каспазу-3.

Таким образом, антиапоптотический эффект SkQ1 в ткани мозга при гипероксии связан с предотвращением повышения экспрессии гена *CASP3* в коре и активности эффекторной каспазы в кортикальных отделах мозга. Протекторное действие SkQ1 при ГБО-индуцированном стрессе опосредуется разнообразным спектром антиоксидантных эффектов и стимуляцией антиапоптотических факторов.

Далее с помощью линейной множественной регрессии был проведен анализ потенциальной взаимосвязи между экспрессией гена *CASP3* и уровнями экспрессии *Nrf2* и Nrf2-контролируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *Gpx4*, *CAT*) в качестве возможных предикторов. Наиболее значимой ($R = 0,750$, $R^2 = 0,562$) из всех возможных регрессионных моделей оказалась модель, в которой оценивалось вероятное влияние предикторов на уровень экспрессии гена *CASP3* в гипероксических условиях (табл. 1). Из таблицы 1 видно, что из пяти генов-предикторов значимое влияние на уровень экспрессии *CASP3* при гипероксии могут оказать два – транскрипционный уровень генов *CAT* и *Gpx4*. При этом, с активацией экспрессии *CASP3* связано снижение экспрессии гена *CAT* ($B = -3,43$; 95% CI (-6,74 и -0,13), $p = 0,043$) и, напротив, повышение экспрессии гена *Gpx4* ($B = 0,16$, 95% CI (0,04 и 0,27), $p = 0,013$). Остальные проанализированные регрессионные модели не включали значимых предикторов и характеризовались низкими коэффициентами детерминации. Проведение регрессионного анализа позволило выявить определенную взаимосвязь уровня экспрессии гена *CASP3* и генов антиоксидантных ферментов. Обратная зависимость экспрессии генов *CASP3* и *CAT* при гипероксии может быть обусловлена важнейшей ролью гидропероксида (H_2O_2) в индукции апоптоза [32]. С другой стороны, не исключено, что прямая взаимосвязь между экспрессией генов *CASP3* и *Gpx4* является компенсаторной реакцией генома на окислительный стресс при гипероксии. Известно, что *Gpx4* синтезируется как короткая (20 кДа) и длинная (23 кДа) изоформы, причем последняя локализована в митохондриях и играет ведущую роль в защите клетки от окислительного стресса и апоптоза [33]. Показано, что делеция гена *Gpx4* у мышей вызывает не только эмбриональную и неонатальную летальность, но и гибель взрослых животных. Кроме того, у мышей, дефицитных по *Gpx4*, наблюдалась митохондриальная дисфункция, повышенный уровень апоптоза и нейродегенерация [34].

Таким образом, защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

Таблица 1. Результаты регрессионного анализа: модель, в которой зависимой переменной является уровень экспрессии гена *CASP3* при гипероксии, в качестве независимых предикторов – уровни экспрессии генов *Nrf2*, *SOD1*, *SOD2*, *Gpx4* и *CAT*

Предиктор	В-коэффициент	SE(B) ¹	β-коэффициент	t	p	95% CI для В	
						Нижняя граница	Верхняя граница
(Константа)	0,149	0,036		4,164	0,001	0,071	0,227
<i>Nrf2</i>	-3,371	3,176	-0,215	-1,061	0,309	-10,290	3,548
<i>SOD1</i>	0,059	0,091	0,126	0,642	0,533	-0,140	0,257
<i>SOD2</i>	-0,320	0,241	-0,445	-1,329	0,208	-0,844	0,204
<i>CAT</i>	-3,431	1,517	-0,542	-2,261	0,043	-6,736	-0,125
<i>Gpx4</i>	0,156	0,054	0,819	2,894	0,013	0,038	0,273

*Значимые предикторы выделены жирным шрифтом ($p < 0,05$)

¹ – Стандартная ошибка В-коэффициента

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП "Высокие технологии" ЮФУ в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ, проект № 6.6762.2017/БЧ.

Список литературы / References:

1. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, no. 6. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
2. Holmström K.M., Baird L., Zhang Y., Hargreaves I., Chalasani A., Land J.M., Stanyer L., Yamamoto M., Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biology Open*, 2013, vol. 2, no. 8, DOI: 10.1242/bio.20134853.
3. Tebay L.E., Robertson H., Durant S.T., Vitale S.R., Penning T.M., Dinkova-Kostova A.T., Haye J.D. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, pt. B, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
4. Sinha K., Das, J., Pal P.B., Sil P.C. Oxidative stress: the mitochondria dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis, *Arch. Toxicol.*, 2013, vol. 87, no. 7, DOI: 10.1007/s00204-013-1034-4
5. Redza-Dutordoir M., Averill Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1863, no. 12, DOI: 10.1016/j.bbamer.
6. Gore A., Muralidhar M., Espey M.G., Degenhardt K., Mantell L.L. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease, *J. Immunotoxicol.*, 2010, vol. 7, no. 4, DOI: 10.3109/1547691X.2010.492254
7. Лукаш А.И., Внуков В.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Кваша П.Н. Металлосодержащие соединения плазмы крови при гипербарической оксигенации. (Экспериментальные и клинические аспекты), Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1996, 107 с. [Lukash A.I., Vnukov V.V., Ananyan A.A., Milyutina N.P., Kvasha P.N. Metal-containing compounds of blood plasma during hyperbaric oxygenation. (Experimental and clinical aspects), Rostov-on-Don: RSU, 1996, 107 p. (In Russ.)]
8. Chistyakov V.A., Serezhnikov V.A., Alexandrova A.A., Milyutina N.P., Prokof'ev V.N., Mashkina E.V., Gutnikova L.V., Dem'yanenko S.V. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on contents of steroid hormones and NO level in rats, *Biochemistry (Moscow)*, 2010, vol. 75, no. 11. DOI: 10.1134/S0006297911060150.
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопр. мед. химии*, 1999, т. 45, с. 14-15. [Sirota T.V. New approach to investigation of autooxidation of adrenaline and its use for change of superoxide dismutase. *Vopr. Med. Khim.*, 1999, vol. 45, pp. 14-15. (In Russ.)]
10. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. A method for determination of catalase activity, *Lab. Delo*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб: ИКФ «Фолиант», 2000, 104 с. [Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. *Metodi otsenki svobodnoradikalnogo okisleniya i antioksidantnoi sistemi organizma. Metodicheskie rekomendatsii* (Methods for assessing free radical oxidation and the body's antioxidant system. Guidelines), SPb: IKF "Foliant", 2000, 104 p. (In Russ.)]
12. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. *Современные методы в биохимии* (под ред. В.Н. Ореховича), М.: Медицина, 1977, с. 63–64. [Stalnaya I.D. Method for determination of diene conjugation of unsaturated higher fatty acids. *Modern methods in biochemistry* (V.N. Orechovich, ed.), M.: Medicine, 1977, pp.63-64. (In Russ.)]
13. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малоновой диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии* (под ред. В.Н. Ореховича), М.: Медицина, 1977, с. 66-68. [Stalnaya I.D., Garishvily T.G. Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry* (V.N. Orechovich, ed.), M.: Medicine, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]
14. Bidlack, W.R., Tappel, A.T. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids*, 1973, vol. 8, no. 4. DOI: 10.1007/BF02544636.
15. Bligh, E., Dyer, W. Rapid method of lipids extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, no. 8. DOI: 10.1139/o59-099.
16. Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milyutina N.P., Ananyan A.A., Danilenko A.O., Panina S.B., Kornienko I.V. Influence of SkQ1 on Expression of Nrf2 Transcription Factor Gene, ARE-Controlled Genes of Antioxidant Enzymes and Their Activity in Rat Blood Leukocytes. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no. 5. DOI: 10.1134/S0006297915050107.
17. Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milyutina N.P., Kornienko I.V., Ananyan A.A., Danilenko A.O., Panina S.B., Plotnikov A.A., Makarenko M.S. Influence of SkQ1 on Expression of Nrf2 Gene, ARE-Controlled Genes of Antioxidant Enzymes and Their Activity in Rat Blood Leukocytes under Oxidative Stress. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no.12, DOI: 10.1134/S0006297915120081.
18. Forman H.J., Davies K.J.A., Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and parahormesis versus free radical scavenging *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, vol. 66, SI. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045.

19. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Muntyan M.S., Nepryakhina O.K., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Pustovidko A.V., Roginsky V.A., Rokitskaya T.I., Ruuge E.K., Saprunova V.B., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev I.V., Skulachev M.V., Sumbatyan N.V., Sviryaeva I.V., Tashlitsky V.N., Vassiliev J.M., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zamyatin A.A., Jr., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, vol. 73, no. 12, DOI: 10.1134/S0006297908120018.
20. Kwak M.K., Itoh K., Yamamoto M., Kensler T.W. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the *nrf2* promoter. *Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 22, no. 9, DOI: 10.1128/mcb.22.9.2883-2892.2002.
21. Harder B., Jiang T., Wu T., Tao S., Rojo de la Vega M., Tian W., Chapman E., Zhang D.D. Molecular mechanisms of *Nrf2* regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention. *Biochem. Soc. Trans.*, 2015, vol. 43, no. 4, DOI: 10.1042/BST20150020.
22. Bryan H.K., Olayanju A., Goldring C.E., Park B.K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 2013, vol. 85, no. 4, DOI: 10.1042/BST20150020.
23. Sandberg M., Patil J., D'Angelo B., Weber S.G., Mallard C. NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology*, 2014, vol. 79, SI, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.004.
24. Cho H.-Y., Jedlicka A.E., Reddy S.P., Zhang L.Y., Kensler T.W., Kleeberger S.R. Linkage analysis of susceptibility to hyperoxia. *Nrf2* is a candidate gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2002, vol. 26, no. 1, DOI: 10.1165/ajrcmb.26.1.4536.
25. Reddy S.P. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Curr. Mol. Med.*, 2008, vol. 8, no. 5.
26. Saric A., Sobocanec S., Safranko Z.M., Hadzija M.P., Bagaric R., Farkas V., Svarc A., Marotti T., Balog T. Diminished resistance to hyperoxia in brains of reproductively senescent female CBA/H mice. *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, 2015, vol. 21, no. 9, DOI: 10.12659/MSMBR.895356.
27. Parrish A.B., Freil C.D., Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013, vol. 5, no. 6, DOI: 10.1101/cshperspect.a008672.
28. Liu W., Wang G., Yakovlev F.G. Identification and functional analysis of the rat caspase-3 gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 10, DOI: 10.1074/jbc.M110768200.
29. Song B., Xie B., Wang C., Li M. Caspase-3 is a target gene of c-Jun: ATF2 heterodimers during apoptosis induced by activity deprivation in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.*, 2011, vol. 505, no. 2, DOI: 10.1016/j.neulet.2011.09.060.
30. Terraneo L., Samaja M. Comparative response of brain to chronic hypoxia and hyperoxia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 9, DOI: 10.3390/ijms18091914.
31. Niture S.K., Jaiswal A.K. Nrf2 protein upregulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 13, DOI: 10.1074/jbc.M111.312694.
32. Zhang L., Wang K., Lei Y., Li Q., Nice E.C., Huang C. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 89, no. 12, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
33. Liang H., Ran Q., Jang Y.C., Holstein D., Lechleiter J., McDonald-Marsh T., Musatov A., Song W., Van Remmen H., Richardson A. Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, vol. 47, no. 3, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
34. Yoo S.-E., Chen L., Na R., Liu Y., Rios C., Van Remmen H., Richardson A., Ran Q. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, vol. 52, no. 9, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.

THE ROLE OF MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SkQ1 IN REGULATION OF SIGNAL SYSTEM KEAP1/Nrf2/ARE AND APOPTOSIS IN THE BRAIN UNDER OXIDATIVE STRESS**Vnukov V.V.¹, Gutsenko O.I.¹, Milyutina N.P.¹, Ananyan A.A.¹, Kornienko I.V.², Plotnikov A.A.¹**¹ Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology

Stachky av., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: natmilut@rambler.ru

² Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

Chechov str., 41, Rostov-on-Don, 344006, Russia

Abstract. The administration of SkQ1 (50 nmol/kg for 5 days) significantly increased mRNA level of transcription factor *Nrf2* and *Nrf2*-controlled genes encoding antioxidant enzymes *SOD1*, *SOD2*, and *CAT* with inconsiderable changes in mRNA level of *SOD3* and *GPx4* in the cerebral cortex of rat brain. This was accompanied by the activation of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GST) and increase in reduced glutathione level. Hyperoxia-induced oxidative stress (0.5 Pa for 90 min) decreased the mRNA level of transcription factor *Nrf2*; the changes in transcriptional activity of *Nrf2*-induced genes encoding antioxidant enzymes (*SOD1-3*, *CAT*, *GPx4*) were insignificant in rat cerebral cortex. Hyperoxia resulted in increased lipid peroxidation intensity, inhibition of CAT, and increase in GST activity, and maintenance of stationery level of SOD and GPx activity in rat cerebral cortex. Pretreatment with SkQ1 before hyperoxic exposure lead to increase in mRNA level of transcription factor *Nrf2* and *Nrf2*-induced genes encoding antioxidant enzymes *SOD1-2*, *CAT*, and *GPx4*; *SOD3* expression was unchanged in the cerebral cortex under oxidative stress. The activity of these antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GST) and reduced glutathione level were concurrently increased. The effect of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on the level of expression of the *CASP3* gene and the caspase-3 activity in the cortex of the cerebral hemispheres was studied in normal conditions and in HBO-induced oxidative stress. It was found that under physiological conditions the applying of SkQ1 (50 nmol/kg, 5 days) does not lead to a change in the expression of the *CASP3* gene and caspase-3 activity in the cells of the cerebral cortex. In HBO-induced oxidative stress (0.5 MPa, 90 min), a significant increase in the mRNA level of the *CASP3* gene and caspase-3 activity in the cortex of the cerebral hemispheres was revealed. The preliminary applying of SkQ1 before the HBO session promotes maintaining the basal level of expression of the *CASP3* gene and the activity of the enzyme in the cells of the cerebral cortex and also leads to the normalization of caspase-3 activity. We suggest that the protective effect of SkQ1 under hyperoxia-induced oxidative stress may be realized via direct antioxidant activity, the activation of defense system Keap1/Nrf2/ARE and stimulation of antiapoptotic mechanisms.

Key words: oxidative stress, hyperoxia, mitochondria-targeted antioxidant, brain, gene expression, antioxidant enzymes, caspase-3.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ИМПУЛЬСНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ

Роденко Н.А., Васильева Т.И., Беляева И.А.

Самарский университет

ул. Московское шоссе, 34, г. Самара, 443086, РФ e-mail: t.rodenco@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2019

Аннотация. В работе рассматривается изменение антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли и антиагрегационной активности пентоксифиллина при воздействии на лекарственные препараты импульсным магнитным полем (ИМП) высокой напряженности. Обнаружено усиление антибактериальных свойств бензилпенициллина и антиагрегационной активности пентоксифиллина, облученных импульсным магнитным полем при определенных значениях напряженности, частоты и количества импульсов. Выдвинута гипотеза повышения антибактериальной и антиагрегационной активности облученных лекарственных препаратов, являющихся антиметаболитами, связанная с изменением конформации молекул и увеличением их сродства к активному центру соответствующих ферментов. Проведены исследования по изучению безопасности облучения бензилпенициллина натриевой соли и пентоксифиллина ИМП. Изучались влияние импульсного магнитного поля на возможность образования свободных радикалов данных лекарственных препаратов и острой токсичности при внутрибрюшинном введении мышам бензилпенициллина натриевой соли и пентоксифиллина до и после обработки импульсным магнитным полем с расчетом и сопоставлением показателей LD₅₀.

Ключевые слова: бензилпенициллина натриевая соль, пентоксифиллин, антибактериальная активность, антиагрегационная активность, импульсное магнитное поле.

В большом количестве работ представлены данные о воздействии постоянного и переменного магнитного поля на простые молекулы, воду, полимеры и другие биологические системы [1-8].

В последнее время в технике получают применение ИМП для осуществления операций штамповки, сборки, сварки [9]. В этих технологиях используются ИМП, возникающие в результате разряда батареи конденсаторов на индуктор (катушку) [10]. Вокруг витков токопровода индуктора возникает и распространяется ИМП.

При реализации магнитно-импульсных технологий используют многократное нагружение однократными импульсами синусоидальной формы с различными временными интервалами в пачке.

Цель настоящего исследования – изучение влияния ИМП высокой напряженности на антибактериальную и антиагрегационную активность лекарственных препаратов и исследование безопасности применения.

Бензилпенициллина натриевая соль и пентоксифиллин облучались импульсным магнитным полем с параметрами напряжения от 0,45 до 6,14 кДж и различным количестве импульсов, используя индукторы – одновитковый и многовитковый.

На рисунке 1 представлена схема воздействия ИМП на лекарственные препараты, размещенные в стандартном флаконе. Стенд для проверки предлагаемого способа, содержит индуктор 1, генератор импульсного тока 2, датчик импульсного магнитного поля (ИМП) 3 и осциллограф 4. Датчик ИМП 3 подключен к осциллографу 4. В индуктор 1 устанавливают флакон 5 с бензилпенициллина натриевой солью (6), после чего проводится её обработка ИМП.

Оценка **антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли** осуществлялась методом диффузии агар [11]. Последовательность процесса подготовки и проведения экспериментов с облученной бензилпенициллина натриевой солью приведена на рисунке 2.

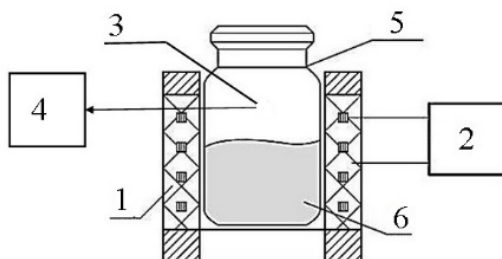


Рисунок 1. Схема воздействия ИМП на бензилпенициллина натриевую соль

Воздействие ИМП на порошок или раствор антибиотика.	Разведение антибиотика до нужной концентрации, распределение по поверхности чашки Петри по 0,1 мл инокулянта <i>Escherichia coli</i> .	Размещение дисков на поверхности чашки и нанесение на них 10 мкл раствора антибиотика.	Размещение чашек Петри в термостат при температуре 30 °С в течение 18 часов.	Измерение зон лизиса.
---	--	--	--	-----------------------

Рисунок 2. Процесс подготовки и проведения экспериментов

Антиагрегационная активность пентоксифиллина изучалась методом тромбоэластометрий [12]. Оценивалось влияние обработки магнитным полем разных характеристик пентоксифиллина на изменение механико-физических характеристик прочности сгустка методом тромбоэластографий. Эксперименты в условиях *in vitro* выполнены на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет. Общее количество доноров составило 12 человек.

Изучение появления свободных радикалов в облученных препаратах оценивали в простых модельных системах, имитирующих наиболее распространенные реакции свободно-радикального окисления в организме и в средах, в которых инициировалось образование активных форм кислорода и реакции перекисного окисления липидов. Регистрацию свечения проводили на хемилюминомере «ХЛМ-003» (Россия). В качестве препарата сравнения была выбрана аскорбиновая кислота с антиоксидантной активностью. Для выявления активных форм кислорода использовали люминол (5-амино-2,3-дегидро-4-фталазиндион), который окисляется и образует электронно-возбужденные карбонильные хромофоры с высоким квантовым выходом, в результате чего резко повышается интенсивность свечения, связанного с образованием активных форм кислорода. Хемилюминесценцию регистрировали в течение 5 минут.

Для инициации активных форм кислорода (модель I) использовали 20 мл фосфатного буфера с добавлением цитрата и люминола. Состав буфера: 2,72 г. KH_2PO_4 , 7,82 г. KCl , 1,5 г. цитрата натрия $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ на 1 литр дистиллированной воды. Величину pH полученного раствора доводили до 7,45 ед. титрованием насыщенным раствором КОН и добавляли 0,2 мл маточного раствора люминола (10^{-5} М). Образование АФК инициировали введением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа.

Для оценки действия соединений на перекисное окисление липидов (модель II) из куриного желтка готовили липопротеиновые комплексы. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, затем гомогенизировали. Хемилюминесценцию инициировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа, запускавшего процесс окисления ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов. По интенсивности развивающегося свечения судили о процессах перекисного окисления липидов.

Проведение **токсикологических исследований** в условиях *in vivo* осуществляли на 80 белых мышах самцах в возрасте 2 месяцев со средней массой тела 20-21 г. при внутрибрюшинном способе введения. Животные прошли карантин в течение 14 дней в условиях отдельного бокса вивария. Температурный режим помещения вивария поддерживался от +18 до +22°C. Освещение вивария совмещенное (естественное и люминесцентное). Ежедневно в помещении вивария проводилась 20 мин. бактерицидная обработка стационарным настенным бактерицидным облучателем. Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам, получали набор натуральных продуктов (овощи, зерно) и стандартную диету, представленную в виде экструдированного гранулированного корма для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков).

При проведении исследований на белых беспородных мышах при внутрибрюшинном введении вещества исследовали в дозах 100, 150, 200, 250, 275, 300 мг/кг. Количество вводимого вещества рассчитывали по объему введенного раствора в зависимости от массы тела с учетом максимально допустимого количества жидкости. Контрольная (интактная) группа животных включена в эксперимент для проведения сравнительной оценки состояния и поведения этих особей и подопытных животных. Данная группа животных по окончании первых суток наблюдений исключалась из эксперимента. Наблюдение за опытными группами проводилось в течение 14 суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При обработке ИМП порошкообразного бензилпенициллина натриевой соли наблюдается рост диаметров лизиса на 12-24% и, следовательно, можно констатировать увеличение ее антибактериальной активности (рис. 3).

В результате экспериментальной работы по изучению антиагрегационной активности установлено, что обработка пентоксифиллина импульсным магнитным полем с напряжением $U = 3$ кВ способствует удлинению показателя R, ответственного за клоттинговую часть коагуляции, на 23,4% относительно интактного пентоксифиллина ($p < 0,05$). Сгусток по механико-физическим характеристикам становится рыхлым, неполноценным – показатель G снижается практически в 1,5 раза ($p < 0,001$), что приводит к смещению общего коагуляционного потенциала в сторону гипокоагуляции (CI принимает отрицательное значение) (табл. 1).

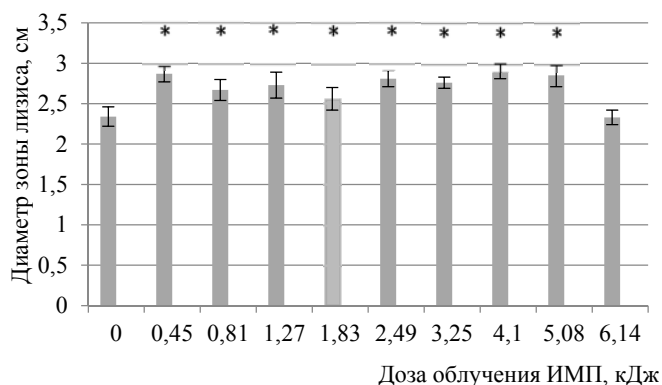


Рисунок 3. Диаметры зон подавления роста *E. coli* при воздействии бензилпенициллина натриевой соли, порошок, которого облучали ИМП с энергиями от 0,45 до 6,14 кДж при количестве импульсов 1 с одновитковым индуктором

Примечание: * - отличия диаметра зоны подавления роста *E. coli* при воздействии бензилпенициллина, облученного ИМП, от контроля достоверны с уровнем значимости $P < 0,05$

Проведены исследования изучению безопасности лекарственных препаратов. Изучалось образование свободных радикалов облученных лекарственных препаратов методом хемилюминесценции. Эксперименты осуществляли на простых модельных системах, имитирующих наиболее распространенные реакции свободно-радикального окисления в организме и в средах, в которых инициировалось образование активных форм кислорода и реакции перекисного окисления липидов. Регистрацию свечения проводили на хемилюминометре «ХЛМ-003» [13].

Установлено, что обработка импульсным магнитным полем лекарственных препаратов не вызывала активацию хемилюминесценции по сравнению с контролем, а значит образования свободных радикалов не происходило.

Изучалось изменение острой токсичности [14] бензилпенициллиновой соли под воздействием магнитного поля проведены на 80 белых мышах самцах в возрасте 2 месяцев со средней массой тела 20-21 г. при внутрибрюшинном способе введения. Результаты экспериментов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Показатели тромбоэластографии при действии пентоксифиллина в условиях *in vitro*, обработанным магнитным полем

Показатель	Контроль	Пент	Пент U=4 кв	Пент U=3 кв	Пент U=1 кв
R, min	12,8 (10,3-15,6)	14,6 (13,2-15,8)	13,8 (11,6-14,2)	17,5 (16,3-19,1)*, ^a	13,4 (12,6-14,3)
Angle, deg	44,7 (39,8-49,4)	33,7 (29,6-35,2)*	32,5 (31,5-35,3)*	33,1 (31,4-36,5)*	34,7 (32,1-36,5)*
MA, mm	57,3 (54,2-61,2)	41,8 (39,8-45,6)*	43,1 (40,8-46,9)*	42,6 (39,2-44,1)*	40,5 (38,6-42,3)*
G, dyn/cm ²	5,7 (4,5-8,1)	4,1 (3,6-4,4)**	3,7 (3,5-4,6)**	2,8 (2,6-3,1)**, ^б	3,9 (3,9-4,7)**
CI	1,4 (1,1-1,5)	0,5 (0,2-0,7)**	0,7 (0,3-0,9)**	-0,9 (-1,1 -0,5)**, ^б	0,8 (0,5-1,0)*

^a $p < 0,05$; ^б $p < 0,001$ - Пент. в сравнении с Пент. облуч. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ - в сравнении с контролем.

Таблица 2. Показатели острой токсичности бензилпенициллина натриевой соли до и после обработки антибиотика ИМП при внутрибрюшинном введении мышам

Шифр	Бензилпенициллина натриевая соль (порошок)	Бензилпенициллина натриевая соль (порошок) при напряженности $H = 3418 \cdot 10^3$ А/м
LD ₅₀ , мг/кг	145,7	144,3

Таблица 3. Показатели острой токсичности пентоксифиллина до и после обработки антибиотика ИМП при внутрибрюшинном введении мышам

Шифр	Пентоксифиллин (раствор)	Пентоксифиллин (раствор) H = 3418·10 ³ А/м
LD ₅₀ , мг/кг	253,4	247,9

Установлено, что обработка магнитным лекарственных препаратов не сопровождается увеличением токсичности.

ВЫВОДЫ

- 1) Обнаружено усиление антибактериального воздействия бензилпенициллина, облученного импульсным магнитным полем при определенных значениях напряженности, частоты и количества импульсов.
- 2) При облучении пентоксифиллина ИМП зафиксировано увеличение антиагрегационной активности.
- 3) В препаратах бензилпенициллина натриевой соли и пентоксифиллина после их облучения ИМП свободных радикалов не обнаружено.
- 4) Воздействие импульсным магнитным полем на бензилпенициллина натриевую соль и пентоксифиллин не сопровождается увеличением токсичности.

Список литературы / References:

1. Новиков В.В. Действие комбинированных магнитных полей с очень слабой переменной низкочастотной компонентой на люминолзависимую хемилюминесценцию крови млекопитающих. *Биофизика*, 2015. т. 60, № 3, с. 530-533. [Novikov V.V. The effect of combined magnetic fields with a very weak variable low-frequency component on the luminol-dependent chemiluminescence of mammalian blood. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 3, pp. 530-533. (In Russ.)]
2. Максимов Г.В., Наговицын А.В. Роль низкомолекулярных белков в реализации действия лазерного излучения и переменного магнитного поля на кровь. *Вестник Московского Университета*, 2009, № 3, с. 8-12. [Maksimov G.V., Nagovitsyn A.V. The role of low molecular weight proteins in the implementation of the action of laser radiation and an alternating magnetic field on blood. *Bulletin of Moscow University*, 2009, no. 3, pp. 8-12 (in Russ.)]
3. Pliss E.M. Magnetic field effect on the oxidation of organic substances by molecular oxygen. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2018, vol. 23, no. 16, pp. 3915-3927.
4. Усанов Д.А., Постельга А.Э., Усанов А.Д. Изменение диэлектрической проницаемости и тангенса угла диэлектрических потерь воды на СВЧ при совместном воздействии низкочастотного и постоянных магнитных полей. *Физика волновых процессов и радиотехнические системы*, 2009, т. 12, № 1, с. 34-38. [Usanov D.A., Postelga A.E., Usanov A.D. Change in the dielectric constant and the tangent of the dielectric loss angle of water on the microwave when combined with low-frequency and constant magnetic fields. *Physics of Wave Processes and Radio Engineering Systems*, 2009, vol. 12, no. 1, p. 34-38 (In Russ.)]
5. Песчанская С.Н., Синани А.Б. Влияние магнитного поля на скачки деформации наномасштаба в полимерах. *Физика твердого тела*, 2008, т. 50, № 1, с. 177-181. [Peschanskaya S.N., Sinani A.B. The effect of a magnetic field on jumps in the deformation of the nanoscale in polymers. *Solid State Physics*, 2008, vol. 50, no. 1, pp. 177-181. (In Russ.)]
6. Вшивков С.А., Русинова Е.В. Влияние магнитного поля на фазовые переходы в растворах производных целлюлозы. *Высокомолекулярные соединения*, 2008, т. 50, № 7, с. 1141-1149. [Vshivkov S.A., Rusinova E.V. The effect of a magnetic field on phase transitions in solutions of cellulose derivatives. *High Molecular Compounds*, 2008, vol. 50, no. 7, pp. 1141-1149. (In Russ.)]
7. Постников В.В. Качественная оценка возможного влияния слабого импульсного поля на микроструктуру биопластика. *Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения*, 2013, т. 13, № 2, с. 186-188. [Postnikov V.V. Qualitative assessment of the possible influence of a weak pulsed field on the microstructure of bioplastics. *Fundamental Problems of Radioelectronic Instrumentation*, 2013, vol. 13, no. 2, pp. 186-188 (In Russ.)]
8. Рыжаков В.В. Исследование влияния магнитных полей на кристаллизацию вязких сахаросодержащих сред. *Оборонный комплекс – научно-техническому прогрессу России*, 2011, № 1. с. 56-61. [Ryzhakov V.V. Investigation of the influence of magnetic fields on the crystallization of viscous sugar-containing media. *The defense complex - to the scientific and technological progress of Russia*, 2011, no. 1. pp. 56-61 (In Russ.)]
9. Глушченков В.А., Карпукхин В.Ф. *Технология магнитно-импульсной обработки материалов*. Самара: Изд-во Федоров, 2014, 208 с. [Glushchenkov V.A., Karpukhin V.F. *Technology of magnetic pulse processing of materials*. Samara: Fedorov Publishing House, 2014, 208 p. (In Russ.)]
10. Глушченков В.А. *Энергетические установки для магнитно-импульсной обработки материалов*. Самара: Изд-во Федоров, 2013, 123 с. [Glushchenkov V.A. *Power plants for magnetic pulse processing of materials*. Samara: Fedorov Publishing House, 2013, 123 p. (In Russ.)]
11. Кленова Н. А. *Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие*. Самара: Самарский университет, 2012, 102 с. [Klenova N. A. *Laboratory workshop in microbiology: textbook*. Samara: Samara University, 2012, 102 p. (In Russ.)]

12. Соболева Е.Н. Тромбоэластография как метод интегральной оценки системы гемостаза. *Первые шаги в науку*, 2011, № 1, с. 91-94. [Soboleva E.N. Thromboelastography as a method of integrated assessment of the hemostatic system. *First Steps in Science*, 2011, no. 1, pp. 91-94 (In Russ.)]

13. Фархутдинов Р.Р., Тевдорадзе С.И. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминомере ХЛ – 003. *Сборник докладов. Москва. Россия. 14-15 сентября 2004*. М.: Изд-во РУДН, 2005, с. 147-154 с. [Farkhutdinov R.P., Tevdoradze S.I. Methods for the study of the chemiluminescence of biological material on the chemiluminometer HL – 003. *Collection of reports. Moscow. Russia. September 14-15, 2004*. M.: Publishing House of RUDN, 2005, pp. 147-154 (In Russ.)]

14. Брагина И.В., Попова А.Ю. Оценка токсичности и опасности химических веществ их смесей для здоровья человека. М.: Роспотребнадзор, 2014, 638 с. [Bragina I.V., Popova A.Yu. *Assessment of toxicity and hazard of chemicals of their mixtures for human health*. M.: Rosпотребнадзор, 2014, 638 p. (In Russ.)]

POSSIBILITY OF APPLICATION OF MEDICINES AFTER THE IRRADIATION OF THE PULSE MAGNETIC FIELD OF HIGH STRENGTH

Rodenko N.A., Vasilyeva T.I., Belyaeva I.A.

Samara University

st. Moscow highway, 34, Samara, 443086, Russia; e-mail: t.rodenko@mail.ru

Abstract. This paper discusses the change in the antibacterial activity of benzylpenicillin sodium salt after the exposure of a pulsed magnetic field (IMP) of high intensity. An increase in the antibacterial effect of benzylpenicillin irradiated by a pulsed magnetic field at certain values of intensity, frequency and number of pulses were found. The impact of a pulsed magnetic field was carried out both on powdered benzylpenicillin sodium salt, and on the antibiotic, which is in solution. In addition, the effect of the storage time of irradiated powdered benzylpenicillin on the change in the diameters of growth suppression zones was studied. The object of the study was the bacteria *Escherichia coli*. Evaluation of the antibacterial effect was assessed by an increase in the lysis zones of *E. coli* compared with the control (not irradiated) material. Studies have been conducted to study the anti-aggregation activity of pentoxifylline irradiated with IMP. An increase in antiaggregation activity was recorded. The hypothesis of an increase in the antibacterial and antiaggregational activity of drugs under the influence of IMP, associated with a change in the conformation of molecules, has been put forward. The research has been conducted to study the safety of exposure of benzylpenicillin to sodium salt and pentoxifylline IMP. The effect of the pulsed electromagnetic field on the antioxidant activity of drugs was studied. The acute toxicity was studied when intraperitoneal administration of benzylpenicillin sodium salt and pentoxifylline to mice before and after treatment with a pulsed electromagnetic field with the calculation and comparison of LD₅₀ indices.

Key words: benzylpenicillin sodium salt, pentoxifylline, antibacterial activity, pulsed magnetic field, agar diffusion method.

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ПЛЕНОК

Васильева Т.И., Шарова Т.В., Хренова А.А., Глушников В.А., Кленова Н.А.

Самарский университет

ул. Московское шоссе, 34, г. Самара, 443086, РФ; e-mail: vastaty@rambler.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2019

Аннотация. Исследовано влияние импульсного магнитного поля при определенных его параметрах (напряженности H , частоте f , количестве импульсов n) на взаимодействие флавоноидов из водного растительного экстракта с макромолекулами бактериальной целлюлозной пленки. О том, что произошло связывание молекул флавоноидов с целлюлозой, судили по достоверному уменьшению концентрации флавоноидов в растворе растительного экстракта после воздействия на него импульсными магнитными полями, а также по дальнейшему вымыванию данных биологически активных веществ из высушенных пленок бактериальной целлюлозы. Была выдвинута гипотеза об усилении сорбционных свойств бактериальных целлюлозных пленок в условиях воздействия импульсных магнитных полей из-за увеличения подвижности микрофобрил целлюлозы.

Ключевые слова: импульсное магнитное поле, флавоноиды, бактериальная пленка, целлюлоза.

В настоящее время появилось достаточно большое количество работ по влиянию импульсных магнитных полей на химические и биологические системы, так в сильном магнитном поле возрастает сорбционная способность газов на полимерных пленках [1]. Обнаружен эффект упрочнения модифицированной древесины березы после импульсной обработки в слабом (до 0,5 Тл) магнитном поле с возникновением ковалентных связей С–О–С между боковыми группами макромолекул целлюлозы [2]. Бактериальная целлюлоза имеет уникальное строение, что позволяет в нее вводить разнообразные системы с сохранением высокой прочности на разрыв, она отличается химической чистотой, наличием мелких, равномерно расположенных пор, отсутствием токсичности и аллергенности [3,4]. Флавоноиды как вещества для абсорбции представляют собой особый особый интерес, так как они обладают антиоксидантным, противовоспалительным, капилляроукрепляющим действием [5].

Целью настоящей работы было изучение влияния ИМП высокой напряженности на интенсивность взаимодействия флавоноидов с матрицей – бактериальной целлюлозной пленкой.

Эксперименты проводились на научно-технических базах лабораторий кафедры «Обработка металлов давлением» и кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии Самарского университета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На рисунке 1 представлена схема воздействия ИМП на растительный экстракт и бактериальные пленки, размещенные в стандартном флаконе.

При этом использовалась магнитно-импульсная установка МИУ-15 [6], параметры которой приведены в таблице 1.

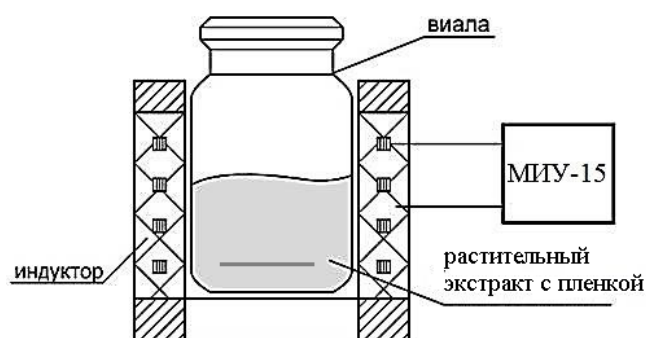


Рисунок 1. Схема воздействия ИМП на растительный экстракт с целлюлозной пленкой

Таблица 1. Параметры МИУ-15

Запасаемая энергия, W , кДж	Напряжение разряда, U , кВ	Собственная частота разрядного тока, f , кГц	C_0 , Мкф	L_0 , мкГн
18	1...20	55	100	0,09

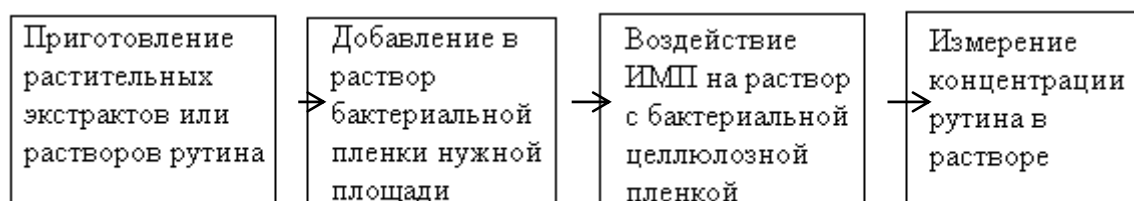


Рисунок. 2. Процесс подготовки и проведения экспериментов

Таблица 2. Параметры воздействия ИМП на растительные экстракты

W, кДж	0,45	1,83	4,11
U, кВ	3,0	6,0	9,0
N (одновитковый индуктор), А/м 10 ⁶	0,09	0,37	0,82
f кГц	10		
N	1		

Синтез бактериальной целлюлозной пленки осуществляли по методике [7] с использованием штамма бактерий *Gluconacetobacter sucrofermentas H-110*. Питательная среда содержала водный раствор с D-глюкозой – 20 г/л, дрожжевым экстрактом – 5,0 г/л, пептоном – 5,0 г/л, Na₂HPO₄ – 2,7 г/л, лимонной кислотой – 1,15 г/л, при pH 6,0. Культивирование проводили в шейкере-инкубаторе в течение трех суток со скоростью перемешивания 150 об/мин при температуре 30°C, затем стационарно в течение семи суток при той же температуре, до появления поверхностной пленки бактериальной целлюлозы. Бактериальную целлюлозу отделяли от культуральной среды и периодически промывали 0,5%-водным раствором NaOH, затем дистиллированной водой и 0,5%-м раствором HCl и вновь дистиллированной водой до нейтральной реакции. Затем образцы помещали на ровную поверхность и сушили при комнатной температуре до постоянной массы.

Концентрацию флавоноидов определяли с помощью спектрофотометрического анализа их комплексов с хлоридом алюминия в интервале $\lambda_{\text{max}} = 408-420$ нм [5]. В качестве стандарта служил рутин (ч.д.а.).

Статистическую обработку полученных данных проводили стандартным способом с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия с уровнем $p < 0,05$ [8].

Последовательность процесса подготовки и проведения экспериментов приведена на рисунке 2

Исследование проводили при воздействии ИМП с напряжением в диапазоне U от 3 кВ до 9 кВ (табл. 2) при частоте $f = 10$ кГц (одновитковый индуктор) и количестве импульсов $n = 1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По стандартной методике количественного определения флавоноидов используют спиртовые растительные экстракты [9]. Спиртовой раствор более активная реакционная среда, чем вода, поэтому измерения концентрации флавоноидов проводили как в спиртовом растворе, так и водном растворе, учитывая то, что рутин относится к гликозидированным флавоноидам [10], которые растворяются в воде, особенно при нагревании.

Были получены спектры поглощения водного и спиртового растворов рутина с алюминия хлоридом и было выявлено, что максимумы поглощения (λ_{max}) комплекса рутина (конц. 0,2 мг/мл) с 2% хлоридом алюминия спиртового и водного растворов совпадают и наблюдаются для $\lambda_{\text{max}} = 415$ нм. Для этой длины волны были построены калибровочные графики отдельно для водного и спиртового растворов, по которым в процессе работы находили концентрацию рутина.

Для выбора объекта исследования для растительных экстрактов сравнивали концентрации флавоноидов в водных экстрактах различного растительного сырья. Для дальнейших экспериментов был выбран укроп пахучий (*Anethum graveolens*), содержащий достаточно высокое содержание растворимых в воде флавоноидов.

Изучение влияния импульсных магнитных полей на взаимодействие флавоноидов из растительного экстракта укропа (спиртового и водного) с бактериальной целлюлозной пленкой показало, что взаимодействие с пленкой спиртовых растворов вызывает значительное усиление желтой окраски раствора (рис. 2), поэтому дальнейшие исследования мы продолжили с водными растительными экстрактами, а также непосредственно с водным раствором рутина.

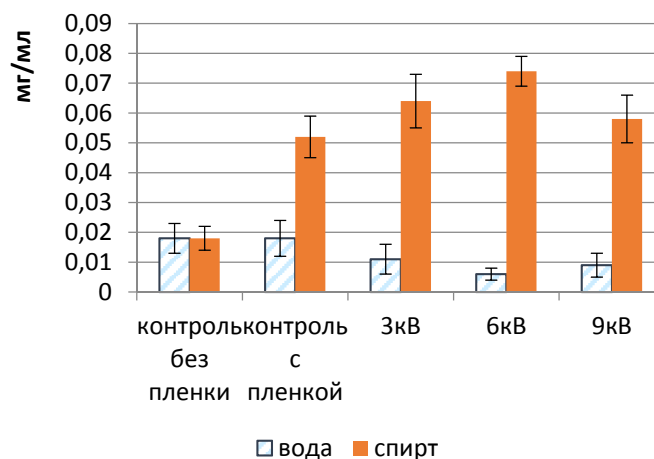


Рисунок 2. Влияние импульсного магнитного поля на концентрацию флавоноидов свежего укропа водного и спиртового экстрактов, содержащих бактериальную целлюлозную пленку

В условиях воздействия импульсного магнитного поля на концентрацию флавоноидов укропа водного экстракта, содержащего бумагу (калька) и бактериальную целлюлозную пленку наблюдали тенденцию к снижению флавоноидов при этих же напряжениях 6 кВ (рис. 3).

Дальнейшие эксперименты мы проводили только при ИМП с напряжением 6 кВ, но бактериальную пленку брали с разной площадью.

При влиянии импульсного магнитного поля ($U = 6$ кВ) на концентрацию флавоноидов укропа в водном экстракте, содержащем бактериальную целлюлозную пленку разной площади ($S = 0,8$ см² и $S = 1,6$ см²) были получены результаты, представленные на рисунках 4 и 5.

Было обнаружено достоверное снижение концентрации флавоноидов на 37 % в водном растворе укропа, содержащим бактериальную целлюлозную пленку большей площади ($S = 1,6$ см²), при воздействии ИМП с напряжением 6 кВ.

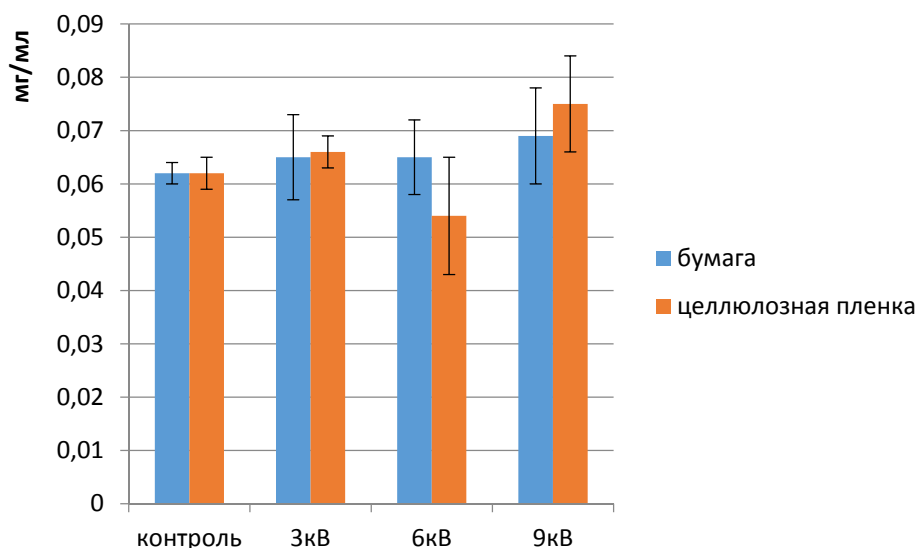


Рисунок 3. Влияние импульсного магнитного поля на концентрацию флавоноидов свежего укропа водного экстракта, содержащего бумагу (калька) и бактериальную целлюлозную пленку

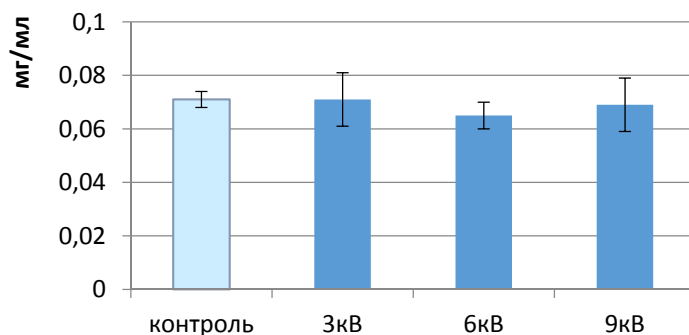


Рисунок 4. Влияние импульсного магнитного поля на концентрацию флавоноидов укропа в водном экстракте, содержащем бактериальную целлюлозную пленку ($S = 0,8 \text{ cm}^2$)

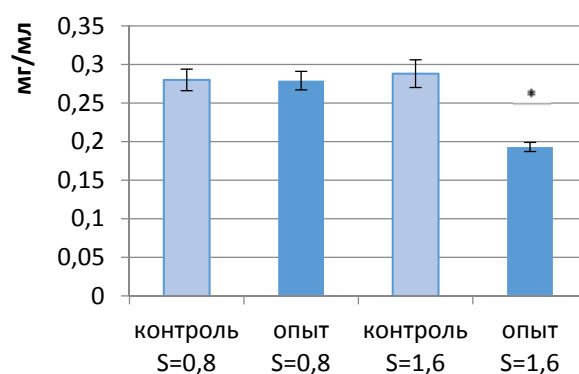


Рисунок 5. Влияние импульсного магнитного поля ($U=6 \text{ kV}$) на концентрацию флавоноидов укропа в водном экстракте, содержащем бактериальную целлюлозную пленку разной площади ($S = 0,8 \text{ cm}^2$ и $S = 1,6 \text{ cm}^2$)

Чтобы исключить различные вещества, содержащиеся в растворе укропа, дальнейший эксперимент мы проводили с водным раствором рутина при концентрации $0,2 \text{ мг/мл}$. При изучении влияния импульсного магнитного поля ($U = 6 \text{ kV}$) на концентрацию рутина в водном растворе, содержащем бактериальную целлюлозную пленку разной площади, получены подобные результаты: снижение концентрации рутина в растворе, содержащем бактериальную целлюлозную пленку с площадью $0,8 \text{ cm}^2$, в условиях воздействия ИМП примерно на 8%, а в растворе, содержащем пленку большей площади $1,6 \text{ cm}^2$ на 13% (рис. 6).

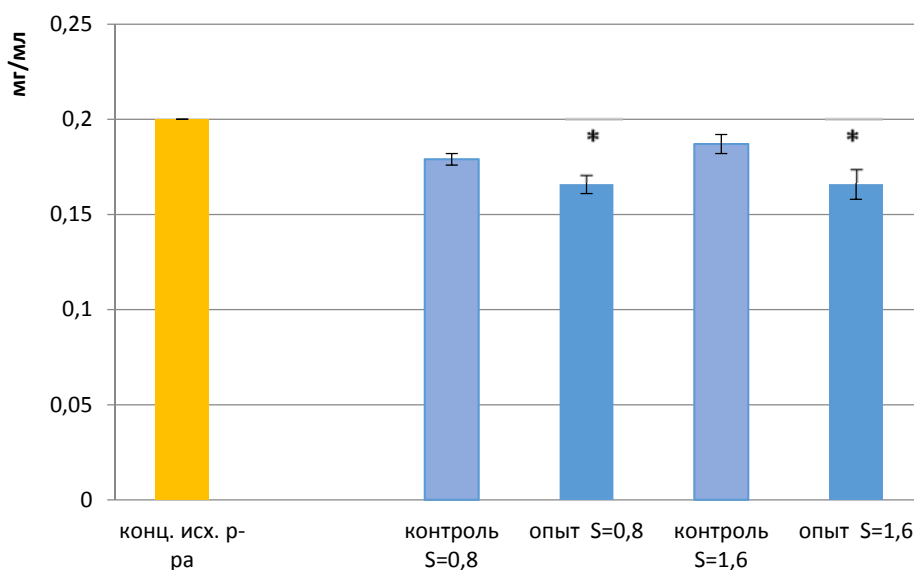


Рисунок 6. Влияние импульсного магнитного поля ($U = 6 \text{ kV}$) на концентрацию рутина в водном растворе, содержащем бактериальную целлюлозную пленку разной площади ($S = 0,8 \text{ cm}^2$ и $S = 1,6 \text{ cm}^2$)

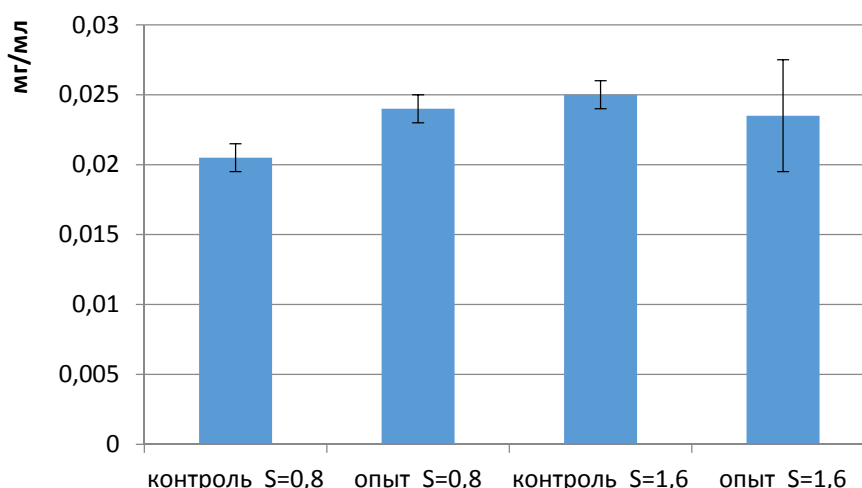


Рисунок 7. Концентрация рутина после замачивания в водном растворе облученных пленок разной площади ($S = 0,8 \text{ см}^2$ и $S = 1,6 \text{ см}^2$)

Без воздействия ИМП бактериальные пленки также впитывали в себя раствор с рутином, о чем свидетельствует снижение концентрации рутина относительно исходного раствора с концентрацией 0,2 мг/мл в среднем на 10% (рис. 6).

После замачивания в водном растворе высушенных облученных пленок разной площади концентрация рутина оказалась достоверно выше там, где пленки с меньшей площадью облучались в ИМП, что видно на рисунке 7. Это свидетельствует о том, что рутин не связывается с молекулами целлюлозы пленки, а располагается между целлюлозными волокнами. Импульсное магнитное способствует большей адсорбции молекул раствора, возможно из-за усиления движения молекул. При увеличении площади пленки в 2 раза концентрация рутина в растворе, который подвергался облучению, не отличается от контроля, что свидетельствует о небольшой задержке флавоноидов внутри пленки. Схема, показывающая усиление впитываемости бактериальной целлюлозной пленки в условиях воздействия ИМП на раствор с пленкой, представлена на рисунке 8.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что рутин не связывается с молекулами целлюлозы пленки, а располагается между целлюлозными волокнами. А импульсное магнитное поле способствует большему впитыванию молекул раствора, возможно из-за усиления движения молекул.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена тенденция к снижению концентрации флавоноидов при воздействии импульсных магнитных полей с напряжением 6 кВ на водный экстракт укропа, содержащий бактериальную целлюлозную пленку и достоверное снижение концентрации флавоноидов на 37% в водном растворе укропа, содержащем бактериальную целлюлозную пленку площадью $1,6 \text{ см}^2$, при воздействии ИМП с напряжением 6 кВ.
2. Выявлено достоверное снижение концентрации рутина на 7,3%, в его водном растворе, содержащем бактериальную целлюлозную пленку площадью $0,8 \text{ см}^2$ и на 11 % с площадью $1,6 \text{ см}^2$.
3. Впитывающая способность бактериальных целлюлозных пленок зависит от их площади, чем больше площадь выше сорбционные свойства. Но из пленок меньшей площади ($0,8 \text{ см}^2$), обработанных импульсным магнитным полем, рутин вымывался полностью, а из пленок большей площади ($1,6 \text{ см}^2$), вышедшая концентрация рутина, не отличалась от контроля, что свидетельствует о задержке молекул флавоноидов внутри пленок.

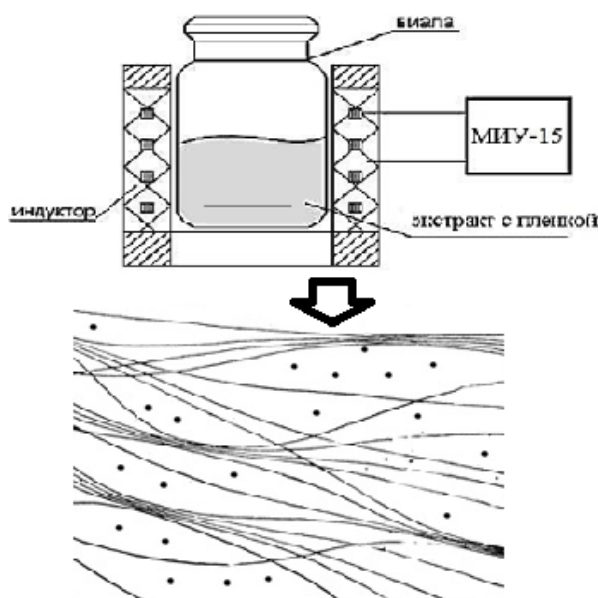


Рисунок 8. Схема, показывающая усиление сорбционных свойств бактериальной целлюлозной пленки в условиях воздействия ИМП на раствор с пленкой

Список литературы / References:

1. Кривошеев С.И., Шнеерсон Г.А., Платонов В.В., Селемир В.Д., Таценко В.М., Филиппов А.В., Бычкова Е.А. Влияние сильного магнитного поля на адсорбцию газов. *Журнал технической физики*, 2016, т. 86, № 1, с. 127-131. [Krivosheev S.I., Shneerson G.A., Platonov V.V., Selemir V.D., Tatsenko V.M., Filippov A.V., Bychkova E.A. The effect of a strong magnetic field on gas adsorption. *Journal of Technical Physics*, 2016, vol. 86, no. 1, pp. 127-131. (In Russ.)]
2. Постников В.В., Камалова Н.С., Кальченко С.В. О возможном влиянии импульсного магнитного поля на образование ковалентных связей между макромолекулами целлюлозы в модифицированной древесине. *Физика и химия обработки материалов*, 2009, № 6, с. 91-93. [Postnikov V.V., Kamalova N.S., Kalchenko S.V. On the possible influence of a pulsed magnetic field on the formation of covalent bonds between cellulose macromolecules in modified wood. *Physics and Chemistry of Materials Processing*, 2009, no. 6, pp. 91-93. (In Russ.)]
3. Basavaraj S.H., Gupta S.G. Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, vol. 26, iss. 10, no. 253, pp. 1823-1828.
4. Malcolm B.R. *Cellulose: Molecular and Structural Biology, Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose*. B.R. Malcolm ed., Springer, 2007, 355 p.
5. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья. *Химия растительного сырья*, 2004, № 1, с. 47-52. [Lobanova A.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. The study of biologically active flavonoids in extracts from plant materials. *Chemistry of Plant Raw Materials*, 2004, no. 1, p. 47-52. (In Russ.)]
6. Глушченков В.А., Карпухин В.Ф. *Технология магнитно-импульсной обработки материалов*. Самара: Изд-во Федоров, 2014, 208 с. [Glushchenkov V.A., Karpukhin V.F. Technology of magnetic pulse processing of materials. Samara: Fedorov Publishing House, 2014, 208 p. (In Russ.)]
7. Grande Cr.J. [et al.] Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 2009, vol. 5, pp. 1605-1615.
8. Фролов Ю.П. *Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум*. Самара: Самарский университет, 1997, 256 с. [Frolov Yu.P. *Mathematical methods in biology. Computer and programming: Theoretical foundations and a workshop*. Samara: Samara University, 1997, 256 p. (In Russ.)]
9. Ермаков А.И. *Методы биохимического исследования растений*. Ленинград: Колос, 1972, 125 с. [Ermakov A.I. *Methods of biochemical research of plants*. Leningrad: Kolos, 1972, 125 p. (In Russ.)]
10. Смирнова М.М., Яборова О.В., Накарякова Н.И., Люст Е.Н., Олешко О.А. Определение суммы флавоноидов в траве пиона. *Фундаментальные исследования*, 2014, № 12, ч. 1, с. 164-168. [Smirnova M.M., Yaborova O.V., Nakaryakova N.I., Lust E.N., Oleshko O.A. Determination of the amount of flavonoids in peony grass. *Basic Research*, 2014, no. 12, part 1, pp. 164-168. (In Russ.)]

EFFECT OF PULSED MAGNETIC FIELDS ON SORPTION PROPERTIES BACTERIAL CELLULOSE FILMS

Vasilyeva T.I., Sharova T.V., Khrenova A.A., Glushenkov V.A., Klenova N.A.

Samara University

Moscow highway st., 34, Samara, 443086, Russian Federation e-mail: vastaty@rambler.ru

Abstract. The effect of the pulsed magnetic field at certain parameters (intensity H , frequency f , number of pulses n) on the interaction of flavonoids from the aqueous plant extract with macromolecules of the bacterial cellulose film was studied. The fact that there was a binding of flavonoid molecules with cellulose was judged by a significant decrease in the concentration of flavonoids in the solution of the plant extract after exposure to pulsed magnetic fields, as well as by further leaching of these biologically active substances from the dried films of bacterial cellulose. The hypothesis was proposed about the strengthening of the sorption properties of bacterial cellulose films in the conditions of influence of pulsed magnetic fields for increasing the mobility of microfibril cellulose.

Key words: *pulsed magnetic field, flavonoids, bacterial cellulose film.*

GREEN CHEMISTRY: USING THE AQUEOUS EXTRACT OF THE LEAVES OF A MEXICAN OAK (*QUERCUS RUGOSA*; FAGACEAE) FOR SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES

Oropeza D.R., Reyes Ramírez L.A., García M.C., Morales G.C., Cervantes Tavera A.M.,
Hernández Santiago A.A., Arzola Flores J.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

av. San Claudio, S/N Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 71590, Mexico; e-mail: ximikad09@mail.ru

Received: 10.07.2019

Abstract. Currently, the silver nanoparticles (AgNPs) are highly recurrent in medicine due to its magnetic and optical properties, becoming important antimicrobial, antiviral and anticarcinogenic agents; nevertheless, the synthesis of said nanoparticles is based on chemical methods, applying reducing and stabilizing agents that are highly polluting to environment and harmful to health. However, plant extracts can be used as a "green" method alternative to chemical conventional synthesis. In the present work, the aqueous extract of the leaves of an Oak native to Mexico (*Quercus rugosa*; Fagaceae) was used as a reducing and stabilizing agent in AgNPs synthesis using silver nitrate as a precursor. Different tests were performed by varying the volume of the aqueous extract and the concentration of silver nitrate. Through UV-vis spectroscopy, the presence of biomolecules, such as polyphenols and flavonoids, was identified. The AgNPs were characterized by the identification of their plasmonic response.

Key words: mexican oak; *quercus rugosa*; *fagaceae*; silver nanoparticles.

INTRODUCTION

Nanoparticles of noble metals, mainly gold (AuNPs) and silver (AgNPs) exhibit interesting optical properties that can be utilized on medical applications in radiotherapy systems and thermal ablation; and given its nature of biocompatible materials, do not pose significant risks to human health and the environment [1]. AgNPs application in clinical treatments involves no side effects to health, since they have reported remains of silver in despicable concentrations in different organs and systems of rats [2]; nevertheless, the synthesis of said nanoparticles is based on the implementation of reducing agents and chemical stabilizes which may lead to the emergence of some toxic chemical species absorbed and consequently, generate counterproductive effects in medical applications [1]; inducing side effects on health and negatively impacting the environment. However, synthesis AgNPs through microorganisms or plant extracts could mitigate the effects of these problems, making the nanoparticles potentially more biocompatible and respectable with the environment [1, 3, 4].

It has been shown that the secondary metabolites of plants, such as flavonoids, polyphenols and terpenes, that could be closely related to the immune system of plants by having bactericidal and bacteriostatic properties [5-9], act as reducing and stabilizing agents in the synthesis of AgNPs, being a powerful "green" resource alternative to the conventional chemical synthesis of metallic nanoparticles [10].

In recent years, concern for the environment and human health has increased considerably, so in many investigations the extracts have been applied mainly leaves of different plants in the biosynthesis of metal nanoparticles for medical applications, particularly for their antimicrobial qualities: Shankar and collaborators in 2004 used the leaves of the neem of India in the synthesis of gold and silver nanoparticles [1], as well as Shakeel and collaborators in 2016 [11]. Mostafa and collaborators in 2014 used olive leaves in the synthesis of AgNPs to test their antibacterial effect; while Logeswari and collaborators in 2015 applied in the biosynthesis of AgNPs, the extracts of the leaves of different plants of medical-food interest (purple basil, eggplant, asiatic centella and orange tree). Bagherzade and collaborators in 2017 used the extract of saffron in their "green synthesis" experiments of AgNPs [12]. Researches on nanoparticle biosynthesis focuses principally on commercial plant species and in Mexico, these studies are precarious despite the great diversity of plants we possess; having a broad field of research poorly exploited in our native species with potential applications in bio and nanotechnology. The white oak (*Quercus rugosa*; Fagaceae Née, 1801) is a tree species endemic to Mexico that dwell in wooded regions with temperate climates [13], this tree possess bactericidal properties and its leaves have been used in traditional Mexican medicine to fight infectious diseases and wounds [14]. For all the above, the objective of the present study was to use the aqueous extract of white oak leaves as a reducing and stabilizing agent for the biosynthesis of AgNPs from silver nitrate as precursor.

METHODOLOGY

1. Aqueous extract preparation. The dry leaves of white oak were collected of a mature specimen in the state of Puebla, Mexico. The leaves were ground to a fine powder and 2 grams of the vegetable powder were weighed and mixed with 10 mL of deionized water at 80-95 °C in a test tube and vortex was immediately applied for 5 minutes; subsequently it was centrifuged at 2500 rpm at 37 °C for 10 minutes. Again, 15 mL of deionized water at 80-95 °C was added to the tube with the mixture and vortexed for 5 minutes. Finally, it was centrifuged at 2500 rpm at 37°C for 15 min. The supernatant liquid was separated of the mixture to be applied immediately in the biosynthesis of the AgNPs.

2. Aqueous extract characterization. The characterization of the aqueous extract for the determination of the biocompounds with reducing and stabilizing effect was carried out by UV-vis spectroscopy [15].

3. Silver nanoparticles biosynthesis.

3.1 Tests of variation of the aqueous extract concentration. We based on the chemical synthesis method of Creighton [16], solutions of 20 mL of 0.3 M of AgNO_3 concentration were prepared to mix them with different volume of plant extract (1, 2, 3, 4 and 5ml) and were shaken at room temperature for 10 min. The formation of silver nanoparticles was determined by the change in the coloration of the solutions and the UV-vis spectrum. The solutions were monitored for 5 days to study their stability.

3.2 Tests of variation of silver nitrate molarity. In this case, the molarity was modified and solutions of 20 mL of 1, 2, 3, 4 and 5 M concentration of AgNO_3 were prepared to mix each with 3 ml of the aqueous extract of the white oak. The mixtures were shaken at room temperature for 10 min. The formation of AgNPs was determined by the change in coloration of the solutions and the UV-vis spectrum. The solutions were monitored for 5 days.

4. AgNPs characterization. The characterization of the nanoparticles obtained was carried out by UV-vis spectroscopy [21] for the identification of surface plasmon resonance reported from 400 to 470 nm [17, 18] for 5 days

RESULTS AND DISCUSSION

1. Determination of the vegetal biocompounds in the aqueous extract with reducing and stabilizing activity.

To be able to use the aqueous extract of *Q. rugosa*, it was necessary to determine the presence mainly phenolic compounds, biocomponents with reducing and stabilizing effect in the biosynthesis of AgNPs. Aleixandre-Tudo and Du Toit in their research on the release of phenolic compounds from the solid parts of the grape berries during the wine making process published [19] report the absorbance peaks for different phenolic compounds (malvidin-3-glucoside, malvidin-3-pcoumarylglucoside, catechin, gallic acid, caftaric acid, coumaric acid, rutin, quercetin) that absorb in the range from 200 to 400 nm approximately (except for malvidin-3-glucoside and malvidin-3-pcoumarylglucoside, which range up to 600 nm), with slight variations depending on the identity of the phenolic compound. In this context, the resulting spectrogram for the aqueous extract white oak presents an absorbance peak in approximately 310 nm (Fig. 1), which suggests that some phenolic compounds that possess the fruits of the grape, are also present in the leaves of the tree used in this study. However, it is necessary to carry out the characterization by FT-NIR to confirm the presence of said bio components.

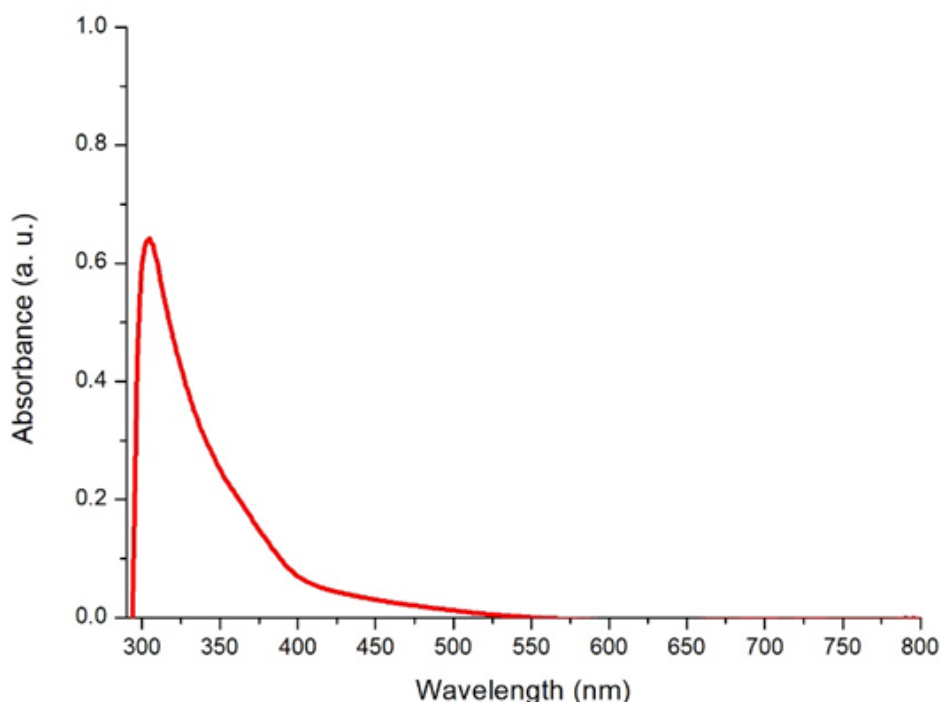


Figure 1. UV-vis spectrogram of the aqueous extract of *Q. rugosa*. A peak of absorbance is observed in approximately 310 nm, at which point they absorb some phenolic compounds, plant biocomponents that have reducing and stabilizing properties in the biosynthesis of AgNPs

2. Determination of surface plasmon resonance of AgNPs.

2.1. Tests of variation of the aqueous extract concentration. There are multiple investigations on the synthesis of AgNPs in which plant extracts are applied as reducing and stabilizing agents; however, the way in which the variation in the concentration of those extracts influences, as well as the concentration of the precursor in the growth of the AgNPs over time, is poorly studied and probably also depends on the plant species used. When the concentration of the precursor was set to 3 M, favorable results were observed in growth and surface plasmon morphology from the third day on all concentrations applied, especially in volume greater than 2 mL of the extract (Fig. 2), but when the concentrations of the extract are little, in this case 1 and 2 mL, the growth stops in the fourth day, as the availability of the bio compounds with the reducing and stabilizing effect is probably finished (Fig. 2 A and B) At higher volume of the aqueous extract (3, 4 and 5 mL), the definition of the surface plasmons resonance improves over the time and greater growth is observed (Fig. 2 C, D and E).

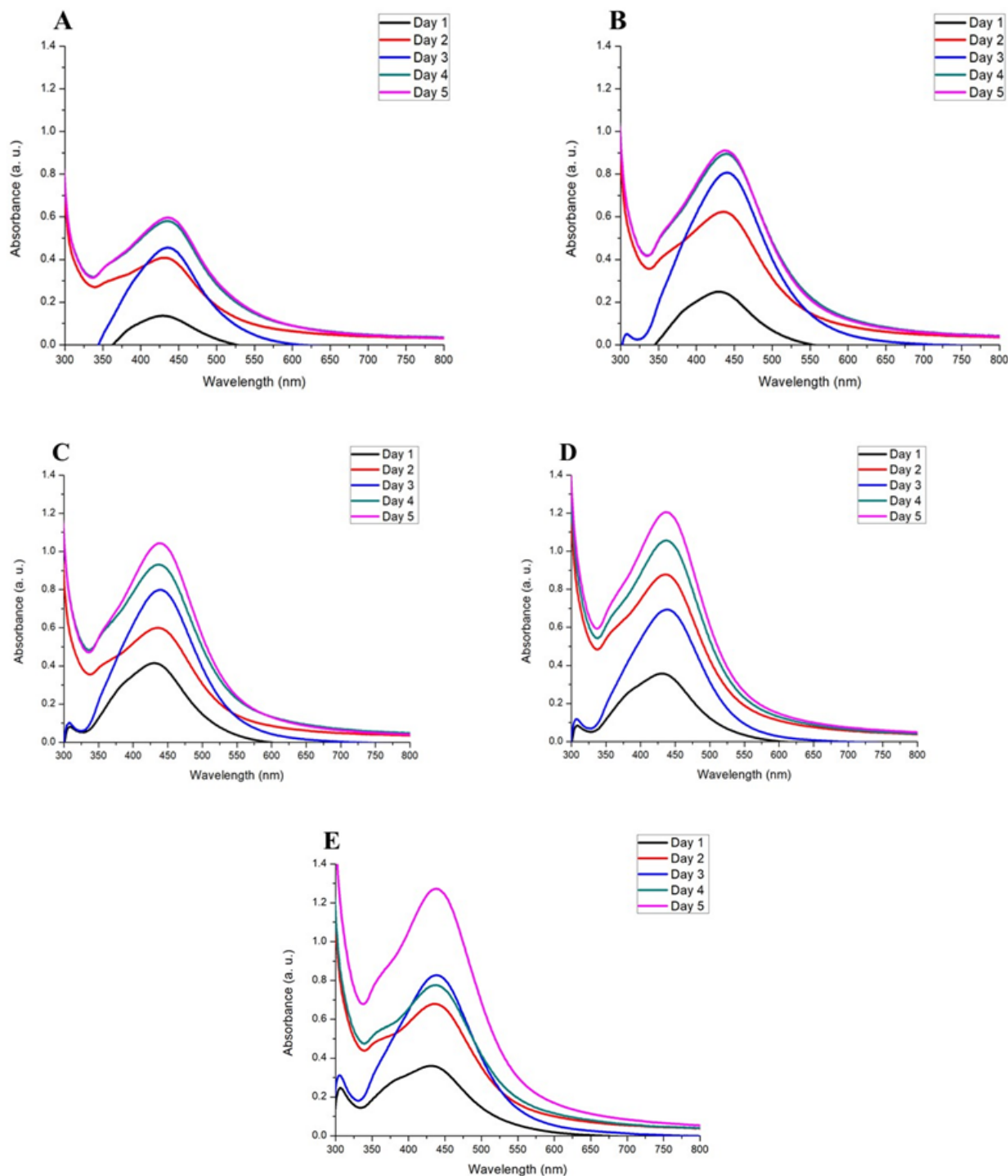


Figure 2. UV-vis spectrograms of 1, 2, 3, 4 and 5 mL of the aqueous extract of *Q. rugosa* with 3 M of AgNO_3 evaluated for 5 days (A, B, C, D and E respectively). The surface plasmon morphology is adjusted from the third day with marked in growth depending on the volume of the aqueous extract

2.2. Tests of variation of the silver nitrate molarity. When the concentration of the AgNO_3 is varied and the volume of the aqueous extract is set at 3 mL, a greater growth and better morphology of the surface plasmon resonance is observed on the third day, especially in concentrations greater than 1 M; however, the growth decreases in the fourth day and increases again to the fifth day. This phenomenon is probably due to the nanoparticles are broken and formed again due to their instability (Figure 3 A, B, D and E). In the case of the 3 M concentration of AgNO_3 , the growth increases gradually without showing backs, which suggests that the nanoparticles are more stable and grew steadily during the 5 days; this indicates that 3 M is the ideal concentration of AgNO_3 for the adequate synthesis of nanoparticles (Fig. 3 C).

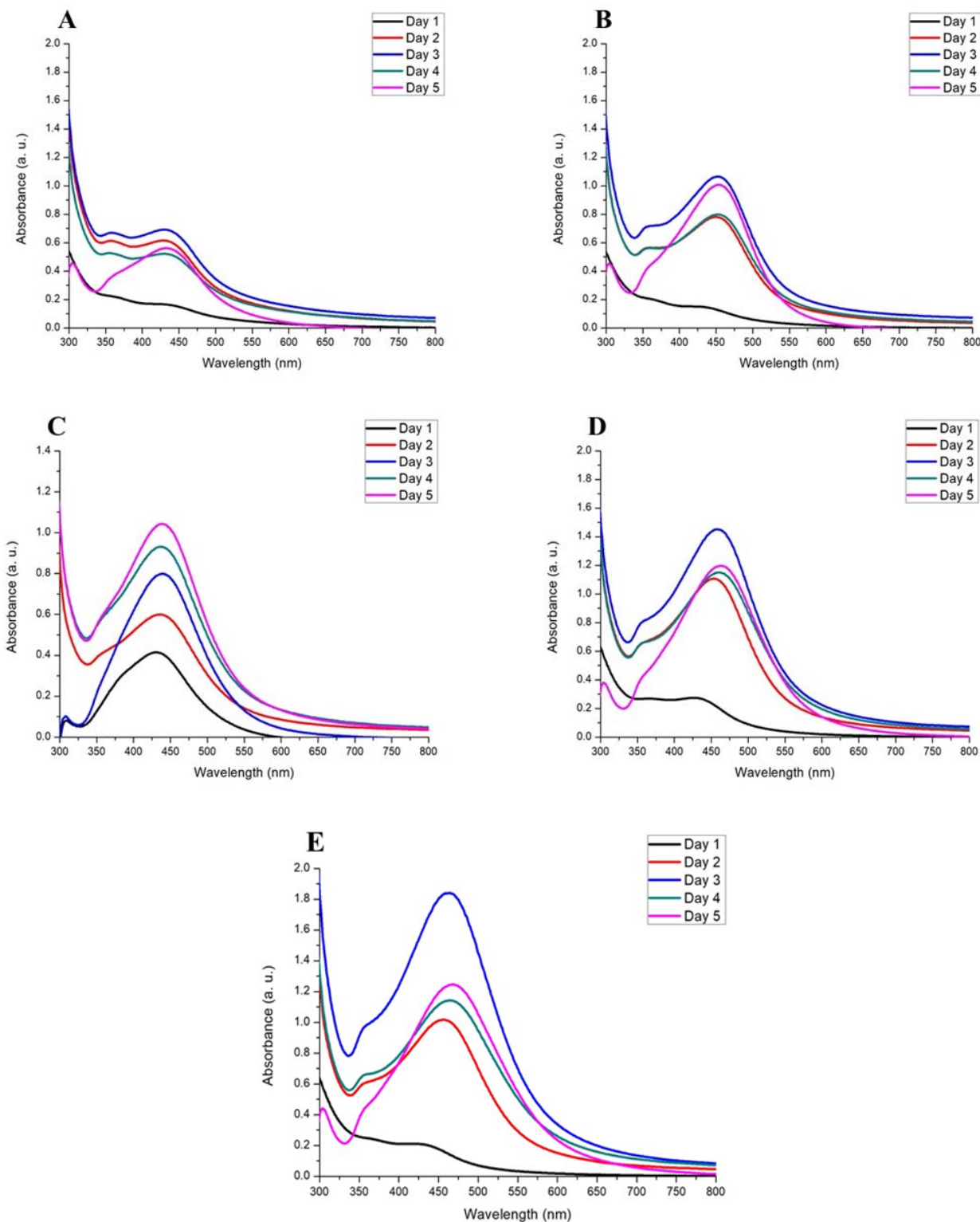


Figure 3. UV-vis spectrograms of 1, 2, 3, 4 and 5 M of the AgNO_3 with 3 mL of the white oak aqueous extract evaluated for 5 days (A, B, C, D and E respectively). The highest growth is observed on the third day, with a decrease in all concentrations in the fourth day (A, B, D and E) except for the 3 M concentration that presents a gradual growth (C)

CONCLUSIONS

Due to the aqueous extract of white oak leaves contains phenolic compounds, is an excellent agent with reducing and stabilizing effect, being a viable alternative friendly to the environment and human health that can be applied in the "green synthesis" of AgNPs.

The formation and particularly the growth of the nanoparticles over time is determined by the volume of the aqueous extract and the concentration of the precursor; being lower in low volume; in addition, the better defined surface plasmons resonance were obtained from the second day in high concentrations of both elements in the biosynthesis of AgNPs; however, the concentration of 3 M of the AgNO₃ is the most adequate, and the high concentrations of the aqueous extract can vary in the 3 M colloidal solution to obtain the successful biosynthesis of AgNPs. However, it is necessary to carry out the characterization by transmission electron microscopy to study the average size of the AgNPs.

It is highly recommendable to continue with researches on the potential applications of endemic plant species in biotechnology so that the manufacturing processes are more respectful with the environment and human health.

References:

1. Shankar S.S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. *Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (Azadirachta indica) leaf broth*. India: Materials Chemistry Division, National Chemical Laboratory, 2004.
2. Kim Y.S., Kim J.S., Cho H.S., Rha D.S., Kim J.M., Park J.D., Choi B.S., Lim R., Chang H.K., Chung Y.H., Kwon I.H., Jeong J., Han B.S., Yu I.J. Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. Incheon Institute, Korea. *Journal de Toxicología por Inhalación*, 2008, pp. 575-583.
3. Vilchis-Nestor A.R. et al. *Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using Camellia sinensis extract*. Faculty of Chemistry, Autonomous University of the State of Mexico, Toluca, Mexico, 2008.
4. Mittal A.K. et al. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances Magazine*, 2013, pp. 346-356.
5. Mensah J.K., Okoli R.I., Ohaju-Obodo J.O., Eifediyi K. Phytochemical, nutritional and medical properties of some leafy vegetables consumed by Edo people of Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 7, no. 14, pp. 2304-2309
6. García A.Á., Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.*, 2009, vol. 2, no. 3, pp. 119-145. [García A.Á., Pérez-Urria Carril E. Secondary plant metabolism. *Reduca (Biology). Plant Physiology Series*, 2009, vol. 2, no. 3, pp. 119-145. (In Span.)]
7. Pérez-Alonso N., Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotechnología Vegetal*, 2011, vol. 11, no. 4, pp. 195-211. [Pérez-Alonso N., Jiménez E. Production of secondary metabolites of plants through in vitro culture. *Plant Biotechnology*, 2011, vol. 11, no. 4, pp. 195-211. (In Span.)]
8. Moudi M. [et al.] Vinca alkaloids. *Int J Prev Med*, 2013, vol. 4, no. 11, pp. 1231-1235.
9. Cano T. Caracterización de una espirolactona sesquiterpénica α -metilénica obtenida de *Ambrosia arborescens* Milerl y evaluación de su actividad biológica en *Trypanosoma cruzi*. *Revista Soc-Quim Perú*, 2014, pp. 124-135. [Cano T. Characterization of an α -methylenic sesquiterpenic spiro lactone obtained from *Ambrosia arborescens* Milerl and evaluation of its biological activity in *Trypanosoma cruzi*. *Soc-Quim Peru Magazine*, 2014, pp. 124-135. (In Span.)]
10. Neira I. *Green synthesis of nanoparticles to remove dyes in Aqueous Media*. University of Coruña Science Faculty. Department of Physical Chemistry and Chemical Engineering. Spain, 2015.
11. Ahmed S. [et al.] Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Research in Radiation and Applied Sciences*, 2015, pp. 1-7.
12. Bagherzade G. [et al.] Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 227-233.
13. Batis A. [et al.] *Árboles y Arbustos Nativos Potencialmente Valiosos para la Restauración Ecológica y la Reforestación*. Instituto de Ecología, UNAM – Conabio, 1999. [Batis A. [et al.] *Potentially Valuable Native Trees and Shrubs for Ecological Restoration and Reforestation*. Institute of Ecology, UNAM - Conabio, 1999 (In Span.)]
14. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009. Recuperado el 25 de marzo del 2019 de: http://www.unamenlinea.unam.mx/recurso/biblioteca-digital-de-la-medicina-tradicional-mexicana_80999. [Library of Traditional Mexican Medicine. *Atlas of the Plants of Traditional Mexican Medicine*. National Autonomous University of Mexico, 2009. Retrieved on March 25, 2019 from: http://www.unamenlinea.unam.mx/recurso/biblioteca-digital-de-la-medicina-tradicional-mexicana_80999 (In Span.)]
15. Olsen E.D. *Metodos ópticos de análisis*. Editorial Reverté, Barcelona, España, 1990, 681 p. [Olsen E.D. *Optical methods of analysis*. Editorial Reverté, Barcelona, Spain, 1990, 681 p. (In Span.)]

16. Mongue M. Nanopartículas de plata: metodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *An. Quim.*, 2009, vol. 105, no. 1, pp. 33-41. [Mongue M. Silver nanoparticles: methods of synthesis in solution and bactericidal properties. *An. Quim.*, 2009, vol. 105, no. 1, pp. 33-41. (In Span.)]
17. Edison T.J.I., Sethuraman M.G. Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using Punica granatum peel and its application as a green catalyst for the reduction of an anthropogenic pollutant 4-nitrophenol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, vol. 104, pp. 262-264.
18. Thakur M., Pandey S., Mewada A., Shah R., Oza G., Sharon M. Understanding the stability of silver nanoparticles bio-fabricated using Acacia arabica (Babool gum) and its hostile effect on microorganisms. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, vol. 109, pp. 344-347.
19. Aleixandre-Tudo J.L., du Toit W. *The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. IntechOpen, 2018.

ВЛИЯНИЕ КАВИТАЦИОННОЙ ОБРАБОТКИ ВОДЫ НА РОСТ ГИДРОБИОНТОВ**Барбин Н.М.¹, Алексеев К.С.¹, Вершинин В.Л.²**¹ Уральский государственный аграрный университет

ул. К.Либкнехта, 42, г. Екатеринбург, 620075, РФ

² Институт экологии растений и животных УрО РАН

ул. 8 Марта, 202, г. Екатеринбург, 620144, РФ; e-mail: NMBarbin@mail.ru

Поступила в редакцию: 20.05.2019

Аннотация. В работе рассмотрено воздействие воды после кавитации на золотых рыбок и шпорцевых лягушек. Описана установка для кавитационной обработки воды. Обнаружено, что после кавитационной обработки у воды происходит изменение pH и электропроводности. Показатели прироста массы тела у рыб опытной группы превышают аналогичные показатели у рыб контрольной группы. Разведение лягушек в кавитационно-обработанной воде ведет к приросту массы тела.

Ключевые слова: кавитация, обработка воды, золотые рыбки, шпорцевые лягушки.

В настоящее время представляет интерес метод кавитационного воздействия на воду. Использованию кавитационных технологий посвящены работы [1-4]. Предлагаются различные кавитационные устройства для водоподготовки, в коммунальных службах, при очистке бытовых и сточных вод [5, 6].

Кавитацией называется процесс образования в капельной жидкости пузырьков, заполненных газом или паром, выделившимся из жидкости при уменьшении статического давления до некоторого критического значения [7].

Критическое давление соответствует в реальных условиях давлению преобразования или давлению насыщения для растворенного в жидкости газа. Пульсации резонансных пузырьков которые происходят с большой амплитудой в определенных условиях, и разрушение кавитационных полостей могут привести к физико-химическим эффектам [8]. При схлопывании кавитационных пузырей, за очень короткое время (порядка нескольких микросекунд) развивается высокое давление (микроудар) до 400 МПа, а температурный градиент в месте схлопывания жидкости повышается до 500-800°C [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В ФГУП НИИ «Гермес» (Ракетно-космическое агентство, г. Златоуст) разработано оборудование для механической обработки жидкостей гидроударами и кавитацией [9].

Установка выполнена в настольном варианте. Его основными частями являются роторно-статорный узел с вертикальным расположением вала и электродвигатель. При работе роторно-статорный узел размещается в емкости с обрабатываемой жидкостью. Проходя через этот узел, жидкость подвергается гидроударно-кавитационному воздействию. Конструкция установки приведена на рисунке.

Роторно-статорный узел состоит из следующих частей: двигателя (1), вала (2), держателя (3), ротора (4) и статора (5).

На верхней плите (6), размещается кронштейн (7) с электродвигателем (1), конденсаторами (8), переключателем (9), шнуром питания (10) с вилкой для включения в электросеть. Снизу к верхней плите крепится держатель (3), на котором укреплен статор (5). На вал двигателя устанавливается вал (2) с ротором (4).

Ротор (4) и статор (5) имеют специальные пазы. Держатель, ротор, статор и вал изготавливаются из нержавеющей стали 12Х18Н10Т. В процессе работы они находятся в емкости с водой. Вода к ротору (4) и статору (5) поступает через окна (11) держателя (3). Плита (6) закрепляется на стойке (12) вокруг которой она может поворачиваться на 50°. Стойка устанавливается на основании (13).

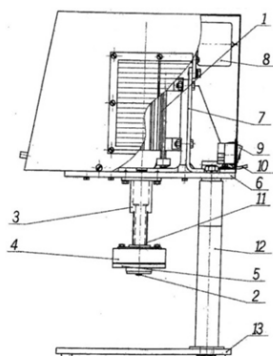


Рисунок 1. Настольная установка для кавитационной обработки воды

Обрабатываемый объем воды составлял 5 литров. При включении в сеть (220 В) ротор начинал вращение с частотой 2750 об./мин. Вода, поступающая в модуль через специальные окна, подвергалась кавитации. При этом в сосуде создавалась вихревая воронка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Воду следует рассматривать как способную к самоорганизации неравновесную динамическую систему, чувствительную к слабым воздействиям различной природы. В водных системах неразрывно сосуществуют химические и структурные превращения. Будучи первичной мишенью слабых, в том числе электромагнитных и механических воздействий, вода продуцирует активные формы кислорода и азота, непосредственно воздействующие на рецепторы клетки, а также образует единый водно-липидно-белковый комплекс биологической мембраны, преобразующий слабые внешние сигналы в изменение макроскопической упругости мембраны, сопровождающиеся модуляцией характеристик интегральных белков. Изменение свойств мембранных белков приводит к изменению функциональных свойств живой клетки [10].

Ранее было исследовано влияние воды, подвергнутой кавитации, на рост рыб [11], уничтожение дафний [12], на состав крови собак [13].

В данной работе объектами исследования были золотые рыбки и шпорцевые лягушки (*Xenopus laevis*).

1. Золотые рыбки.

Было создано две группы рыбок: опытная и контрольная по 10 рыбок в каждой. Были созданы идентичные условия содержания, кормления, температурного режима. Единственным отличием стало: в аквариуме с опытной группой была вода, подвергнутая гидродинамической обработке.

В процессе эксперимента производилась регулярная замена воды из аквариумов в объеме 30 % в каждом. В опытный аквариум добавлялась кавитационно-обработанная вода, а в контрольный добавлялась вода без обработки. Для обоих аквариумов забор воды производился из одного источника – городского водопровода. Периодичность замены воды составила 1 раз в 3 суток.

Кормление рыб производилось специальным кормом для золотых рыбок. Объем корма и периодичность кормления для контрольной и опытной групп были идентичны. Взвешивание производилось на лабораторных электронных весах MASSA-KBK-600 с периодичностью 1 раз в 7 дней.

В процессе эксперимента велась автоматическая безостановочная запись измерений pH и окислительно-восстановительного потенциала воды в каждом из аквариумов. Для измерений использовались: прибор серии АНИОН-4100, предназначенный для измерения ЭДС, pH (pX), молярной, массовой концентрации ионов, удельной электрической проводимости и соленосодержания, а также синхронизированный с ним персональный компьютер для записи полученных результатов.

В процессе эксперимента происходило изменение физико-химических свойств воды, прошедшей кавитационную обработку в опытном аквариуме, в отличие от воды в контрольном аквариуме. В опытном аквариуме наблюдается растянутое во времени увеличение показаний pH и снижение окислительно-восстановительного потенциала воды. Водородный показатель оказывает существенное влияние на биологические и биохимические процессы и поэтому имеет очень важное значение в жизни рыб, особенно в период роста и развития.

Показатели по динамичности прироста живой массы тела у рыб опытной группы превышают аналогичные показатели у рыб контрольной группы (табл. 1). Набор массы в контрольной группе прекратился на 17 дней раньше, чем в опытной. Средняя длина рыб в опытной группе отличается на $10,5 \pm 2\%$ от контрольной [11].

2. Шпорцевые лягушки.

В данной работе объектом исследования были шпорцевые лягушки (*Xenopus laevis*).

Производилась регулярная замена воды в аквариумах, объемом 50% от емкости каждого. В опытном аквариуме добавлялась кавитационно-обработанная вода, а в контрольном добавлялась вода без обработки. Для всех аквариумов забор воды производился из одного источника – городского водопровода после отстаивания в течение 7 суток. Замена воды производилась 1 раз в семь суток.

Кормление лягушек производилось специализированным кормом для рыб. Количество корма и периодичность кормления для контрольной и опытной групп были идентичны.

Из данных по изменению pH следует, что в опытном аквариуме с регулярной добавкой кавитационно-обработанной воды значение pH плавно повышалось или, другими словами, происходило защелачивание, в то время как окислительно-восстановительный потенциал плавно понижался. Водородный показатель

Таблица 1. Различия динамики прироста массы рыб

Время измерения, дни	Разница массы между опытной и контрольной группами, %
15	4,45
30	13,57
45	15,36
60	12,65

Таблица 2. Различие динамики прироста массы лягушек

Время измерения, дни	Разница массы между опытной и контрольной группами, %
7	5,21
15	8,13
22	15,17
29	18,10

оказывает существенное влияние на биологические и биохимические процессы, и поэтому имеет очень важное значение в жизни лягушек, особенно в период роста и развития.

В ходе эксперимента производилось взвешивание, частотой раз в неделю, на лабораторных электронных весах MASSA-KBK-600. Также велась автоматическая запись показателей pH и окислительно-восстановительного потенциала воды в каждом из аквариумов.

Разведение лягушек в кавитационно-обработанной воде ведет к изменению прироста массы тела (табл. 2). Показатели прироста живой массы тела у лягушек опытной группы превышают аналогичные показатели у лягушек контрольной группы. Набор массы в контрольной группе прекратился на 21 день раньше, чем в опытной.

Можно сделать вывод об эффективности применяемой методики содержания гидробионтов в воде, прошедшей кавитационную обработку.

Список литературы / References:

1. Ивченко В.М., Кулагин В.А., Немчин А.Ф. *Кавитационная технология*. Красноярск: изд-во КГУ, 1990, 170 с. [Ivchenko V.M., Kulagin V.A., Nemchin A.F. *Cavitation technology*. Krasnoyarsk: Izdatel'stvo KGU, 1990, 170 p. (In Russ.)]
2. Кулагин В.А. Перспективы развития кавитационных нанотехнологий. *Профессорское собрание Красноярского края: региональная общественная организация*. Режим доступа: http://www.professors.ru/A_Kulagin.html. [Kulagin V.A. Prospects for the development of cavitation nanotechnologies. *Professorskoe sobranie Krasnoyarskogo kraja: regional'naya obshchestvennaya organizatsiya*. Available at: http://www.professors.ru/A_Kulagin.html. (In Russ.)]
3. Федоткин И.М. *Интенсификация технологических процессов*. Киев: Вища шк., 1979, 205 с. [Fedotkin I.M. *Intensification of technological processes*. Kiev: Vishcha shkola, 1979, 205 p. (In Russ.)]
4. Федоткин И.М., Немчин А.Ф. *Использование кавитации в технологических процессах*. Киев: Вища шк., 1984, 190 с. [Fedotkin I.M., Nemchin A.F. *The use of cavitation in technological processes*. Kiev: Vishcha shkola, 1984, 190 p. (In Russ.)]
5. Ивашенко А.Т., Рязанцев А.А., Усольцева Н.Б. *Генератор гидродинамических колебаний*: пат. 2269386 Рос. Федерация, МПК В06В 1/20; заявитель и патентообладатель Сибир. гос. ун-т путей сообщения (СГУПСО); заявл. № 2004113935/28, 05.05.2004; опубли. 10.02.2006, Бюл. № 4, 5 с. [Ivashchenko A.T., Ryazantsev A.A., Usol'tseva N.B. *Generator of hydrodynamic vibrations*: patent 2269386 Russian Federation, Int. Cl. B06B 1/20; patent applicant and proprietor Sibirskii gosudarstvennyi universitet putei soobshcheniya (SGUPS); application № 2004113935/28, 05.05.2004; date of publication: 10.02.2006, Bull. no. 4, 5 p. (In Russ.)]
6. Кривоулицкий А.С. Применение кавитационной технологии в бытовом водоснабжении. *Труды КГТУ*, вып. 2-3. Красноярск: ИПЦ КГТУ, 2006, с. 148-154. [Krivolutskii A.S. The use of cavitation technology in domestic water supply. *Trudy KGTU*, Iss. 2-3. Krasnoyarsk: Izdatel'sko-poligraficheskii tsentr KGTU, 2006, pp. 148-154. (In Russ.)]
7. Пирсол И. *Кавитация*. М.: Мир, 1975, 95 с. [Pearsall J. *Cavitation*. Moscow: Mir, 1975, 95 p. (In Russ.)]
8. Saksena T.K., Nyborg W.L. Sonoluminescence from stable cavitation. *J. Chem. Phys.*, 1970, vol. 53, no. 5, pp. 1722-1733.
9. Яхно Т.А., Уваров В.М., Санин А.К., Казаков В.В. Гидроударно-кавитационное воздействие на воду. *Матер. V съезда биофизиков России*, Ростов-на-Дону, 2015, т. 2, с. 339. [Yakhno T.A., Uvarov V.M., Sanin A.K., Kazakov V.V. Hydraulic-cavitation impact on water. *Proceedings of V Congress of Biophysicists of Russia*, Rostov-on-Don, 2015, vol. 2, p. 339. (In Russ.)]
10. Лобышев В.И., Дубровский А.А., Мухачев А.Я., Соловей А.Б. Вода – первичная мишень слабых воздействий на биологические системы. В сб. «Проблемы биологической физики», с. 245-263. Ред. В.А. Твердислов. М.: URSS, 2010, 320 с. [Lobyshev V.I., Dubrovskii A.A., Mukhachev A.Ya., Solovei A.B. Water – primary target of slight impacts on biosystems. Book of abstracts “*Problemy biologicheskoi fiziki*”, pp. 245-263. Edited by V.A. Tverdislov. Moscow: URSS, 2010, 320 p. (In Russ.)]
11. Барбин Н.М., Алексеев К.С., Чирков А.А. Особенности роста рыб в кавитационно-обработанной воде. *Научные труды VIII Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»*, СПб., 2018, т. 8, с. 6. [Barbin N.M., Alexeev K.S., Chirkov A.A. Characteristics of fish growth in cavitation-treated water. *Collection of research papers of VIII International Congress “Slabye i sverkhslabye polya i izlucheniya v biologii i meditsine”*, St. Petersburg, 2018, vol. 8, p. 6. (In Russ.)]
12. Барбин Н.М., Алексеев К.С., Чирков А.А. Воздействие кавитации на водные микроорганизмы. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 4, с. 910-912. [Barbin N.M., Alexeev K.S., Chirkov A.A. Effect of cavitation on aquatic microorganisms. *Aktual'nye voprosy biologicheskoi fiziki i khimii*, 2018,

vol. 3, no. 4, pp. 910-912. (In Russ.)]

13. Барбин Н.М., Чирков А.А. Изменение показателей крови собак при их поении водой, прошедшей гидродинамическую обработку. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2017, т. 2, № 1, с. 423-425. [Barbin N.M., Chirkov A.A. Changes in blood values of dogs which drink hydrodynamically treated water. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 423-425. (In Russ.)]

EFFECT OF CAVITATION WATER TREATMENT ON THE GROWTH OF HYDROBIONTS

Barbin N.M.¹, Alexeev K.S.¹, Vershinin V.L.²

¹ Ural State Agrarian University

Karla Libknekhta St., 42, Ekaterinburg, 620075, Russia

² Institute of Ecology of Animals and Plants, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

8 Marta St., 202, Ekaterinburg, 620144, Russia; e-mail: NMBarbin@mail.ru

Abstract. The work deals with the effect of cavitation-treated water on goldfish and clawed frogs. An installation for cavitation water treatment is described. It was found that after cavitation treatment, pH and electrical conductivity of water have changed. Indices of body weight gain of the fish in the experimental group exceed those of the fish in the control group. Rearing of frogs in cavitation-treated water leads to the body weight gain.

Key words: *cavitation, water treatment, goldfish, clawed frogs.*

SYNTHESIS OF ZNO BY THE HYDROTHERMAL METHOD USING DIFFERENT PRECURSORS FOR THE DEGRADATION OF METHYLENE BLUE

Luna Flores A., Morales Sánchez M.A., Hernández Santiago A.A.,
Cervantes Tavera A.M.

Meritorious Autonomous University of Puebla

av. San Claudio, S/N Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 71590, Mexico; e-mail: ximikad09@mail.ru

Received: 16.06.2019

Abstract. Photo catalysis has become a very important area in the processes of wastewater treatment for the degradation of organic compounds. The most used photocatalytic are TiO₂ and ZnO due to their low toxicity, chemically inert in the degradation processes, easy to obtain and relatively inexpensive. Although they have been widely used, methodologies for obtaining these materials to increase their photocatalytic activity are still being developed. Due to their nature, TiO₂ and ZnO have a band gap of 3.2 approximately, which makes them activate only with energy that corresponds to the wavelength of ultraviolet light. The synthesis of ZnO it does by the hydrothermal method using different zinc precursors (acetate, nitrate and sulfate). The results show the obtaining of hexagonal crystalline phase in all cases with a variation in morphology. Its photocatalytic activity is evaluated in the degradation of methylene blue. ZnO obtained from zinc acetate shows greater photocatalytic activity by eliminating 66% of methylene blue. In this work the importance of the choice of the precursor in the synthesis of ZnO for specific applications is shown. In the case of the hydrothermal method, when using zinc acetate in the synthesis of ZnO, the material obtained has a greater photocatalytic activity for the degradation of methylene blue (25% more) compared to that obtained from zinc nitrate and zinc sulfate.

Key words: hydrothermal, photo catalysis.

INTRODUCTION

In recent years, photo catalysis has become a very important area in the processes of wastewater treatment for the degradation of organic compounds. The most used photocatalytic are TiO₂ and ZnO due to their low toxicity, chemically inert in the degradation processes, easy to obtain and relatively inexpensive [1]. Although they have been widely used, methodologies for obtaining these materials to increase their photocatalytic activity are still being developed [2]. Due to their nature, TiO₂ and ZnO have a band gap of 3.2 approximately, which makes them activate only with energy that corresponds to the wavelength of ultraviolet light. Many efforts have been made to develop techniques to obtain materials that are active with wavelengths corresponding to visible light and thus take advantage of solar radiation [3].

EXPERIMENTAL PART

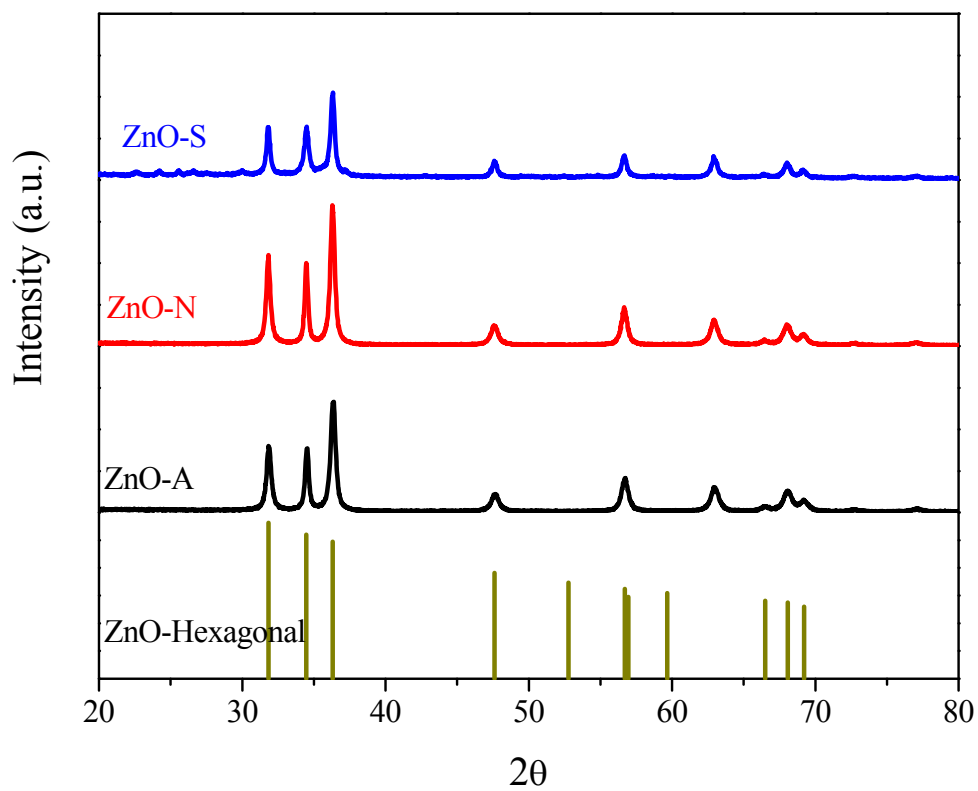
Synthesis of ZnO. The synthesis of ZnO was carried out as follows: in 50 mL of distilled water, 500 mg of the zinc precursor (acetate, nitrate and sulfate) were dissolved. The solution is placed in a ball flask and treated thermally at 80 ° C for 2 hrs. keeping the system closed. After the heat treatment the resulting powder is rinsed with water and dried at 80 ° C for 30 min. Finally, the photocatalytic powder is obtained. The materials were labeled as ZnO-S, ZnO-N and ZnO-A for the ZnO obtained from zinc sulfate, zinc nitrate and zinc acetate, respectively.

Tests of photocatalytic activity. Photocatalytic tests are performed in a system previously described [4]. For each test, 15 mg dispersed in 60 mL of a solution of methylene blue (10 ppm). The process is monitored by UV-vis aliquots at regular intervals of time for 90 min.

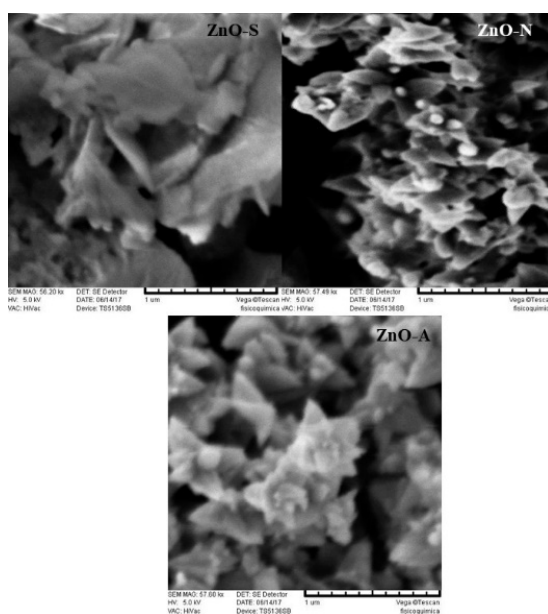
RESULTS

In Figure 1a the x-ray diffractogram of the synthesized materials shown. In all cases, ZnO presents a hexagonal crystalline phase according to the reference standard PDF 04-020-0364. The images obtained by SEM are shown in Figure 1b. In this figure we can see the great dependence that exists on the morphology and the precursor of ZnO. In the case of ZnO-N and ZnO-A, although both have flower-like morphology, the size of the ZnO-A structures is slightly larger. However, ZnO-S has a leaf type morphology of little more than 1 µm in size.

In Figure 2a the UV-vis absorption of the photocatalytic powders is shown. Although the three photocatalytic have a strong absorption below 400 nm (corresponding to the UV region), ZnO-A, unlike ZNO-S and ZNO-N, has a slight absorption around 500 nm (corresponding to the visible region).



a)



b)

Figure 1. a) XRD of synthesized materials. b) SEM of the photocatalysts obtained

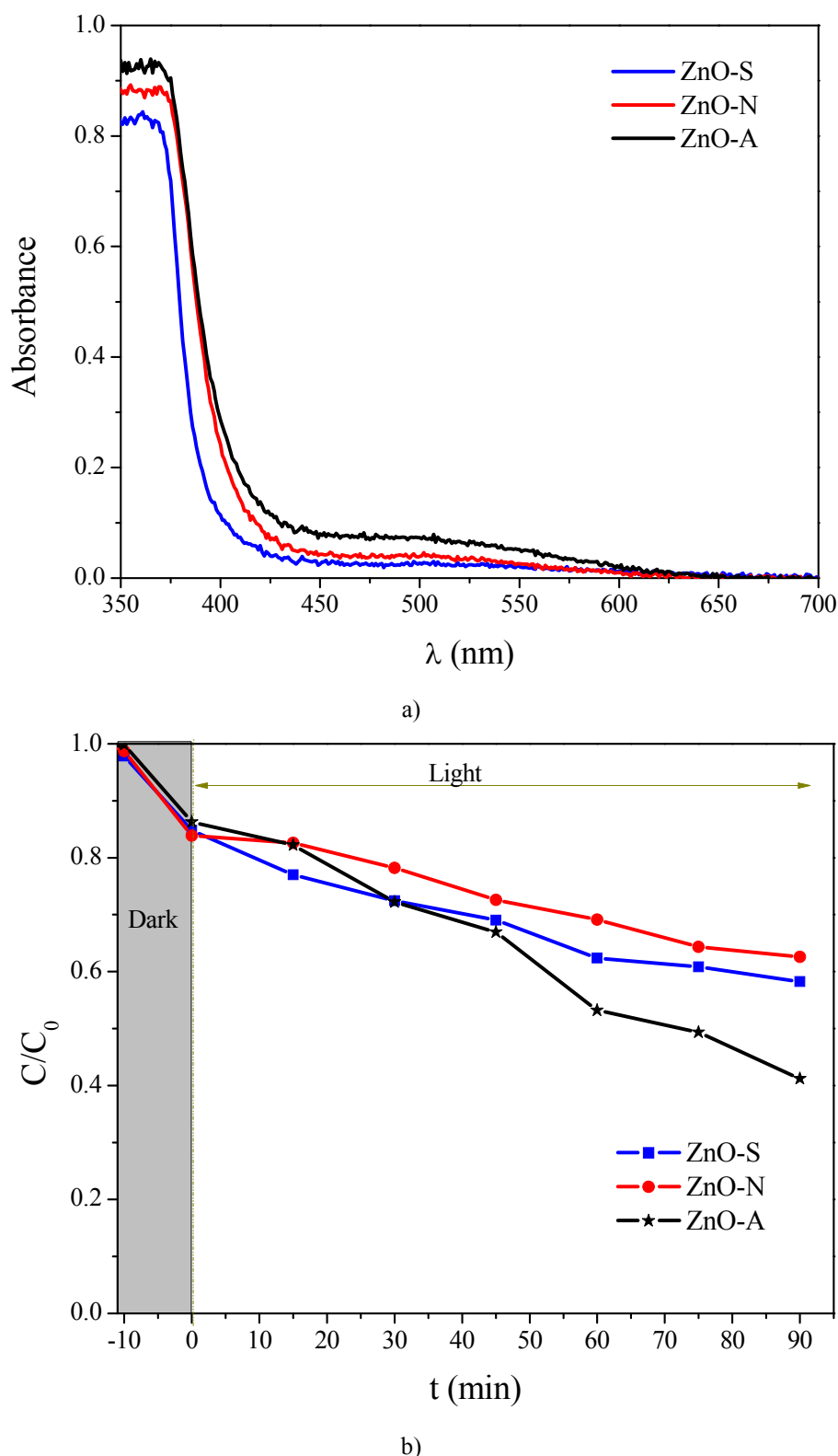


Figure 2. a) DRS for synthesized photocatalytic. b) Degradation of methylene blue using the different photocatalytic obtained

In figure 2b the photocatalytic activity in the degradation of methylene blue of the materials obtained is shown. In this figure we can distinguish two regions: the first one corresponding to the adsorption of the material (dark) for which, once the photocatalyst is dispersed in the methylene blue solution, it is placed in the reactor with air bubbling but with the lamp off, allowing the adsorption-desorption equilibrium to be reached. Once this process is reached (approximately 10 minutes for our material) the radiation source is turned on and the degradation stage begins (second stage). Despite the difference in morphology presented by the photocatalyst synthesized (Fig. 1b), all three absorb practically the same amount of dye (15%, approximately). However, in terms of material degradation, ZnO-A shows a greater percentage of

elimination of methylene blue (66%) in 90 min than ZnO-S (42%) and ZnO-N (38%). The increase in photocatalytic activity of ZnO-A can be deviated from the slight absorption present in the visible region as can be seen in figure 2a.

CONCLUSIONS

In this work the importance of the choice of the precursor in the synthesis of ZnO for specific applications is shown. In the case of the hydrothermal method, when using zinc acetate in the synthesis of ZnO, the material obtained has a greater photocatalytic activity for the degradation of methylene blue (25% more) compared to that obtained from zinc nitrate and zinc sulfate.

References:

1. Tian J., Zhao Z., Kumar A., Boughton R., Liu H. Recent progress in design, synthesis, and applications of one-dimensional TiO₂ nanostructured surface heterostructures: a review. *Chemical Society Reviews*, 2014, vol. 43, no. 20, pp. 6920-6937.
2. Chen X., Liu L., Yu P.Y., Mao S.S. Increasing Solar Absorption for Photocatalysis with Black Hydrogenated Titanium Dioxide Nanocrystals. *Science*, 2011, vol. 331, pp. 746-750.
3. M. Pelaez, N.T. Nolan, S.C. Pillai [et al.] A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2012, vol. 125, pp. 331-349.
4. Luna-Flores A., Valenzuela M.A. [et al.] Synergetic Enhancement of the Photocatalytic Activity of TiO₂ with Visible Light by Sensitization Using a Novel Push-Pull Zinc Phthalocyanine. *International Journal of Photo energy*, 2017, ID 1604753), 9 p.

CHARACTERIZATION OF THE COMPOSTING PROCESS USING MACHINE LEARNING ALGORITHMS

Molina Monteleón C.M., Saviñon Flores M.F., Vidal Robles E., Hernández Santiago A.A.,
Arzola Flores J.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

av. San Claudio, S/N Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 71590, Mexico; e-mail: ximikad09@mail.ru

Received: 16.06.2019

Abstract. The compost is a biological process of degradation of organic matter that has different applications in agriculture and the remediation of soils. Use of the package for data mining Orange was possible the development of an artificial intelligence algorithm, which was carried out through the treatment of images and their classification in the middle of the methods Logistic Regression, Neural Network, Random Forest, Support Vector Machine (SVM) and k-Nearest-Neighbors. With the algorithm, the stage of the compost process is identified by comparing the images of compost under controlled conditions. It is possible to create a supervised learning algorithm to be able to predict the stages of the composting process using only photographic images of the compost. Because of this, the algorithm that best performs the classification is the multilayer perceptron neural network. This result will allow the development of a portable device that allows identifying the quality of the soil.

Key words: machine learning algorithms, composting.

INTRODUCTION

The composting process is known to be an excellent alternative as a final disposal of organic waste: microorganisms degrade waste under aerobic conditions, transforming them into a homogenous and assimilable material for plants. Different applications for compost are known as organic fertilizer in agriculture, horticulture, landscaping, erosion control and soil recovery, depending on the stage of the process. According to the variation of temperature, there are three main stages in a composting: mesophilic phase, thermophilic or hygienic phase and cooling or mesophilic phase, in addition to a maturing stage of variable duration [1].

In the previous project, "Monitoring and control of a compost using Arduino", the monitoring and control of a composting system and the collection of images for 2 months was carried out [2]. Now the use of these images is proposed to generate an artificial intelligence algorithm to identify each stage of the composting process. An artificial intelligence algorithm is defined as the simulation of human intelligence processes by machines, especially computer systems. These processes include learning (the acquisition of information and rules for the use of information), reasoning (using the rules to reach approximate or final conclusions) and self-correction [3].

For the development of the project the Orange package was used, a computer program to perform data mining and predictive analysis developed in the computer faculty of the University of Ljubljana. It consists of a series of components developed in C ++ that implement data mining algorithms, as well as preprocessing operations and graphical representation of data. It is an open source tool for data analysis and visualization where data mining is done through visual programming or by Python code. It has components for Machine Learning, additions for bioinformatics and text mining [4].

The development of the algorithm aims to streamline and facilitate the identification of the stage of the composition process, the use of compost can be used in other applications.

METHODOLOGY

For the training of the algorithm the images of the compost under controlled conditions of the previous project were used. The treatment that was given to them has the following order:

1. Data acquisition
2. Embedded images
3. Matrix construction
4. Multilayer Perceptron Neural Network
5. Training
6. Testing
7. Prediction

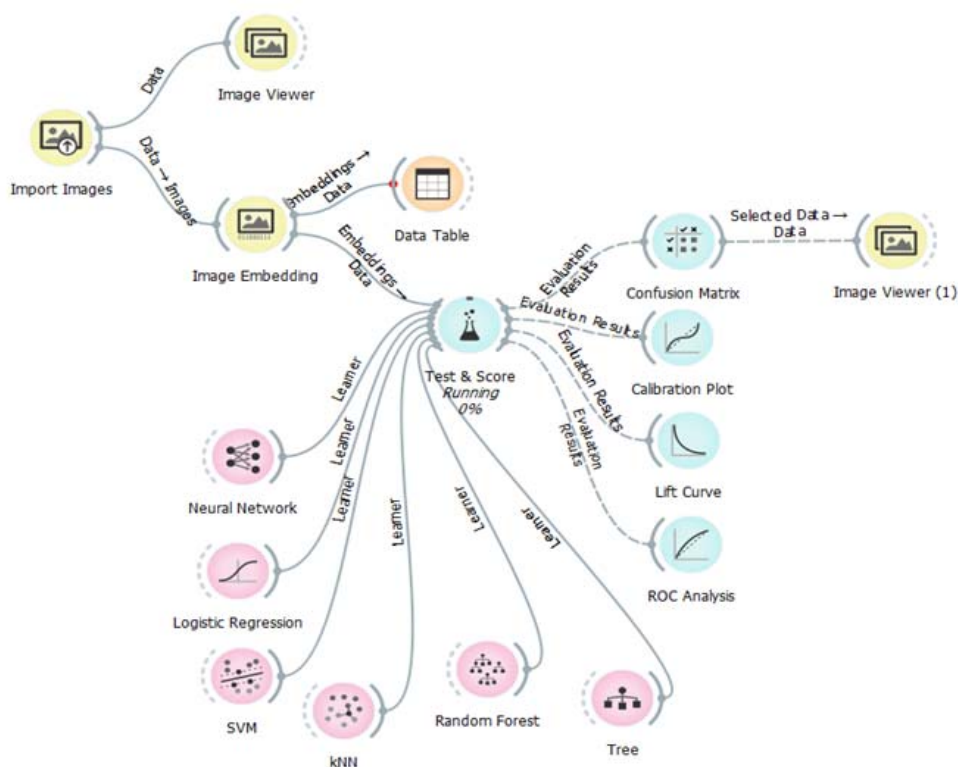


Figure 1. Models of supervised learning for the classification of images obtained from the composting process

The images were imported, and the embedding was performed, which reads the images and uploads them to a remote server or evaluates them locally. Machine learning models are used to calculate a feature vector for each image and return an improved data table with additional columns (image descriptors).

Then, 6 models were used to make the classification:

1. Logistic Regression: Learn a logistic regression model from the data. It only works for classification tasks [5].
2. Neural Network: Uses sklearn's (Python) multilayer perceptron algorithm that can learn nonlinear and linear models [6].
3. Random Forest: Build a set of decision trees. Each tree is developed from a bootstrap sample from the training data. When developing individual trees, an arbitrary subset of attributes is drawn (hence the term "Random"), from which the best attribute for division is selected. The final model is based on the majority vote of individually developed trees in the forest [7].

Table 1. Accuracy of the different supervised learning algorithms

Test & Score

Tue May 28 19, 23:12:16

Settings

Sampling type: Stratified 5-fold Cross validation

Target class: Average over classes

Scores

Method	AUC	CA	F1	Precision	Recall
kNN	0.690	0.243	0.233	0.234	0.243
Tree	0.566	0.158	0.156	0.166	0.158
SVM	0.526	0.174	0.185	0.353	0.174
Random Forest	0.775	0.239	0.228	0.227	0.239
Neural Network	0.846	0.332	0.321	0.315	0.332
Logistic Regression	0.828	0.377	0.379	0.394	0.377

1. SVM: Support vector support machine is a machine learning technique that separates the attribute space with a hyperplane, thus maximizing the margin between the instances of different classes or class values [8].
 2. Tree: It is a simple algorithm that divides data into nodes by class purity. It is a precursor of the random forest. Tree in Orange is designed internally and can handle both discrete and continuous datasets [9].
 3. k-Nearest-Neighbors: Use an algorithm that searches for "k" closest training examples in the feature space and uses its average as a prediction [10].
- For the training and testing of the algorithms the cross-validation with 5 folds was used. The above, to ensure that the training models do not show overfitting [11].

RESULTS AND DISCUSSION

The 247 images divided into 23 categories were imported, corresponding to each one of the days in which the images were acquired. Subsequently, the cross-validation with 5-folds was applied for the training of the algorithms. Table 1 shows the accuracy (AUC) obtained by applying each of the 6 supervised learning algorithms.

The multilayer perceptron neural network has the highest accuracy. That is, the neuronal network with a hidden layer of 1000 neurons can perform the best classification of the images (AUC = 0.846), followed by the logistic regression (AUC = 0.828). Therefore, it is possible to make the prediction of the day in which the composting process is only using a photograph of the compost.

CONCLUSIONS

It is possible to create a supervised learning algorithm to be able to predict the stages of the composting process using only photographic images of the compost. Because of this, the algorithm that best performs the classification is the multilayer perceptron neural network. This result will allow the development of a portable device that allows to identify the quality of the soil.

References:

1. Oviedo-Ocaña E.R., Dominguez I., Komilis D., Sánchez, A. Co-composting of green waste mixed with unprocessed and processed food waste: influence on the composting process and product quality. *Waste and Biomass Valorization*, 219, vol. 10, no. 1, pp. 63-74.
2. Saviñon-Flores M.F. Diseño y construcción de un sistema de compostaje empleando las plataformas Arduino y Python (Tesis de pregrado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, 2019. [Saviñon-Flores M. F. *Design and construction of a composting system using the Arduino and Python platforms*. Undergraduate Thesis, Benemérita Autonomous University of Puebla, Puebla, Mexico, 2019. (In Span.)]
3. Al-Turjman, F. Artificial Intelligence in IoT. *Springer*, 2019.
4. Pejovic V., Majhen I., Janez M., Zupan B. *RICERCANDO: Data Mining Toolkit for Mobile Broadband Measurements*. 2019. arXiv preprint arXiv:1901.07287.
5. Jie M.A., Collins G.S., Steyerberg E.W., Verbakel J.Y., van Calster B. A systematic review shows no performance benefit of machine learning over logistic regression for clinical prediction models. *Journal of clinical epidemiology*, 2019.
6. Heidari A.A., Faris H., Mirjalili S., Aljarah I., Mafarja M. Ant Lion Optimizer: Theory, Literature Review, and Application in Multi-layer Perceptron Neural Networks. In *Nature-Inspired Optimizers*. *Springer, Cham.*, 2019, pp. 23-46
7. Tyralis H., Papacharalampous G., Langousis A. A brief review of random forests for water scientists and practitioners and their recent history in water resources. *Water*, 2019, vol. 11, no. 5, p. 910.
8. Guo H., Wang W. Granular support vector machine: a review. *Artificial Intelligence Review*, vol. 51, no. 1, pp. 19-32.
9. Paez A., López F., Ruiz M., Camacho M. Inducing non-orthogonal and non-linear decision boundaries in decision trees via interactive basis functions. *Expert Systems with Applications*, vol. 122, pp. 183-206.
10. Jiang J., Chen Y., Meng X., Wang L., Li K. A novel density peaks clustering algorithm based on k nearest neighbors for improving assignment process. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 523, pp. 702-713.
11. Rabinowicz A., Rosset S. *Cross-Validation for Correlated Data*. 2019. arXiv preprint arXiv:1904.02438.

DESCRIPTION AND STATISTICAL ANALYSIS OF THE SOD1 NETWORK AND ITS CORRELATION WITH ITS GENETIC PROPERTIES

Morán Titla C.D., Atenco Rosas J.E., Robles E.V., Fortiz R.M., Morales G.C.,
Hernández Santiago A.A., Arzola Flores J.A.

Meritorious Autonomous University of Puebla

av. San Claudio, S/N Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 71590, Mexico; e-mail: ximikad09@mail.ru

Received: 10.07.2019

Abstract. In living organisms are produced reactive oxygen species (ROS) which are oxidizing elements of cells. They are commonly produced because of cellular metabolism, as well as the consequence of toxic agents, such as tobacco smoke, ionizing radiation and carcinogens, to name a few. The negative effect of ROS on the biochemical pathways of cells is called oxidative stress. The methodology used in this study could guide the study of different genetic regulatory networks, in order to identify possible therapeutic targets. The co-expressed genetic complex network of SOD1 in Homo sapiens was obtained from the database Functional protein association networks, which is made up of the following genes: ATP5H, ATP5O, PSMB3, PSMB1, PSMA5, PSMB4, PSMB6, ATP5D, SOD1, MDH1 and HSD17B10. For each gene in the network the following functional properties were obtained: central score (hub), authority score, and grade, clustering coefficient and betweenness centrality. The properties were calculated using two types of network, directed and non-directed. When carrying out the study of the genetic network of SOD1 using the Theory of complex networks, it was shown that possibly its functional properties of the SOD1 gene are not completely related to its structural chemical properties, that is, the function of the SOD1 gene within the Genetic network should be studied from a holistic approach and not from a reductionist perspective.

Key words: genetic complex network, statistical analysis.

INTRODUCTION

In living organisms are produced reactive oxygen species (ROS) which are oxidizing elements of cells. They are commonly produced because of cellular metabolism, as well as the consequence of toxic agents, such as tobacco smoke, ionizing radiation and carcinogens, to name a few. These elements can become harmful depending on the concentration and the biochemical process they trigger [1]. ROS are extremely reactive molecules, have a limited time of existence, capable of oxidative modifying any biomolecule, which results in a series of chain reactions causing damage. In pathological conditions or not, when the quantity of these molecules increases, the essential macromolecules can be modified oxidative and consequently affect the signaling pathways that are controlled by the cellular redox state. The negative effect of ROS on the biochemical pathways of cells is called oxidative stress [2]. The organisms exposed to an atmosphere with a large amount of oxygen, developed macromolecules of enzymatic origin, able to regulate the amount of ROS and inhibit their reaction with biological molecules [3]. The components of the antioxidant system of the cells are diverse, it can be mentioned the primary antioxidants that eliminate ROS or prevent the formation of these molecules. The primary function of primary antioxidants is to convert ROS into less reactive species. For example, some enzymes that are part of the primary antioxidants are the enzymes of the superoxide dismutase (SOD) family. SOD1 is a soluble protein of 32 kDa, discovered for the first time in 1969 by Mc Cord and Fridovich [4]. It can be in the cytosol, in the nucleus and in the mitochondrial intermembrane space. Immunocytochemical studies have shown that it can also be found in lysosomes and peroxisomes [5]. The importance of this enzyme is such that in genetic diseases such as Down syndrome (DS) and the familial form of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have been described alterations in the functions of one of the components of the family of SOD, in Particular Cu-Zn cytosolic superoxide dismutase (Cu / Zn-SOD1 or SOD1), so that currently many investigations have been developed with the aim of deepening the role of this antioxidant enzyme in the pathogenesis of these genetic diseases [4]. An alternative to study the importance of these enzymes at the cellular level, is by analyzing the interactions between enzymes, proteins and genes from the computational context, analyzing the networks of chemical interactions, which can be modeled using the Theory of complex networks. With this approach, the chemical species participating in a series of chemical reactions can be modeled as nodes and the connections between them can represent physical, chemical or functional interactions between the biomolecules [6]. You can compare networks that are derived from a macromolecule, that is, modeling changes in the topology of the network, for example, removing nodes or modifying the direction of the information flow (directed or unguided network).

Because of its importance in pathologies and its function as an antioxidant, the SOD1 enzyme has been studied in different aspects, from the thermodynamic aspect at the molecular level [7], its relation with diseases of the nervous system [9] and also in studies at the cellular level [8]. However, from within the context of the Theory of complex networks, until now an analysis for the gene that encodes the enzyme has not been implemented. Therefore, the objective of this paper is to statistically describe and analyze the SOD1 genetic network and correlate its functional properties with its genetic properties, in order to study whether the functional properties of a gene are actually related to its structural chemical properties.

METHODOLOGY

Construction of a complex SOD1 network. The co-expressed genetic complex network of SOD1 in Homo sapiens was obtained from the database Functional protein association networks, which is made up of the following genes: ATP5H, ATP5O, PSMB3, PSMB1, PSMA5, PSMB4, PSMB6, ATP5D, SOD1, MDH1 and HSD17B10. For each gene in the network the following functional properties were obtained: central score (hub), authority score, and grade, clustering coefficient and betweenness centrality. The properties were calculated using two types of network, directed and non-directed.

Subsequently, to encompass all the properties of the genes and obtain a representative value, the model of Bickerton et al. [10], which consists of an attractiveness index that allows identifying the most important nodes in the network by weighing on all the structural properties of the network, the model is as follows:

$$Index = \exp\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \ln d_i\right),$$

where n is the number of structural properties of the network, d_i corresponds to each of the statistical properties of the network for each i -th node.

Obtaining the genetic properties of the SOD1 network. The genetic properties of the SOD1 network of the GeneCard database were obtained; the obtained properties are the following: gene of origin, beginning of the sequence in pb (pairs base), term of the sequence (pb), size of the gene (pb), gift and score. On the other hand, the number of nucleotides in each gene of the National Center for Biotechnology Information database was obtained, the nucleotides used were: Adenine (A), Thymine (T), cytosine (C) and Guanine (G). He again evaluated the attractiveness index.

Statistical analysis. The statistical analysis was carried out using the programming language R V3.6.0. To obtain the construction and modification of the network, the following libraries were used: dplyr, tidyr, data.table, igraph, bipartite, network and textclean. Because not all the genetic and functional properties of the genes had normal distribution errors, nonparametric statistical tests and a generalized linear model were used. To compare the index between the two types of SOD1 network (directed and non-directed network), a wilcoxon analysis was performed for dependent groups. To compare the values of the index by removing the most important nodes both in the directed network and in the non-directed network, a generalized linear model of two factors with Gamma error was performed for independent groups, since the data had a high coefficient of variation, on the other hand, to evaluate the devolution, the car package was used. To study the similarity between the functional properties of the SOD1 networks (directed and non-directed, without modifications) and the genetic properties, a clustering with Euclidean scale was generated and of the average type with the vegan library. To correlate the attractiveness indexes obtained from the matrices with functional properties of the SOD1 networks (directed and non-directed without modification) and the genetic properties, a multiple Spearman correlation was performed using the libraries: Hmisc and corplot. An alpha value of 0.05 was considered.

RESULTS

Analysis of the complex network of SOD1. Figures 1 and 2 show the value of the attractiveness index for each of the nodes of the directed and non-directed networks, showing that in both cases the node with the highest value of the index in SOD1, because it shows a greater degree of functional importance in both networks. On the other hand, the average value of the attractiveness index for the directed network is 1.39 ± 0.03 and the median value was 1.40. The non-directed network had on average a value of 1.41 ± 0.04 and a median with a value of 1.39, no statistical differences were found between the networks (fig. 3). The genes with the highest value of the attractiveness index in the directed and non-directed network were SOD1 and PSMB4 (directed: 1.71 and 1.44, non-directed: 1.84 and 1.48, respectively), which confirms the importance of the SOD1 gene in the network. By removing both genes from the networks, their structure is modified (fig. 4 and 5), because the SOD1 gene functions as a link between two groups of nodes in the network, showing the formation of two modules in the network. On the other hand, the value of the index also changes, due to the removal of the nodes with the highest value of the attractiveness index (tab. 1). Marginally significant differences were found in the value of the indexes when removing nodes (tab. 2 and fig. 6).

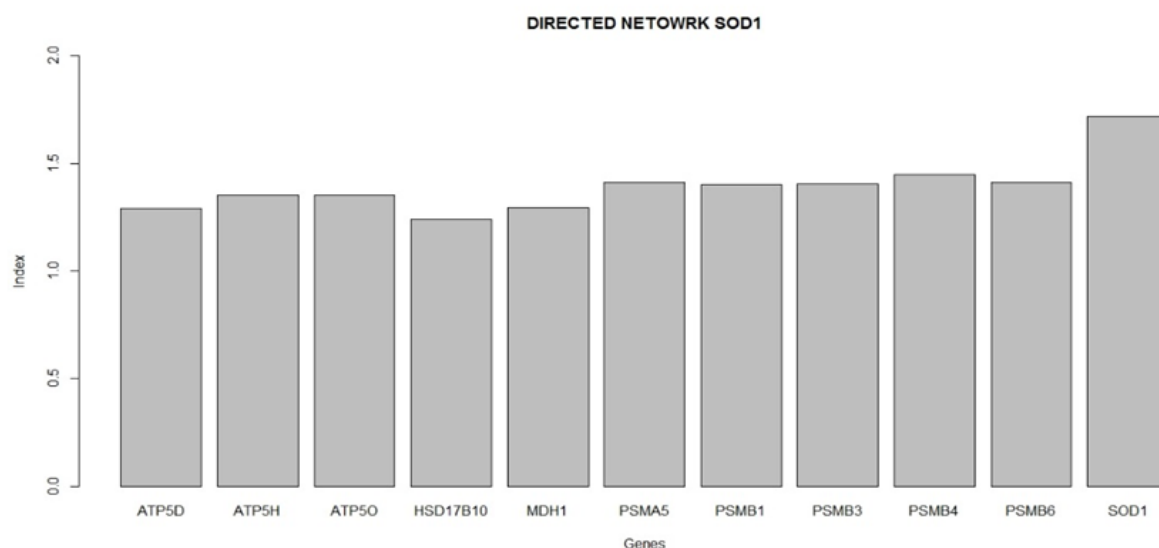


Figure 1. Values of the attractiveness index of the nodes (genes) in the directed SOD1 network. The highest values are observed: SOD1 and PSMB4 and the lowest value: HSD17B10 (1.24)

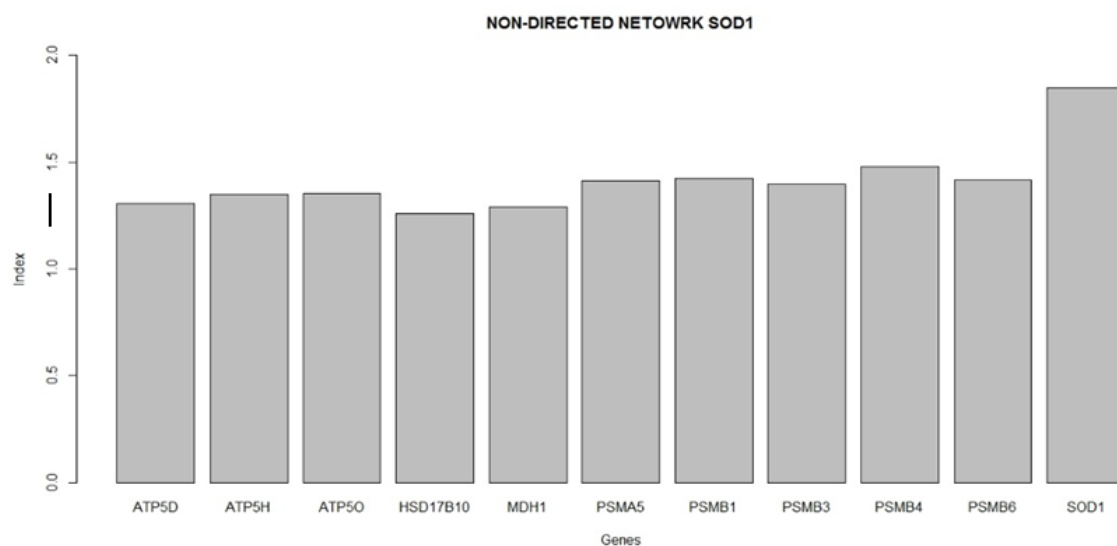


Figure 2. Values of the attractiveness index of the nodes (genes) in the directed SOD1 network. The highest values are observed: SOD1 and PSMB4 and the lowest value: HSD17B10 (1.25)

Table1. The descriptive statistics are shown when modifying the SOD1 network. The highest values are observed in the networks without changes (original). The lowest values in both networks are observed when removing the nodes SOD1 and PSMB4

Network type	Directed			Non-directed		
Chance	Nodes	Mean $\pm$ SE	Median	Nodes	Mean $\pm$ SE	Median
Original	11	1.39 $\pm$ 0.03	1.40	11	1.41 $\pm$ 0.04	1.39
SOD1	10	1.30 $\pm$ 0.03	1.32	10	1.32 $\pm$ 0.04	1.33
PSMB4	10	1.35 $\pm$ 0.04	1.36	10	1.38 $\pm$ 0.05	1.37
PSMB4 and SOD1	9	1.29 $\pm$ 0.02	1.30	9	1.30 $\pm$ 0.02	1.38

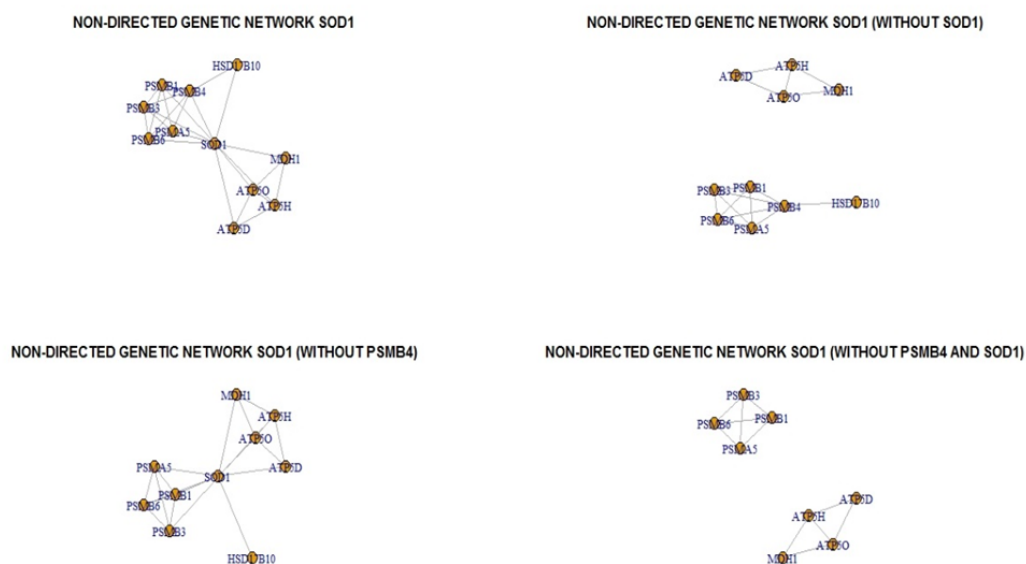


Figure 5. The different topologies of the SOD1 network of non-directed type are shown. By removing the nodes (SOD1 and PSMB4), the HSD17B10 gene node disappears

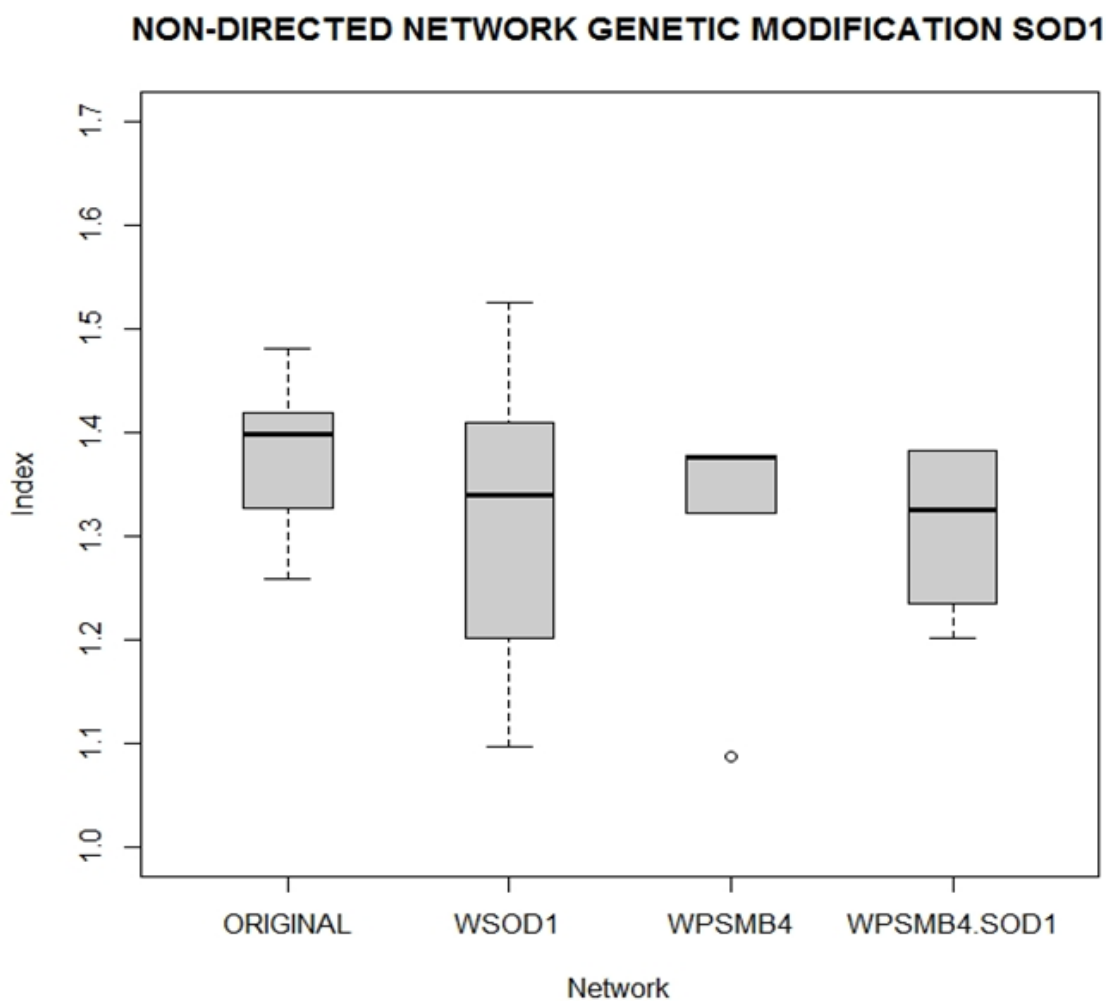


Figure 6. Graph showing the median with the minimum and maximum values of the attractiveness indexes when modifying the SOD1 network. The lowest values can be seen when removing SOD1 and PSMB4

Correlation of the SOD1 network and its genetic properties. When calculating the attractiveness index obtained from the genetic characteristics of the nodes (genes) that make up the SOD1 network, we obtained an average value of 6.18 ± 0.25 and a median of 6.35. When clustering, only a similarity pattern is observed between the directed and non-directed network (both without modifications), on the other hand, the genetic network differs from these two (fig. 7). A high correlation was found between the two SOD1 networks (directed and non-directed). However, none is correlated with the genetic properties (fig. 8), this difference is possibly due to the fact that the particular characteristics (physicochemical properties) of the genes do not reflect their functional properties within genetics, that is, it is necessary to study the genes from a holistic approach and not from the reductionist perspective.

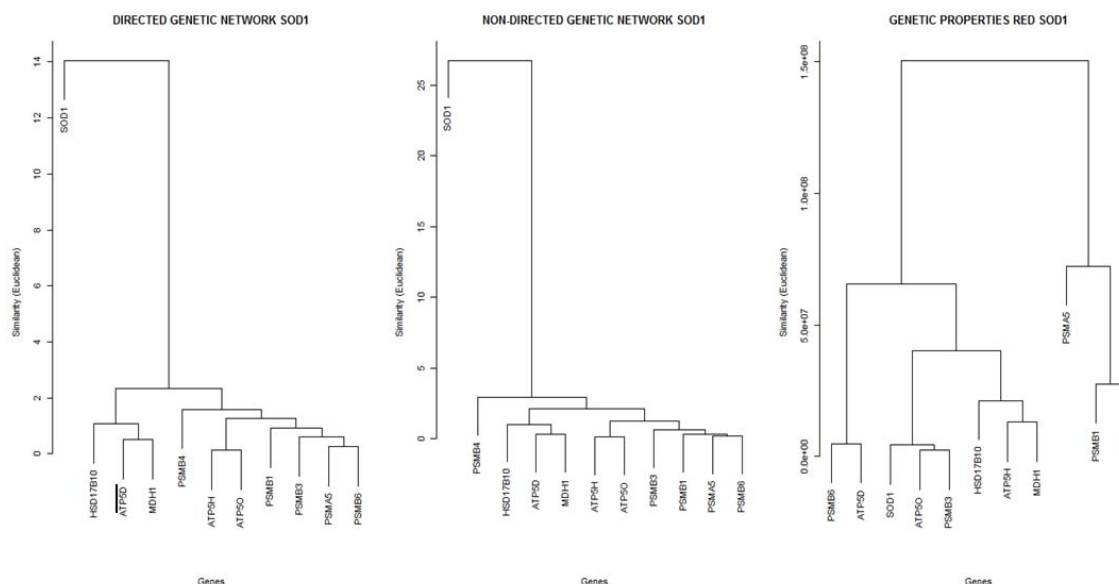


Figure 7. Graph showing the dendrograms corresponding to the unmodified network of SOD1 (directed and non-directed) and their genetic properties. A pattern of two groups is observed in general for the dendrograms

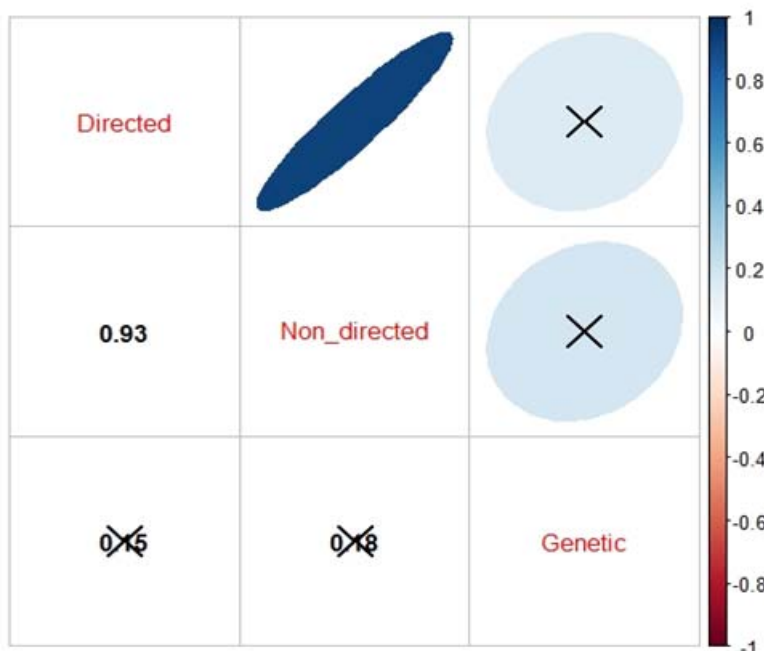


Figure 8. Graph showing the multiple correlation coefficients of attractiveness indices between the two SOD1 networks (directed and non-directed) and their genetic properties. SOD1 networks have a high correlation ($P < 0.001$). However, none is correlated with its genetic properties

CONCLUSIONS

When carrying out the study of the genetic network of SOD1 using the Theory of complex networks, it was shown that possibly its functional properties of the SOD1 gene are not completely related to its structural chemical properties, that is, the function of the SOD1 gene within the Genetic network should be studied from a holistic approach and not from a reductionist perspective. The methodology used in this study could guide the study of different genetic regulatory networks, in order to identify possible therapeutic targets.

References:

1. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.*, 2002, vol.82, no. 1, pp. 47-95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
2. Jones D.P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, vol. 8, pp. 1865-79. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1865.
3. Rani P.K, Meena U., Karthikeyan J. Evaluation of antioxidant properties of berries. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2004, vol. 19, no. 2, pp. 103-10.
4. Castillo-Casaña Y., Riverón-Forment G. Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. *Rev. Cubana Genet Comunit.*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 5-11.
5. Milani P., Gagliardi G., Cova E., Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurology Research International*, 2011, pp. 1-9. DOI: 10.1155/2011/458427.
6. Tamari Y., Nawata H., Inoue E., Yoshimura A., Yoshii H., Kashino G., Seki M. et al. Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. *Free Radical Research*, 2013, vol. 47, no. 1, pp. 1-7. DOI: 10.3109/10715762.2012.734916.
7. Przylj N. Biological network comparison using graphlet degree distribution. *Bioinformatics*, 2006, pp. 177-183. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl301.
8. Scardoni G., Petterlini M., Laudanna C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics*, 2006, pp. 177-183. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp517.
9. Andersen P.M. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the Cu-Zn superoxide dismutase gene. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2006, vol. 6, no. 1, pp. 37-46,
10. Banks C.J., Rodriguez N.W., Gashler K.R., Pandya R.R., Mortenson J.B., Whited M.D., Soderblom E.J., Thompson J.W., Moseley M.A., Reddi A.R., Tessem J.S., Torres M.P., Bikman B.T., Andersen J.L. Acylation of superoxide dismutase 1 (SOD1) at K122 governs SOD1- mediated inhibition of mitochondrial respiration. *Mol Cell Biol.*, 2017, vol. 37, pp. e00354-17. DOI: 10.1128/MCB.00354-17.

БИОТУРБАЦИЯ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ АКУСТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕРЕХОДНОГО СЛОЯ ДНА МЕЛКОГО МОРЯ

Лисютин В.А., Ластовенко О.Р.

Севастопольский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 10.07.2019

Аннотация. Морское дно имеет сложную слоистую структуру, в которой можно выделить граничащий с водным переходный слой неконсолидированных морских осадков. Переходный слой, в отличие от заглубленных слоев является «деятельным». Биотурбация бентических животных оказывает глубокое воздействие на физические и акустические свойства морских осадков. Инфауна – разновидность бентоса, организмы которого обитают непосредственно внутри донных осадков рек, озер, прудов, морей. Закапывание, проглатывание, переваривание, дефекация, строительство труб, нор изменяют пористость, размер зерна, и как следствие, объемные и сдвиговые свойства осадков. В статье рассматривается воздействие некоторых видов инфауны на физические свойства осадков. В рамках GSEC теории распространения упругих волн в морских осадках по измеренным частотным зависимостям скорости звука и коэффициента затухания восстанавливаются физические свойства среды. Физические свойства среды связываются с биотурбацией. Показывается, что биотурбация по-разному влияет на физические характеристики среды, определяющие акустические свойства продольной и поперечной волн. Показывается, что выявление биотурбации в бентическом пограничном слое на фоне его общей гидродинамической изменчивости является сложной задачей.

Ключевые слова: морские осадки, дисперсия фазовой скорости, межгранулярное трение, коэффициент затухания, инфауна, биотурбация.

ВВЕДЕНИЕ

Морское дно имеет сложную слоистую структуру, в которой можно выделить непосредственно граничащий с водным, переходный слой неконсолидированных морских осадков. Переходный слой, в отличие от заглубленных является «деятельным». Приливы, морские течения, штормы, движение донных рыб, биотурбация и другие факторы могут нарушать покой частичек песка, ила, глины, слагающих переходный слой.

В работе приводятся и анализируются результаты ряда экспериментальных исследований касающихся влияния биологических факторов на физические и акустические характеристики переходного слоя. Акустические характеристики – это скорость звука, коэффициент затухания и их частотные зависимости [1, 2]. Акустические характеристики зависят от микромеханических характеристик трения между частичками и физических характеристик среды: пористости, гидравлической проницаемости и микрохарактеристик пор – эффективного размера и извилистости [1, 2]. Извилистость может быть измерена по «фактору формирования» или «параметру пористости», $FF = \rho_s/\rho_w$ – отношению электрического сопротивления насыщенного элемента среды к сопротивлению такого же элемента, заполненного морской водой. Фактор формы зависит только от пористости и извилистости.

Термин «биотурбация» часто используется для описания того, как живые организмы влияют на субстрат, в котором они живут. Инфауна – разновидность бентоса, организмы которого обитают непосредственно внутри донных осадков рек, озер, прудов, морей. Включает многие виды моллюсков, иглокожих, кольчатых и круглых червей, личинок насекомых, некоторых рыб, камнеточцев и древоточцев. В зависимости от грунта выделяют пелофильную (в иле), псаммофильную (в песке), литофильную (в камнях), аргиллофильную (в глине) инфауну [3]. Биотурбация бентических животных в осадках оказывает глубокое воздействие на их свойства. Биотурбация – т.е. взбалтывание, перемешивание, закапывание, проглатывание, переваривание, дефекация, строительство труб, биоосаждение, цементацию и метаболические действия изменяют пористость, размер зерна, плотность, жесткость и сжимаемость осадков. Большинство организмов инфауны найдено в верхних 25 см осадка, известного как бентический пограничный слой [4].

СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

На рисунке 1 показаны места обитания трех видов инфауны, влияющих на геоакустические свойства дна. *Arenicola marina* (морской пескожил – червь) и *Corophium arenarium* (мелкие ракообразные) уменьшают жесткость осадков. *Arenicola Marina* создает большие норы в верхнем слое (10-15 см), вследствие дыхания и прокачки воды разжижает и рыхлит поверхность слоя, что приводит к увеличению пористости. *Arenicola Marina* предпочитает субстрат в виде среднего песка, крупный слишком велик для проглатывания, в мелком неловко строить норы. Фекальные отложения *A. Marina* могут влиять на межзеренное трение [5].

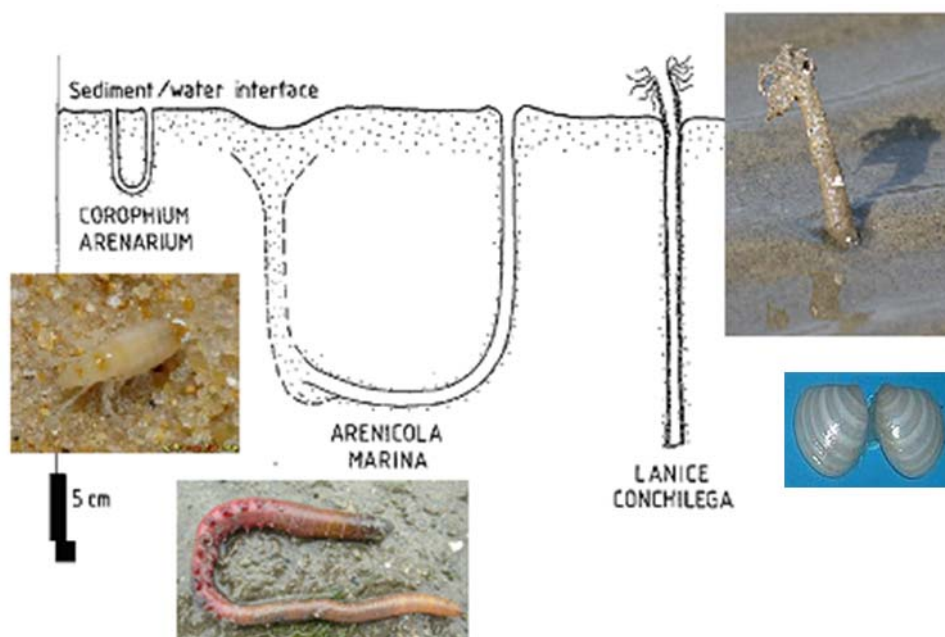


Рисунок 1. Морская инфауна (адаптировано с использованием [5])

Роющие *Corophium arenarium* строит в песке полые U-образные норы, размером от 30 до 50 мм, открытые с обоих концов. Другой вид, *Corophium volutator* очень похож, но выбирает морскую грязь. Создание открытых нор уменьшает скорость сдвиговых волн при увеличении численности организма [5].

Наоборот, *Lanice conchilega* (песчаный каменный червь), имеет характерную выступающую бахромчатую трубу. Трубка внедряется в осадки и покрыта прочным, эластичным, однородным слизистым слоем. Трубка связывает окружающие зерна, увеличивает жесткость среды, на что указывает увеличение скорости поперечной волны, когда появляется больше организмов. Все три вида вызывают снижение удельного электрического сопротивления, что свидетельствует об изменениях в объемной пористости, извилистости, и, следовательно, о изменении скорости звука. Процесс строительства нор, включающий отбор зерна по размеру и форме приводит к изменению структуры и свойств осадков между норами [5].

Многие организмы инфауны производят слизистый материал, называемый внеклеточным полимерным материалом. У некоторых морских беспозвоночных 80% общего расхода энергии животным составляет производство слизи. Мягкая органическая цементация (склеивание) частиц образующейся инфузионной слизью закупоривает поры и снижает проницаемость отложений. Лабораторные исследования показали, что гетеротрофные микроорганизмы могут уменьшать проницаемость отложений на порядок, что может оказывать сложное влияние на скорость звука и затухание из-за изменений в подвижности поровой жидкости. Полевые измерения показали, что объемная плотность отложений уменьшается в результате увеличения доли воды и содержания фекальных гранул. Грязи с высокой степенью биотурбации могут достигать 92% пористости. Верхние несколько сантиметров абиссальных отложений, которые интенсивно перерабатываются глубоководными бентическими животными, имеют пористость от 60 до 90% [4]. Это приводит к уменьшению скорости звука.

На рисунке 2 приведены результаты измерений скорости поперечной волны в зависимости от концентрации *Arenicola Marina*, *Corophium arenarium*, *Lanice conchilega* [5].

В работе [4] приводится результат воздействия биотурбации *Nucula annulata* (мелкая ракушка – рис. 1): изменение пористости 70/86 %, объемного модуля упругости 3,4e9/2,8e9 Па, сдвигового модуля 1,6e8/0,4e8 Па, объемной плотности 1510/1250 кг/м³, что меняет скорость компрессионной волны с 1547/1514 м/с, сдвиговой 325/179 м/с, затухание на частоте 3,5 кГц 0,35/0,2 дБ/м. Для расчета были использованы простые эмпирические формулы: $c_p = 2455.9 - 21.716P + 0.126P^2$, м/с; $\alpha = 0.7602 - 0.01487P + 0.000078P^2f$, дБ/м, где P – пористость, %, f – частота, кГц.

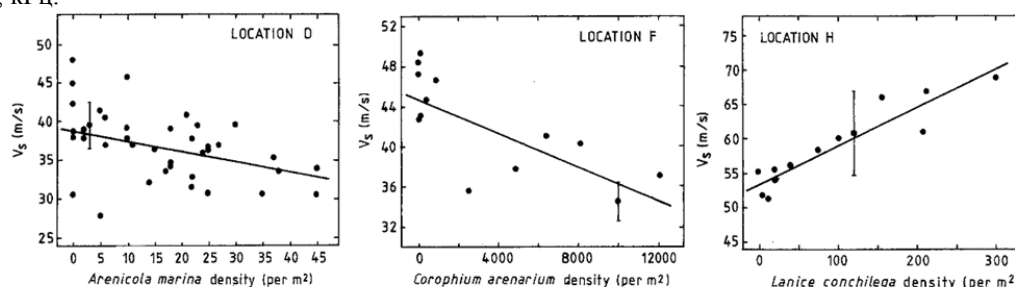


Рисунок 2. Скорость сдвиговой волны в зависимости от концентрации инфауны. Воспроизведено из [5]

ПРИЛОЖЕНИЕ GS+EC ТЕОРИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЗВУКА В МОРСКИХ ОСАДКАХ

В простейшем случае, пренебрегая межгранулярным трением и дисперсией скорость звука в осадках можно определить по формуле Вуда

$$c_0 = \sqrt{\frac{K_m}{\rho_m}},$$

где $\frac{1}{K_{m(ean)}} = \frac{P}{K_f} + \frac{1-P}{K_g}$, $\rho_m = P\rho_f + (1-P)\rho_g$, $\rho_{f,g}$, $K_{f,g}$ – плотности и модули упругости флюида и твердой фазы соответственно.

Согласно теории GS+EC [1,2] комплексная фазовая скорость продольной волны определяется уравнением

$$\tilde{c}_p^2 = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}, \quad (1)$$

где $a = \rho_m$; $b = -(K_m(1 + 0.33\phi\rho_m A F_C) + \gamma D)$; $c = 0.33\phi K_m \gamma D A F_C$; $A = \frac{(\rho_g - \rho_f)}{\rho_g \rho_f}$; $D = (i\omega)^n$; γ – жесткость среды с межгранулярным взаимодействием, Па; n – показатель стресс-релаксации; ϕ – перколяционная пористость – внутренний параметр теории;

$$F_C(w) = 1 - \frac{2J_1(i^{3/2}w)}{i^{3/2}wJ_0(i^{3/2}w)};$$

$w = \sqrt{\frac{a^2 \rho_f}{\eta}} \omega$; $J_{0,1}$ – функции Бесселя; a – радиус пор; η – динамическая вязкость жидкости, Па·с.

Комплексная фазовая скорость сдвиговой волны может быть определена по формуле

$$\tilde{c}_s = \sqrt{\frac{\gamma_s (i\omega)^m}{\rho_{eff}}}, \quad (2)$$

где $\rho_{eff} = \rho_m - \phi \rho_f F_C(w)$ – эффективная плотность; γ_s – сдвиговая жесткость, Па; m – сдвиговый показатель стресс-релаксации.

Вещественные скорости продольной и поперечной волн $c_{p,s}$ и коэффициенты затухания $\alpha_{p,s}$ могут быть получены из комплексных фазовых скоростей: $c_{p,s} = (\text{Re}(\tilde{c}_{p,s}^{-1}))^{-1}$, $\alpha_{p,s} = -\omega \text{Im}(\tilde{c}_{p,s}^{-1})$, Нп/м.

Рассмотрим данные [5], приведенные на рис.2. Инвертируя формулу (2), предполагая отсутствие дисперсии, определив равновесную плотность из статистических корреляций с диаметром гранул (рис. 3) можно вычислить изменение межгранулярной жесткости за счет влияния биотурбации:

$$\gamma_s = c_s^2 \rho_m, \quad (3)$$

что дает: точка D ($d = 2,29$, $\rho_m = 1950$ кг/м³) $\gamma_s = 2,97$ МПа – нет биотурбации, $\gamma_s = 2,12$ МПа – максимальная битурбация; точка F ($d = 3,07$, $\rho_m = 1910$ кг/м³) $\gamma_s = 3,88$ МПа – нет биотурбации, $\gamma_s = 2,21$ МПа – максимальная битурбация; точка H ($d = 2,69$, $\rho_m = 1935$ кг/м³) $\gamma_s = 5,44$ МПа – нет биотурбации, $\gamma_s = 9,21$ МПа – максимальная битурбация. Как видно из расчетов, в первых двух случаях биотурбация снижает межгранулярное трение, в последнем – увеличивает.

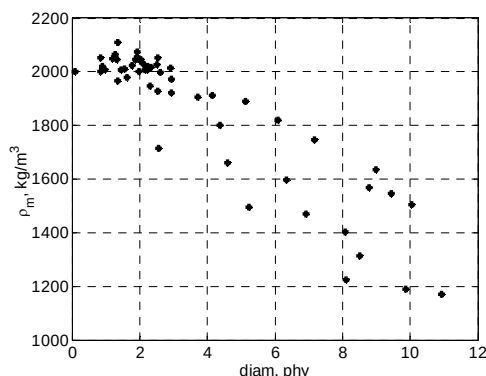


Рисунок 3. Статистические корреляции между объемной плотностью и диаметром гранул (фи единиц)

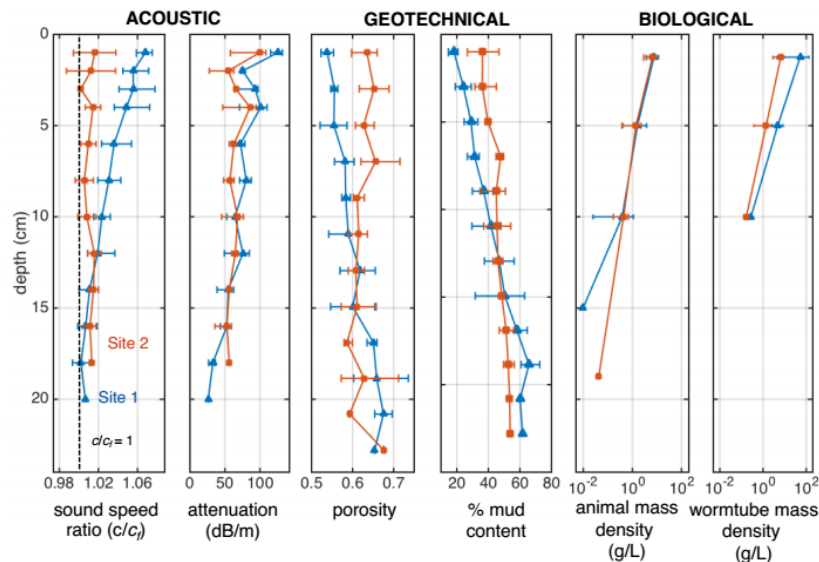


Рисунок 4. Зависимость скорости звука, затухания, пористости, процента содержания грязи от глубины, затухание, пористость, процент грязи, массовая плотность инфуны и массовая плотность твердых червячных труб. Частота 100 кГц. Взято из [6]

Рассмотрим данные, приведенные в [6]. Здесь измерялась вертикальное распределение акустических, физических и биологических характеристик в переходном слое на глубину до 18 см. Данные приведены на рисунке 3. Кроме того, в двух точках были измерены частотные зависимости фазовой скорости звука и затухания на двух глубинах: 2 см - приповерхностный слой с наибольшей плотностью биотурбации и глубина 18 см – с наименьшей плотностью.

В обеих точках глубина воды 5 – 7 м. Входные данные для применения GSEC теории следующие. Точка 1 (синий): $\rho_g = 2560 \text{ кг/м}^3$, $K_g = 3,8 \cdot 10^{10} \text{ Па}$, $\rho_f = 1020 \text{ кг/м}^3$, $K_f = 2,37 \cdot 10^9 \text{ Па}$, $\eta = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$, $P = 0,55$ для глубины 2 см и $P = 0,66$ для глубины 18 см. Точка 2: $P = 0,65$. Вначале проанализируем физические характеристики сред в двух точках на двух глубинах.

Локация 1 (синий). Эта точка удивительна тем, что пористость с ростом глубины возрастает (рис. 4). Увеличение пористости объясняется возрастанием доли мелкодисперсного «мусора». Несмотря на увеличение пористости, проницаемость среды должна уменьшаться. Скорость звука в полном соответствии с формулой Вуда с ростом глубины уменьшается и на частоте 100 кГц сравнивается с c_w – скоростью звука в воде. Следующая необычность в том, что большая скорость звука соответствует большему затуханию – в правильных, плотных морских осадках должно быть наоборот. Этот эффект существенно неоднородного дна конкурирует с уменьшением плотности биотурбации и затрудняет выявление ее последствий.

Локация 2 (оранжевый). Здесь дно более однородно, пористость, скорость звука и затухание практически постоянны (напомним, что пока речь идет о одной частоте).

Рассмотрим теперь вопрос о том, что можно сказать о биотурбации из дисперсионных кривых. Поиск наилучшего соответствия осуществлялся по совпадению дисперсионных кривых с экспериментальными точками

тангенса потерь $\beta_p = \frac{\alpha_p c_p}{\omega}$, поскольку эта величина зависит и от скорости и от затухания. Результаты инверсии приведены в таблице 1, дисперсионные кривые на рисунке 5.

Таблица 1. Результаты инверсии

Параметр Точка, глубина	a , мкм	ϕ	γ , Па	n	K_m , Па	c_0 , м/с	P	κ , м ²
Локация 1, 2 см	3,68	0,3	$6,56 \cdot 10^5$	0,362	$4,10 \cdot 10^9$	1547	0,55	$5,09 \cdot 10^{-13}$
Локация 1, 18 см	3,68	0,08	$6,66 \cdot 10^5$	0,371	$3,48 \cdot 10^9$	1502	0,66	$1,36 \cdot 10^{-13}$
Локация 2 2 см	3,68	0,2	$2,72 \cdot 10^5$	0,414	$3,58 \cdot 10^9$	1508	0,64	$3,39 \cdot 10^{-13}$
Локация 2 18 см	3,68	0,2	$0,97 \cdot 10^5$	0,492	$3,58 \cdot 10^9$	1508	0,64	$3,39 \cdot 10^{-13}$

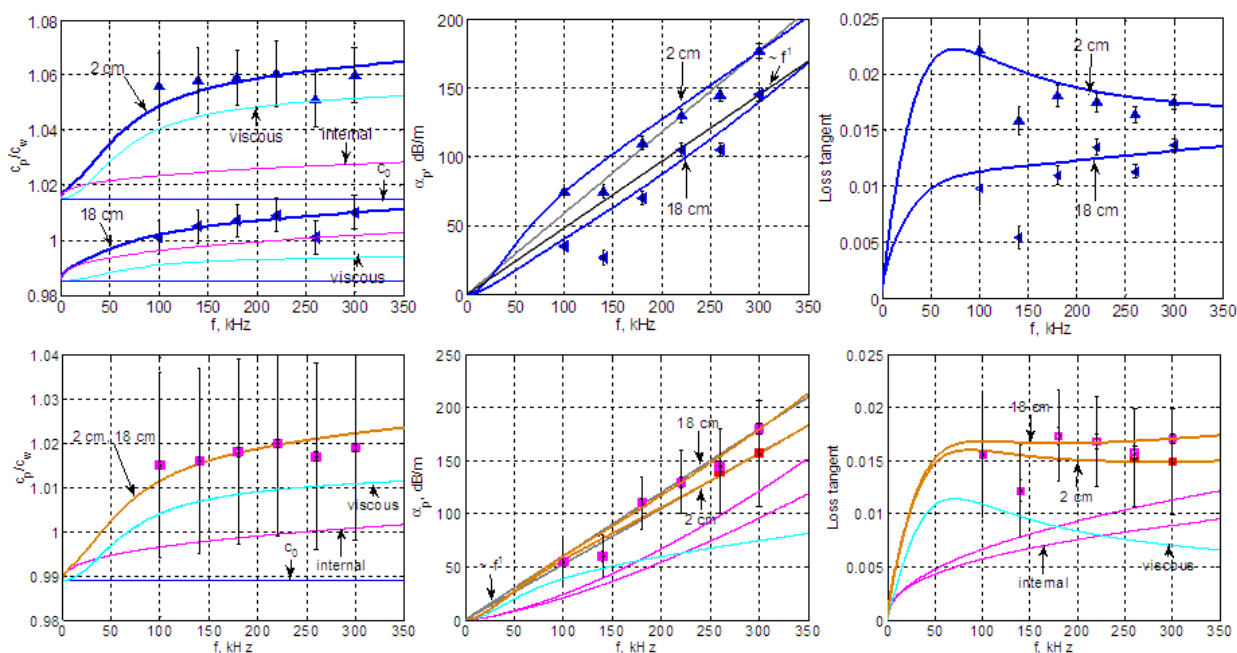


Рисунок 5. Дисперсионные кривые, восстановленные по экспериментальным точкам. Локация 1 – верхняя панель, локация 2 – нижняя панель

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В морских осадках дисперсия фазовой скорости и частотная зависимость затухания обусловлены двумя причинами: внутренним (между частицами) и вязким (при относительном движении воды) трением. Внутреннее трение показывает частотную зависимость затухания $\alpha \sim f^1$, в этом случае тангенс потерь постоянен, вязкое трение на высоких частотах дает $\alpha \sim f^{1/2}$. В реальной среде, где присутствует и вязкое и внутреннее трение в зависимости от баланса между силами показатель в степенном законе затухания будет больше $1/2$, но меньше 1. Уменьшение показателя соответствует пропорциональному увеличению доли вязкого трения и переходу среды в состояние суспензии. На рисунке 5 закон $\alpha \sim f$ выделен серой линией. Дисперсия скорости звука так же имеет две компоненты, обусловленные внутренним и вязким трением. Внутреннее трение дает слабую дисперсию во всем диапазоне частот, вязкое трение – значительную дисперсию в окрестности релаксационной частоты, где меняется характер течения в порах и вместо вязких сил на низких частотах (мягкая среда) начинают господствовать инерционные силы. Жидкость не успевает вытекать из щелей между гранулами, среда становится более жесткой и скорость звука возрастает.

Теория GSEC позволяет оценить компоненты дисперсии по раздельности.

Локация 1. В приповерхностном слое показатель в степенном законе затухания < 1 , основной вклад в дисперсию скорости вносит упругость флюида, перколяционная пористость 0,3. С ростом глубины и горного давления среда уплотняется, перколяционная пористость и проницаемость снижается (хотя объемная пористость растет – рис. 4), основной вклад в дисперсию скорости звука вносит уже внутреннее трение. Показатель в степенном законе затухания приближается к обычной единице. Тем не менее, среда «мягкая», показатель стресс-релаксации (показатель нелинейности среды) $n = 0,37$. Из таблицы 1 нетрудно видеть, что параметры межгранулярного трения вдоль вертикали меняются незначительно. Акустические характеристики среды существенно изменяются исключительно по причине конкурирующего увеличения объемной пористости (определяет c_0) и уменьшения перколяционной пористости (зависит от гидравлической проницаемости). На глубине 18 см тангенс потерь со слабой тенденцией к росту – следствие межгранулярного трения. Как следствие, можно представить, что рассмотренный здесь вид биотурбации не меняет микроскопические характеристики межгранулярного трения, но меняет макрохарактеристики среды, касающиеся относительного движения флюида. Насыщенность приповерхностного слоя трубками и норами червей разжижает слой, увеличивает гидравлическую проницаемость среды.

Локация 2. Здесь ситуация противоположная. Экспериментальные точки, соответствующие двум глубинам практически совпадают, за исключением единственной – коэффициент затухания на большей глубине оказывается больше на единственной частоте (хотя в пределах доверительного интервала различий нет). Для нормальной среды должно быть наоборот. Единственный вывод, который можно сделать – биотурбация здесь уменьшает внутреннее трение.

ВЫВОДЫ

Среди факторов гидродинамической изменчивости переходного слоя морских осадков биотурбация занимает не главное место. Надежно выявить и оценить вклад конкретной инфауны на изменчивость акустических характеристик неконсолидированным морских осадков возможно только после дополнительных трудоемких исследований. Важное место в этих исследованиях должно иметь измерение диссипативно-дисперсионных характеристик сред в максимально возможной широкой полосе частот.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и города Севастополь в рамках научного проекта № 18-42-920001.

Список литературы / References:

1. Лисютин В.А. Простая акустическая модель неконсолидированных морских осадков с внутренним и вязким трением. *Экологический вестник научных центров ЧЭС*, 2018, т. 15, № 3, с. 39-51. DOI: 10.31429/vestnik-15-3-39-51. [Lisyutin V.A. A Simple Acoustic Model of Unconsolidated Marine Sediments with Internal Friction and Viscous Dissipation. *Ecological Bulletin of Research Centers of the Black Sea Economic Cooperation*, 2018, vol. 15, no. 3, pp. 39-51. DOI: 10.31429/vestnik-15-3-39-51. (In Russ.)]
2. Лисютин В.А. Обобщенная реологическая модель неконсолидированных морских осадков с внутренним трением и эффективной сжимаемостью. *Морской гидрофизический журнал*, 2019, т. 35, № 1, с. 85-100. DOI: 10.22449/0233-7584-2019-1-85-100. [Lisyutin V.A. Generalized Rheological Model of the Unconsolidated Marine Sediments with Internal Friction and Effective Compressibility. *Physical Oceanography*, 2019, vol. 35, no. 1, pp. 77-91, DOI: 10.22449/1573-160X-2019-1-77-91. (In Russ.)]
3. *Большая советская энциклопедия*. М.: Советская энциклопедия, 1969-1978. [*Bol'shaya sovetskaya entsiklopediya*. M.: Sovetskaya entsiklopediya, 1969-1978 (in Russ.)]
4. Richardson M.D., Young D.K. Geoacoustic models and bioturbation. *Marine Geology*, 1980, vol. 38, pp. 205-218.
5. Jones S.E., Jago C.E. In situ assessment of modification of sediment properties by burrowing invertebrates. *Marine Biology*, 1993, vol. 115, pp. 133-142.
6. Lee K.M., Venegas G.R., Ballard M.S., Wilson P.S. et al. Acoustics of biologically active marine sediments. *Proceedings of Meetings on Acoustics*, 2018, vol. 33, iss. 1, p. 005003. DOI: 10.1121/2.0000875.

BIOTURBATION AND VARIABILITY ACOUSTIC PROPERTIES TRANSITIONAL LAYER OF THE BOTTOM OF THE SHALLOW SEA**Lisyutin V.A., Lastovenko O.R.**

Sevastopol State University

Universitetskaya Str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: vlisiutin@mail.ru

Abstract. The seabed has a complex layered structure in which one can distinguish a transitional layer of unconsolidated marine sediments bordering on the water. The transition layer, unlike the bury layers, is “active”. Bioturbation of benthic organisms has a profound effect on the physical and acoustic properties of marine sediments. Infauna is a type of benthos, whose organisms live directly inside the bottom sediments of rivers, lakes, ponds, seas. Burrowing, ingestion, digestion, defecation, tube building, change the porosity, grain size, bulk and shear properties of sediments. The article discusses the impact of certain types of infauna on the physical properties of precipitation. Within the framework of the GSEC theory of the propagation of elastic waves in marine sediments, the physical properties of the medium are restored from the measured frequency dependences of the speed of sound and the attenuation coefficient. The physical properties of the medium are associated with bioturbation. It is shown that bioturbation affects differently the physical properties of the medium, which determine the acoustic properties of the longitudinal and transverse waves. It is shown that the identification of bioturbation in the benthic boundary layer against the background of its general hydrodynamic variability is a difficult task.

Key words: *marine sediments, phase-velocity dispersion, intergranular friction, attenuation coefficient, infauna, bioturbation.*